

*ÉCOLE DOCTORALE Vie et Santé ED414*

**Biotechnologie et signalisation cellulaire, UMR7242**

**THÈSE** présentée par :

**Juliette KAEFFER**

soutenue le : **22 septembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Implication de GPRASP1 dans le  
développement de la tolérance analgésique  
aux agonistes du récepteur opioïde delta**

**THÈSE co-dirigée par :**

**Mme LECAT Sandra**  
**M SIMONIN Frédéric**

Chargée de recherche, Université de Strasbourg  
Directeur de recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme BRELOT Anne**  
**M BUSSEROLLES Jérôme**

Chargée de recherche, Institut Pasteur Paris  
Maitre de conférences, Université Clermont Auvergne

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme KIEFFER Brigitte**  
**Mme PERROY Julie**

Professeur, Université de Strasbourg  
Directeur de recherche, Université de Montpellier



« C'est le temps que tu as perdu pour ta rose, qui fait ta rose si importante. »

*Le Petit Prince*, Antoine de Saint-Exupéry



# Remerciements

Bien qu'elle ne change la vie que d'une personne, une thèse de biologie ne se fait pas tout seul dans son coin. Pour cela, dans un premier lieu, il faut une paillasse, des pipettes, quelques -80, une animalerie... Bref, un laboratoire. Et pour m'avoir autorisée à travailler au sein de votre unité et vous appliquer à la rendre fonctionnelle, accueillante, lui donner une vie, de l'humanité et de la joie, merci aux Drs. Jean-Luc Galzi et Guy Zuber. Merci aussi aux agents qui répondent avec rapidité et efficacité à nos demande, Sylvie Douessin pour nous réexpliquer, à chaque congrès, pas à pas, en restant souriante, toutes les démarches à faire dans le bon ordre, Claire Guth dont la rigueur nous évite bien des mauvaises surprises, Raphaël Poinsignon et la super équipe du service technique, pour la vitesse d'intervention, les réparations bricolées qui tiennent 3 ans et les aptitudes d'électriciens qui ont évité à mes 3 ans d'échantillons de finir en bouillie.

Je tiens également à remercier les membres du jury de s'être rendus disponibles, le Pr. Brigitte Kieffer, pour avoir lu mon manuscrit et assisté à cette soutenance, le Dr. Julie Perroy pour avoir fait le déplacement depuis Montpellier, et pour en plus avoir pris le temps d'expertiser ce travail et d'en rédiger un rapport, les Dr. Anne BreLOT et Dr. Jérôme Busserolles.

Si je présente aujourd'hui cette thèse, c'est parce que quelqu'un a bien voulu m'en confier le soin. Alors Fred, merci d'avoir jugé mon CV de pharmacienne en herbe assez intéressant il y a 5 ans et 3 mois de cela, et de m'avoir fait confiance depuis pour travailler sur différents projets qui te tiennent à cœur, me confier des mises au point hasardeuses et des responsabilités d'appareil précieux. Il faut faire des phrases courtes et mettre la conclusion percutante à la fin du paragraphe. J'ai appris beaucoup de choses pendant ces années sur le jazz, les soirées karaoké au Japon et les orchidées sauvages.

Merci Sandra, de toute ton implication, ton énergie, ton optimisme, pour ton esprit bouillonnant trouvant dans chaque résultat de nouvelles idées pour rebondir sur 3 manips complémentaires. Merci pour la bienveillance avec laquelle tu m'as encadrée et aidée à venir à bout de cette thèse.

Mais ce travail ne s'est pas fait uniquement dans l'UMR7242, j'ai eu la chance d'interagir avec des spécialistes d'ailleurs, d'autres domaines.

Je dois un grand merci au Dr. Dominique Massotte, pour m'avoir formée à l'immunohistochimie d'un bout à l'autre et avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions aussi bien scientifiques fondamentales que pratico-pratiques, même lorsque vous ne l'aviez pas.

La sélectivité de la co-immunoprécipitation et l'extraction de DOR en quantité visible dans des organes microscopiques m'ont donné bien du fil à retordre, et peut être n'en serais-je pas venue à bout sans les précieux conseils de nos collaborateurs spécialistes Dr. Franck Vandermoere et Dr. Philippe Hammann, vos idées éclairées ont évité que le n° des colIP de mise au point ne dépasse la vingtaine.

Je remercie également le Dr. Yannick Goumon, et Virginie Andry, d'avoir tenté d'extraire quelque chose digne d'intérêt de mes prélèvements inexploités, qui m'avaient usé les yeux et la patience pour aller végéter dans un congélateur.

Grâce à Romain Vauchelles et la Plateforme d'Imagerie Quantitative de la faculté de pharmacie de Strasbourg, j'ai pu avoir le plaisir de mêler science et photographie artistique.

Si mes petites bouboules étaient en si bonne forme, je le dois à Stéphane Doridot, qui a géré leur élevage avec soin, intelligence et réactivité, même à mes débuts, quand les consignes étaient très floues.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Patrick Wolf, pour cette petite macro salvatrice filée entre deux clopes.

Un grand merci aux Dr. Juliette Godin et Dr. Stéphane Gasman, de vous être investis dans votre rôle de Comité de Suivi de Thèse, de vous être réellement intéressés à mon sujet, à mes essais infructueux et à mes résultats incomplets, pour me proposer des pistes d'amélioration judicieuses et des expériences complémentaires qui m'ont permis de répondre à beaucoup de questions depuis.

Pour la relecture assidue de ces quelques 150 pages et 300 références, merci à Nath, maman et Caro. L'art des mindmaps de clarification d'idées a été inculqué par le Dr. Baptiste Letellier

Pour réaliser ce travail, j'ai eu une équipe pullulante de personnes volontaires et bienveillantes.

Comment parler de personne bienveillante sans penser à Renaud Wagner. Contre toute attente, j'aurais connu une de tes colères (pas dirigée contre moi dieu merci). Mais elle n'a que plus de force par sa rareté. Merci pour ton calme olympien, pour nos nombreuses discussions professionnelles, personnelles ou philosophiques. Combien de petites questions techniques sur

l'emprunt d'un ultraturax ont généré 25 minutes de réponse sur les interactions avec divers collègues, souvenirs de congrès ou devenir de tes anciens étudiants.

Mais ce bureau était empli de bonnes âmes, calmes et serviables. On compte parmi elles Valérie Kugler et Gabrielle, qui m'ont aidée en toute discrétion, avec juste le trait d'humour bien placé qu'on n'entend que si on le veut, mais sans lesquelles je n'aurais ni souris génétiquement différenciées, ni anticorps pour le vérifier.

En passant à la porte d'à côté, un autre grand merci me vient. Tu le mérites amplement Nathalie, pour ta patience, ta bonne humeur constante, tes doigts de fée qui piquent, coupent et ne tremblent jamais, parce que « mais ouiii, ça va le faiiiire ». Merci de t'être intoxiquée un peu avec moi, pour que je ne baigne dans le sang formolé que quatre heures en rigolant au lieu de douze à compter les minutes.

Dans un autre bureau mais non moins une collègue précieuse, merci Valérie U, pour m'avoir accueillie en mai 2018, m'avoir formée avec tout le soin et la patience dont tu es capable, t'être appliquée à me donner les bonnes pratiques pour ne gâcher ni mon travail ni celui des autres et faire en sorte que la vie d'équipe tourne au mieux. Nous avons dû apprendre à être des grandes filles indépendantes pendant 6 mois, mais ton absence n'a fait que souligner tout ce que tu apportes à cette équipe !

La suite géographique logique arrive à Marie-Laure et là, un simple merci serait bien insuffisant, il manquerait le quart de cette thèse sans tes mains. Merci d'avoir été mon don d'ubiquité pendant un an et quelques, d'avoir été mon pense bête, ma référence bon sens et logique, mon tableau blanc à réflexion pour éviter de foncer tête baissée en faisant de nombreuses bêtises, quoi qu'on en dise, être deux pipelettes qui réfléchissent à voix haute nous a permis de sauver bien des manips et du temps ! Merci aussi d'avoir réussi à composer avec mes étourderies, mon organisation cafouilleuse, mes tableaux décalés et mes horaires UTC+0, en me le faisant remarquer, mais sans jamais te fâcher. Et évidemment, pour m'avoir raconté toute l'histoire du labo depuis 20ans, pour les secrets qui seront bien gardés et pour m'avoir permis de rire beaucoup dans des situations qui auraient pu être bien pénibles seule !

Un grand merci également au Pr. Claire Gavériaux-Ruff, pour les discussions scientifiques, les conseils, les corrections, les idées que tu as pu me suggérer mais également la sollicitude et la disponibilité dont tu fais preuve pour tous les jeunes étudiants de ce labo.

Mes 5 ans de vie au labo n'auraient rien eu à voir si je n'y avais pas été accueillie dans une équipe jeune et dynamique, alors merci aux premières qui ont montré la voie, Glenn et Raph,

les rousses d'origine. Merci Lady Quillet de m'avoir formée, de continuer de répondre à mes questions, de m'avoir dit qu'on y survivait, et même qu'on pouvait en repartir avec de bons souvenirs. Après tout, « La biologie c'est fantastique ! » Mais aussi, merci de m'avoir transmis un peu de votre expérience et de la philosophie à adopter pour s'adapter à cet environnement.

Les CDD passent, les gens partent, mais de nouvelles têtes sympathiques prennent la relève. Ce fut un plaisir de finir cette thèse au rythme des pizzas, des barbecues et des palets bretons avec la cuvée 2021-2022, Claire, Magali, Thomas, et nos deux psychologues en herbe, Alexis et Océane. Si le palet a besoin de soleil, les bières et les karaokés n'ont pas de saison !

Parmi la masse de précaires qui peuplent les labos de recherche, un nombre non négligeable de gens sympas ont fait un passage parmi nous, je ne serai sûrement pas exhaustive mais de nombreux noms me viennent à l'esprit dans nos petits et moins petits stagiaires : Stan, Léa, Bertrand, Lucile J, Fyona, Sandra D., et le meilleur des stagiaires GASP, calme, efficace et serviable, Eyrian. Les expériences communes et le voisinage de bureau en été rapprochent aussi, Céline ce fut un plaisir de t'accueillir 1-2-3-4 fois à Strasbourg. Vivement la cinquième !

Et au milieu, deux vaillants représentants de la gente masculine chez les RDI, résistants discrètement malgré les années à l'invasion d'œstrogènes, Adam et Arthur.

Mais également toute l'équipée de précaires/unpeumoinsprécaires qui ont rythmé les événements et les terrasses, les grimpeurs, les joueurs invétérés, les fêtards, Aline, Hanna, Manon F, Elodie, Olivier, Mini Mike, Marion M, Marion L, Johan, Zuleyha, Tamara, Lucas et tous les autres que ma mémoire défaillante oublie mais qui n'ont pas moins compté à donner à cette unité de la vie et de la joie. Merci au comité des fêtes de nous organiser des événements festifs, d'innover dans les concours, les remises de prix et les pots post-formation.

Mais qui dit RCPG Douleur et inflammation dit RCPG addicts et réunions au sommet du vendredi après-midi. Malgré ce que l'on pourrait penser, il n'est pas aisé pour la pipelette que vous avez connue de synthétiser en seulement quelques lignes formelles l'importance que vous avez eu au quotidien durant 3ans. Déjà, sur les 10kg gagnés, je vous en dois au moins 3 avec toutes les soirées raclettes, crêpes, lasagnes, burgers, torchonsdethéendifusion... Mais grâce aux reines du shopping et à la couture pour les nuls, vous m'avez également permis d'adapter ma garde-robe!

Cloé, ma voisine de bureau surprise, je suis bien heureuse de pour une fois ne pas être restée bloquée sur le « mais c'est qui ça ? Qu'est-ce qu'elle fiche dans mon bureau ? » que m'a inspiré notre première rencontre. L'année de cohabitation qui a suivi aurait été bien moins drôle.



Une rencontre prévalidée par Lucile s'annonçait mieux avec Lina, mais il a fallu un temps pour révéler la petite fouine de compétition sous tes airs angéliques et apprendre à décrypter ton regard excédé sous la réponse polie. Et quelle bonne surprise !

Il me semble qu'une thèse se vit mieux quand on a une co-thésarde, alors Manon, ce fut un plaisir de partager mon premier congrès avec toi, de prendre la bonne résolution de sortir plus souvent avec les gens de l'espla un 17 mars 2020, d'engloutir les burgers post dissection, d'aiguiser mon esprit critique et d'encaisser les 12h d'ISH à tes côtés.

Lucile, trois ans ne m'ont pas suffi pour y placer au bon endroit, mais maintenant je m'énerve fin. J'aime le concept de raffinement dans l'agacement. La boule d'entrain que tu es a apporté vie et joie dans mon quotidien durant ton passage en Alsace. L'écho de ton rire et le cliquetis de ton bracelet hantent toujours l'extrémité sud du couloir du 3<sup>ème</sup> étage du bâtiment D du pôle API. Reviens Luluuu !

Et Rosine, ma binôme, mon date de saint Valentin. Là dans les bons moments et dans les mauvais, même s'ils étaient nombreux. Nos eye contacts de labmeeting disaient tout. Tu partis un 22 septembre, je n'ai tenu bon qu'un an sans toi !

Mais même en thèse, il y a une vie à côté du labo... qu'on peut partager avec d'anciens joyeux étudiants qui ont aussi beaucoup aimé le campus d'Illkirch Aude, Thomas et Florent, pour avoir partagé cette aventure avec moi, dans d'autres labos, mais toujours dans le même esprit !

J'ai une pensée émue pour mes vieux copains, qui n'ont pas fui à force de m'entendre parler de souris et dire que je n'avais pas le temps de venir les voir, prendre des vacances... Je suis particulièrement contente de pouvoir clôturer mes 11 ans de vie étudiante avec toujours les Girl Power Pharma à mes côtés. Cette fois c'est la bonne !

Il y a aussi les plus anciens, Damien, Laura, Nicolas, mais qui aurait cru que dans ces rencontres coups de cœur faites il y a quinze ans, j'aurais aujourd'hui le plaisir de partager avec vous un bon nombre de galères de thèse, la rédaction qui n'avance pas, le travail le dimanche, la motivation vacillante, Axel, Perrine, Eric, les gars si j'ai pu le faire, vous allez grave assurer aussi.

A toi, inconnu qui rencontrant une thésarde de quatrième année aigrie à deux doigts de la rédaction, n'a pas pris tes jambes à ton cou et a réussi à voir quelqu'un digne d'intérêt sous la couche de fatigue et d'acidité, et t'es appliqué avec succès à lui faire retrouver un peu

d'optimisme et assuré qu'elle garde une hygiène de vie décente. Merci de m'avoir fait tenir le coup.

Mais pour en arriver là, il faut reconnaître que les bases étaient bonnes et que j'ai grandi avec un bonus. Génétique ou éducation je ne saurais déterminer, mais avoir pour grand frère le Dr. Nicolas Kaeffer, ça montre la voie que l'on peut suivre si on s'en donne les moyens, parce qu'ils ont été mis à notre portée. Merci Nicolas d'avoir été un modèle à suivre, scientifiquement et moralement. Et merci Caroline, d'avoir pris le relai quand je n'arrivais plus à suivre, pour ton calme qui encaisse tranquillement ma nervosité. La culture et la logique ont été entraînées dès notre plus jeune âge par papi et mamie, les musées, la grammaire comme les mots croisés éveillent l'esprit.

Mais tout ce cadre familial idéal est l'œuvre de deux personnes admirables dans toute leur discrétion, dévouées, qui se sont appliquées à nous donner l'opportunité de nous épanouir, de découvrir nos talents et chercher notre voie, qui nous ont transmis des valeurs morales et une éthique, qu'ils appliquent eux-même au quotidien. Fais ce que tu peux, tant que tu le fais de ton mieux. Suis ta conscience. Choisis un travail auquel tu trouves un sens.

Pour m'avoir permis et encouragée à en arriver là, pour m'avoir soutenue sans jamais me forcer, pour avoir assez cru en moi pour que je me persuade que j'en étais capable, merci papa, merci maman.

Aux enseignants du lycée Louis Pasteur de Strasbourg, Christiane Volgringer et Norbert Grimont qui un mercredi après-midi ont emmené la 2<sup>nd</sup>e4 « scientifique » découvrir l'IGBMC, où j'ai observé pour la première fois un cerveau au microscope, et comparé un sujet sain et celui d'un consommateur de drogues. Il m'a fallu 13 années de plus mais j'ai appris à les étudier de moi-même, sous des microscopes sophistiqués.

J'envoie toute ma gratitude à ces nombreuses personnes qui sont restées fiables et fidèles au poste, malgré les crises sanitaires et existentielles. Qui ont cru en moi, souvent plus que moi-même, mais m'en convainquent un peu plus chaque jour.

A mes bouboules duveteuses. Rien de tout cela n'existerait sans vous.

Merci à vous tous, qui prendrez la peine de lire ce manuscrit au moins en partie.





# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
I. Les récepteurs couplés aux protéines G dans la physiologie animale : présentation générale .....	2
A. Les RCPG.....	2
B. Les principaux RCPG jouant un rôle dans la douleur et son traitement : les opioïdes .....	3
II. La douleur chronique .....	7
A. Définitions de la douleur .....	7
1) Rôle physiologique de la douleur.....	7
2) Voies neuronales de la douleur .....	9
B. Distinction entre la douleur aiguë et la douleur chronique .....	13
C. Prévalence de la douleur chronique et impact sociétal .....	14
1) Causes principales de la douleur chronique .....	14
2) Comorbidités et impact sociétal : de l'importance de prendre en charge la douleur de façon satisfaisante. ....	16
a) Prévalence de la douleur chronique en Europe .....	16
b) Comorbidités de la douleur chronique .....	16
D. Traitements de la douleur chronique disponibles sur le marché .....	17
1) Généralités sur l'antalgie et les paliers.....	17
2) Les antalgiques de palier I.....	18
a) Le paracétamol .....	18
b) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens .....	19
a) L'aspirine (acide acétyl-salicylique) .....	21
3) Les antalgiques de palier II ciblant entre autres MOR.....	22
a) La codéine et la dihydrocodéine.....	22
b) Le tramadol .....	22
4) Les antalgiques de palier III .....	22
a) Leur prescription .....	23
b) Mécanismes d'action.....	24
5) Les effets indésirables des opioïdes non liés à la douleur.....	26
a) Les propriétés antitussives .....	26
b) Les propriétés émétiques.....	26

c)	La constipation .....	27
d)	Les démangeaisons.....	27
e)	La dépression respiratoire .....	28
f)	L'addiction .....	28
g)	Les troubles de l'humeur.....	30
6)	Les effets paradoxaux de la morphine.....	31
a)	La tolérance analgésique .....	31
b)	L'hyperalgésie induite par les opiacés .....	31
III.	Le récepteur opioïde delta : état de l'art et potentiel thérapeutique .....	33
A.	Description générale de DOR .....	33
1)	Les agonistes modèles utilisés pour l'étude de DOR.....	34
a)	Le SNC80 .....	35
b)	Le ARM390.....	35
2)	Les outils génétiques disponibles pour l'étude du rôle de DOR .....	37
a)	Les souris déficientes pour le récepteur delta opioïde .....	37
b)	Les souris knock-in .....	38
3)	Structure et distribution de DOR.....	39
a)	Structure de DOR .....	39
b)	Distribution de DOR .....	40
4)	Fonction de DOR et de ses agonistes .....	42
a)	Antihyperalgésie.....	42
b)	Propriétés antidépressives et anxiolytiques.....	47
c)	Apprentissage et mémorisation .....	47
d)	Peu d'effets indésirables opioïdes classiques provoqués par les agonistes de DOR .....	48
5)	Effets indésirables connus de l'activation de DOR par un agoniste .....	48
a)	Hyperlocomotion.....	48
b)	Convulsions .....	49
c)	Tolérance aux agonistes de DOR.....	49
B.	Fonctionnement de DOR.....	51
1)	Couplage aux protéines G hétérotrimériques de DOR.....	51
2)	Les cascades intracellulaires modulées par la protéine G .....	51
a)	Voie activée par la sous-unité $\alpha$ de la protéine $G_i$ .....	51

b)	Voies activées par la sous-unité G $\beta$ / $\gamma$ de la protéine Gi.....	53
c)	Régulation de l'activité des protéines G hétérotrimériques .....	55
C.	Activabilité du DOR avant stimulation (préactivation) et après stimulation (tolérance), rôle du trafic membranaire complexe de DOR.....	55
1)	Localisation subcellulaire de DOR .....	55
2)	Trafic membranaire de DOR : exocytose, endocytose, adressage au lysosome et recyclage.....	56
a)	Adressage à la membrane plasmique et protéines impliquées .....	56
b)	Internalisation de DOR après activation et mécanismes .....	58
c)	Recyclage ou dégradation : voies différentes selon l'agoniste .....	66
D.	Tolérance analgésique aux agonistes de DOR = mécanismes différents de MOR .....	68
1)	Tolérance <i>in vivo</i> .....	69
2)	Superactivation de l'AMPC .....	69
3)	Internalisation par les $\beta$ -arrestines .....	69
a)	Par SNC80.....	69
b)	Par ARM390 .....	69
4)	Mécanismes moléculaires de la tolérance aux agonistes de DOR .....	70
IV.	Rôle physiologique proposé de la G-Protein coupled Receptor Associated Sorting Protein 1 .....	71
A.	Description générale de l'expression de GPRASP1 .....	71
B.	Les outils disponibles pour son étude .....	72
C.	Les protéines interagissant avec GPRASP1 .....	73
1)	Les RCPG.....	73
2)	Les protéines impliquées dans l'adressage intracellulaire du récepteur.....	73
3)	Les connaissances sur l'implication de GPRASP1 dans les mécanismes adaptatifs de DOR .....	73
V.	Revue : GPRASP/ARMCX Protein Family: Potential Involvement in Health and Diseases Revealed by their Novel Interacting Partners .....	74
	<b>Objectifs du travail de thèse .....</b>	<b>75</b>
	<b>Résultats .....</b>	<b>77</b>
I.	Partie 1 : Les mises au point expérimentales .....	79
A.	Évaluation des méthodes de lyse par Bioprep et par ultra Turrax .....	79

1)	Enjeux de la mise au point de la lyse des tissus murins.....	79
2)	Paramètres évalués pour la lyse des tissus .....	80
3)	Points critiques à prendre en compte pour le broyage des tissus et l'obtention de l'optimisation de l'échantillon protéique.....	84
B.	Préparations de membranes de cerveaux .....	84
1)	L'objectif.....	84
2)	Composition du tampon de lyse .....	85
3)	Broyage par Bioprep-24R .....	85
C.	Immunoprécipitations.....	86
1)	L'objectif.....	86
2)	Composition du tampon pour l'immunoprécipitation.....	86
3)	Extraits de moëlle épinière.....	87
a)	Broyage .....	87
b)	Immunoprécipitation du DOR-eGFP extrait des moëlles épinières.....	88
4)	Extraits de ganglions rachidiens dorsaux .....	88
a)	Broyage .....	88
b)	Immunoprécipitation du DOR-eGFP extrait des GRD .....	89
D.	Co-immunoprécipitations de DOR-eGFP et des complexes protéiques associés .....	89
1)	L'objectif des co-immunoprécipitations : problématique et différence de l'immunoprécipitation.....	89
2)	Conditions évaluées pour visualiser l'interaction DOR-eGFP et GPRASP1 par co-immunoprécipitation révélée par Western Blot .....	90
3)	Broyage des tissus murins .....	90
4)	Évaluation de la composition optimale du tampon de lyse pour la co-immunoprécipitation de GPRASP1 avec DOR-eGFP .....	91
5)	Billes GFP-Trap .....	92
6)	Co-immunoprécipitation des complexes protéiques avec DOR-eGFP issus d'extraits de cerveau.....	93
II.	Partie 2 : Article. La tolérance analgésique DOR .....	94
A.	Introduction, contexte général.....	94
B.	Objectif.....	94
C.	Résumé des résultats .....	95



D.	Publication.....	95
III.	Partie 3 : Évaluation de la mise en place de la tolérance analgésique suite à l'injection répétée de l'agoniste ARM390 entre les souris sauvages et les souris KO-GPRASP1.....	96
A.	Intérêt de l'évaluation du ARM390 .....	96
B.	Matériel et Méthode propres à l'étude de la réponse à l'agoniste ARM390....	96
1)	Composés : .....	96
2)	Animaux .....	97
3)	Modèles expérimentaux .....	97
4)	Préparation de membranes de cerveaux .....	97
5)	Quantifications de DOR-eGFP par binding .....	97
6)	Quantification de DOR-eGFP par Western Blot.....	97
C.	Résultats : ARM390 ne provoque ni tolérance analgésique ni dégradation de DOR dans les souris WT ou les souris KO-GPRASP1 .....	97
1)	Pas de développement de tolérance analgésique suite à un traitement répété de ARM390 dans les souris sauvages et les souris KO-GPRASP1 .....	97
2)	Pas de dégradation de DOR-eGFP suite à un traitement répété de ARM390 dans les souris sauvages et les souris KO-GPRASP1 .....	98
3)	Conclusion sur le traitement répété par ARM390.....	99
IV.	Partie 4 : Expériences complémentaires pour l'exploration du rôle de GPRASP1 dans le maintien de l'effet analgésique de SNC80 injecté de manière répétée : analyse de la quantité de certains neurotransmetteurs dans les extraits de GRD .....	101
A.	Dosage des neurotransmetteurs dans les GRD.....	101
1)	Objectif.....	101
2)	Matériel et méthode.....	101
a)	Préparation des échantillons.....	101
b)	Instruments et conditions analytiques de LC-MS/MS .....	102
3)	Échantillons analysés .....	102
4)	Résultats .....	102
5)	Conclusion.....	104
V.	Partie 5 : Analyse de la résolution de l'hyperalgésie inflammatoire et de la résolution de l'allodynie neuropathique dans les souris WT comparée aux souris KO-GPRASP1.....	105

A.	Contexte .....	105
B.	Suivi de la résolution de l'hyperalgésie chez des animaux KO-GPRASP1 comparé aux animaux WT-GPRASP1 .....	105
1)	Modèle de douleur inflammatoire .....	105
2)	Modèle de douleur neuropathique.....	106
C.	Conclusions .....	107
<b>Discussion</b>	.....	<b>109</b>
I.	GPRASP1 est nécessaire pour l'établissement de la tolérance analgésique à l'agoniste SNC80 de DOR.....	111
II.	La dégradation de DOR est indépendante de la présence de GPRASP1 .....	112
III.	GPRASP1 semble impliqué dans le trafic membranaire de DOR .....	113
IV.	La désensibilisation de DOR n'empêche pas la réponse analgésique.....	115
V.	Co-immunoprécipitation de GPRASP1 avec DOR-eGFP .....	117
VI.	Hypothèses complémentaires à explorer.....	119
A.	Étude des modulations de GPRASP1 et DOR par hybridation <i>in situ</i> .....	119
B.	Étude directe des voies de signalisation.....	119
C.	Exploration des modifications de transcription provoquées par l'absence de GPRASP1.....	120
D.	Hypothèses alternatives : incompétence de DOR dans les neurones périphériques .....	120
E.	Perspectives médicales .....	121
<b>Conclusion</b>	.....	<b>125</b>
<b>Annexe</b>	.....	<b>161</b>
I.	Annexe 1 .....	163

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> Affinité des peptides opioïdes pour les différents récepteurs opioïdes .....	6
<b>Tableau 2</b> <i>Les classes d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens et leurs indications thérapeutiques</i> .....	20
<b>Tableau 3</b> <i>Tableau d'équianalgésie des traitements opioïdes avec la morphine per os</i> ("Recommandations Douleur de l'adulte," 2023).....	23
<b>Tableau 4</b> Modèles animaux génétiquement modifiés pour permettre l'étude de DOR.....	36
<b>Tableau 5</b> Modèles de douleur expérimentaux dans lesquels des agonistes de DOR ont été évalués .....	43
<b>Tableau 6</b> Modèles de douleurs persistantes utilisés pour l'évaluation du SNC80 .....	44
<b>Tableau 7</b> Associations majoritaires de DOR avec les sous-unités G $\alpha$ selon les conditions expérimentales.....	52
<b>Tableau 8</b> Protéines et chaperonnes interagissant avec DOR pour son adressage à la membrane plasmique. ....	57
<b>Tableau 9</b> Stimuli entraînant un adressage à la membrane plasmique ou une préactivation de DOR. ....	58
<b>Tableau 10</b> Évaluation <i>in vitro</i> des agonistes DOR sur la phosphorylation et l'internalisation du récepteur .....	60
<b>Tableau 11</b> Effets de la délétion de $\beta$ -arrestine 1 et 2 sur l'internalisation et la tolérance des récepteurs opioïdes.....	65
<b>Tableau 12</b> Paramètres évalués lors de la mise au point de la lyse par bioprep-24R sur cerveau .....	80
<b>Tableau 13</b> Paramètres évalués lors de la mise au point de la lyse par Bioprep® sur moëlle épinière.....	82
<b>Tableau 14</b> Paramètres évalués lors de la mise au point de la lyse par bioprep-24R sur ganglions rachidiens dorsaux.....	83
<b>Tableau 15</b> Évaluation des paramètres importants pour la co-immunoprécipitation de GPRASP1 avec DOR-eGFP.....	90
<b>Tableau 16</b> Protéines interagissant avec DOR identifiées par LC-MS/MS chez les souris FLAG-DOR et validées par un autre résultat.....	118

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> Schéma d'un récepteur couplé aux protéines G dans la bicouche lipidique.....	3
<b>Figure 2</b> Importance des RCPG dans les mécanismes de régulation de la douleur et de la génération des potentiels d'action par les neurones pré- et post-synaptiques.....	4
<b>Figure 3</b> Effet de l'activation des récepteurs opioïdes sur les neurones pré- et post-synaptiques. .....	5
<b>Figure 4</b> Échelle visuelle analogique d'évaluation de la douleur.....	8
<b>Figure 5</b> Soupe inflammatoire produite par le système immunitaire activant les nocicepteurs. .....	10
<b>Figure 6</b> Organisation des voies de transmission et de contrôle de la douleur. ....	12
<b>Figure 7</b> Les cinq principales familles des causes de douleurs chroniques.....	15
<b>Figure 8</b> <i>Mécanismes d'action de la morphine.</i> ....	24
<b>Figure 9</b> <i>Modulation de l'influx nociceptif par l'action du récepteur aux opioïdes <math>\mu</math> (MOR).</i> .....	25
<b>Figure 10</b> <i>Voies d'activation du système de récompense par la morphine.</i> ....	29
<b>Figure 11</b> Structure des ligands sélectifs DOR. ....	34
<b>Figure 12</b> Schéma de la structure de DOR et de ses sites de phosphorylation.....	39
<b>Figure 13</b> Distribution de DOR dans le système nerveux de la souris.....	41
<b>Figure 14</b> Voies d'administration d'agonistes empruntées pour évaluer l'analgésie due à DOR. .....	45
<b>Figure 15</b> Cascades intracellulaires activées par la stimulation de DOR.....	54
<b>Figure 16</b> Différentes régulations des récepteurs opioïdes selon le bas ou haut potentiel d'internalisation des agonistes. ....	59
<b>Figure 17</b> Transduction du signal après activation d'un RCPG.....	61
<b>Figure 18</b> Comparaison de la quantité de DOR-eGFP retrouvée dans des préparations de membranes après un broyage par ultra turrax ou bioprep. ....	85
<b>Figure 19</b> Evaluation de l'efficacité d'extraction de DOR-eGFP après lyse dans des tampons RIPA ou DDM/CHAPS ainsi que de la concentration en NaCl sur l'immunoprécipitation de DOR-eGFP extraits de moëlle épinière.....	88
<b>Figure 20</b> Essai de lyse des ganglions rachidiens dorsaux avec et sans détergents. ....	89
<b>Figure 21</b> Évaluation de l'appareil de lyse, du nombre de lavages et de la préclarification sur la co-immunoprécipitation entre DOR-eGFP et GPRASP1. ....	91
<b>Figure 22</b> Effet du ARM390 dans les KO-GPRASP1 sur l'hyperalgésie induite par le CFA.98	

<b>Figure 23</b> ARM390 n'entraîne pas de dégradation de DOR-eGFP après des stimulations répétées.....	100
<b>Figure 24</b> Neurotransmetteurs détectés dans les GRD en condition neuropathique. ....	103
<b>Figure 25</b> Résolution de l'hyperalgésie inflammatoire chez les animaux KO-GPRASP1 ...	106
<b>Figure 26</b> Résolution de l'allodynie provoquée par constriction du nerf sciatique chez des animaux KO-GPRASP1.....	107
<b>Figure 27</b> Paysage spatiotemporel de l'activation des récepteurs opioïdes dans la cellule...	115
<b>Figure 28</b> Représentation schématique d'une hypothèse de l'implication de GPRASP1 dans la régulation de l'analgésie aux agonistes DOR. ....	124

## Liste des annexes

Annexe 1 Zeder <i>et al.</i> 2023, Characterization of anti-GASP motif antibodies that inhibit the interaction between GPRASP1 and G protein-coupled receptors .....	159
--	-----

## Liste des abréviations

- AC : adénylate cyclase  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien  
ALIX : *ALG interacting protein X*  
AM404 : N-arachidonoylphénolamine  
AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
APEX : *Ascorbate peroxydase*  
ARM390 : ARM1000390 = N,N-diéthyl-4-(phényl-pipéridine-4-ylideneméthyl)-benzamide  
ARMCX : *ARMadillo Repeat-Containing proteins on the X Chromosome* : Protéine contenant des répétitions du motif Armadillo codée par le chromosome X  
ARN = RNA : acide ribonucléique  
*ARRB1* :  $\beta$ -arrestine 1 = arrestine 2  
*ARRB2* :  $\beta$ -arrestine 2 = arrestine 3  
BAD : *Bcl2 associated death promoter*  
BCA : *bicinchoninic acid assay* = essai à l'acide bicinchoninique  
BDNF : *brain derivated neurotrophique factor* = facteur neurotrophique issu du cerveau  
Bmax : *binding maximum* = liaison maximale  
BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* = Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence  
BSA : *Bovine Serum Albumin* = Albumine de sérum bovin  
Cav2 : canal calcique voltadge dépendant de type 2  
CB1 : récepteur cannabinoïde de type 1  
CCI : *chronic constriction injury* = constriction chronique du nerf sciatique  
CFA : *complete Freund's adjuvant* = adjuvant complet de Freund  
cGASP : *COOH-terminal fragment of G-protein coupled receptor sorting protein*  
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate  
CMV : cytomégalovirus  
coIP : co-immunoprécipitation  
COX-1 : cyclooxygénase de type 1  
COX-2 : cyclooxygénase de type 2  
CPM : coups par minute  
Cter : carboxy-terminale  
CXCR4 : récepteur des chimiokines de type 4  
D4-AEA : Arachidonoyl ethanolamide-d4  
D8-2AG : 2-Arachidonoyl Glycerol-d8  
DADLE : [D-Ala2, D-Leu5]-Enkephaline  
DAG : diacylglycérol  
DDM : n-Dodecyl  $\beta$ -D-Maltopyranoside  
DN4 : questionnaire de douleur neuropathique 4  
DOR : delta opioid receptor = récepteur  $\delta$ -opioïde  
DPDPE : [D-Pen2,D-Pen5]-enkephaline  
DPM : désintégrations par minute  
DRG = GRD : *Dorsal root ganglia* = ganglion rachidien dorsal  
EC50 : concentration efficace médiane  
ECE2 : Enzyme de conversion de l'endothéline de type 2  
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique  
eGFP : *enhanced Green Fluorescent Protein* : protéine fluorescente verte améliorée  
ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport* = complexe de tri endosomal requis pour le transport  
EVA : échelle visuelle analogique  
FLAG-DOPr : récepteur  $\delta$  opioïde couple à une étiquette FLAG de séquence DYKDDDDK  
 $G\alpha_i$  : sous-unité alpha inhibitrice de la protéine G  
 $G\alpha_s$  : sous-unité alpha stimulatrice de la protéine G  
 $G\alpha_o$  : sous-unité alpha o de la protéine G  
 $G\alpha_q$  : sous-unité alpha q de la protéine G  
 $G\beta\gamma$  : sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine G  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GAD65 : décarboxylase acide glutamique de type 65  
GDP : guanosine diphosphate  
GFP : *Greenfluorescent protein* = protéine fluorescente verte  
GIRK : *G-protein activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> current* = courant potassique rectifiant activé par les protéines G

GPCR= RCPG : récepteur couplé aux protéines G  
GPRASP = GASP : GPCR-Associated Sorting Protein (Protéine de tri associée aux récepteurs couplés aux protéines G)  
GRK : *GPCR Kinase* = Kinase des RCPG  
GTP : guanosine triphosphate  
HA-DOPr : hémagglutinine  
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
HGF : facteur de croissance des hépatocytes  
HRP : *horseradish peroxidase* : peroxidase du raifort  
HRS : *Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* : substrat de tyrosine kinase régulée par le facteur de croissance des hépatocytes  
i.p. : intrapéritonéal  
IB : immunoblot  
IP : immunoprecipitation  
Kir3 : *potassium channel inwardly rectifying 3* =  
KO : knock-out  
KOR : *kappa opioid receptor* = recepreur aux opioïdes kappa  
LC-MS : *liquid chromatography-mass spectrometry* = chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse  
LIMK : *LIM domain kinase* = kinase des domaines LIM  
MOR : Récepteur Mu Opioïde  
mRNA = ARNm : acide ribonucléique messenger  
μMACS  
MVB : *multivesicular bodies* = corps multivésiculaires  
NGF : *neuronal growth factor* = facteur de croissance neuronale  
NK1 : récepteur à la neurokinine de type 1  
NAPQI : N-acétyl-p-benzoquinone imine  
N-ter : amino-terminale  
OCT : optimal cutting temperature  
OIH = HIO : hyperalgésie induite par les opiacés  
ON : *overnight* = durant une nuit

*Oprd1* : *opioid peptide receptor delta 1* = gène du récepteur aux peptides opioïdes delta  
PBS : *Phosphate Buffer Saline* = Tampon phosphate salin)  
PEI : Polyéthylèneimine  
PFA : Paraformaldehyde  
pH : Potentiel hydrogène  
PKA : protéine kinase A  
PLC : phospholipase C  
p.o. : *per os*  
PPI : *protein-protein interaction* = interaction protéine-protéine  
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G  
RGS4 : *regulator of G protein signaling 4* = Régulateur de la signalization par la protéine G de type 4  
RLU : *relative luminescence unit* : unité de luminescence relative  
ROCK : *Rho-associated Protine kinase* = protéine kinase associée à Rho  
RPM : rotation par minute  
s.c. : sous-cutané  
SDS : Sodium Dodecyl-Sulfate = Laurylsulfate de sodium  
SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium  
shRNA : *short hairpin ribonucleic acid* = petit acide ribonucléique en épingle à cheveux  
SH-SY5Y : lignée cellulaire dérivée de neuroblastome humain  
siRNA : *small interfering ribonucleic acid* = petit acide ribonucléique interférant  
SNC : Système nerveux central  
SNC80 : (+)-4-[( $\alpha$ R)- $\alpha$ -((2S,5R)-4-Allyl-2,5-diméthyl-1-pipérazinyl)-3-méthoxybenzyl]-N,N-diéthyl benzamide  
TGN : *trans Golgi network* = réseau trans-Golgien  
TRPV1 : *transient receptor potential vanilloid type 1*  
vGLUT1 : *vesicular glutamate transporter 1* = transporteur du glutamate de type 1  
WB : Western Blot  
WGA : *whole genome amplification* = amplification du génome complet  
WT : *Wild-Type* = type sauvage







# **Introduction**

# **I. Les récepteurs couplés aux protéines G dans la physiologie animale : présentation générale**

Pour pouvoir prendre en compte des stimuli extérieurs, des variations internes, physiologiques ou pathologiques, les cellules ont besoin d'être capables de percevoir des informations provenant de leur environnement et d'y répondre. Pour cela, des récepteurs, protéines transmembranaires sont présents à la surface de chaque cellule. Ils sont capables de se lier à des molécules, qui peuvent les activer, des agonistes, ou les bloquer, des antagonistes. Ces ligands peuvent être des molécules endogènes (peptides, hormones, ...) ou exogènes (médicaments, ...). On les nomme des agonistes s'ils activent le récepteur ou des antagonistes s'ils en empêchent l'activation. Parmi ces récepteurs, la plus grande des familles est celle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

## **A. Les RCPG**

Les récepteurs couplés aux protéines G sont une famille de protéines membranaires très représentée dans le règne animal. Ils sont 799 à être codés par le génome humain (Lagerström and Schiöth, 2008) et représentent le tiers des cibles thérapeutiques des médicaments possédant actuellement une autorisation de mise sur le marché (Hauser et al., 2017; Hill, 2006).

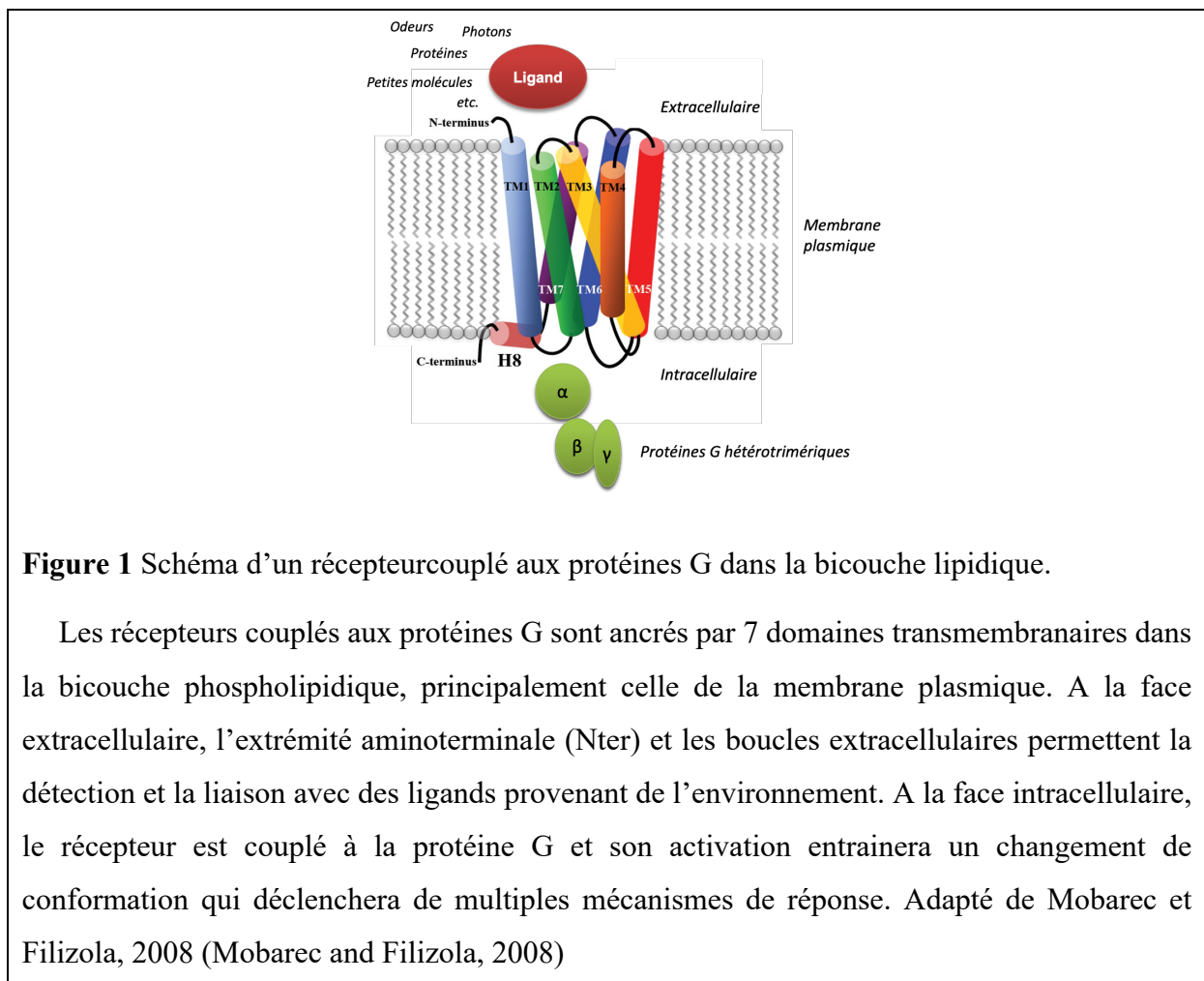
Ils peuvent être activés par des ligands très variés, comme des peptides, des hormones glycoprotéiques, des ions  $Ca^{2+}$ , des acides aminés ou des petites molécules (Lagerström and Schiöth, 2008) (**Figure 1**).

Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, leur partie C-terminale est associée à une protéine G hétérotrimérique, effectrice. Il existe trois sous-catégories principales de protéines G : les  $G\alpha_s$ , stimulatrices qui vont activer la production d'Adénosine Mono Phosphate cyclique (AMPc) par la cellule et donc activer la cellule dans laquelle elles se trouvent, les protéines  $G\alpha_{i/o}$ , inhibitrices, qui au contraire vont inhiber le cycle de l'AMPc, et les protéines  $G\alpha_q$ , dont l'effet est médié par la régulation de calcium intracellulaire.

Les protéines G associées aux RCPG sont en configuration hétérotrimérique, composées de 3 sous-unités,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . C'est la partie  $G\alpha$  qui va porter la propriété inhibitrice/activatrice de la cascade de cyclisation d'AMPc et de libération de calcium intracellulaire. Elle est liée à un Guanosyl Di-Phosphate (GDP) lorsqu'elle est en conformation inactive. Lors de la liaison d'un agoniste, le récepteur change de conformation, ce qui induit un changement de conformation

de la protéine G. Celle-ci échange alors le GDP auquel elle est liée contre un Guanosyl Tri-Phosphate (GTP) et la sous-unité  $\alpha$  liée au GTP se sépare de la sous-unité  $G\beta/\gamma$ . La cascade cellulaire associée est alors activée. La réponse prend fin lorsque le GTP est hydrolysé en GDP par la partie catalytique de la protéine  $G\alpha$ , qui se réassocie ainsi à  $\beta\gamma$  et retrouve sa conformation inactive liée au récepteur (Hilger et al., 2018).

L'activation de  $G\alpha_i$  cause l'inhibition de l'adénylate cyclase et module le potentiel membranaire par les canaux ioniques  $Ca^{2+}$  et  $K^+$  (Sauriyal et al., 2011).



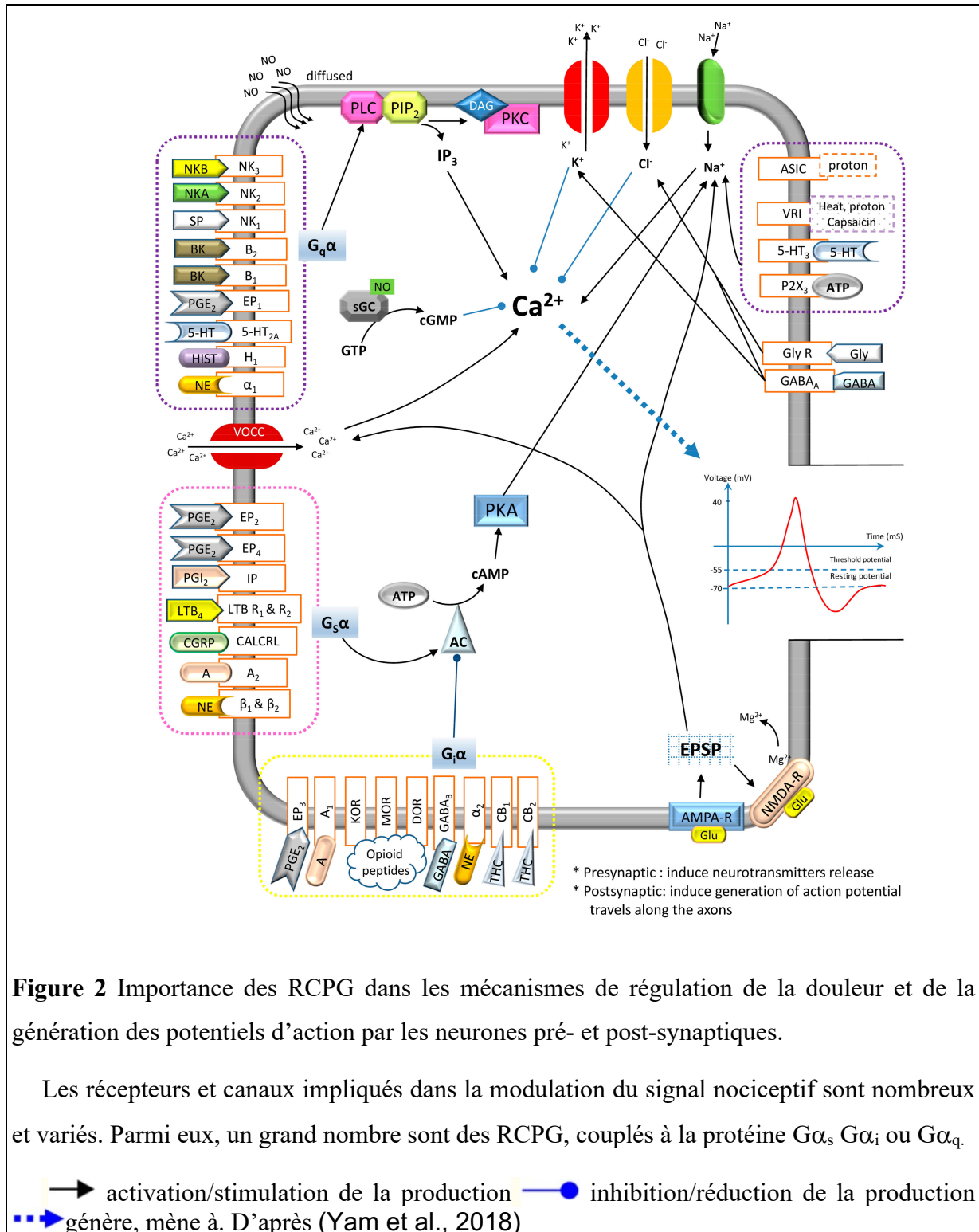
**Figure 1** Schéma d'un récepteur couplé aux protéines G dans la bicouche lipidique.

Les récepteurs couplés aux protéines G sont ancrés par 7 domaines transmembranaires dans la bicouche phospholipidique, principalement celle de la membrane plasmique. A la face extracellulaire, l'extrémité aminoterminal (Nter) et les boucles extracellulaires permettent la détection et la liaison avec des ligands provenant de l'environnement. A la face intracellulaire, le récepteur est couplé à la protéine G et son activation entrainera un changement de conformation qui déclenchera de multiples mécanismes de réponse. Adapté de Mobarec et Filizola, 2008 (Mobarec and Filizola, 2008)

## B. Les principaux RCPG jouant un rôle dans la douleur et son traitement : les opioïdes

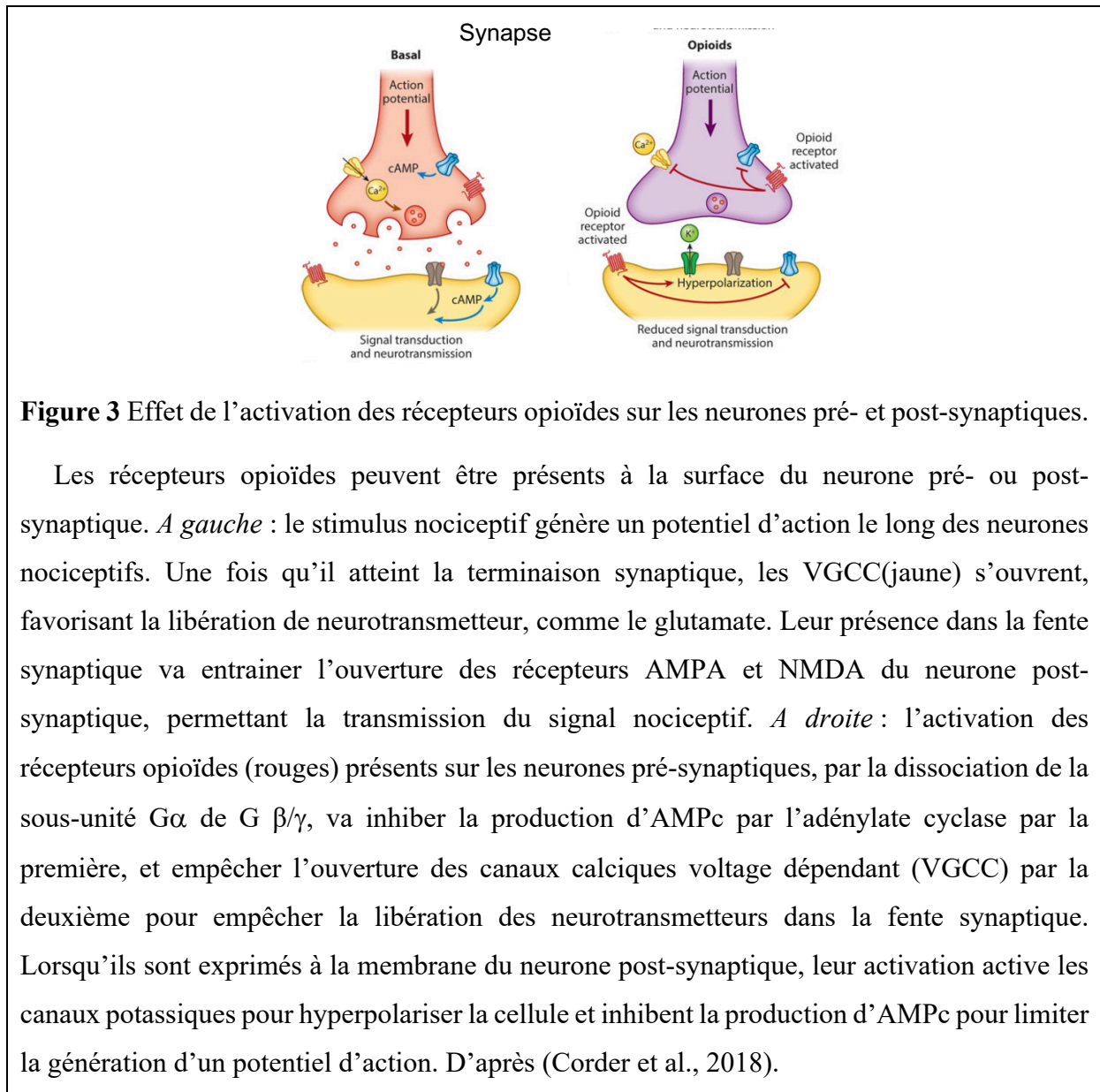
De nombreux RCPG sont impliqués dans la détection et la modulation endogène de la douleur (**Figure 2**). Parmi eux, on peut citer de manière non exhaustive les récepteurs à la prostaglandine EP2, les récepteurs de la substance P, NK1, les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 et les récepteurs aux opioïdes (**Figure 2**). Les récepteurs opioïdes sont au nombre de

quatre, mu, delta et kappa (MOR, DOR, KOR) ainsi qu'orphanine FQ/nociceptine (NOP). Ils se trouvent en particulier dans les zones du système nerveux de transmission et de régulation de la douleur (**Figure 3**).



**Figure 2** Importance des RCPG dans les mécanismes de régulation de la douleur et de la génération des potentiels d'action par les neurones pré- et post-synaptiques.

Les récepteurs et canaux impliqués dans la modulation du signal nociceptif sont nombreux et variés. Parmi eux, un grand nombre sont des RCPG, couplés à la protéine  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$  ou  $G\alpha_q$ .



Les récepteurs opioïdes ont pour ligands endogènes des peptides de la famille des endorphines, endomorphines, enképhalines et dynorphines (Akil et al., 1998). Les enképhalines, Leu- et Met, ont été découvertes comme « morphine endogène » il y a une cinquantaine d'années par Hugues et collaborateurs (Hughes et al., 1975). A ces deux pentapeptides s'ajoutent les endorphines  $\alpha$  et  $\beta$  (15 et 16 acides aminés) (Ling et al., 1976), décrites comme ayant une activité contractile sur les muscles lisses intestinaux inhibée par la naloxone. Une troisième famille de peptides activant le système opioïde a été décrite 3 ans plus tard, celle des dynorphines (Goldstein et al., 1979). La dernière catégorie de peptides connus pour être des agonistes endogènes des récepteurs opioïdes sont les endomorphines, deux

tétrapeptides dont le gène n'a jamais pu être identifié (Hackler et al., 1997; Harrison et al., 1998).

Les peptides ayant la meilleure affinité pour DOR sont les enképhalines, mais elles ne sont pas sélectives du récepteur  $\delta$ . La Leu- ainsi que la Met-enképhaline sont codées par le gène préproenképhaline (Noda et al., 1982), qui donne deux prohormones proenképhaline, la préproenképhaline A ainsi que la proenképhaline. Ces prépropeptides sont clivés et protéolysés pour donner leurs formes actives, la Leu- et la Met-enképhaline, qui partagent une séquence initiale commune : Tyrosine-glycine-glycine-phénylalanine (McLaughlin, 2013). Le gène préproenképhaline est exprimé chez l'Homme dans le système nerveux central, dans le nucleus accumbens, le caudame putamen, le cortex préfrontal, la moëlle épinière mais également dans les ganglions rachidiens dorsaux (GRD), les organes reproducteurs et les voies respiratoires.

La Leu-enképhaline a un  $K_i$  (constante d'inhibition reflétant l'affinité de la liaison de la molécule pour le récepteur) estimé de 4nM sur DOR et 3,4nM sur MOR, la Met-enképhaline de 1,7 et 0,65nM respectivement, *in vitro* (cellules CHO-DG44 vs COS-7), suggérant l'absence de sélectivité entre les deux récepteurs (Raynor et al., 1994), quand l'équipe de Mansour et collaborateur a observé une affinité légèrement supérieure pour DOR (**Tableau 1**).

**Tableau 1** Affinité des peptides opioïdes pour les différents récepteurs opioïdes

	Mu	Delta	Kappa
<i>Proenkephalin peptides</i>			
Leu-Enk	6.19 (1.00)	0.37 (0.04)	93.65 (13.39)
Met-Enk	1.80 (0.15)	0.45 (0.03)	47.44 (11.99)
Met-Enk-Arg-Phe	0.37 (0.12)	0.57 (0.04)	0.34 (0.11)
Met-Enk-Arg-Gly-Leu	1.40 (0.35)	0.52 (0.18)	0.48 (0.14)

$K_i$  exprimés en nM  $\pm$  erreur standard, étudié dans un modèle cellulaire COS-1. D'après (Mansour et al., 1995)

MOR, DOR et KOR sont couplés à une protéine  $G_i$ , qui va donc inhiber le neurone qui les exprime, diminuant la transmission du message nociceptif. En situation douloureuse, la libération endogène de peptides opioïdes ou l'administration d'opioïdes exogènes, va activer ces récepteurs couplés à une protéine  $G_{\alpha_i}$ . Cette stimulation va provoquer l'inhibition indirecte de canaux calciques voltage dépendant, ainsi que l'inhibition de l'adénylate cyclase, donc indirectement la production d'AMPc, et bloquer la libération de neurotransmetteurs comme le glutamate et la substance P, ainsi qu'engendrer une hyperpolarisation membranaire.



L'ensemble de ces phénomènes conduit à bloquer la transmission du message nerveux par le neurone présynaptique (Trescot et al., 2008).

Un seul des trois récepteurs opioïdes est actuellement ciblé par les médicaments disponibles sur le marché pour le traitement de la douleur : MOR. Il est la cible principale de la classe médicamenteuse qu'on appelle les opioïdes, qui regroupe la morphine, le fentanyl, la codéine, l'oxycodone...(Kristensen et al., 1995) En absence de ce récepteur, la morphine comme le fentanyl perdent leur effet analgésique (Matthes et al., 1996). Leur importance et leurs implications dans la prise en charge de la douleur seront plus largement détaillées dans la partie II.D.4).

## II. La douleur chronique

### A. Définitions de la douleur

#### 1) Rôle physiologique de la douleur

La **douleur** est définie par le Larousse comme une « sensation pénible, désagréable, ressentie dans une partie du corps », mais également comme un « sentiment pénible, affliction, souffrance morale » (Larousse, 2023). L'association internationale pour l'étude de la douleur en parle comme « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou décrite en termes évoquant une telle lésion » (“IASP Announces Revised Definition of Pain,” 2020).

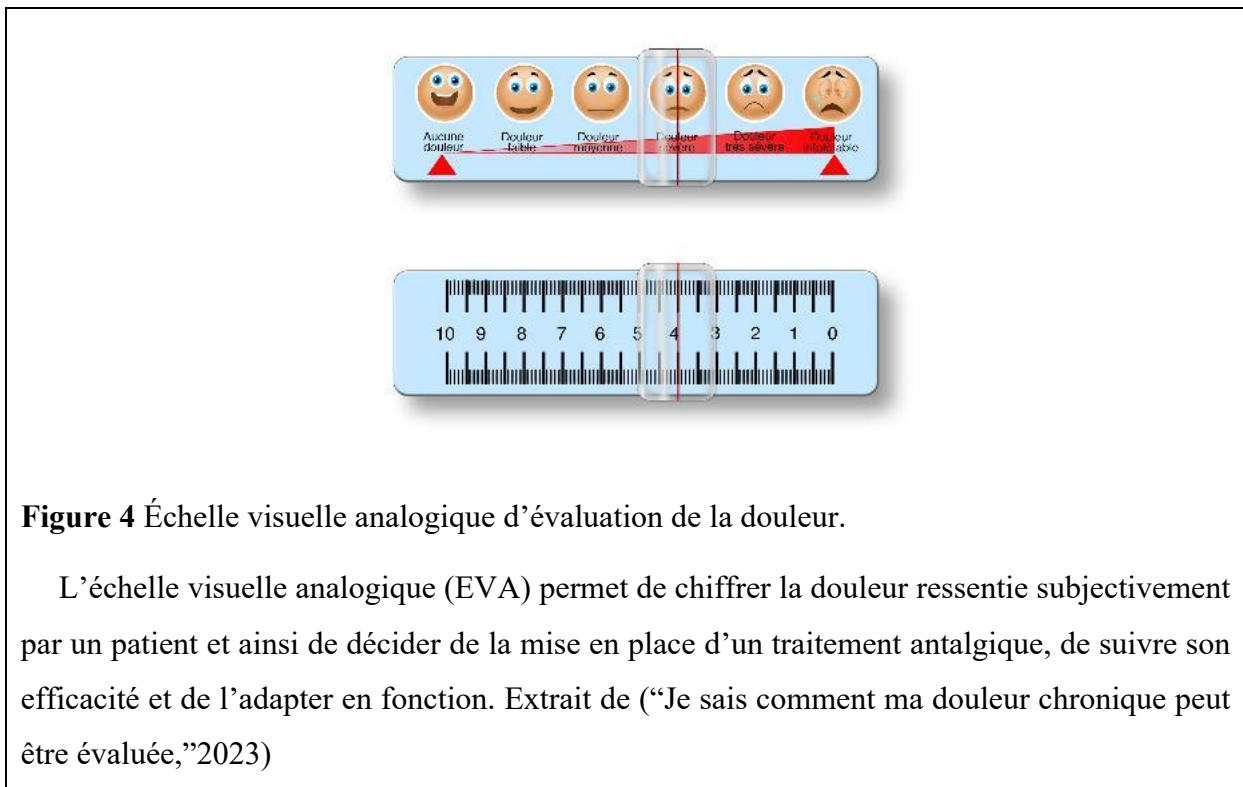
Dans ces deux cas, le concept de douleur prend en compte d'un côté un signal organique de danger, correspondant au signal d'alarme auquel est souvent apparentée la douleur aiguë, mais également un aspect psychoaffectif qui lui est associé. Ainsi la douleur est reconnue comme subjective, déplaisante et comportant des composantes multiples. Ces différents volets ont été décrits et rassemblés par Bernard Calvino en 2019 (Calvino, 2019).

La douleur comprend dans un premier temps une composante **sensori-discriminative**, dépendant des mécanismes neurophysiologiques produits par un système nerveux dédié à sa détection, allant de la périphérie (terminaisons nerveuses dans la peau, les organes...) passant par leurs corps cellulaires regroupés en ganglions rachidiens dorsaux (*dorsal root ganglia* = GRD) aux abords de la colonne vertébrale, transitant par la moëlle épinière, où il entraîne un réflexe de retrait, pour ensuite parvenir au cerveau. Cet influx nerveux est décodé pour donner les caractéristiques temporelles, de localisation, d'intensité et de « qualité » du stimulus détecté

comme nociceptif. Ce n'est qu'à cette étape qu'on passe de la nociception à la douleur, consciente.

La douleur comprend également une **composante affective et émotionnelle**, qui associe le caractère désagréable voire insupportable à la perception sensori-discriminative. Elle est à l'origine des états émotionnels plus prononcés comme l'anxiété lorsqu'il y a un risque de reproduire cette douleur ou la dépression. Le stimulus nociceptif transite par le système limbique (= amygdale, hippocampe et cortex limbique), lequel est responsable de l'association de la douleur aux émotions négatives (Veinante et al., 2013).

La douleur inclut ensuite une **composante cognitive**, qui concerne la perception consciente de la douleur, avec l'attention qui y est portée, l'anticipation et le souvenir de douleurs antérieures, mais également la valeur morale qui peut être associée à la douleur, dépendant des référentiels sociétaux, culturels ou religieux (Hampton et al., 2015).



Dans un dernier temps, la **composante comportementale** regroupe les expressions de cette douleur, que ce soit par la parole, le gémissement, la posture ou les mimiques. C'est celle-ci qui est utilisée pour évaluer et diagnostiquer la douleur. C'est cette intégration de la douleur qui nous permet de l'exprimer, de la qualifier et de la quantifier. C'est sur cette évaluation que repose notre méthode principale de mesure de la douleur en clinique chez les patients adultes. A partir de 6 ans, on utilise une échelle visuelle de douleur (EVA) pour associer un chiffre (verso de l'échelle) à une intensité de douleur ressentie par le patient (recto de l'échelle **Figure**

4). De cette façon, on peut évaluer la nécessité de mettre en place un traitement antalgique et selon l'évolution du chiffre associé, suivre si le traitement a l'effet escompté.

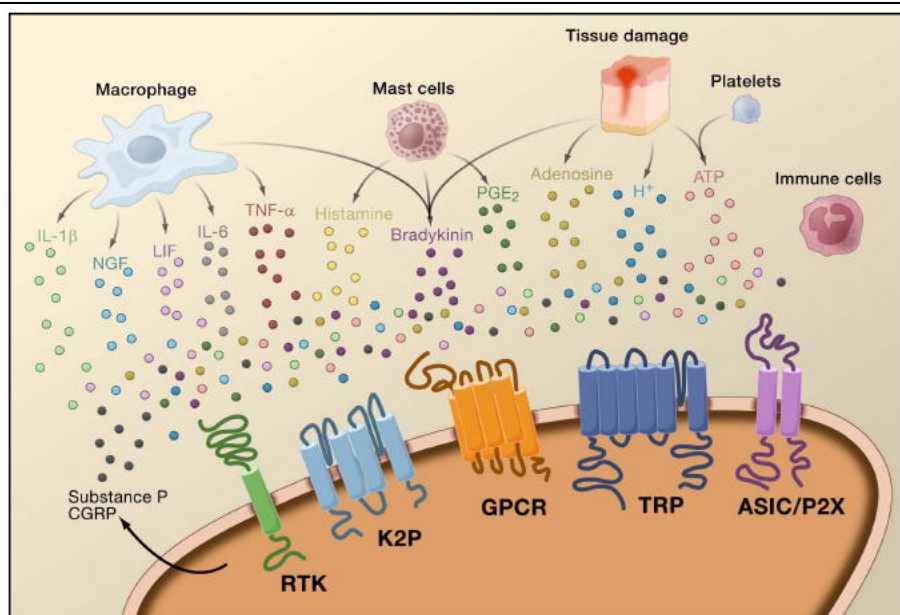
## 2) Voies neuronales de la douleur

La douleur est donc une fonction sensorielle, qui a besoin d'un système neuronal dédié. Elle fonctionne sur un modèle récepteur – capteur/émetteur/transducteur - effecteur.

Des **récepteurs périphériques**, présents aux terminaisons libres de neurones spécialisés appelés nocicepteurs, détectent des variations environnementales, comme des pressions, des substances chimiques, des changements de température ou de pH. C'est l'intensité du stimulus qui, lorsqu'elle atteint le seuil d'excitation du neurone, va déclencher l'apparition d'un potentiel d'action. Ce potentiel d'action correspond à une dépolarisation de la membrane qui génère un signal électrique parcourant l'axone et entraînant la libération de neurotransmetteur aux synapses. Le potentiel de membrane d'un neurone au repos est de -50mV. En condition physiologique, il faut qu'il atteigne 20mV pour générer le potentiel d'action. Les canaux sodiques voltage dépendant s'ouvrent pendant la phase de dépolarisation. Lorsque le potentiel d'action a été généré, les canaux sodiques se referment et c'est au tour des canaux potassiques de repolariser la membrane cellulaire, jusqu'à atteindre une hyperpolarisation transitoire, qui définit la période réfractaire pendant laquelle il sera plus difficile de déclencher un potentiel d'action.

Les **nocicepteurs** sont constitués de deux sous-groupes de neurones de petits diamètres dont les fibres afférentes sont regroupées pour former, soit des fibres A $\delta$ , myélinisées, soit les fibres C amyéliniques (**Figure 6**). Ces nocicepteurs sont capables de détecter différents stimuli. Si le nocicepteur est spécialisé dans la détection des températures en dehors de la plage 10-43°C, c'est un **thermonocicepteur**. S'il est activé par des agents chimiques dits algogènes (générant de la douleur, exogènes acide chloridrique, phénols, soude caustique..., comme endogènes : acide lactique, sérotonine...) on parle d'un **chémonocicepteur**. Si son activation a lieu suite à des pressions/forces de cisaillements exercées sur le tissu, c'est un **mécanocicepteur**. Certains sont sensibles à plusieurs sortes de stimulation, on parle alors de nocicepteurs **polymodaux**. Leurs corps cellulaires sont regroupés dans une structure bordant la face dorsale de la colonne vertébrale, appelée ganglion de la racine dorsale de la moëlle épinière (GRD). Ils vont être à l'origine de la douleur dite **nociceptive**.

Dans la majorité des cas, l'apparition d'une douleur aiguë est associée à une lésion tissulaire. Dans le cadre de cette lésion, les cellules lésées ainsi que les cellules immunitaires recrutées en réponse vont produire des molécules pro-inflammatoires, génériquement désignées comme « **soupe inflammatoire** » (Figure 5). Beaucoup des molécules émises en réponse à l'inflammation vont également être détectées par les nocicepteurs, grâce aux récepteurs présents sur les terminaisons nerveuses, augmentant le signal nociceptif. On a alors à faire à de la douleur de type **inflammatoire**.



**Figure 5** Soupe inflammatoire produite par le système immunitaire activant les nocicepteurs.

L'inflammation générée lors d'un dommage tissulaire entraîne le relargage de nombreuses molécules proinflammatoires par le tissu lésé et les cellules immunitaires. Parmi elles, un grand nombre sont des cytokines qui vont activer des récepteurs présents à la surface des nocicepteurs et les activer. ASIC : *acid sensing ion channel* ; ATP : adénosine triphosphate ; GPCR : *G-protein coupled receptor* ; IL-1 $\beta$  : interleukine 1 $\beta$  ; IL-6 : interleukine 6 ; NGF : *neuronal growth factor* ; P2X : récepteur canal purinergique de type 2 ; PGE2 : prostaglandine E2 ; RTK : récepteur tyrosine kinase ; TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor  $\alpha$*  ; TRP : *transient receptor potential*. Extrait de (Basbaum et al., 2009).

Le nocicepteur est un neurone de premier ordre, qui projette sur un neurone de deuxième ordre, au niveau de la corne dorsale de la moëlle épinière, un neurone nociceptif post synaptique. C'est lui qui constitue la voie ascendante de la douleur, le message est ainsi emmené

au tronc cérébral ainsi qu'aux aires corticales : noyau relais du tronc cérébral, thalamus et cortex somesthésique SI et SII (**Figure 6**).

Les 4 principaux sites de traitement de la douleur au niveau supraspinal sont :

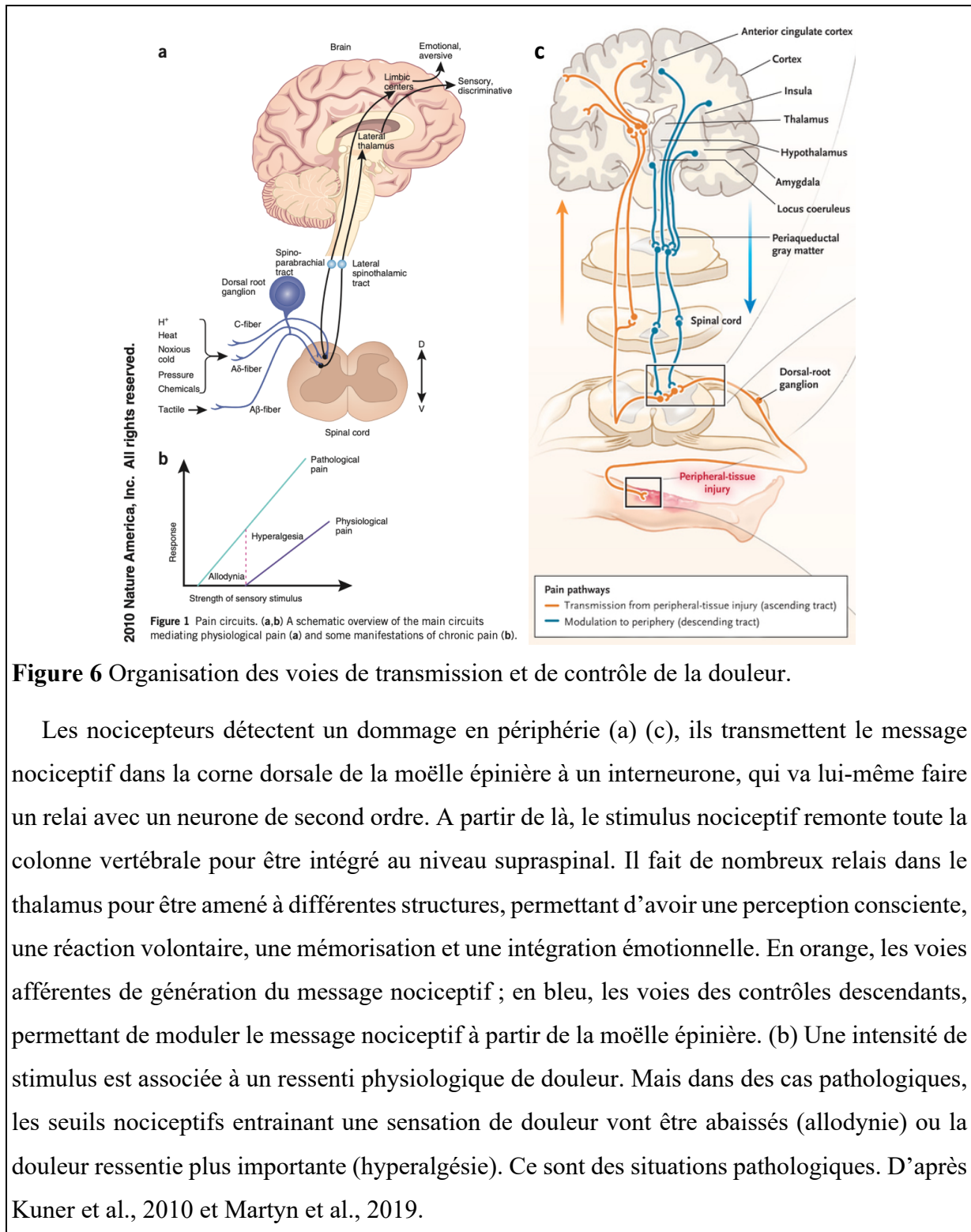
- Le noyau ventro-postéro-latéral du thalamus, qui reçoit l'information en direct. Il projette sur les aires somesthésiques pour obtenir les informations de temporalité, intensité et localisation de la douleur.
- Le noyau gigantocellulaire, qui est une projection bulbaire et mésencéphalique. Il permet un relais de l'information nociceptive jusqu'au thalamus médian non spécifique. Il est impliqué dans la mise en éveil des réflexes physiologiques au niveau cardiorespiratoire, moteur et émotionnel. Il est également responsable de la transmission vers les aires frontales et préfrontales, qui permettent les réactions élaborées, qu'elles soient cognitives ou émotionnelles.
- L'hypothalamus, dans un second temps, contrôle les réactions végétatives et libère les hormones de contrôle du stress.
- Le complexe amygdalien, qui appartient au système limbique, suit le noyau parabrachial dans la transmission de l'information et permet le contrôle des réactions affectives et émotionnelles.

La fonction effectrice est remplie par des neurones des **aires corticales** où le message est traduit en information consciente et entraîne une adaptation comportementale.

En plus de l'intégration au niveau cérébral, lors de l'activation des neurones post synaptiques, des contrôles modulateurs vont également être activés (**Figure 6c**). Ce phénomène a lieu aussi bien au niveau de la corne dorsale de la moëlle épinière qu'en rétrocontrôle négatif généré par les centres supraspinaux (Zhuo and Gebhart, 1990). Originaires principalement du mésencéphale (substance grise périaqueducale) et de la région rostro-ventrale du bulbe, avec le *raphe magnus nucleus*, ils vont activer des interneurons inhibiteurs sérotoninergiques et inhiber les interneurons excitateurs présents dans la moëlle épinière et ainsi limiter la transmission du message généré par les nocicepteurs (Cathenaut et al., 2022).

Des contrôles négatifs proviennent du locus coeruleus et subcoeruleus par des neurones adrénérgiques et génèrent une analgésie spinale par l'intermédiaire des récepteurs  $\alpha$ 2-

adrénergiques. Les agonistes  $\alpha$ 2-noradrénergiques pourraient donc représenter un intérêt dans la prise en charge de la douleur au niveau périphérique (Kremer et al., 2018)(Letellier et al., 2021).



**Figure 6** Organisation des voies de transmission et de contrôle de la douleur.

Les nocicepteurs détectent un dommage en périphérie (a) (c), ils transmettent le message nociceptif dans la corne dorsale de la moëlle épinière à un interneurone, qui va lui-même faire un relai avec un neurone de second ordre. A partir de là, le stimulus nociceptif remonte toute la colonne vertébrale pour être intégré au niveau supraspinal. Il fait de nombreux relais dans le thalamus pour être amené à différentes structures, permettant d’avoir une perception consciente, une réaction volontaire, une mémorisation et une intégration émotionnelle. En orange, les voies afférentes de génération du message nociceptif ; en bleu, les voies des contrôles descendants, permettant de moduler le message nociceptif à partir de la moëlle épinière. (b) Une intensité de stimulus est associée à un ressenti physiologique de douleur. Mais dans des cas pathologiques, les seuils nociceptifs entraînant une sensation de douleur vont être abaissés (allodynie) ou la douleur ressentie plus importante (hyperalgésie). Ce sont des situations pathologiques. D’après Kuner et al., 2010 et Martyn et al., 2019.

Pour contrebalancer ce système, il y a également des contrôles positifs, facilitateurs, qui descendent du bulbe rostro-ventral vers la corne dorsale de la moëlle épinière (**Figure 6c**). Ainsi, le contrôle de la douleur est un mécanisme basé sur des équilibres de plusieurs systèmes, provenant de centres différents, centraux comme périphériques, qui permettent de maintenir une homéostasie.

## **B. Distinction entre la douleur aiguë et la douleur chronique**

Parfois, la douleur perdure plus de 3 mois, et peut persister malgré la disparition de la cause organique. On parle alors de douleur chronique, qui est handicapante et reconnue comme une maladie par la classification internationale des maladies depuis 2023 (“CIM-11 pour les statistiques de mortalité et de morbidité,” 2022.). Si la douleur chronique se met en place lorsque la cause douloureuse perdure, on parle alors de sensibilisation périphérique. Elle provient d’un maintien de l’activation des nocicepteurs par la soupe inflammatoire, qui génèrent un abaissement du seuil de sensibilité à force de garder les canaux et récepteurs-cibles activés. Dans le cas d’une lésion nerveuse en revanche, le processus d’adaptation majoritaire est central, spino-cérébral.

La douleur chronique est caractérisée par deux phénomènes d’adaptation majeurs sous-jacents, qui sont des mécanismes de **neuroplasticité**. Le premier type concerne des **adaptations moléculaires** qui modifient la nature ou la quantité des neurotransmetteurs, récepteurs et canaux ioniques exprimés par les voies de la douleur. En périphérie ce phénomène, appelé « switch phénotypique », est retrouvé lorsque les nocicepteurs baignent dans la « soupe inflammatoire » durablement et les modifications donnent lieu à une **sensibilisation périphérique**, particulièrement dans les cas d’inflammation chronique (type arthrite), qui facilitent l’excitabilité des fibres, le seuil de d’excitation des nocicepteurs est alors abaissé. Au niveau du système nerveux central, aux synapses dans la moëlle épinière, le type de neurotransmetteurs produits par un neurone est modifié par l’environnement généré par une douleur prolongée. La modification de leur libération dans la fente synaptique change donc la réponse post synaptique et la répétition de stimulation impacte également l’activation post synaptique. On appelle ce phénomène **sensibilisation centrale**. On retrouve en particulier une augmentation des neurones exprimant Fos, les dynorphines, les enképhalines et l’acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA).

Le deuxième type de modifications permis par la neuroplasticité concerne des **adaptations structurales**, plus fréquentes dans les cas de douleurs neuropathiques. On observe alors une modification de la physiologie des cellules, de leur taille, leur forme, du nombre et de l'expansion des neurites, de l'apparition de bourgeonnements... Les terminaisons A $\beta$ , sensorielles, peuvent envahir les couches superficielles de la corne dorsale de la moëlle épinière, normalement dédiées à la douleur. Des nerfs spécialisés dans la détection du toucher ou de la chaleur vont alors se projeter dans des zones faisant relais avec les aires d'intégration de la douleur. L'hypothèse que cela pourrait être à l'origine des sensations anormales ressenties par les patients souffrant de douleurs neuropathiques, comme l'allodynie (douleur provoquée) ou les fourmillements (sensation spontanée), a été émise (Calvino, 2019, chapitre 2). La douleur chronique est effectivement souvent associée avec une modification de perception de la douleur. On parle d'hyperalgésie lorsque pour un stimulus normalement douloureux, le seuil de ressenti douloureux est abaissé. L'allodynie est, elle, une situation où un stimulus indolore va être ressenti comme douloureux (**Figure 6b**).

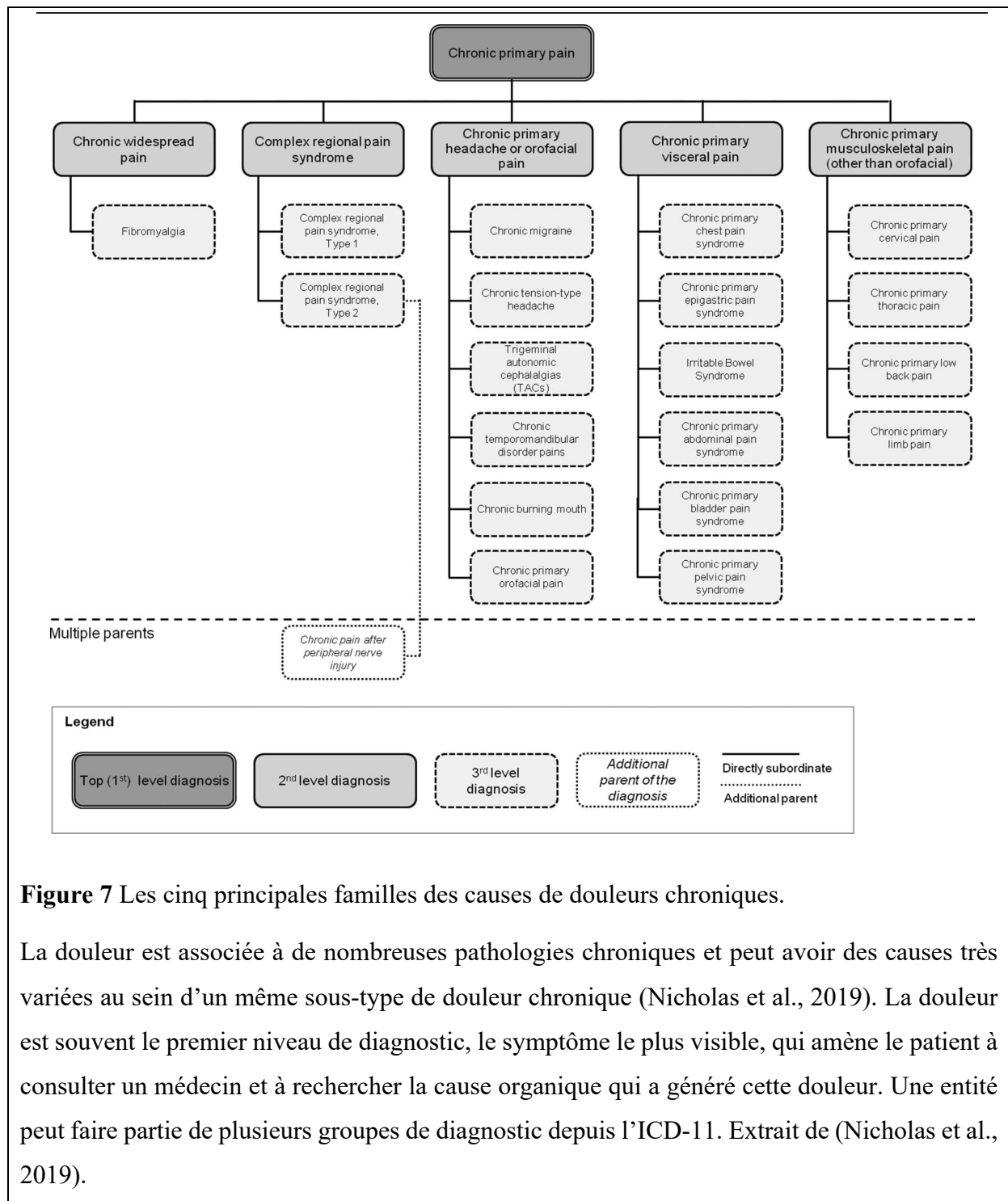
## C. Prévalence de la douleur chronique et impact sociétal

### 1) Causes principales de la douleur chronique

Au fil des décennies et selon l'axe de réflexion, plusieurs classifications de la douleur ont été établies. La plus communément admise découpe la douleur en quatre grands sous-types (Basbaum et al., 2009)(Nicholas et al., 2019).

- (i) Les **douleurs par excès de nociception**, qui sont souvent associées à des inflammations ;
- (ii) Les **douleurs neuropathiques**, qui proviennent d'une lésion ou d'un dysfonctionnement du système nerveux somatosensoriel. Elles ont un tableau clinique particulier et peuvent être dépistées à l'aide du questionnaire dédié DN4 (Bouhassira et al., 2004) ;
- (iii) Certaines douleurs sont **mixtes**, regroupent des caractéristiques d'excès de nociception et de neuropathie ;
- (iv) Une catégorie un peu différente regroupe les **douleurs nociplastiques**, anciennement appelées idiopathiques ou centralisées (Kosek et al., 2016). Elles proviennent d'une perturbation des cheminement de la douleur, un changement de fonction de neurones. Il y a une anomalie dans les centres de contrôle de la douleur au niveau central, se traduisant fréquemment par un ressenti anormalement douloureux comme de l'allodynie (ressenti douloureux d'une stimulation normalement indolore) ou une hyperalgie (exacerbation de la





**Figure 7** Les cinq principales familles des causes de douleurs chroniques.

La douleur est associée à de nombreuses pathologies chroniques et peut avoir des causes très variées au sein d'un même sous-type de douleur chronique (Nicholas et al., 2019). La douleur est souvent le premier niveau de diagnostic, le symptôme le plus visible, qui amène le patient à consulter un médecin et à rechercher la cause organique qui a généré cette douleur. Une entité peut faire partie de plusieurs groupes de diagnostic depuis l'ICD-11. Extrait de (Nicholas et al., 2019).

douleur ressentie pour une stimulation normalement douloureuse). Cela proviendrait d'une adaptation du réseau nerveux, d'une neuroplasticité sans origine identifiée. Certains patients en souffrant ne montrent ni physiopathologie précise, ni activation de nocicepteurs, ni lésion du système nerveux, son origine demeure inconnue.

Les douleurs chroniques découlent de différentes pathologies (Nicholas et al., 2019) (**Figure 7**). On y trouve les douleurs **articulaires**, causées par l'arthrite rhumatoïde par exemple, les

douleurs **neuropathiques**, causées par des lésions mécaniques comme les amputations mais également les dégénérescences nerveuses dues au diabète ou au virus du zona, **les migraines**, **l'endométriose**, les douleurs **musculosquelettiques** (catégorie regroupant aussi bien la goutte que les tendinites et la fibromyalgie), les **syndromes douloureux régionaux complexes**, les **douleurs post-chirurgicales**, la **fibromyalgie** et les **douleurs cancéreuses**, pouvant être causées par la tumeur aussi bien que par les traitements.

## **2) Comorbidités et impact sociétal : de l'importance de prendre en charge la douleur de façon satisfaisante.**

### **a) Prévalence de la douleur chronique en Europe**

Puisqu'elle est le signe d'un dysfonctionnement organique et qu'elle est associée à une sensation désagréable, la douleur, qu'elle soit aiguë ou chronique, est la première cause de consultation médicale en France (Queneau et al., 2018). En effet, si les causes de douleur chronique sont aussi variées, cela a comme conséquence inévitable que les patients en souffrant sont d'autant plus nombreux. Certaines études ont montré qu'elle concernait jusqu'au tiers de la population adulte en Europe et aux Etats-Unis (Bouhassira et al., 2008; Breivik et al., 2013, 2006; Dahlhamer et al., 2018; Zelaya et al., 2020) et parmi cette large proportion, 32% des patients en souffriront pendant plus de 8 ans. L'âge moyen des patients se situe entre 45 et 55ans avec une prépondérance féminine. Les coûts de prise en charge de ces patients, par les consultations médicales, paramédicales et les examens biologiques répétés associés à des traitements médicamenteux au long cours font qu'on estime le budget de la prise en charge de la douleur entre 1 et 10% du PIB des pays européens (Breivik et al., 2013).

### **b) Comorbidités de la douleur chronique**

Les impacts de la douleur chronique sur la vie personnelle, professionnelle et sociale sont assez importants pour qu'elle ait été déclarée comme handicapante. Elle est source de baisse de productivité ou d'incapacité au travail, voire de licenciement. La limitation dans les mouvements entraîne également une désociabilisation des personnes en souffrant.

De nombreuses affections psychologiques y sont associées, avec un syndrome anxiodépressif fréquent. Les pensées suicidaires et les passages à l'acte aboutis sont nettement plus fréquents chez les patients souffrant de douleur chronique (Hassett et al., 2014; Magni et al., 1998). Par conséquent, la douleur chronique a un impact non pas uniquement sur la qualité de vie, mais également sur l'espérance de vie et la mortalité (Kadam et al., 2005).

La douleur chronique est également associée au développement d'addictions. La prise de substances d'abus est plus élevée avec cette pathologie que dans la population générale. Cependant, les traitements principaux de douleur étant des sources d'addictions (addiction aux opioïdes, voir paragraphe II.D.5f) de l'introduction) et les déclarations de patients étant souvent partielles sur le sujet des prises illicites, il est difficile d'estimer correctement l'importance de ce phénomène. La dépendance à une substance a été estimée entre 2 et 19% selon les critères d'études (Fishbain et al., 1992).

Pour de nombreux patients souffrant de douleur chronique, la prise en charge et le soulagement de leur peine est une tâche compliquée, qui requiert une approche pluridisciplinaire, de la cause aussi bien que des symptômes, mais actuellement plus de la moitié des patients estiment leur soulagement insuffisant (Katon et al., 1991; Lim et al., 2015).

## **D. Traitements de la douleur chronique disponibles sur le marché**

Les paragraphes suivants sont extraits du mémoire de diplôme d'état de docteur en pharmacie, « La douleur chronique et sa prise en charge thérapeutique : cas particulier de la morphine », défendu le 27 mai 2022 à la faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg par Juliette Kaeffer. Ils sont reproduits en italique

### **1) Généralités sur l'antalgie et les paliers**

*« Les molécules spécialisées pour la limitation ou la suppression de la douleur sont appelées des antalgiques. L'antalgie consiste à réduire une sensation de douleur ; l'analgésie, elle, la supprime totalement.*

*Les traitements contre la douleur sont classés par la communauté scientifique (Organisation mondiale de la santé) en trois paliers différents, du moins au plus puissant.*

*Le **palier I** comprend des antalgiques non opioïdes, pour les douleurs d'intensité faible à modérée, avec par exemple le paracétamol, l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ils agissent principalement via l'inhibition de cyclo-oxygénases centrales COX-1 et -2, ainsi que la synthèse de prostaglandines (Graham et al., 2013).*

Le **palier II** vise lui les douleurs d'intensité modérée, avec des opioïdes faibles, dérivés de la morphine. On y trouve donc la codéine ou le dextropropoxyphène par exemple (retiré du marché européen en 2017).

Pour les douleurs d'intensité forte à sévère, on a recours au **palier III**, on retrouve généralement la morphine et des dérivés aussi ou plus puissants, comme le fentanyl. Cela concerne 44% des patients souffrant de douleur chronique.

Grâce à l'évaluation préalable de l'intensité de la douleur, on essaye d'adapter le palier de traitement à prescrire par rapport au niveau de douleur ressenti par le patient. Si le soulagement est insuffisant, on pourra alors soit changer de molécules (mécanisme d'action différent entre le paracétamol et les AINS), soit passer à un traitement du palier suivant.

## **2) Les antalgiques de palier I**

Anciennement appelés antalgiques « périphériques », ils sont prescrits dans le traitement de la douleur faible à modérée, de type aiguë ou chronique par excès de nociception (“\*Antalgiques non opiacés : Les points essentiels,” n.d.). On y regroupe 3 types de traitements, d'action antalgique mais également antipyrétique : le paracétamol, l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Ils peuvent être dispensés sur prescription ou bien en automédication.

### **a) Le paracétamol**

#### **(i) Son mécanisme d'action**

Le paracétamol, ou acétaminophène, est une molécule centrale dans le traitement de la douleur aiguë et prescrite à 1/3 des patients souffrant de douleur chronique. Mais bien qu'il soit largement utilisé depuis plus d'un siècle, son mécanisme d'action reste incomplètement élucidé (Ayoub, 2021). L'état de l'art décrit une action passant par la synthèse des prostaglandines par les cyclooxygénases, mais uniquement à une dose supra thérapeutique. Alors qu'in vitro, des concentrations faibles de paracétamol auront tendance à augmenter la production des prostaglandines (Bambai and Kulmacz, 2000; Swierkosz et al., 2002).

Il y aurait deux enzymes responsables de la synthèse d'acide arachidonique, lequel sert de précurseur à une série de prostaglandines. Les prostaglandines font partie des molécules pro-

*inflammatoires qui vont également exciter les nocicepteurs et être responsables de l'apparition de la douleur.*

*[...]*

*La COX-2 a un lien étroit avec le système cannabinoïde : ils sont métabolisés par COX-2, tout comme le 2-arachidonoylglycérol, agoniste de CB1. Par conséquent, le blocage de la dégradation des endocannabinoïdes par la cyclooxygénase 2 par le paracétamol, ou l'inhibition de leurs transporteurs de recapture permet une augmentation de la concentration de cannabinoïdes dans la fente synaptique. Cela aboutit à l'activation plus longue de CB1 et CB2 dans le système nerveux central, qui possèdent des propriétés analgésiques.*

*[...]*

## **(ii) Les recommandations dans la prise en charge de la douleur chronique**

*Le paracétamol est antalgique de palier I classique. Il est recommandé en première intention dans les douleurs ostéoarthritiques. Il est également largement utilisé en association avec d'autres antalgiques dans le traitement des douleurs chroniques*

*Les antalgiques classiques ne donnent pas ou peu de soulagement des douleurs neuropathiques (paracétamol, morphiniques à faible ou très forte dose).*

*Aucun traitement médicamenteux n'a aujourd'hui d'indication spécifique dans la fibromyalgie. Toutefois, l'utilisation des antalgiques (paracétamol, opioïdes faibles), des antidépresseurs, de la prégabaline, ainsi que d'approches non pharmacologiques (kinésithérapie, thérapie cognitive ou comportementale, relaxation, hypnose, acupuncture) est conseillée.*

*Les traitements non médicamenteux, pour certains experts, comprennent bains chauds, exercice, thérapie cognitive, relaxation.*

## **b) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens**

### **(i) Leurs mécanismes d'action**

*Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une large famille de molécules, composée de sept sous-familles de structures chimiques différentes dont le mécanisme d'action est défini en opposition aux anti-inflammatoires stéroïdiens (les corticoïdes). On retrouve une*

vingtaine d'AINS, avec entre autres le diclofénac, l'ibuprofène et le kétoprofène parmi les arylcarboxyliques, le meloxicam parmi les oxicams et le célécoxib du groupe des inhibiteurs sélectifs de la cox-2 **Tableau 2.**

**Tableau 2** Les classes d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens et leurs indications thérapeutiques

<i>Molécules</i>	<i>Indications</i>
<p><b>AINS utilisés comme antalgiques-antipyrétiques :</b></p> <p><b>Ibuprofène, kétoprofène, diclofénac, naproxène, acide méfénamique</b></p>	<p>Traitement symptomatique des affections douloureuses et/ou fébriles</p> <p>Traitement symptomatique des dysménorrhées essentielles.</p>
<p><b>Classe des arylcarboxyliques (diclofénac, kétoprofène...)</b></p> <p><b>Classe des fénamates (acide niflumique)</b></p> <p><b>Classe des oxicams (piroxicam, meloxicam, ténoxicam)</b></p> <p><b>Classe des indoliques (indométacine, sulindac)</b></p>	<p>Traitement symptomatique au long cours des rhumatismes inflammatoires chroniques et de certaines arthroses douloureuses et invalidantes.</p> <p>Traitement symptomatique de courte durée de poussées aiguës des rhumatismes articulaires, arthroses, arthrites, lombalgies.</p> <p>Douleurs post-opératoires, crises de coliques néphrétiques, traumatologie, traitement adjuvant des manifestations inflammatoires en stomatologie ou chirurgie dentaire ou ORL.</p>
<p><b>Phénylbutazone</b></p>	<p>Traitement symptomatique au long cours de la spondylarthrite ankylosante.</p> <p>Traitement de courte durée (moins de 7 jours) des poussées aiguës de rhumatismes abarticulaires, goutte et radiculalgie sévère.</p>
<p><b>Nimésulide</b></p>	<p>Traitement symptomatique des arthroses douloureuses et invalidantes.</p>
<p><b>Célécoxib</b></p>	<p>Traitement symptomatique des douleurs de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde.</p>
<p><b>Parécoxib</b></p>	<p>Traitement à court terme des douleurs post-opératoires.</p>

D'après Pharmacomedicale.org ("Anti-inflammatoires non-stéroïdiens,"2022)

Comme le paracétamol, leur action passe par l'inhibition de cyclooxygénases. Cela va bloquer la synthèse de prostaglandines et de thromboxanes à partir de l'acide arachidonique ("Anti-inflammatoires non-stéroïdiens," n.d.). L'inhibition de la COX-2, inductible en réponse à des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , est responsable de l'effet anti-inflammatoire recherché. L'inhibition de la COX1 constitutive va elle déclencher les effets indésirables comme la toxicité rénale (maintien du flux sanguin par les prostaglandines), les troubles digestifs et ulcères gastroduodénaux ou la production de thromboxane A2.

**(ii) Les recommandations dans la prise en charge de la douleur chronique.**

Les AINS peuvent être utilisés comme antalgiques et antipyrétiques. Selon les sous-familles, on peut également les prescrire dans le traitement d'arthroses douloureuses et invalidantes, de poussées aiguës de douleurs articulaires d'origine rhumatoïde, arthrite ou lombalgies, pour les douleurs post opératoires, de stomatologie et les coliques néphrétiques.

La plupart des AINS ont un métabolisme hépatique et sont éliminés par voie rénale.

Les traitements antalgiques sont choisis selon leur efficacité sur le patient.

**a) L'aspirine (acide acétyl-salicylique)**

L'aspirine possède des propriétés à la fois analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires ainsi qu'antiagrégant plaquettaire.

Ses mécanismes

**(i) Mécanismes d'action**

L'aspirine est un dérivé de l'acide-salicylique. Comme les AINS, elle inhibe la synthèse des prostaglandines, pro-inflammatoires et pro-nociceptives, en agissant sur la COX-1 ainsi que la COX-2 au niveau périphérique.

**(ii) Les recommandations pour la prise en charge de la douleur**

Dans le cadre du traitement de la douleur, elle est prescrite en 3 prises de 1 gramme par jour. L'effet anti-agrégant plaquettaire est obtenu avec un dosage faible, inférieur à 300mg par jour, alors qu'on atteint l'effet anti-inflammatoire avec les posologies les plus élevées, pouvant être prescrites jusqu'à 6 grammes par jour maximum, en 4 prises espacées de 4 heures au

*minimum. Les effets indésirables principaux sont des troubles digestifs pouvant aller jusqu'à l'hémorragie digestive.*

*On la retrouve en association dans des spécialités avec plusieurs autres molécules : la caféine, la vitamine C ou le paracétamol principalement.*

*[...]*

### **3) Les antalgiques de palier II ciblant entre autres MOR**

*Leur objectif est de soulager les douleurs modérées à sévères. Ils sont représentés par les opioïdes faibles : la codéine, la dihydrocodéine et le tramadol.*

#### **a) La codéine et la dihydrocodéine**

*La codéine a une efficacité 10 fois plus faible que la morphine. Un dixième de la codéine en moyenne est métabolisé par le CYP2D6 en morphine, qui a un effet analgésique (voire le mécanisme d'action en II.D.4)b) ("Codéine," 2013)). Par conséquent son efficacité va dépendre de la présence et du variant de CYP2D6 qui possède le patient. De même la dihydrocodéine devient de la dihyromorphine grâce au même cytochrome et c'est son métabolite qui est actif sur les récepteurs du système opioïde ("DICODIN L.P. 60 mg, comprimé à libération prolongée -Résumé des caractéristiques du produit - Base de données publique des médicaments," 2022).*

#### **b) Le tramadol**

*Le tramadol possède un mécanisme d'action double : il a des **propriétés agonistes sur le récepteur  $\mu$  aux opioïdes ( $\mu$  opioïd receptor, MOR)**, mais il inhibe également la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. Le tramadol est une prodrogue, c'est après la O-déméthylation par les cytochromes 2D6 et 3A4 qu'on obtient un produit actif sur MOR ("Tramadol - an overview | ScienceDirect Topics," n.d.). Mais son action antalgique n'est pas uniquement due au système opioïde : lorsqu'on en bloque l'effet par de la naloxone, un antagoniste de MOR, on garde un effet antalgique important. La majorité de l'action du tramadol passe donc par sa deuxième propriété pharmacologique : il inhibe les enzymes de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.*

### **4) Les antalgiques de palier III**

*Les antalgiques de paliers III pour les douleurs sévères sont des opiacés ou opioïdes. Les opiacés sont dérivés de l'opium extrait du pavot *Papaver somniferum*. Ce sont donc des substances alcaloïdes d'origine naturelle, ou obtenues par hémisynthèse à partir des*



composants de l'opium. Le terme opioïde regroupe également des molécules synthétiques ayant le même mécanisme d'action.

### a) Leur prescription

La morphine par voie orale est considérée comme molécule de référence parmi les opioïdes, mais il en existe maintenant de nombreux, naturels ou synthétiques, dont la majorité a un pouvoir analgésique plus puissant **Tableau 3**.

Le tableau 2 ci-dessous montre la puissance analgésique obtenue par les opioïdes les plus couramment utilisés en médecine, comparée à celle de 10mg de morphine. Seules deux molécules nécessitent un dosage plus important pour avoir un effet analgésique équivalent à celui de la morphine : le tramadol et la codéine, qui sont des antalgiques de palier II.

La morphine par voie orale est la référence analgésique admise. D'autres voies d'administration ont un meilleur effet grâce à une plus grande biodisponibilité. D'autres agonistes de MOR ont été développés avec un pouvoir analgésique plus puissant, comme la buprénorphine ou le fentanyl.

**Tableau 3** Tableau d'équianalgésie des traitements opioïdes avec la morphine per os

Analgésiques	Équivalents posologiques	Rapport d'analgésie
Codéine	60 mg = 10 mg de morphine orale	1/6
Tramadol	50 mg = 10 mg de morphine orale	1/5
Morphine orale	référence étalon	1
Morphine intraveineuse	3,3 mg = 10 mg de morphine orale	3
Morphine sous-cutanée	5 mg = 10 mg de morphine orale	2
Hydromorphone	4 mg = 30 mg de morphine orale	7,5
Buprénorphine	0,2 mg = 6 mg de morphine orale	30
Nalbuphine (sous-cutanée)	5 mg = 10 mg de morphine orale	2
Fentanyl transdermique	25 µg/h = 60 mg de morphine orale par jour	100 à 150
Oxycodone orale	10 mg = 20 mg de morphine orale	2

D'après ("Recommandations Douleur de l'adulte," 2023)

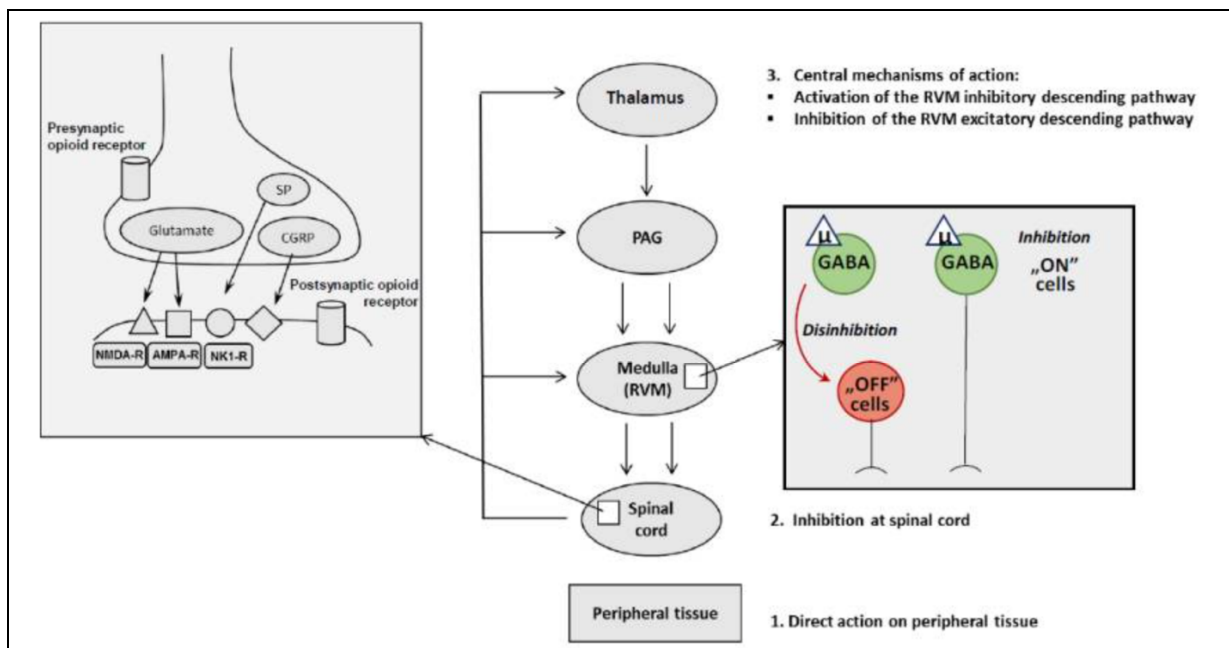
[...]

Concernant les opioïdes faibles ou moyens, le tramadol ne peut être prescrit que 3 mois depuis 2020. Il faut adapter sa posologie au patient, selon le but de traitement recherché.

Les opioïdes forts sont mis en 3ème ligne des traitements des douleurs chroniques, qu'elles soient neuropathiques, cancéreuses. Il faut bien définir les objectifs de traitements et surveiller le développement d'addiction pour ces traitements ("Fréquence médicale," 2021).

### b) Mécanismes d'action

Le système opioïde endogène est composé de 4 récepteurs couplés aux protéines G,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  et orphanine FQ/nociceptine. Ils sont principalement distribués dans des cellules nerveuses.

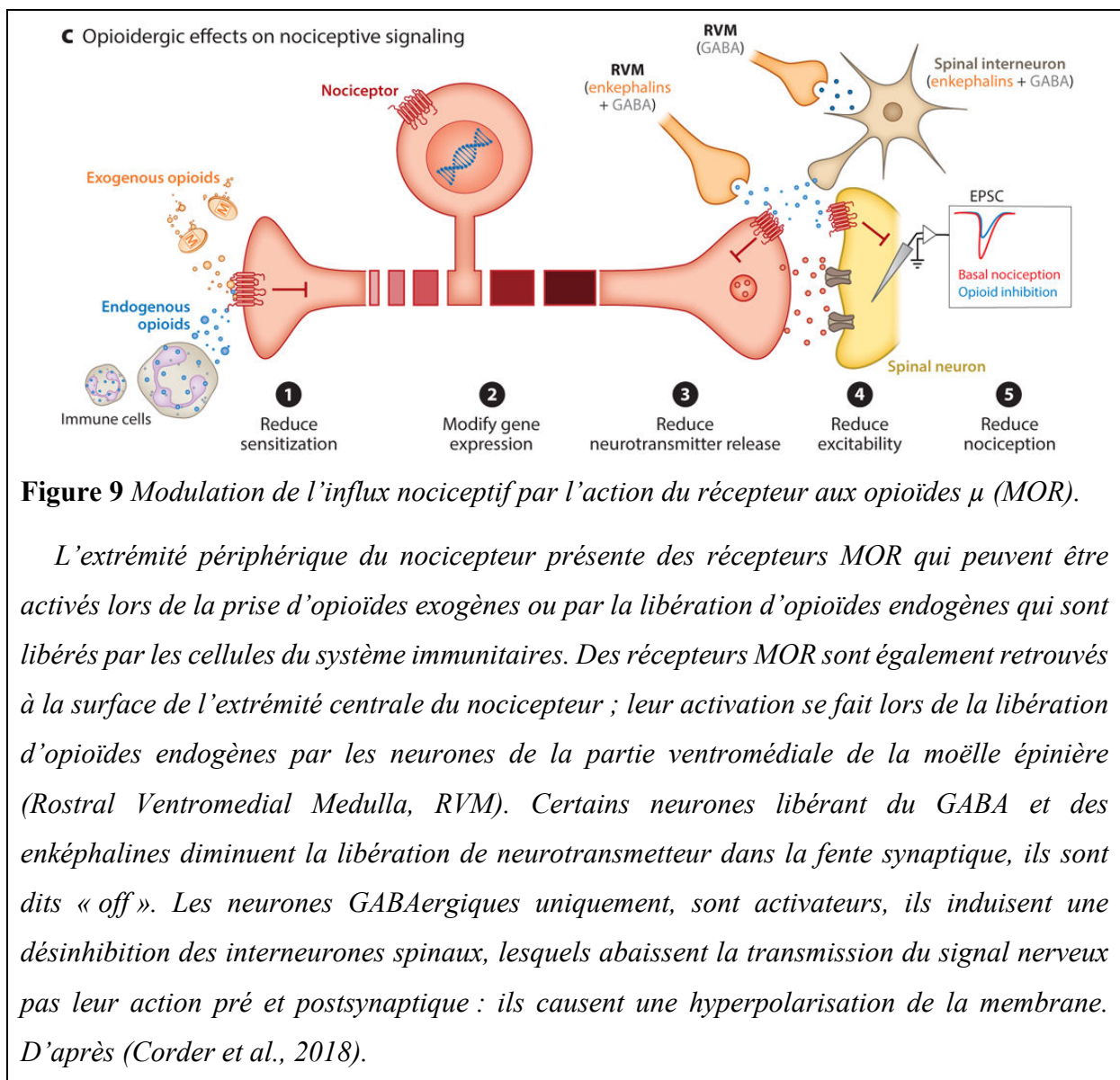


**Figure 8** Mécanismes d'action de la morphine.

Au niveau supraspinal, les analgésiques opioïdes stimulent MOR présent sur les interneurons GABAergiques, ce qui inhibe la libération de GABA dans le RVM. Le rôle du GABA est de bloquer le signal des cellules « OFF », de rétrocontrôle négatif, donc la diminution de sa libération va permettre au potentiel d'action d'être généré. Au niveau spinal, la morphine agit par l'intermédiaire de MOR présynaptique dans la corne dorsale de la moëlle épinière. L'activation du récepteur va bloquer la libération des neurotransmetteurs pronociceptifs (Glutamante, Substance P, CGRP) par le nocicepteur et donc empêcher la transmission du signal nociceptif aux neurones de second ordre. PAG : periaqueductal gray ; RVM : rostral ventromedial medulla ; GABA :  $\gamma$ -aminobutyric acid ; SP : substance P ; CGRP : calcitonin gene-related peptide ; NMDA-R : N-methyl-D-aspartate receptor ; NK1 : R-neurokinin-1 receptor ; AMPA : R- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor. D'après (Listos et al., 2019)

[...]

Le récepteur  $\mu$ , à 7 domaines transmembranaires, est couplé à une protéine intracellulaire  $G_i$ , inhibitrice. L'activation du récepteur par un agoniste va donc bloquer la transmission du message intracellulaire. Les récepteurs  $\mu$  aux opioïdes sont distribués sur les terminaisons nerveuses périphériques des fibres afférentes primaires mais également aux corps cellulaires des neurones de second ordre dans les lamina I et II de la corne dorsale de la moëlle épinière et dans le cerveau (Kohno et al., 1999). De cette façon, en les activant, la morphine va bloquer la génération du stimulus nociceptif à son origine, en périphérie, mais également lors de son relai dans la moëlle épinière et de son intégration consciente au niveau central (**Figure 9**).



*La morphine reste une substance de référence dans le traitement de la douleur, aigue mais également chronique. Pourtant des effets indésirables et paradoxaux, divers autant que nombreux, y sont associés. Un traitement par des opioïdes entraîne des effets épigénétiques durables. Les gènes concernés sont impliqués dans la croissance cellulaire au niveau des gonades, dans la mort et la morphologie d'autres cellules comme les macrophages et dans l'excitabilité neuronale.*

*Associations de traitements :*

*La morphine est le gold standard des douleurs de type cancéreuses, mais son efficacité peut être optimisée avec une association avec des anesthésiques locaux ou de la clonidine (Taira, 2008). La clonidine est un dérivé alphasymphomimétique, c'est-à-dire un agoniste partiel des récepteurs adrénergiques  $\alpha_2$ . Son action sur les récepteurs localisés dans le bulbe rachidien lui donne des propriétés antihypertensives, mais elle est aussi reconnue pour avoir un effet sédatif et renforcer l'effet analgésique de la morphine. Le récepteur  $\alpha_2$  adrénergique est présent dans la corne dorsale de la moëlle épinière, où transitent les messages nociceptifs. Le récepteur  $\alpha_2$  adrénergique médie la régulation de la transmission nociceptive par son action sur le rétrocontrôle descendant exercé par la noradrénaline (Bahari and Meftahi, 2019). La seule autorisation de mise sur le marché de la clonidine est le traitement de l'hypertension artérielle, mais son efficacité en association avec des analgésiques commence à être mise en évidence dans plusieurs essais cliniques (Joshi et al., 2000).*

## **5) Les effets indésirables des opioïdes non liés à la douleur**

### **a) Les propriétés antitussives**

*Les propriétés antitussives de certains opioïdes, comme la codéine et la dextrométorphane, proviennent de leur effet dépressif sur les centres respiratoires. Les mécanismes responsables sont l'activation des récepteurs MOR ou KOR et l'antagonisme du récepteur DOR. Il est probable que les propriétés antagonistes du récepteur NMDA participent également à la diminution des toux après la prise de codéine (Brown et al., 2004).*

### **b) Les propriétés émétiques**

*La morphine est responsable de plusieurs effets indésirables de type gastro-intestinaux.*

*Il a été constaté depuis des décennies que la morphine par voie intra veineuse (10mg pour 70kg) est responsable de nausées durant deux heures chez 70% des patients, allant jusqu'aux vomissements pour 60% des sujets sains (Thompson et al., 1995).*

*Une autre étude a mis en avant des nausées et vomissements chez environ un tiers des patients après analgésie post chirurgicale. Cette fois-ci le traitement intraveineux était à hauteur de 0,12mg/kg, soit 8,4mg / 70kg (Cann et al., 2002). Ces deux études ont également conclu que contrairement aux théories en cours, cet effet n'était pas dû au métabolite actif de la morphine, la morphine-6-glucuronide.*

### **c) La constipation**

*Le phénomène de constipation, induit lors de la prise d'opiacés, est un effet indésirable fréquent et sous-évalué. Sa prise en charge est donc d'autant plus retardée.*

*Elle concerne 51 à 87% de patients cancéreux traités avec de la morphine, et la moitié des patients recevant chroniquement de la morphine pour une autre pathologie qu'un cancer (Bertrand, 2006).*

*Cet effet provient de l'action du récepteur  $\mu$  aux opioïdes, non pas dans les neurones sensoriels ou le cerveau mais de celui localisé dans la sous-muqueuse digestive. Son activation par la morphine bloque la libération de neurotransmetteur, ce qui entraîne un manque du signal nécessaire à la stimulation motrice du péristaltisme et d'autres phénomènes moteurs du tube digestif. Elle s'accompagne d'une baisse des sécrétions digestives et d'une augmentation de la déshydratation du bol digestif ainsi qu'une contraction sphinctérienne (Farmer et al., 2019).*

*Pour pouvoir poser le diagnostic de constipation induite par l'usage d'opiacés, on a recourt à la grille de critères « Rome IV » (Aziz et al., 2020).*

*Pour lutter contre cet effet indésirable, on peut utiliser des antagonistes des récepteurs opioïdes à effet périphérique ne passant pas la barrière hémato encéphalique. Dans ce cas, ils atteignent les récepteurs MOR du tube digestif empêchant la constipation, mais pas ceux du système nerveux central, permettant un maintien de l'effet analgésique recherché. On trouve par exemple la méthylnaltréxone par administration sous cutanée, le naloxéol par voie orale ou la naldémédine par voie orale.*

### **d) Les démangeaisons**

*Cet effet indésirable provient d'une interaction entre la morphine et la production/sécrétion d'histamine au niveau cardiovasculaire (Liu et al., 2011).*

### e) La dépression respiratoire

*Le récepteur  $\mu$  aux opioïdes est retrouvé dans les centres de contrôle de la respiration, où on détecte la concentration en  $CO_2$  et  $O_2$  dans le sang. L'action de la morphine va biaiser l'estimation faite de leurs taux et la surestimation va ralentir la respiration du patient jusqu'à l'arrêter. Ce mécanisme est responsable des décès par surdose aux opiacés. Le traitement de cet arrêt respiratoire, lorsqu'il est détecté à temps, est une administration de naloxone, l'antagoniste du récepteur MOR (0,4 à 2mg, en IV, par 0,1mg toutes les 2 minutes, jusqu'à obtenir un rétablissement suffisant de la fréquence respiratoire. ("Naloxone," 2017))*

### f) L'addiction

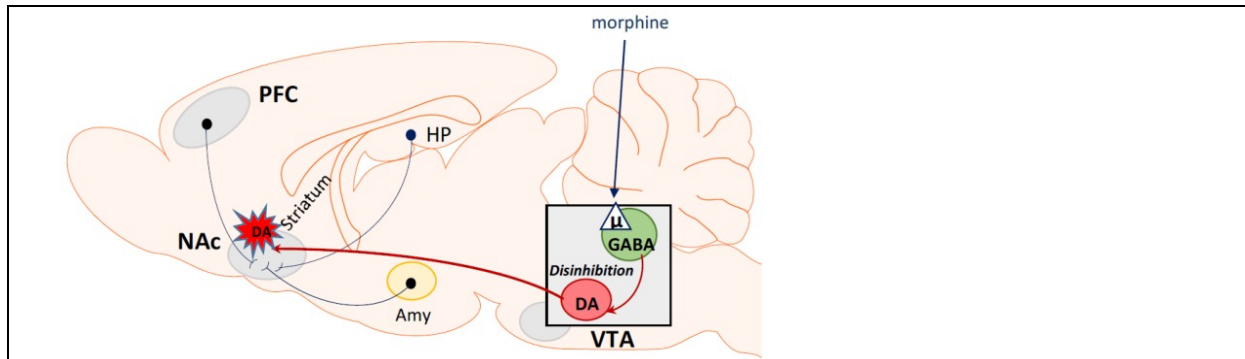
*En plus de leur tolérance, les opioïdes ont des capacités addictives importantes (**Figure 10**) et leur arrêt brutal est responsable d'un syndrome de sevrage physique important. On y trouve comme symptômes, 8 à 12h après la dernière prise : transpiration, insomnies, douleurs articulaires, musculaires et osseuses, agitation, anxiété, crampes abdominales, diarrhée et larmoiements. Ces symptômes sont majorés autour du 2<sup>ème</sup> jour et durent en moyenne 10 jours. En revanche, la recherche compulsive de la substance par le patient persiste bien plus longtemps. Une étude, menée grâce aux données Medicare, a montré que pour près de 50 000 patients en rémission ayant pris des opioïdes pendant leur traitement, ont une consommation bien plus élevée d'opiacés que les sujets contrôle (2,5 fois supérieure chez les patients atteints de cancer colorectal) et cette différence de consommation met en moyenne 6 ans à s'égaliser (Salz et al., 2019). Cette observation met en avant le risque de prescrire des analgésiques opiacés pour soulager des douleurs aiguës car il y a une probabilité non négligeable que cet usage perdure bien au-delà de la douleur initiale à cause des propriétés addictives des opioïdes.*

*Il est possible que les symptômes d'addiction et de sevrage observés dans la dépendance aux opiacés soient liés à des mécanismes moléculaires similaires à ceux de la tolérance analgésique : il semble y avoir une suractivation de la voie AMPc / protéine Kinase A et de la réponse AMPc à la liaison d'un agoniste (Christie, 2008). Ces activations peuvent avoir un impact sur la plasticité neuronale, ce qui modifie durablement les voies neuronales activées en réponse aux opiacés. Le récepteur aux opioïdes  $\mu$ , par sa localisation et les modifications entraînées par son activation, va stimuler les voies de la récompense, renforçant progressivement l'addiction. Les projections des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et sur le nucleus accumbens sont impliqués dans le développement des changements physiologiques et comportementaux observés dans les addictions. C'est le cas*

particulièrement dans la dépendance aux opioïdes ou à l'alcool. Deux mécanismes permettent l'addiction : la stimulation des neurones dopaminergiques dans l'aire tegmentale ventrale, dont l'axone fait ses synapses dans le Nucleus Accumbens (NAc) ; et le blocage des neurones GABAergiques inhibiteurs, qui laissent donc le champ libre à l'activation des neurones dopaminergiques dans la VTA. Cela augmente la facilité et la fréquence d'activation des neurones dopaminergiques.

Il a été montré que la libération de dopamine dans le NAc est corrélée avec des sensations d'euphorie chez les humains et l'inhibition des récepteurs à la dopamine chez le rongeur a montré leur importance dans les comportements d'auto-administration de drogue (Di Chiara et al., 2004).

Beaucoup de ces neurones expriment également du glutamate. Il semble que la libération simultanée de dopamine et glutamate soit cruciale dans les comportements addictifs (Buck et al., 2021). Le glutamate semble avoir un rôle dans la génération de vésicules synaptiques dopaminergiques dans les neurones dans le nucleus accumbens. Lors de l'activation des neurones pas les opiacés, on pourra alors avoir une libération de dopamine plus importante par la stimulation.



**Figure 10** Voies d'activation du système de récompense par la morphine.

La morphine active MOR localisé dans les neurones GABAergiques de l'aire tegmentale ventrale. L'activation de la protéine  $G_i$  du RCPG va empêcher la libération de GABA, neurotransmetteur inhibiteur, dans la fente synaptique. Les neurones dopaminergiques sont donc activables, ce qui stimule dans la libération de dopamine dans le nucleus accumbens. PFC : prefrontal cortex ; Nac : nucleus accumbens ; HP : hypothalamus ; Amy : amygdala ; VTA : ventral tegmental area ; GABA :  $\gamma$ -aminobutyric acid ; DA : dopamine . Extrait de (Listos et al., 2019).

*La méthadone, agoniste complet, la buprénorphine, agoniste partiel et la naltrexone, antagoniste de MOR, sont les molécules de référence recommandées par l’OMS (Abuse and Organization, 2009) pour soulager les patients souffrant de dépendance aux opioïdes et limiter les rechutes (Wang et al., 2019).*

### **g) Les troubles de l’humeur**

*Les effets psychoactifs des opiacés sont nombreux et comportent une somnolence, une baisse de la vigilance mais également une euphorie intense et des hallucinations. Ces deux derniers points sont à l’origine de la prise récréative de certains dérivés opioïdes comme l’héroïne ou le fentanyl.*

*D’un point de vue neurologique, il a été montré depuis longtemps que l’activation des récepteurs opioïdes a des conséquences sur le système dopaminergique, au niveau des corps cellulaires, des terminaisons nerveuses afférentes et efférentes. La production cérébrale d’enképhalines endogènes, les peptides agonistes des récepteurs opioïdes, est corrélée à celle de la dopamine.*

*L’administration de morphine impacte l’activité des neurones dopaminergiques dans l’aire tegmentale ventrale : on constate une diminution de la libération de dopamine, de sa recapture et de son métabolisme (Schmauss and Emrich, 1985).*

*Ensemble, ces effets indésirables ainsi que la prescription facilitée d’une forme à libération prolongée d’oxycodone (Oxycontin<sup>R</sup>) engendre depuis une dizaine d’année une explosion des morts par overdose d’opiacés aux États-Unis (Mattson et al., 2021). Depuis 2015, 50 000 personnes par an y sont décédées par overdose aux opioïdes, qu’ils soient prescrits ou illicites. Ce nombre a atteint 92 000 morts en 2020. Cela provient grande partie d’un mésusage de ces composés. Une prescription facilitée par la loi américaine, avec des informations fallacieuses sur le faible caractère addictif de ces molécules a conduit à une surprescription d’opiacés aux États-Unis. Il est estimé qu’1,7 millions d’américains font un mésusage d’opioïdes prescrits et 650 000 souffrent d’une addiction à l’héroïne, dont 80% ont initialement reçu une prescription médicale d’opiacés à visée antalgique (National Institute on Drug Abuse, 2021).*



## **6) Les effets paradoxaux de la morphine**

### **a) La tolérance analgésique**

#### **(i) Description du phénomène**

*Parmi les effets indésirables des opiacés, la tolérance analgésique est problématique pour l'efficacité de l'analgésie recherchée par le traitement.*

*La tolérance analgésique correspond à une baisse de l'analgésie obtenue par une même dose administrée, lors d'un traitement répété. Ainsi, il faudra augmenter la quantité de morphine administrée pour maintenir une analgésie similaire. Ce résultat a pu être mis en évidence à de nombreuses reprises dans des modèles murins où l'analgésie produite par la morphine est évaluée quotidiennement (Elhabazi et al., 2014).*

[...] NB : Les mécanismes supposés en sont décrits en III.D p.68

### **b) L'hyperalgésie induite par les opiacés**

#### **(i) Description du phénomène**

*L'hyperalgésie, qui se traduit par une diminution du seuil de sensibilité à la douleur, est un phénomène qui paraît assez contradictoire avec l'effet principal des opioïdes qui est de soulager la douleur. Pourtant, il est bien connu et de nombreuses fois décrit (Lee et al., 2011). On parle alors d'hyperalgésie induite par les opiacés (HIO). Son identification remonte à plus d'un siècle, par Abutt en 1870 qui parlait de la morphine en disant qu'elle « tend à encourager chaque douleur qu'elle prétend soulager ». Une décennie plus tard, un médecin allemand, Rossbach, décrivait dans un article ce phénomène observé sur des patients cancéreux “when dependence on opioids finally becomes an illness of itself, opposite effects like restlessness, sleep disturbance, hyperesthesia, neuralgia, and irritability become manifest.” (Rossbach, 1880).*

*Cette adaptation a été ensuite observée chez des rongeurs et cela même avec une dose de 1mg/kg, trop faible pour obtenir une analgésie visible (Alizadeh et al., 2014; Bianchi et al., 2011; Milne et al., 2013; Sanna et al., 2015). Des études cliniques ont également pu mettre en évidence l'apparition de cette hypersensibilité chez des patients traités par opioïdes (Hayhurst and Durieux, 2016). L'HIO a été décrite dans les cas de douleurs post chirurgicales, les douleurs lombaires, les douleurs cancéreuses et musculosquelettiques, chez les patients*

*souffrant de dépendance (Compton et al., 2001) mais également chez les sujets sains (Mauermann et al., 2016).*

## **(ii) Mécanismes supposés**

*L'une des raisons évoquées pour expliquer le développement de cette hypersensibilité est l'existence d'un isoforme spécifique différent du récepteur.*

*Ce variant de récepteur, à 6 domaines transmembranaires avec un résidu N terminal extracellulaire tronqué, serait couplé à une protéine  $G_s$  qui activerait les cellules au lieu de les inhiber, facilitant ainsi le développement des stimuli douloureux (Gris et al., 2010).*

*[...]*

*Il reste un autre mécanisme pouvant mener à une hypersensibilité. En effet, lors d'une inflammation systémique, on trouve également une réponse du système immunitaire présent autour du système nerveux central ; les astrocytes et la microglie vont entretenir l'excitation des neurones de second ordre en relarguant également des substances pro-inflammatoires de type chemokines, cytokines ou glutamate par exemple. Les opioïdes vont avoir une action sur cette production, en l'entretenant même en absence de blessure ou d'infection, exacerbant le message nociceptif (Martyn et al., 2019).*

*Pour limiter le développement de l'HIO et préserver les patients, on recommande d'avoir recours à des changements de traitement au bout de quelques mois. Les effets indésirables des différentes molécules ne sont pas aussi intenses selon le traitement et le patient (Mercadante and Bruera, 2016; Ramasubbu and Gupta, 2011).*

*Pour limiter l'apparition de ces effets contre productifs, on peut recommander l'utilisation de la buprénorphine associée à la naloxone (antagoniste du récepteur MOR) dans le traitement de la douleur de patients dépendant aux opiacés : il semble y avoir un effet bénéfique qui passerait par une réduction de l'hyperalgésie induite par les opiacés, bloquée par la présence d'un antagoniste MOR dans le mélange (Chen et al., 2014). »*

Suite à la limitation qu'elle représente dans la prise en charge de la douleur, la tolérance analgésiques aux agonistes MOR est le sujet de nombreuses études. Elle dépendrait à la fois de mécanismes de tolérance cellulaire, incluant la diminution de MOR fonctionnels par désensibilisation et internalisation par les bêta-arrestines et du renforcement de la signalisation

contraire, comme la suractivation de l'adénylate cyclase, et des modifications adaptatives des circuits de la douleur du système nerveux, y compris le développement de l'hyperalgésie induite par les opioïdes (Cahill et al., 2016 ; Khan et Mehan, 2021 ; Roeckel et al., 2016).

D'autres mécanismes sont étudiés pour expliquer le développement de la tolérance analgésique, comme l'activation de systèmes anti-opioïdes, pro-nociceptifs, qui contrebalanceraient l'inhibition des voies nerveuses par les peptides opioïdes endogènes. Plusieurs systèmes présentent des propriétés anti-opioïdes y compris les récepteurs à peptides RFamides, dont les propriétés pronociceptives sont très étudiées au sein de notre équipe de recherche (Drieu la Rochelle et al., 2018; Quillet et al., 2016; Roeckel et al., 2016).

La tolérance analgésique à l'agoniste MOR dépend du ligand et récemment les recherches se sont penchées sur le développement d'agonistes biaisés vers la protéine G, qui vont favoriser l'activation de cette voie de signalisation uniquement, au lieu de ligands activant à la fois la protéine G et les voies des bêta-arrestines (Kelly et al., 2023). Face aux limitations thérapeutiques actuelles dans la prise en charge de la douleur chronique, nous nous sommes penchés sur un autre récepteur aux opioïdes, le récepteur aux opioïdes delta (DOR), qui présente des propriétés anti-nociceptives intéressantes et dont l'activation produit moins d'effets indésirables que l'activation de MOR.

### **III. Le récepteur opioïde delta : état de l'art et potentiel thérapeutique**

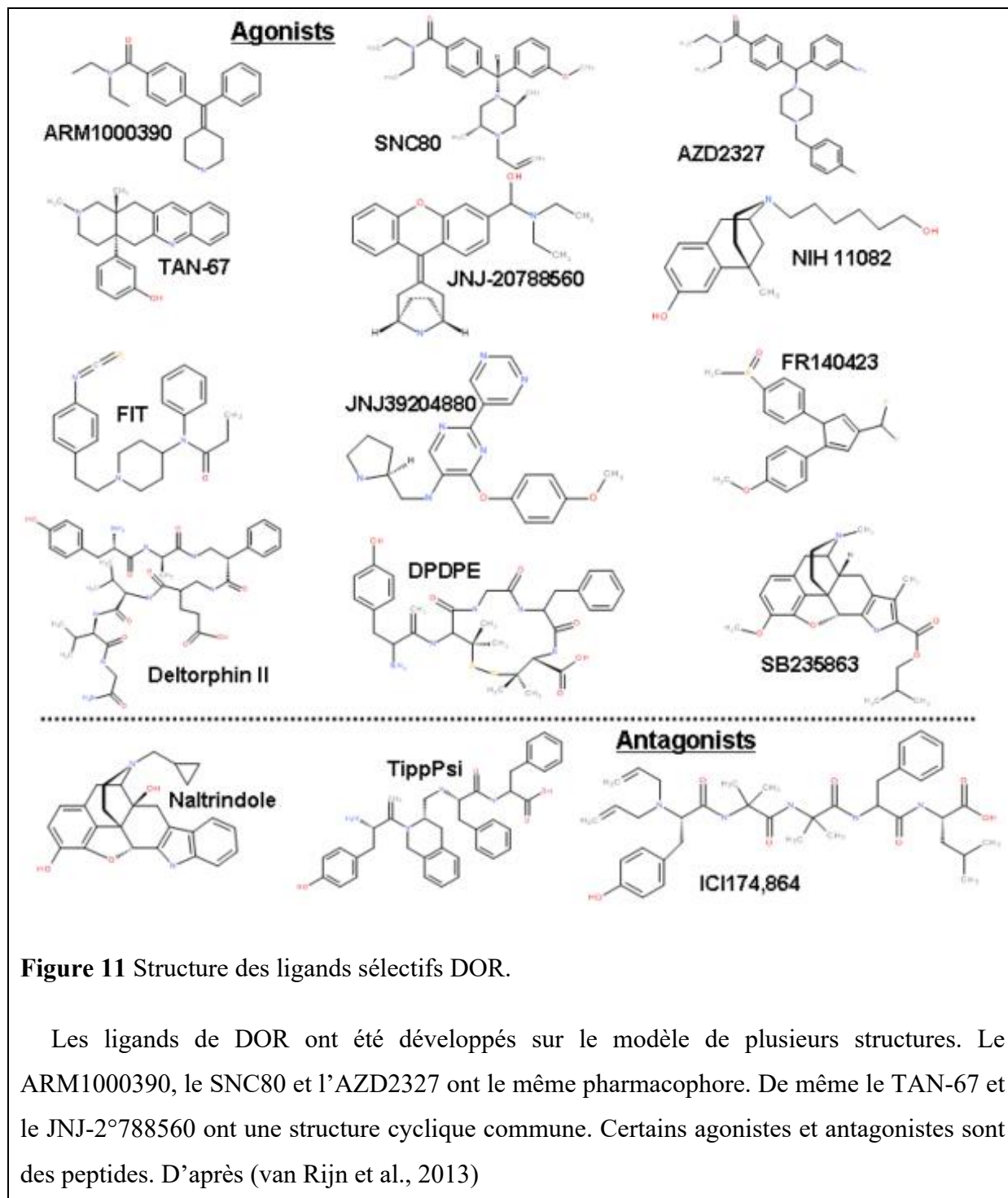
#### **A. Description générale de DOR**

Des récepteurs du système nerveux liant la naloxone, molécule antagoniste de l'effet des opiacés, ont été décrits pour la première fois en 1973 (Pert and Snyder, 1973). Depuis, trois récepteurs opioïdes ont été différenciés, avec l'identification de leurs séquences ainsi que de leurs structures.

Le récepteur opioïde delta est un récepteur de 371 acides aminés (Kieffer et al., 1992). Plus de 90% des aminoacides de la séquence primaire de DOR sont conservés entre la souris, le rat, le singe et l'humain (Gendron et al., 2019). Le gène *opr1* qui code pour DOR (Kieffer et al., 1992) se trouve sur le chromosome 4 chez la souris, 5 chez le rat et 1 chez l'humain (Befort et al., 1994; Bzdega et al., 1993; Kaufman et al., 1994).

## 1) Les agonistes modèles utilisés pour l'étude de DOR

En trente ans, le nombre de ligands sélectifs du récepteur delta opioïde qui ont été développés est non négligeable (Figure 11).



**Figure 11** Structure des ligands sélectifs DOR.

Les ligands de DOR ont été développés sur le modèle de plusieurs structures. Le ARM1000390, le SNC80 et l'AZD2327 ont le même pharmacophore. De même le TAN-67 et le JNJ-2°788560 ont une structure cyclique commune. Certains agonistes et antagonistes sont des peptides. D'après (van Rijn et al., 2013)

Ils ont été plus ou moins caractérisés *in vitro* et dans des modèles précliniques, en particulier chez le rongeur. Certains ont atteint les premières phases des essais cliniques. Leur

développement est majoritairement axé sur le traitement de la douleur chronique, en particulier migraineuse, mais également comme anxiolytique et antidépresseur.

Les deux petites molécules qui ont été utilisées au cours de cette thèse comme modèles d'agonistes entraînant une tolérance ou non sont le SNC80 et le ARM1000390 (ou ARM390). Leur structure est très proche, seules des « chaînes latérales » sont ajoutées sur le SNC80. Ces variations suffisent néanmoins à différencier les effets obtenus sur plusieurs aspects, aussi bien la tolérance analgésique observée que le comportement du récepteur subcellulaire ou les effets indésirables associés. Le naltrindole est l'antagoniste sélectif de référence de DOR qui a été utilisé au cours de cette thèse pour vérifier la sélectivité d'action des agonistes.

### a) Le SNC80

Le SNC80 est la plus ancienne petite molécule sélective de DOR, synthétisée pour la première fois en 1994 par Calderon. Sa formule ((+)-4-[( $\alpha$ R)- $\alpha$ -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethyl benzamide se synthétise en  $C_{28}H_{39}N_3O_2$ , ce qui lui donne un poids moléculaire de 450 g/mol (**Figure 11**). Son affinité pour les récepteurs opioïdes a été déterminée par liaison de radioligand sur des membranes de cerveau par Bilsky en 1995. Une valeur d'affinité ( $K_i$ ) de 1,78nM a été obtenue pour DOR, contre 881nM pour MOR et 441nM pour KOR (Bilsky et al., 1995). Plus récemment, Pradhan et collaborateurs (Pradhan et al., 2009) ont déterminé une valeur de  $K_i$  de 9,1nM en compétition avec du naltrindole radiomarqué, cette valeur est associée à une concentration efficace pour activer 50% de la protéine G associée à DOR de 121nM en test de liaison du [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S, sur des membranes de cerveaux de souris DOR-eGFP. Il a depuis été utilisé comme référence pour l'étude de DOR dans de nombreux articles (**Tableau 6**).

#### (i) Effet *in vivo*




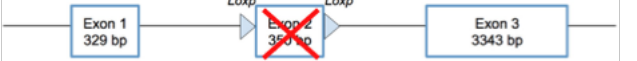
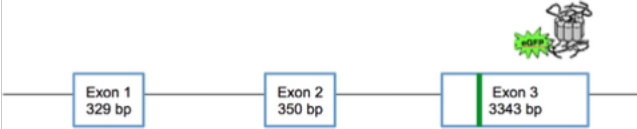
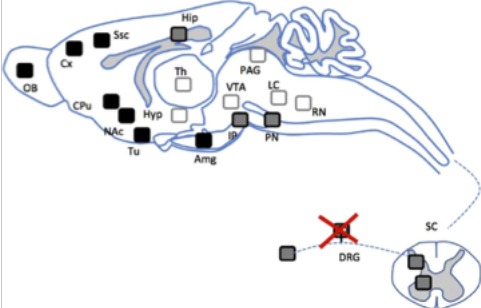
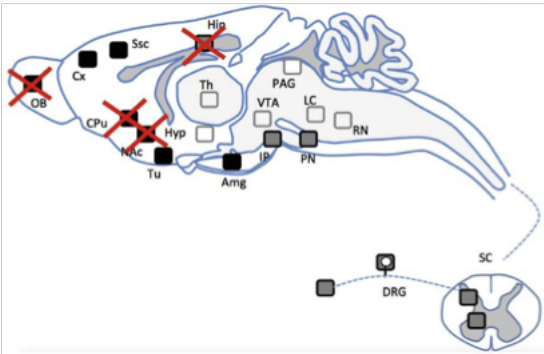
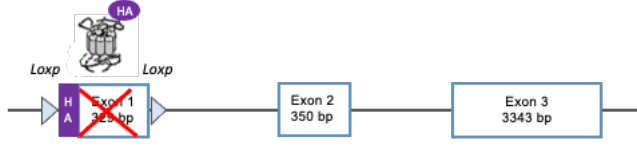
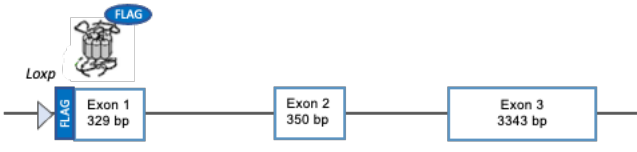
Le SNC80 est communément administré par injection intrapéritonéale (i.p.), pour un traitement systémique, à une concentration de 10mg/kg. Dans la majorité des cas, son effet analgésique est évalué 45min après cette administration.

### b) Le ARM390

#### (i) Généralités

Le AR-M1000390 ou ARM390 est un agoniste dérivé du SNC80, développé par Astra Zeneca, qui a été beaucoup moins étudié. Le ARM390 n'occupe que partiellement le domaine

**Tableau 4** Modèles animaux génétiquement modifiés pour permettre l'étude de DOR

Mouse model	Genetic mutation	References
Wild-type		Evans et al. (1992), Kieffer et al. (1992)
DOR-KO <sub>exon 2</sub>		Zhu et al. (1999), van Rijn and Whistler (2009a,b)
DOR-KO <sub>exon 1</sub>		Filliol et al. (2000)
DOR <sup>CMV</sup> KO		Gaveriaux-Ruff et al. (2011), Chu Sin Chung et al. (2014, 2015)
DOR-eGFP		Scherrer et al. (2006)
DOR <sup>Nav1.8</sup> cKO		Gaveriaux-Ruff et al. (2011)
DOR <sup>Dlx5/6</sup> cKO		Chu Sin Chung et al. (2014, 2015)
HA-DOR <sup>flox</sup>		Su et al., 2017
FLAG-DOR <sup>f</sup>		Degradmaison et al., 2020

Adapté de (Vicente-Sanchez et al., 2016)

de liaison du SNC80 (Wei et al., 2000). Pourtant, son Ki pour le récepteur DOR sur des membranes de cerveau est de 2,3nM, soit une affinité équivalente à celle du SNC80, mais une

EC50 de 169nM par test de liaison de [<sup>35</sup>S]GTPγS après activation de la protéine G (Pradhan et al., 2010).

### (i) Utilisation *in vivo*

Lors de ses quelques utilisations *in vivo* dans la littérature, le ARM390 est administré par voie orale (p.o.) pour éviter le développement d'inflammations au site d'injection (Pradhan et al., 2009). Mais la quantité utilisée est souvent de 60mg/kg au lieu de 10mg/kg comme le SNC80 (Blaine and van Rijn, 2023; Chu Sin Chung et al., 2015a).

## 2) Les outils génétiques disponibles pour l'étude du rôle de DOR

Il existe de multiples modèles de souris génétiquement modifiées permettant d'étudier le rôle physiologique de DOR. Ils sont résumés dans le **Tableau 4**.

### a) Les souris déficientes pour le récepteur delta opioïde

Dans un premier temps, pour déterminer les mécanismes de douleur et d'analgésie dans lesquels DOR est requis, des animaux génétiquement modifiés pour être Knock-out (KO) pour le gène codant pour DOR, ont été créés.

#### (i) Les KO constitutifs DOR

Il existe 3 modèles décrits de KO totaux de DOR. L'un est déficient pour l'exon 1 (Filliol et al., 2000), l'autre est déficient pour l'exon 2 (Zhu et al., 1999) et un troisième est généré par croisement avec une délétion sous la dépendance du promoteur CMV (Gaveriaux-Ruff et al., 2011).

#### (ii) Les KO conditionnels

Plusieurs KO conditionnels ont également été créés pour étudier le rôle de DOR dans des sous familles de populations cellulaires. Des souris *Oprd1<sup>fl/fl</sup>*, dont le gène DOR est flanqué de sites LoxP, ont été utilisées. Parmi elles se trouve le DOR<sup>Nav1.8</sup> cKO spécifiquement inactivé grâce à la Cre recombinase dans les neurones exprimant le canal sodique Nav1.8 (Weibel et al., 2013) déficient dans les neurones sensoriels périphériques Aβ et Aδ (Bennett et al., 2019), ou dans les neurones GABAergiques du proencéphale, grâce à un croisement avec des souris exprimant la Cre recombinase sous la dépendance du promoteur *Dlx5/6* (Chu Sin Chung et al., 2015b). Le gène *Oprd1* floxé a été utilisé également pour que, croisé avec des animaux GFAP-Cre, le récepteur DOR soit excisé du génome spécifiquement dans les astrocytes (Reiss et al., 2021).

## **b) Les souris knock-in**

Les RCPG sont des cibles contre lesquelles il est difficile d'obtenir des anticorps spécifiques. Ils sont dans l'ensemble profondément enchâssés dans la membrane plasmique et la zone pouvant servir d'épitope est limitée à leur extrémité N-ter, C-ter et aux boucles intra- ou extracellulaires. De plus, bien qu'ils soient impliqués dans la régulation de mécanismes fins, nombreux et variés, les RCPG sont des protéines très faiblement exprimées de façon endogène, il est donc complexe de détecter leur présence spécifiquement et de les différencier du bruit de fond (Bardoni et al., 2014). Plusieurs équipes ont donc généré des lignées de souris exprimant le récepteur DOR fusionné à une protéine rapportrice, de sorte à pouvoir suivre cette protéine rapportrice plutôt que le récepteur lui-même, particulièrement dans des études de biochimie et d'imagerie.

### **(i) Les souris DOR-eGFP**

Décrites par Grégory Scherrer et collaborateurs en 2006 (Scherrer et al., 2006), ces souris ont fait l'objet de nombreuses études et ont été utilisées au cours des travaux décrits dans ce manuscrit de thèse. La enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) a été insérée dans l'exon 3 du gène codant pour DOR de manière à être exprimée en fusion avec la partie carboxyl terminale (C-ter) intracellulaire du récepteur.

Les souris DOR-eGFP présentent un niveau d'expression de DOR connu comme étant 1,5 fois plus élevé que le nombre de récepteur présent dans les souris sauvages. La distribution de DOR-eGFP est similaire aux animaux sauvages. Il a été vérifié en particulier que DOR-eGFP était bien exprimé dans les mêmes régions cérébrales, mais également que sa distribution était équivalente chez les mâles et les femelles, avec une co-expression dans les neurones positifs pour la parvalbumine, la calbindine et la somatostatine (Erbs et al., 2012). On observe un peu plus de DOR-eGFP à la membrane plasmique et le SNC80 entraîne son endocytose dans le caudate putamen. Elles ont un fond génétique C57Bl6/J ; 129SvPas (50/50). Ces souris ont été utilisées pour les travaux présentés dans cette thèse.

### **(ii) HA-DOR**

Des souris HA-DOR (ou HA-DOPr) portant une protéine étiquette dérivée de l'hémagglutinine de la grippe (HA) en N-ter de l'exon 1 ont été générées par Su et collaborateurs en 2017 (Su et al., 2017). Ces souris ont permis le suivi de HA-DOR par immunohistochimie à



l'aide d'anticorps anti-HA. La distribution de HA-DOR est similaire à celle attendue, il est présent dans le bulbe olfactif, le cortex et l'hippocampe.

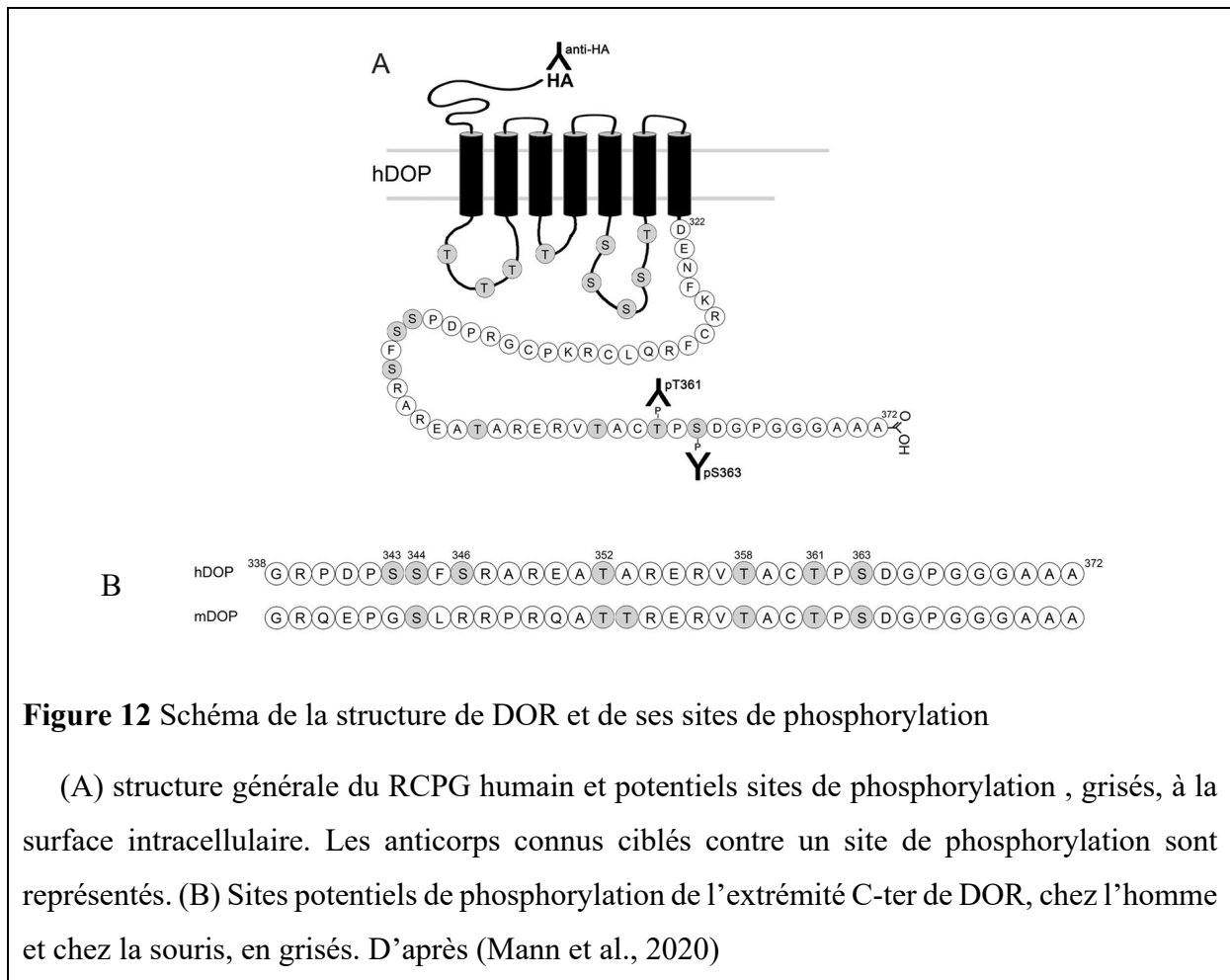
### (iii) FLAG-DOR

Les souris FLAG-DOR (ou FLAG-DOPr) ont été décrites pour la première fois en 2020 par l'équipe de Louis Gendron (Degrandmaison et al., 2020). L'insertion de l'étiquette FLAG en N-ter de DOR leur a permis d'immunoprécipiter le récepteur et de déterminer le premier interactome de DOR *in vivo*.

## 3) Structure et distribution de DOR

### a) Structure de DOR

La structure tertiaire de DOR a été élucidée par cristallographie pour la première fois en 2012 par l'équipe de Kobilka (Granier et al., 2012). Depuis, sa conformation en association avec deux ligands, le peptide agoniste KGCHM07 et la petite molécule agoniste DPI-287, est connue grâce à Claff et collaborateurs (Claff et al., 2019). Le docking de dérivés de ces ligands,



**Figure 12** Schéma de la structure de DOR et de ses sites de phosphorylation

(A) structure générale du RCPG humain et potentiels sites de phosphorylation, grisés, à la surface intracellulaire. Les anticorps connus ciblés contre un site de phosphorylation sont représentés. (B) Sites potentiels de phosphorylation de l'extrémité C-ter de DOR, chez l'homme et chez la souris, en grisés. D'après (Mann et al., 2020)

dont l'agoniste SNC80, ont également été comparés (Claff et al., 2019; Wang et al., 2023; Zhuang et al., 2022). Il a également été observé que DOR était sujet aux modifications post translationnelles, comme la N-glycosylation des résidus N18, N33, S6, S25 et S29 à son extrémité N-terminale (Lackman et al., 2014), ainsi qu'une palmitoylation en C328 et C333 de sa partie C-terminale (Merkouris et al., 1996), impliquant des interactions protéines-protéines, des hétéromérisations, avec MOR en particulier (DiCello et al., 2020; Dietis et al., 2011; Erbs et al., 2015).

## **b) Distribution de DOR**

### **(i) Distribution anatomique de DOR**

#### ***(a) Expression de DOR dans les neurones du système nerveux central***

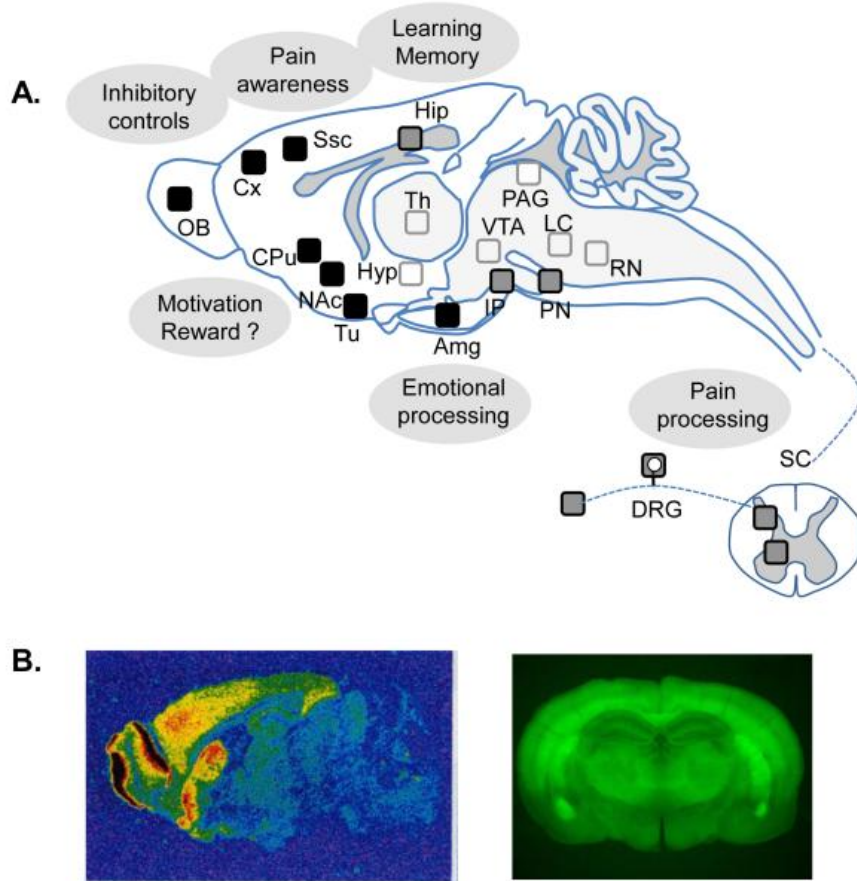
Dans le système nerveux central, le récepteur DOR est exprimé dans des structures cérébrales qui ont un rôle dans la réponse émotionnelle, comme l'anxiété ou la dépression, mais aussi la mémoire spatiale comme l'hippocampe dorsal. Il est également présent dans de nombreuses structures impliquées dans la régulation de la douleur, comme dans le cortex cérébral, le striatum, l'amygdale, la moëlle épinière (**Figure 13**) (Pradhan et al., 2011).

Au niveau cellulaire, DOR a été observé dans des neurones exprimant GAD65 et GAD67, il est donc synthétisé par des interneurons GABAergiques, inhibiteurs. Il n'est pas présent dans des neurones positifs pour VGLUT1 ou VGLU2, et n'est donc pas exprimé par les interneurons excitateurs. On le retrouve co-exprimé avec la somatostatine et les proenképhalines dans la couche granuleuse et le gyrus denté ainsi qu'avec le neuropeptide Y au niveau de l'hippocampe (Williams et al., 2011)(Erbs et al., 2012).

Chez l'homme, au niveau cérébral, la distribution est comparable à la souris : on retrouve le récepteur delta de la couche II à la VI du cortex préfrontal, occipital, dans l'hippocampe et dans le striatum. En revanche, il ne serait pas trouvé dans la moëlle épinière (Peckys and Landwehrmeyer, 1999).

#### ***(b) Expression de DOR dans les neurones du système nerveux périphérique***

Lors des premières expériences, Peckys et Landwehrmeyer n'ont pas observé DOR dans les GRD (Peckys and Landwehrmeyer, 1999). Depuis, il y a été mis en évidence à de multiples



**Figure 13** Distribution de DOR dans le système nerveux de la souris

(A) Représentation schématique des zones de liaison de ligands radioactifs avec DOR. Les zones où DOR est le plus abondant sont (carrés noirs) le bulbe olfactif, l'amygdale et le striatum. L'expression de DOR est modérée dans les zones indiquées d'un carré gris (interpeduncular and pontine nuclei, hippocampe, moëlle épinière et GRD) et faiblement exprimée dans l'hypothalamus, le thalamus, le mésencéphale, et le brain stem (carré ouverts). Ces aires sont impliquées dans la douleur, la génération d'émotions et les systèmes de récompenses, de mémorisation et d'apprentissage. (B) La distribution de DOR a été visualisée en coupe sagittale par autoradiographie après liaison de [<sup>3</sup>H]-deltorphine I ainsi qu'en coupe coronale à l'aide de récepteur fluorescent d'animaux knock-in DOR-eGFP. Abbreviations: Amg: amygdala; Cpu: Caudate putamen; Cx, cortex; DRG: dorsal root ganglia; FC: frontal cortex; Hip: hippocampus; Hyp: hypothalamus; IP, interpeduncular nucleus; LC: locus coeruleus; NAc: nucleus accumbens; OB: olfactory bulb = bulbes olfactifs; PN, pontine nucleus; PAG: periaqueductal gray = substance grise périaqueducale; RN: raphe nucleus; SC: spinal cord = moëlle épinière; Ssc: somatosensorial cortex; Th: thalamus; Tu: olfactory tubercle; VTA: ventral tegmental area. Extrait de (Pradhan et al., 2011).

reprises, souvent à l'aide de récepteurs DOR-eGFP (Mennicken et al., 2003; Bardoni et al., 2014; Ceredig et al., 2020) (**Figure 13 A**).

Une différence de distribution a été constatée entre humain et murin, dans le type cellulaire exprimant DOR dans les GRD. Seuls des neurones de petit et moyen diamètre expriment DOR chez l'homme, avec des projections dans la laminae I et II de la moëlle épinière, alors que tous les types de neurones seraient positifs dans les ganglions de souris (Mennicken et al., 2003).

Dans le système nerveux périphérique, on le retrouve également dans des neurones des ganglions rachidiens et des organes mécanosenseurs formant les corpuscules de Meissner, impliqués dans le développement d'une hypersensibilité mécanique (Bardoni et al., 2014).

### *(c) Expression de DOR par d'autres types cellulaires*

Dans l'ensemble DOR est décrit comme étant exclusivement neuronal (Erbs et al., 2012), mais l'équipe de Claire Gavériaux-Ruff a réalisé des animaux KO conditionnels de DOR dans les astrocytes (Reiss et al., 2021) et a pu observer un effet sur l'analgésie suggérant que l'expression y est présente et a un rôle dans la régulation de la douleur, avec des adaptations analgésiques différentes entre mâles et femelles.

DOR est exprimé dans des cellules du système immunitaire comme les macrophages, (Stratton et al., 2018)(Pirzgalska et al., 2017). Chez la souris, son ARNm a également été détecté dans les lymphocytes CD8+, dans le pancréas et dans le cœur ("Oprd1 (opioid receptor, delta 1) | Gene Report | BioGPS," 2023). Chez l'humain, Human Protein Atlas indique qu'en plus du système nerveux, DOR est enrichi dans les cellules entéroendocrines du colon, dans les cellules tubulaires proximales du rein, dans les cardiomyocytes, dans le foie et les lymphocytes T, dans les cellules endocrines pancréatiques  $\alpha$  et  $\beta$ , les myocytes des muscles squelettiques et les spermatogonies. ("Tissue Cell Type - OPRD1 - The Human Protein Atlas," 2023)

## **4) Fonction de DOR et de ses agonistes**

### **a) Antihyperalgésie**

Le récepteur opioïde delta faisant partie de la famille des opioïdes, son implication dans le système de régulation de la douleur a été démontrée à de nombreuses reprises.

Des agonistes peptidiques soit synthétiques, le DPDPE analogue des enképhalines (Mosberg et al., 1983) soit naturels, la deltorphine extraite de la peau de l'amphibien américain

*Phyllomedusa sauvagii* (Kreil et al., 1989), ont été les premiers outils pharmacologiques pour étudier le rôle de DOR dans la douleur. Puis de petites molécules chimiques ayant une bonne affinité et sélectivité pour DOR ont été développées, des agonistes (BW373U86 et son énantiomère le SNC80 (Bilsky et al., 1995)) et un antagoniste, le naltrindole, découvert en 1988 par Portoghesi (Portoghesi et al., 1988). Le rôle de DOR dans la douleur chronique a été largement décrit dans de nombreux modèles animaux (Gaveriaux-Ruff et al., 2011) (**Tableau 5, Tableau 6**).

**Tableau 5** Modèles de douleur expérimentaux dans lesquels des agonistes de DOR ont été évalués

Agoniste	Modèle de douleur	Espèce	Modalité de douleur	Références
<b>DPDPE/ DSLET</b>	Formaline	Rat		(Obara et al., 2009)
	Capsaïcine	Rat	Mécanique	(Saloman et al., 2011)
	Inflammatoire	Rat	Mécanique	(Stein et al., 1989; Zhou et al., 1998)27/10/2023 15:25:00
		Souris	Chaud	(Hervera et al., 2009)
	Neuropathique	Rat	Chaud et mécanique	(Obara et al., 2009)
		Souris	Chaud, froid et mécanique	(Hervera et al., 2010)
			Froid	(Mika et al., 2001)
	Cancer	Souris	Chaud	(Baamonde et al., 2005)
<b>Deltorphine</b>	Formaline	Souris		(Morinville et al., 2003)
		Rat		(Bilsky et al., 1995; Cahill et al., 2001; Pradhan et al., 2006)
	Inflammatoire	Rat	Mécanique	(Otis et al., 2011)
			Chaud	(Beaudry et al., 2009) (Cahill et al., 2003; Fraser et al., 2000; Mika et al., 2001)
		Souris	Chaud	(Gendront et al., 2007)
	Neuropathique	Rat	Mécanique	(Kabli and Cahill, 2007)
			Froid et mécanique	(Holdridge & Cahill, 2007)
			Froid	(Mika et al., 2001)
	Cancer	Souris	Chaud	(Otis et al., 2011)

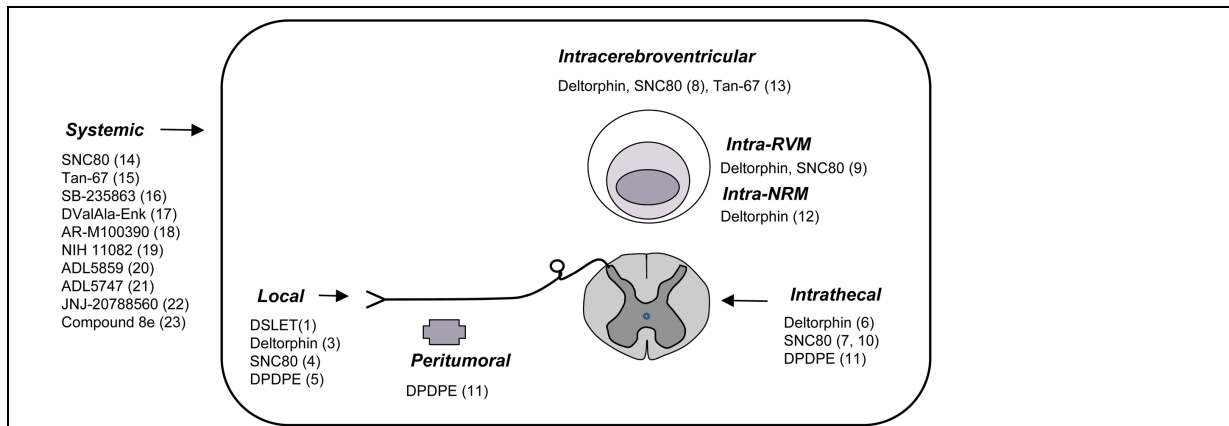
D'après (Gavériaux-Ruff and Kieffer, 2011).

**Tableau 6** Modèles de douleurs persistantes utilisés pour l'évaluation du SNC80

Agoniste	Modèle de douleur	Espèce	Modalité de douleur	Références
SNC80	Formaline	Souris		(Barn et al., 2001)
		Rat		(Obara et al., 2009)
	Hyperalgésie par GDNF	Rat	Mécanique	(Joseph and Levine, 2010)
	Hyperalgésie par NGF	Rat	Mécanique	(Joseph and Levine, 2010)
	Hyperalgésie par PGE2	Singe	Chaud	(Brandt et al., 2001)
		Rat	Mécanique	(Pacheco et al., 2005)
	Allodynie par dynorphine A	Rat	Mécanique	(Kawaraguchi et al., 2004)
	Inflammatoire	Singe		(Brandt et al., 2001)
			Rat	Chaud
		Rat	Mécanique	(Cao et al., 2001)
			Souris	Chaud
		Souris	Chaud et mécanique	(Pradhan et al., 2010, 2009) (Gavériaux-Ruff et al., 2008)27/10/2023 15:25:00
	Neuropathique	Singe	Chaud	(Brandt et al., 2001)
		Rat	Chaud et mécanique	(Obara et al., 2009)
		Souris	Mécanique	(Scherrer et al., 2009)s
Chaud et mécanique			(Gaveriaux-Ruff et al., 2011)	

GDNF : facteur neurotrophique dérivé de la glie, NGF : facteur de croissance neuronale, PGE2 : prostaglandines E2. D'après (Gavériaux-Ruff and Kieffer, 2011).

Il a été mis en évidence à de nombreuses reprises, chez les rongeurs (rat et souris) mais également chez le singe rhésus, aussi bien dans des modèles de douleurs persistantes d'origine inflammatoire, neuropathique que cancéreuse, que les agonistes DOR, qu'ils soient peptides endogènes ou exogènes ou petites molécules, ont un effet anti-hyperalgésiant. Cette conclusion a été confirmée dans les modalités thermiques au chaud et au froid, ainsi qu'en hyperalgésie et allodynie mécanique. De nombreuses voies d'administration des agonistes ont été empruntées pour étudier le rôle central et périphérique de DOR, avec des injections intrathécales ou intracérébroventriculaires de peptides, permettant d'avoir un effet central malgré la barrière hématoencéphalique (**Figure 14**). L'antagoniste sélectif de DOR, le naltrindole, a été utilisé pour mettre en évidence le rôle de DOR dans ces observations. Le blocage pharmacologique par le naltrindole ainsi que le blocage génétique chez les animaux KO-DOR montrent que DOR est responsable de l'analgésie observée lors de l'administration de SNC80, aussi bien dans la



**Figure 14** Voies d'administration d'agonistes empruntées pour évaluer l'analgésie due à DOR.

Le schéma résume les voies d'administration par lesquelles l'activation de DOR donne une réponse analgésique. Abréviations : NRM : noyau du raphe magnus, RVM : moëlle rostro-ventrale. Extrait de (Gavériaux-Ruff and Kieffer, 2011) Références : 1 (Obara et al., 2009) ; 3 (Bilsky et al., 1995; Kabli and Cahill, 2007) ; 4 (Pacheco et al., 2005) (Obara et al., 2009) (Joseph and Levine, 2010) (Gavériaux-Ruff et al., 2008) ; 5 (Stein et al., 1989) (Hervera et al., 2009; Zhou et al., 1998) ; 6 (Beaudry et al., 2009; Bilsky et al., 1996; Cahill et al., 2001; Dubois and Gendron, 2010; Gendron et al., 2007; Holdridge et al., 2007; Mika et al., 2001; Otis et al., 2011; Pradhan et al., 2006) ; 7 (Pacheco et al., 2005; Scherrer et al., 2009) ; 8 (Fraser et al., 2000) ; 9 (Hurley and Hammond, 2000) ; 10 (Kawaraguchi et al., 2004) ; 11 (Baamonde et al., 2005; Mika et al., 2001) ; 12 (Ma et al., 2006) ; 13 (Kamei et al., 1997) ; 14 (Barn et al., 2001; Brandt et al., 2001; Gallantine and Meert, 2005; Gavériaux-Ruff et al., 2008; Pradhan et al., 2009) ; 15 (Barn et al., 2001) ; 16 (Beaudry et al., 2009; Petrillo et al., 2003) ; 17 (Brainin-Mattos et al., 2006) ; 18 (Pradhan et al., 2010, 2009) ; 19 (Aceto et al., 2007) ; 20 (Bourdonnec et al., 2008) ; 21 (Bourdonnec et al., 2008) ; 22 (Codd et al., 2010) ; 23 (Jones et al., 2009).

modalité mécanique que thermique, en douleur inflammatoire, neuropathique et migraineuse (Gavériaux-Ruff et al., 2008; Pradhan et al., 2014).

En 1983, l'effet des agonistes de DOR a été évalué chez l'humain, par administration intrathécale de DADLE. Le patient avait déclaré un soulagement de la douleur cancéreuse persistante lors des premières administrations de l'agoniste, puis une diminution de l'effet, reflétant la tolérance analgésique (Onofrio and Yaksh, 1983).

## **(i) Effet antihyperalgésique du SNC80**

### ***(a) Effet du SNC80 sur la douleur persistante inflammatoire***

Aminah Pradhan et ses collaborateurs ont montré en 2010, dans un modèle de douleur chronique inflammatoire, générée par administration d'adjuvant complet de Freund (CFA) en sous-cutané (s.c.), aussi bien dans la queue pour une évaluation thermique, que dans la patte pour une évaluation mécanique, que cette molécule provoque une réversion de l'hyperalgésie lors de sa première administration (Pradhan et al., 2010). Après 3h, un quart de l'analgésie maximale est encore présente (Vicente-Sanchez et al., 2018).

### ***(b) Effet du SNC80 sur la douleur persistante neuropathique***

L'effet du SNC80 a été étudié en modèle de neuropathie diabétique. Elle est générée par administration à des rats de 65mg/kg (i.p.) de streptozotocine, une nitrosurée très toxique pour les îlots de Langerhans, qui par leur destruction va mimer un diabète de type I en l'espace d'une semaine. L'administration du SNC80 par voie intrathécale permet au jour 1 d'observer une analgésie mesurée par le test de von Frey.

Dans un modèle de douleur neuropathique induite par la ligature partielle du nerf sciatique (pSNL) le SNC80 a un effet analgésique, mais celui-ci est aboli dans les animaux cKO-Nav1.8 DOR, suggérant un rôle de DOR présent dans les nocicepteurs primaires dans l'analgésie due au SNC80 observée chez les animaux sauvages (Gavériaux-Ruff and Kieffer, 2011).

### ***(c) Effet sur la douleur persistante migraineuse***

La nitroglycérine en injection intrapéritonéale est un modèle utilisé pour mimer le mécanisme des migraines. Le SNC80 dans ce modèle présente un effet anti-hyperalgésique, aussi bien dans les modèles de douleur migraineuse aiguë que chronique. Dans ce cadre, l'administration de SNC80 tous les deux jours permet également de limiter le développement de mécanismes aversifs induits par la douleur, comme la préférence de place conditionnée (Pradhan et al., 2014).



## (ii) Effet analgésique du ARM390

L'analgésie initiale aigüe obtenue dans des modèles de douleur inflammatoire (CFA) ou migraineuse (NTG) est identique à celle du SNC80 : pour une dose de 10mg/kg, 45min après l'administration *per os* (p.o.), on constate un retour au seuil nociceptif basal, le ARM390 estompe donc l'hyperalgésie produite par l'inflammation de même que celle générée par la nitroglycérine. En revanche, cette analgésie dure moins de 3h (Vicente-Sanchez et al., 2018).

### b) Propriétés antidépressives et anxiolytiques

Le récepteur opioïde delta, en plus de son rôle dans la douleur, module d'autres fonctions, dont la régulation de certaines réponses émotionnelles. Les animaux déficients pour le gène *oprdl*, n'exprimant pas DOR, présentent un phénotype dépressif et une réponse anxieuse plus élevée que les animaux sauvages. Cette particularité n'est pas retrouvée chez les souris déficientes pour MOR ou KOR, différenciant les effets des récepteurs opioïdes (Filliol et al., 2000). Cette observation a été corrélée avec celle faite sur les animaux KO pour le propeptide des agonistes endogènes principaux de DOR, la proenképhaline. Cette fois encore, le niveau d'anxiété observé était anormalement élevé, confirmant l'implication du couple DOR/enképhalines dans la régulation du niveau de stress (König et al., 1996), suggérant ainsi que l'activation de DOR pourrait entraîner un effet anxiolytique. Cela a été confirmé par l'utilisation de dérivés de la deltorphine-II (Kotlinska et al., 2010). Par ailleurs, l'administration d'un inhibiteur de l'enkephalinase, en maintenant la concentration d'enképhalines à un niveau élevé, produit un effet antidépresseur à deux reprises (Tejedor-Real et al., 1998). Chez le rat, cette augmentation en enképhalines circulantes a permis de mettre en évidence une plus grande persistance de la nage dans le test de nage forcée, mais également une augmentation de la transcription de l'ARNm du BDNF (brain derived neurotrophic factor), qui serait impliquée dans l'efficacité clinique des antidépresseurs (Jutkiewicz et al., 2006).

### c) Apprentissage et mémorisation

DOR est exprimé dans des aires cérébrales importantes pour la mémorisation, comme l'hippocampe et les études comportementales ont montré que les animaux KO-DOR ont un déficit à l'apprentissage et pour les tâches motrices mettant en jeu l'hippocampe et le striatum (Le Merrer et al., 2013). Les résultats de déficience d'apprentissage sont également obtenus lors de l'administration de l'antagoniste sélectif naltrindole (Le Merrer et al., 2013). DOR semble également impliqué dans la prise de décision liée à une expérience préalable, en

particulier via des interneurones cholinergiques du striatum ventral (Bertran-Gonzalez et al., 2013).

#### **d) Peu d'effets indésirables opioïdes classiques provoqués par les agonistes de DOR**

La morphine est bien connue pour ses nombreux effets indésirables comme la constipation et la dépression respiratoire, pouvant mener au décès du patient en cas de surdosage, accrus par le risque de développement d'une addiction II.D.5)f).

L'effet de la morphine est obtenu majoritairement par stimulation du récepteur mu aux opioïdes. Il est aussi celui responsable des effets indésirables majeurs. En revanche, la stimulation de DOR par ses agonistes, bien qu'ayant un rôle dans le système émotionnel comme le montre l'apparition d'un effet anxiolytique et antidépresseur, ne produit pas les effets les plus pernicioeux de la morphine.

En effet, ni la dépression respiratoire ni la constipation ne semblent se développer chez les animaux traités par un agoniste DOR, contrairement à la morphine (Gallantine and Meert, 2005), rendant son usage potentiellement moins dangereux pour le patient.

Bien que DOR soit exprimé dans le système limbique, l'effet addictif des agonistes de DOR est peu documenté. Dikshtein a mis en évidence le rôle de DOR dans les symptômes d'addiction à la cocaïne et la recherche de la substance, car après le développement d'une addiction par administration répétée de cocaïne, l'autoadministration de cocaïne lors d'une phase de sevrage d'animaux dépendants est inhibée par l'ajout d'un antagoniste sélectif de DOR.

Dans plusieurs études sur la dépendance à l'alcool, DOR a été montré comme jouant un rôle protecteur des sujets. Il est suggéré que cet effet serait dû aux propriétés anxiolytiques des agonistes de DOR par action indirecte et non à un effet sur l'addiction. Cet effet est observé chez les souris déficientes DOR sur la prise d'éthanol, alors que celle de nicotine est augmentée, et le tétrahydrocannabinol et la morphine non impactés (Lutz and Kieffer, 2013).

### **5) Effets indésirables connus de l'activation de DOR par un agoniste**

#### **a) Hyperlocomotion**

L'activation de DOR par certains agonistes va être responsable d'une hyperlocomotion. Elle peut également amplifier l'hyperlocomotion générée par la prise de cocaïne (Kotlinska et al., 2010). Une hyperlocomotion a également été observée chez les animaux constitutivement déficients pour DOR (Filliol et al., 2000).

## **b) Convulsions**

Certains agonistes de DOR ont montré des propriétés convulsivantes. Elles sont de courtes durées et limitées par le développement d'une tolérance dès la deuxième administration d'agonistes. Elles seraient dues à la production de monoxyde d'azote (Khavandgar et al., 2002) et d'un mécanisme indépendant des effets anti-dépresseurs ou analgésiques (E. M. Jutkiewicz et al., 2005).

### **(i) Convulsions générées par le SNC80**

Un effet inattendu de l'activation de DOR par le SNC80 est le développement de crises de convulsions à la première administration, avec modification du tracé de l'électroencéphalogramme (Chu Sin Chung et al., 2015a). Il s'observe de manière dose-dépendante et une tolérance rapide se développe, dès la deuxième administration (Vicente-Sanchez et al., 2018). Ces convulsions sont inhibées par la coadministration de SNC80 avec l'antagoniste sélectif naltrindole (Blaine and van Rijn, 2023) et absente chez des KO totaux de DOR (Chu Sin Chung et al., 2015a), indiquant qu'elles proviennent d'une activité de DOR, mais l'utilisation de souris déficientes pour DOR dans les neurones GABAergiques suggère que ce serait par l'activation de DOR dans l'hippocampe et le striatum que l'épilepsie serait générée (Chu Sin Chung et al., 2015a).

### **(ii) Convulsions générées par ARM390**

Les effets épileptiques d'ARM390 ne sont pas inexistantes, mais environ 6 fois moindres que ceux du SNC80, les rendant exceptionnels plutôt que fréquents (Blaine and van Rijn, 2023).

## **c) Tolérance aux agonistes de DOR**

Dans les effets analgésiques comme dans les effets convulsivants, l'activation répétée de DOR est décrite comme conduisant au développement d'une tolérance à certains de ses agonistes. La tolérance correspond à une diminution de l'effet obtenu pour une même dose d'agoniste administrée. Elle est également observée chez d'autres RCPG, comme la réponse analgésique liée à l'activation des récepteurs MOR ou cannabinoïdes (voir II.D.6a) et III.D.)

### **(i) Tolérance analgésique au SNC80**

Si le SNC80 permet d'obtenir une analgésie dans de multiples modèles de douleur chronique, une limitation à son utilisation est importante : lors d'administrations quotidiennes, chez la souris, dès le jour 3, le SNC80 a perdu la majorité de son effet et la tolérance analgésique s'approfondit jusqu'à la 6<sup>ème</sup> administration (Bagheri Tudashki et al., 2020).

Une différence importante a été observée à la suite d'une seconde administration de SNC80 12 ou 24h après la première. En effet, si les deux injections d'agoniste sont espacées de 12h, l'effet antihyperalgésique est perdu lors de la deuxième administration, on parle alors de **tolérance analgésique aigue**, alors que si elles sont espacées de 24h, on retrouve une efficacité maximale de la molécule, dans la modalité thermique (Pradhan et al., 2010). Mais malgré cette nuance, un traitement quotidien avec le SNC80 par voie parentérale donne lieu à une perte complète de son effet après 5 jours, signant le développement complet de la **tolérance analgésique chronique**. Celle-ci est observée chez les animaux DOR sauvages aussi bien en modalité thermique que mécanique ainsi que chez les souris DOR-eGFP, confirmant qu'en réponse comportementale le récepteur en fusion avec la GFP réagit de la même manière aux stimulations. Pour l'étude de son mécanisme, un protocole avec une réadministration du SNC80 à 10mg/kg seulement 4h après la première injection a été établi pour précipiter l'apparition de la tolérance analgésique. Dans ces conditions, aucune analgésie n'est observée consécutivement à la deuxième administration (Pradhan et al., 2016).

### **(ii) Tolérance analgésique au ARM390**

Dans ces modèles, il développe une tolérance analgésique chronique similaire au SNC80 en administration quotidienne dans les modèles de douleurs migraineuses (Pradhan et al., 2014).

Lors de la précipitation de la tolérance par 2 administrations en 4h, l'ARM390 montre toujours un effet maximal lors de la deuxième administration (Pradhan et al., 2016). Le ARM390 n'entraîne pas de tolérance analgésique aigue.

En traitement croisé, ARM390 n'a pas d'effet après le SNC80 mais le SNC80 a un effet maximal conservé après le ARM390, indiquant que le mécanisme sous-jacent de la tolérance analgésique a un impact sur les agonistes DOR ne développant pas de tolérance, et que l'absence de tolérance visible avec ARM390 reflète bien une absence de mise en place de ce processus adaptatif (Pradhan et al., 2009).

**Les mécanismes supposés sont détaillés p.68 en III.D de l'introduction.**

## B. Fonctionnement de DOR

### 1) Couplage aux protéines G hétérotrimériques de DOR

Des souris rendues déficientes pour différentes sous-unités  $\alpha$  de protéines G, à l'aide d'oligonucléotides antisens, ont été utilisées pour montrer l'importance de DOR dans la nociception spinale et supra-spinale (Standifer et al., 1996) (Sánchez-Blázquez and Garzón, 1998). Standifer a inhibé la synthèse de  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_{x/z}$ . Sánchez-Blázquez and Garzón ont eux ciblé  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_{o1}$ ,  $G\alpha_{o2}$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$  et  $G\alpha_{q/11}$ .

L'effet d'un agoniste peptidique de DOR, le [2-D-penicillamin,5-D-penicillamin]-enkephalin) (DPDPE) sur la nociception est inhibé par l'administration spinale d'oligonucléotides anti- $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_q$  (Standifer et al., 1996). Seul  $G\alpha_{x/z}$  n'interagit pas avec DOR. L'inhibition la plus profonde de l'antihyperalgésie est celle provoquée par l'absence de  $G\alpha_{i1}$  (Standifer et al., 1996). Dans les expériences de Sánchez-Blázquez and Garzón, des oligonucléotides antisens de  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_{o2}$  et  $G\alpha_{11}$  ont été administrés par injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) aux souris et chacun a montré un impact sur la réponse aux agonistes de DOR selon les conditions évaluées (Sánchez-Blázquez and Garzón, 1998). Les délétions en  $G\alpha_{i2}$  et  $G\alpha_{i3}$  sont celles qui inhibent le plus profondément la réponse anti-nociceptive du DPDPE ainsi que celle de la deltorphine-II. L'association de DOR avec les protéines G semble pléiotropique selon la méthode utilisée pour l'évaluer (Piñeyro and Archer-Lahlou, 2007)(Tableau 7).

En cellules transfectées de récepteur DOR humain, une plus grande affinité de DOR pour  $G\alpha_{i1}$  que pour  $G\alpha_o$  a été montrée (Moon et al., 2001). DOR semble donc majoritairement associé à  $G\alpha_i$ , mais différents variants de la sous-unité  $\alpha$  peuvent également lui être associés ou participer indirectement à son effet dans la régulation de la douleur. En BRET, une réponse aux agonistes DOR a été observée pour  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_z$  et  $G\alpha_{oA}$  (Mansour et al., 2021).

### 2) Les cascades intracellulaires modulées par la protéine G

#### a) Voie activée par la sous-unité $\alpha$ de la protéine $G_i$

De l'activation de la protéine  $G_i$  associée à DOR va découler l'activation ou l'inhibition de nombreux processus cellulaires (illustrés Figure 15).

La voie canonique des protéines  $G_i$  est l'**inhibition de l'adénylate cyclase (AC)** par la sous-unité  $\alpha$ . Ce processus est majoritaire dans le striatum, en présence de l'**adénylate cyclase 5**, où

une **inhibition de la synthèse d'AMPC** est corrélée à une activation de la locomotion (Kim et al., 2006)(Olianas et al., 2012a).

**Tableau 7** Associations majoritaires de DOR avec les sous-unités  $G\alpha$  selon les conditions expérimentales

Pleiotropic DOR- $\alpha$ interactions			
<i>Physical interactions (transfected receptor/endogenous G protein)</i>			
CHO cells coimmunoprecipitation	DPDPE	$\alpha_o = \alpha_{i2} > \alpha_{i3}$	[130]
<i>Physical interactions (affinity of solubilized DOR for <math>\alpha</math>)</i>			
Solubilized DORs PWR (plasmon-waveguide resonance) <sup>a</sup>	Deltorphin II	$\alpha_o = \alpha_{i2} > \alpha_{i1} > \alpha_{i3}$	[25]
	DPDPE	$\alpha_o = \alpha_{i2} > \alpha_{i3} > \alpha_{i1}$	
	Morphine	$\alpha_{i3} > \alpha_o = \alpha_{i1} > \alpha_{i2}$	
	SNC	$\alpha_o > \alpha_{i2} = \alpha_{i3} > \alpha_{i1}$	
	TAN67	$\alpha_{i3} > \alpha_o > \alpha_{i1} > \alpha_{i2}$	
Pleiotropic $\alpha$ activation			
<i>Endogenous receptor/endogenous G protein</i>			
Brain membranes (PAG)	Deltorphin II	$\alpha_{i2} \gg \alpha_z$	[131]
	DPDPE	$\alpha_{i2} > \alpha_z$	
Neuroblastoma	DADLE	$\alpha_{i2}$	[132]
NG108-15	DADLE	$\alpha_o > \alpha_{i2} \gg \alpha_{i3}$	[133]
	DADLE	$\alpha_{o2} > \alpha_{i2} > \alpha_{o1} \gg \alpha_{i3}$	[134]
SH-SY5Y	DPDPE	$\alpha_{i1} > \alpha_{i2}; \alpha_{i3}; \alpha_{o1/2}$	[135]
SK-N-BE <sup>a</sup>	Deltorphin I	$\alpha_{o2} > \alpha_{i2}$	[26]
	DPDPE	$\alpha_{i2} = \alpha_{PTX-insensitive} > \alpha_{o2}$	
	Etorphine	$\alpha_{i2} = \alpha_{PTX-insensitive} \gg \alpha_{i3} > \alpha_{i1}$	
<i>Transfected receptor/endogenous G protein</i>			
CHO cells	DADLE	$\alpha_{i2} \geq \alpha_{o2} > \alpha_{i3}$	[136]
GH3 cells	DPDPE	$\alpha_{o1} \gg \alpha_{i2} = \alpha_o > \alpha_{i3}$	[137]
<i>Physical methods (ligand-mediated GTP<math>\gamma</math>S binding to DOR-G<math>\alpha</math> complex)</i>			
Solubilized DORs PWR (plasmon-waveguide resonance) <sup>a</sup>	Deltorphin II	$\alpha_{i2} = \alpha_o > \alpha_{i3} > \alpha_{i1}$	[25]
	DPDPE	$\alpha_{i1} > \alpha_{i2} > \alpha_{i3} > \alpha_o$	
	Morphine	$\alpha_{i1} \gg \alpha_o = \alpha_{i3} > \alpha_{i2}$	
	SNC	$\alpha_{i1} > \alpha_o > \alpha_{i3} > \alpha_{i2}$	
	TAN67	$\alpha_{i3} > \alpha_o > \alpha_{i2} > \alpha_{i1}$	
<i>Ligand affinity for fusion constructs containing different G<math>\alpha</math> subtypes</i>			
HEK 293 cells hDOR- $\alpha_{i1}$ vs hDOR- $\alpha_{o1}$	DADLE	$\alpha_{i1} > \alpha_{o1}$	[138]
Physiological evidence: analgesia			
Supraspinal analgesia <sup>b</sup> (PAG)			
	$\beta$ -endorphine	$\alpha_{i2}; \alpha_{i3}; \alpha_{x/z}$	[139]
	Deltorphin II	$\alpha_{i2}; \alpha_{i3}$	
	DPDPE		
	Deltorphin II	$\alpha_{i2}; \alpha_{i3}; \alpha_{o2}; \alpha_{i1}$ and $\alpha_q$	[140]
	DPDPE	$\alpha_{i2}; \alpha_{i3}; \alpha_{o2}; \alpha_{i1}$ and $\alpha_{o1}$	
Spinal analgesia	DPDPE	$\alpha_{i1} = \alpha_o = \alpha_q \geq \alpha_{i3} > \alpha_{i2} > \alpha_z$	[36]

<sup>a</sup> These studies provide evidence of ligand-specific receptor states.

<sup>b</sup> These studies are suggestive of ligand-specific receptor states.

Références : 25 (Alves et al., 2004) ; 26 (Allouche et al., 1999) ; 36 (Standifer et al., 1996) ; 130 (Law and Reisine, 1997) ; 131 (Garzón et al., 1997) ; 132 (McKenzie and Milligan, 1990); 133(Offermanns et al., 1991) ; 134 (Prather et al., 1994) ; 135 (Laugwitz et al., 1993) ; 136 (Prather et al., 1994) ; 137 (Prather et al., 2000) ; 138 (Moon et al., 2001) ; 139 (Sánchez-Blázquez et al., 1995) ; 140 (Sánchez-Blázquez and Garzón, 1998). Extrait de (Piñeyro and Archer-Lahlou, 2007)

## b) Voies activées par la sous-unité G $\beta$ / $\gamma$ de la protéine Gi

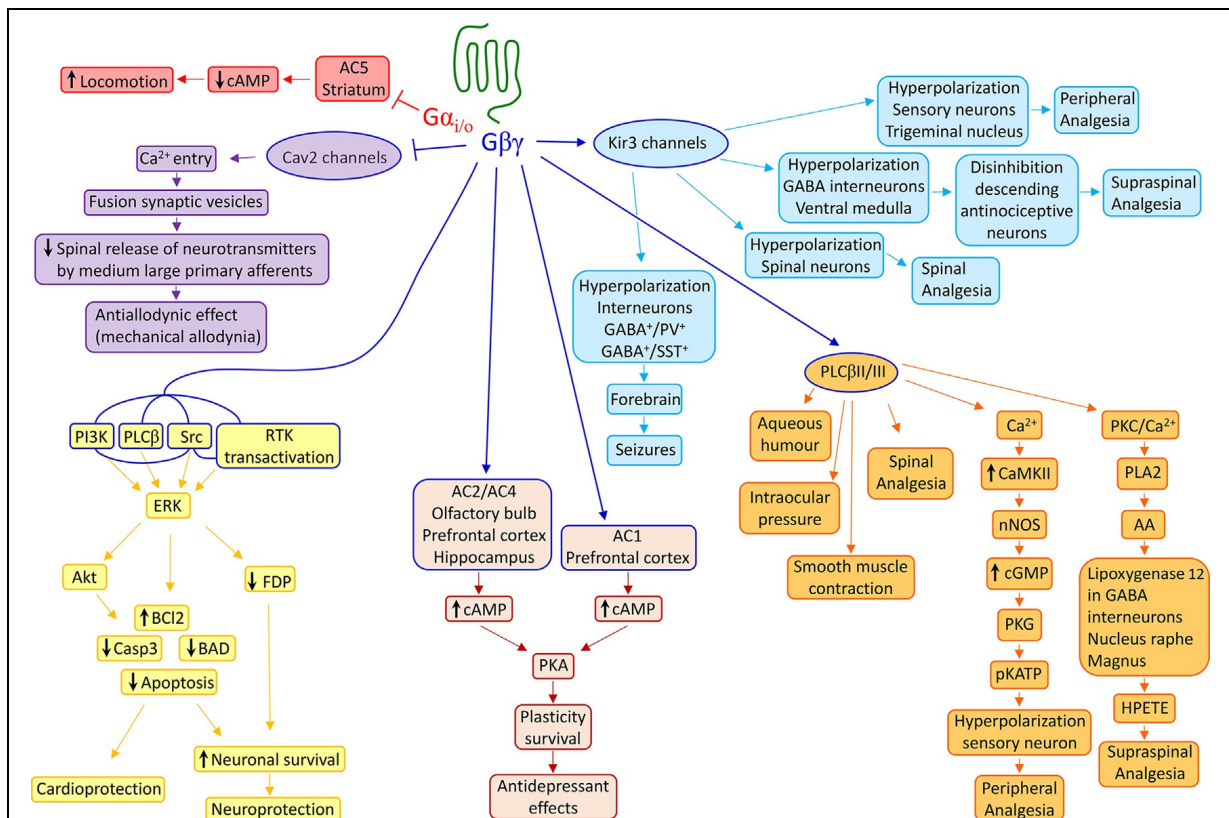
Dans le cortex préfrontal et l'hippocampe, c'est particulièrement la sous-unité G $\beta$ / $\gamma$ , induisant **l'activation des AC 1 et les 2 et 4** dans le bulbe olfactif, conduisant à une augmentation de l'AMPC, générant une plasticité par l'action de la PKA, qui serait responsable des effets anti-dépresseurs des agonistes de DOR (Olianas et al., 2012b) (Ujčíková et al., 2014). Cette idée est renforcée par la présence de troubles de la mémoire chez les animaux KO conditionnels DOR dans l'hippocampes (Pellissier et al., 2018).

L'activation de DOR va aussi se répercuter sur la **voie des MAP kinases**, qui contrôle la réponse aux stimuli stressants. Lors d'un stress métabolique, la sous-unité G $\beta$ / $\gamma$  de DOR active ERK, qui conduit à une augmentation du facteur anti-apoptotique Bcl2 parallèlement à une diminution de la caspase 3, de BAD et finalement de l'apoptose. Ce phénomène entraîne une augmentation de la survie des neurones exprimant DOR en cas de stress, soit une neuroprotection et une cardioprotection (Zheng et al., 2012).

Une autre voie activée par la sous-unité  $\beta/\gamma$  est la **voie PLC $\beta$ II/III**. La phospholipase C (PLC) hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en diacylglycerol (DAG) et inositol triphosphate (IP3). Cette voie va générer une analgésie périphérique (Gong et al., 2015), spinale (Overland et al., 2009) et supraspinale (Ohsawa et al., 1998) par différents intermédiaires, comme la libération de calcium par les compartiments intracellulaires et l'activation de PKC (Dortch-Carnes and Potter, 2003).

DOR va également être l'acteur de sa propre internalisation par l'activation de **la phospholipase D2** (Yang et al., 2010).

D'autres cibles des protéines G $\beta$ / $\gamma$  sont les canaux « **G protein-coupled inward rectifier potassium channels** » (**GIRK**), ou Kir3 (K<sup>+</sup> Inwardly Rectifying). C'est une interaction directe, des sous-unités  $\beta/\gamma$  de la protéine G consécutive à la stimulation de DOR qui conduit à leur activation (Nagi and Pineyro, 2014). L'ouverture du canal cause un efflux de potassium qui hyperpolarise la membrane neuronale, ce qui a pour effet de diminuer l'excitabilité neuronale et donc limiter la propagation du message nociceptif (Bruehl et al., 2013)(Nagi and Pineyro, 2014). Par ailleurs, DOR interagit de manière constitutive avec ces canaux, ce qui permet une réponse rapide lors de la libération des sous-unités de la protéine G et une détection de la conformation du récepteur, dépendant du ligand qui s'y est fixé (Richard-Lalonde et al., 2013).



**Figure 15** Cascades intracellulaires activées par la stimulation de DOR.

L'action du récepteur  $\delta$ -opioïde est médiée par les nombreux effecteurs activés par la sous-unité  $\alpha$  mais également  $\beta/\gamma$ . Abréviations utilisées—AC: adénylyl cyclase, cAMP: adenosine monophosphate cyclique, Ca<sub>v</sub>: canal calcique voltage-dépendant, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, PLC $\beta$ : phospholipase C $\beta$ , Src: proto-oncogene tyrosine-protéine kinase, RTK: récepteur tyrosine kinase, ERK: *extracellular signal-regulated kinase*, Akt : protéine kinase B, FADD: *Fas-Associated Death Domain*, Bcl2: *B-cell lymphoma 2*, Casp3: Caspase-3, BAD: *Bcl-2 associated agonist of cell death*, PKA: Protéine Kinase A AMPc dépendante, Kir3: *G protein-coupled inward rectifier potassium channels*, GABA:  $\gamma$ -aminobutyric acid, PV: parvalbumine, SST: somatostatine, CaMKII: *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- dependent protein kinase II*, nNOS: nitric-oxide synthase neuronale, cGMP: guanosine monophosphate cyclique, PKG: *cGMP-dependent protein kinase G*, pKATP: canal potassique sensible à l'ATP phosphorylé, PKC: protéine kinase C, PLA2: phospholipase A2, AA: acide arachidonique, HPETE: acide hydroperoxyeicosatetraenoïque. Extrait de (Gendron et al., 2019).

Nagi et collaborateurs ont montré que **Kir3** participe à l'activité analgésique des opioïdes chez le rongeur aussi bien que chez l'Homme (Nagi and Pineyro, 2014) ; en effet ce canal est en partie responsable de variabilités de réponses aux opiacés en clinique (Hibino et al., 2010).



La dernière voie régulée par la sous-unité  $G\beta/\gamma$  est celle des canaux calciques voltage dépendants **Cav2**. La sous-unité  $G\beta/\gamma$  va se fixer sur le segment intracellulaire du canal, ce qui empêche son ouverture. Ainsi on inhibe la fusion des vésicules synaptiques et la libération de neurotransmetteurs, en particulier à la projection centrale des nocicepteurs, au niveau présynaptique (Tejedor-Real et al., 1998).

### **c) Régulation de l'activité des protéines G hétérotrimériques**

Une famille de protéines appelées *Regulators of G protein signaling* (RGS) est impliquée dans la modulation de la réponse cellulaire de DOR. La protéine RGS4 se lie à l'extrémité C-ter de DOR et accélère l'activité ATPase de la sous-unité  $G\alpha$ , de sorte à mettre fin à l'activation du récepteur par un retour de la liaison au GDP, comme cela a été montré dans les cellules SH-SY5Y suite à l'administration de SNC80 (Georgoussi et al., 2006)(Wang et al., 2009).

*In vivo*, des animaux déficients pour RGS4 ont permis de montrer que ce régulateur est impliqué dans la fin de la réponse analgésique et antidépressive du SNC80, augmentant sa durée d'action dans ces deux paramètres en absence de RGS4 (Dripps et al., 2017).

## **C. Activabilité du DOR avant stimulation (préactivation) et après stimulation (tolérance), rôle du trafic membranaire complexe de DOR**

### **1) Localisation subcellulaire de DOR**

Chez l'animal, la localisation basale de DOR peut être décrite principalement membranaire, ou concentré dans des vésicules cytoplasmiques denses, qui adresseraient le récepteur à la membrane plasmique lors d'une stimulation extérieure de la cellule. Dans les neurones périphériques, à l'état basal, DOR est localisé principalement dans des vésicules intracellulaires. Son interaction forte avec le complexe protéique du coatamère 1 (COPI), responsable du transport des protéines de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique, renforce l'idée que DOR est principalement présent dans des vésicules intracellulaires à l'état basal.

Il y a deux hypothèses à cette pré-activation fonctionnelle, celle liée au trafic membranaire et celle liée à une séquestration de DOR sous une forme inactive.

## 2) Trafic membranaire de DOR : exocytose, endocytose, adressage au lysosome et recyclage

### a) Adressage à la membrane plasmique et protéines impliquées

Comme toute protéine membranaire, les RCPG ont besoin d'être maturés puis dirigés vers leur localisation intracellulaire correcte. Pour cela, après leur maturation dans l'appareil de Golgi, la machinerie du cytosquelette est requise. Parmi elle, les filaments d'actine, l'*actin severing protein*, la cofiline et la Lim Domaine Kinase (LIMK) sont mises en jeu pour le transport de DOR (Salvarezza et al., 2009) (**Tableau 8**). Pour parvenir à la membrane plasmique, les récepteurs sont pris en charge par le système de régulation des voies de sécrétion (**Figure 16**).

Les facteurs de recrutement à la membrane liés à des mécanismes inflammatoires décrits comprennent la bradykinin (Patwardhan et al., 2006) ou l'agent inflammatoire CFA (Cahill et al., 2003). Une exposition prolongée à des agonistes MOR comme la morphine ou des stress physiologiques peuvent aussi mener à sa présentation à la membrane plasmique (Gendron et al., 2016) (**Tableau 9**). La paroxetine, un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, a récemment été démontrée capable de rendre DOR compétent dans les neurones périphériques dans un modèle de douleur neuropathique, en absence de situation pathologique ou de stress (Brackley and Jeske, 2022).

#### (i) *In vitro*

Concernant DOR, l'adressage à la membrane plasmique est complexe. DOR a été décrit de nombreuses fois comme étant majoritairement intracellulaire à l'état basal, dans des vésicules denses (Gendron et al., 2019).

#### (ii) *In vivo*

Certaines études ont été réalisées à l'aide d'un anticorps anti-DOR montré non sélectif ultérieurement, mais depuis des données ont été obtenues grâce au récepteur étiqueté DOR-eGFP (Pettinger et al., 2013). Elles confirment un recrutement de DOR à la membrane plasmique lors d'une préactivation (**Tableau 9**).

**Tableau 8** Protéines et chaperonnes interagissant avec DOR pour son adressage à la membrane plasmique.

Nom de la protéine	Rôle	Références
Cofiline	Activation de la cofiline augmente l'adressage de DOR à la membrane plasmique	(Mittal et al., 2013)
Complexe COPI	COPI interagit avec DOR et diminue son expression à la membrane plasmique	(St-Louis et al., 2017)
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchange regulatory factor-1 (NHERF-1)	NHERF-1 est une protéine de scaffolding qui par son interaction avec DOR augmente son expression à la surface de la cellule	(Bie et al., 2010)
Kinase dépendante de la cycline 5 (Cdk5)	Cdk5 phosphoryle DOR en Thr161 et augmente l'expression membranaire de DOR ainsi que l'analgésie obtenue	(Xie et al., 2009) (Beaudry et al., 2015)
SERCA2b	Participe au repliage et à la maturation de DOR	(Tuusa et al., 2010)
Calnexine	Se lie au récepteur DOR nouvellement synthétisé non replié	(Leskelaö et al., 2007)
Protéine de transport de récepteur 4 (TRP4)	Régule l'expression membranaire de MOR et DOR	(Décaillot et al., 2008)
Chaperonine contenant une sous-unité ETA de TCP-1 (CCT7)	Inconnu	(Génier et al., 2016)
GPCR-associated sorting protein 1 (GPRASP1)	Maintient DOR dans les endosomes	(Whistler et al., 2002)

D'après (Gendron et al., 2019)

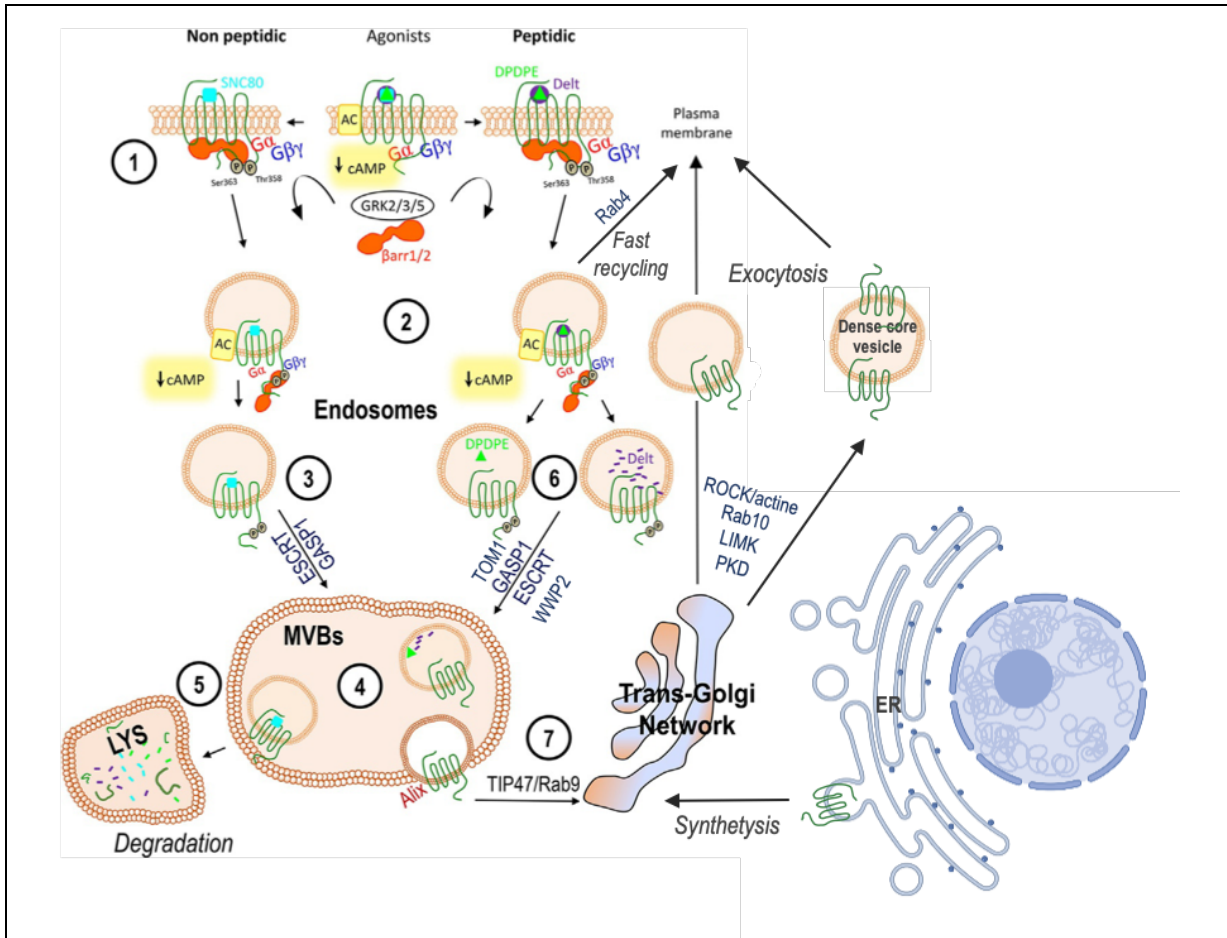
**Tableau 9** Stimuli entraînant un adressage à la membrane plasmique ou une préactivation de DOR.

Stimulus	Cible	Action	Références
2-MeSADP	P2Y1	Augmente l'insertion de DOR à la membrane plasmique	(Bao et al., 2003)
Bradykinine	B1 ou B2	Augmente l'insertion de DOR à la membrane plasmique Induit une compétence fonctionnelle de DOR	(Patwardhan et al., 2006; Pettinger et al., 2013)
Exposition chronique à l'alcool	n/d	Induit une fonctionnalisation de DOR dans la moëlle épinière	(van Rijn et al., 2012)
Inflammation chronique	variée	Augmente l'insertion de DOR à la membrane plasmique Augmente la réponse analgésique obtenue par stimulation de DOR	(Cahill et al., 2003; Cao et al., 2001; Fraser et al., 2000; Gendron et al., 2007, 2006; Hurley and Hammond, 2000)
Deltorphine	DOR	Redistribution de DOR, adressage à la membrane plasmique	(Bao et al., 2003) (Mittal et al., 2013)
Le test de narge forcée	n/d	Augmente l'insertion de DOR à la membrane	(Commons, 2003)
Hypoxic preconditioning	n/d	Induit l'expression de DOR et de Leu-enkephaline	(Gao et al., 2012)
Morphine	MOR	Augmente l'insertion de DOR à la membrane	(Gendron et al., 2006; Morinville et al., 2004; Walwyn et al., 2005)
NGF	TrkA	Augmente l'insertion de DOR à la membrane plasmique	(Bie et al., 2010)
Apprentissage prédictif	n/d	Augmente l'insertion de DOR à la membrane plasmique	(Bertran-Gonzalez et al., 2013)
Substance P	TRPV1	Augmente l'insertion de DOR à la membrane plasmique	(Gendron et al., 2006)
Trypsine	PAR-2	Induit une fonctionnalisation de DOR	(Patwardhan et al., 2006)
Privation d'eau	n/d	Induit une synthèse de DOR	(Stein et al., 1992)

Adapté d'après (Gendron et al., 2019)

### **b) Internalisation de DOR après activation et mécanismes**

Après la stimulation d'un RCPG par un agoniste, il peut être internalisé dans des puits de clathrine. Lors de l'activation de DOR par un agoniste, il a été démontré que DOR peut être rapidement et fortement internalisé, selon l'agoniste (**Tableau 10**)(**Figure 16**).



**Figure 16** Différentes régulations des récepteurs opioïdes selon le bas ou haut potentiel d'internalisation des agonistes.

(1) L'adressage et la relocalisation de DOR de la membrane vers le compartiment intracellulaire. La liaison d'un agoniste, suite à la phosphorylation du récepteur par les GRKs, recrute les  $\beta$ -arrestines. La signalisation par la protéine G est arrêtée lorsque la boncle des  $\beta$ -arrestines déloge la protéine  $G\alpha$  de sa conformation « core ». (2) La conformation « tail » des **arrestines** favorise l'internalisation du récepteur et la formation de magacomplexes qui supportent la signalisation par DOR-lié à l'agoniste pendant qu'ils traversent l'endosome. (3) Des ligands non peptidiques (SNC80) restent liés au récepteur pendant que la machinerie GASP1 et ESCRT le mènent comme vésicule intraluminale (ILV) vers le (4) MVB et (5) le lysosome pour dégrader le récepteur. (6) Les ligands peptidiques vont se dissocier du récepteur lors de l'internalisation à cause du pH acide de l'endosome et être dégradés dans les ILVs. (7) Ainsi, le récepteur non lié est exporté vers l'appareil de Golgi (TGN) et est réadressé à la membrane, recyclé. Adapté avec Biorender.com d'après (Gendron et al., 2019).

(i) *L'internalisation in vitro*

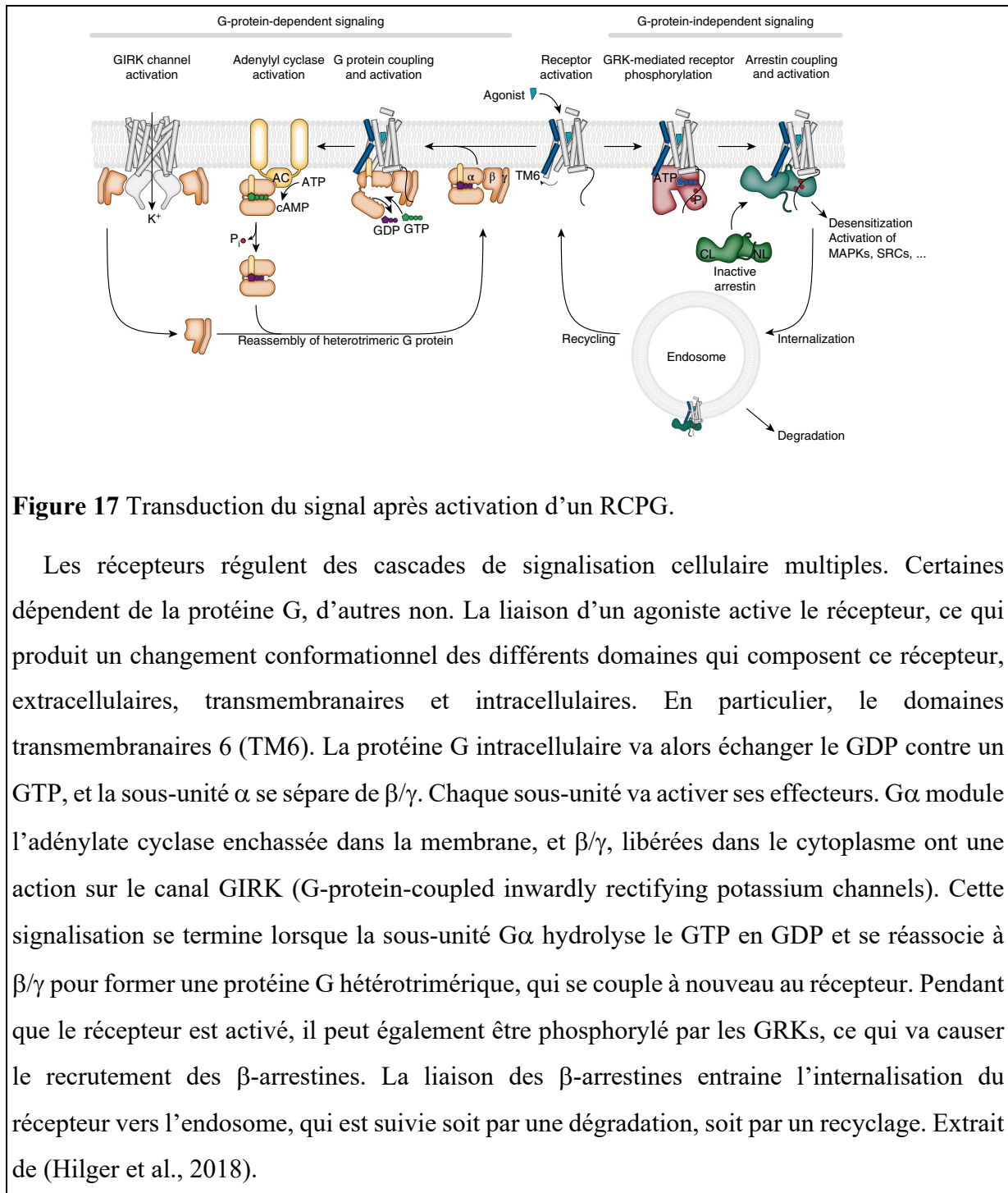
Dans un modèle de culture primaire de neurones de striatum et d'hippocampe, il a été observé que le SNC80 provoque une endocytose de 50% de DOR en 10 à 15min exposés à une concentration de 10nM et en moins de 4min lorsqu'on met les cellules en présence de 1µM de SNC80 (Pradhan et al., 2009). Les agonistes provoquant l'internalisation du récepteur dans des cellules HEK293 transfectées sont principalement le DADLE, DPDPE, SN80, Deltorphine I et II, la met et la Leu-enképhaline, légèrement moins l'ADL5859, ARM390, la buprénorphine, le SB238563 et quasiment pas les agonistes de MOR (**Tableau 10**) (Mann et al., 2020).

**Tableau 10** Évaluation *in vitro* des agonistes DOR sur la phosphorylation et l'internalisation du récepteur

Agoniste	Internalisation à 10µM (estimations %)	pT361-DOR	pS363-DOR	EC50 G-protein signalling (nM)	Durée d'effet (min)	Tolérance max (jours)	Tolérance hétérologue
DADLE	75 <sup>1</sup>	oui 1µM <sup>1</sup>	oui 10nM <sup>1</sup>	0,16 <sup>1</sup>			
DPDPE	75 <sup>1</sup> 75 <sup>3</sup>	1µM env 10min <sup>1</sup>	100nM < 2min <sup>1</sup>	0,39 <sup>1</sup>			
SNC80	75 <sup>1</sup> - 65 <sup>2</sup> - 80 <sup>3</sup>	1µM <sup>1</sup>	100nM <sup>1</sup>	5,62 <sup>1</sup>	75 <sup>2</sup>	J3 <sup>2</sup>	oui <sup>2</sup>
ADL5859	70 <sup>1</sup>	10µM <sup>1</sup>	1µM <sup>1</sup>	57 <sup>1</sup>			
ARM390	70 <sup>1</sup>	10µM <sup>1</sup>	1µM <sup>1</sup>	36,4 <sup>1</sup>			
Deltorphine I	75 <sup>1</sup>	10nM <sup>1</sup>	++ à 10nM <sup>1</sup>	0,36 <sup>1</sup>			
Deltorphine II	75 <sup>1</sup> - 20 <sup>2</sup>	10nM <sup>1</sup>	10nM <sup>1</sup>	0,11 <sup>1</sup>	75 <sup>2</sup>	/ <sup>2</sup>	non <sup>2</sup>
Met-enképhaline	75 <sup>1</sup>	100nM ++ <sup>1</sup>	100nM ++ <sup>1</sup>	0,78 <sup>1</sup>			
Leu-enképhaline	75 <sup>1</sup>	100nM ++ <sup>1</sup>	100nM ++ <sup>1</sup>	0,77 <sup>1</sup>			
Fentanyl	20 <sup>1</sup>	/	10µM <sup>1</sup>	385 <sup>1</sup>			
Méthadone	30 <sup>1</sup>	/	10µM <sup>1</sup>				
Morphine	15 <sup>1</sup> - 35 <sup>3</sup>	/	/	49 <sup>1</sup>			
M6G	25 <sup>1</sup>	/	10µM <sup>1</sup>	1200 <sup>1</sup>			
BUP	15 <sup>1</sup>	/	/	/			
norBUP	40 <sup>1</sup>	10µM <sup>1</sup>	1µM <sup>1</sup>	43 <sup>1</sup>			
SB236853	65 <sup>1</sup>				120 <sup>2</sup>	J4 <sup>2</sup>	oui <sup>2</sup>
TIPP	30 <sup>1</sup> - 35 <sup>3</sup>				>120 <sup>2</sup>	/	non <sup>2</sup>

D'après : <sup>1</sup> : Mann et al. 2020, <sup>2</sup> : Baghera Tudaski et al. 2020, <sup>3</sup> : Charfi et al. 2014

Les propriétés d'internalisation, de phosphorylation et d'activation du récepteur de divers ligands agonistes de DOR ont été évaluées en modèles cellulaires par plusieurs équipes (**Tableau 10**). Lors de l'évaluation de l'internalisation provoquée par l'ARM390 *in vitro*, il y a eu besoin qu'il soit 100x plus concentré que le SNC80 pour obtenir une endocytose similaire dans les neurones d'hippocampe et striatum en culture primaire. On ne peut plus observer d'endocytose dès 100nM de ARM390 (Pradhan et al., 2009).



**Figure 17** Transduction du signal après activation d'un RCPG.

Les récepteurs régulent des cascades de signalisation cellulaire multiples. Certaines dépendent de la protéine G, d'autres non. La liaison d'un agoniste active le récepteur, ce qui produit un changement conformationnel des différents domaines qui composent ce récepteur, extracellulaires, transmembranaires et intracellulaires. En particulier, le domaine transmembranaire 6 (TM6). La protéine G intracellulaire va alors échanger le GDP contre un GTP, et la sous-unité  $\alpha$  se sépare de  $\beta/\gamma$ . Chaque sous-unité va activer ses effecteurs.  $G\alpha$  module l'adénylate cyclase enchassée dans la membrane, et  $\beta/\gamma$ , libérées dans le cytoplasme ont une action sur le canal GIRK (G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels). Cette signalisation se termine lorsque la sous-unité  $G\alpha$  hydrolyse le GTP en GDP et se réassocie à  $\beta/\gamma$  pour former une protéine G hétérotrimérique, qui se couple à nouveau au récepteur. Pendant que le récepteur est activé, il peut également être phosphorylé par les GRKs, ce qui va causer le recrutement des  $\beta$ -arrestines. La liaison des  $\beta$ -arrestines entraîne l'internalisation du récepteur vers l'endosome, qui est suivie soit par une dégradation, soit par un recyclage. Extrait de (Hilger et al., 2018).

## (ii) *L'internalisation in vivo*

- *Internalisation par le SNC80*

Lors d'une injection aigue de SNC80, 20 minutes après, le récepteur DOR-eGFP est fortement internalisé dans le striatum, l'hippocampe, mais également la moëlle épinière et en périphérie dans les GRD (Pradhan et al., 2009). Les mêmes observations ont été faites à 45min après l'administration, au moment où l'analgésie maximale est étudiée par Nozaki et collaborateurs (Nozaki et al., 2012). Cette internalisation est maintenue à 4h, mais le récepteur est de retour à la membrane au bout de 24h.

Lors d'un traitement répété aigu, si la deuxième administration de SNC80 est réalisée 24h après la première, aucune internalisation du récepteur n'a été observée dans l'hippocampe ni dans les GRD. En revanche, si les deux administrations sont espacées de seulement 12h, une internalisation de DOR commence à se développer (Pradhan et al., 2010). Dans un modèle de traitement chronique, après 6 jours de traitement consécutifs, sur des coupes de tissu de cerveau ainsi que de GRD, il a été mis en évidence que le SNC80 provoque une internalisation durable du récepteur DOR-eGFP (Pradhan et al., 2010).

- *Internalisation par ARM390*

Dans des modèles tissulaires, *in vivo*, lors d'une administration unique d'ARM390, le récepteur n'est pas internalisé 20minutes après, ni dans le système nerveux central, ni dans le système nerveux périphérique (Pradhan et al., 2009). Après traitement aigu (2 injections espacées de 12 ou 24h) ou chronique (6 administrations quotidiennes) l'ARM390 ne provoque aucune internalisation de DOR sur des coupes de GRD et d'hippocampe (Pradhan et al., 2010).

## (iii) **Phosphorylation**

Que ce soit après recrutement à la membrane dû à des facteurs extérieurs ou par stimulation directe par un agoniste, il a été démontré à de nombreuses reprises que DOR est fortement internalisé après son activation par le SNC80 ou le DPDPE. Cette internalisation découlerait de la phosphorylation du récepteur.

- *Les phosphorylations de DOR in vitro*

Plusieurs sites de phosphorylation sont connus sur l'extrémité Cter intracellulaire de DOR par des GPCR kinase (GRK) connues pour phosphoryler un très grand nombre de RCPG suite à leur activation. GRK2 et GRK3 phosphorylent en particulier les acides aminés thréonine Thr



358, Thr 361 et sérine Ser363. Cette phosphorylation intervient en quelques minutes ((Mann et al., 2020; Pei et al., 1995).

En mutant les 2 principaux sites de phosphorylation de DOR, Thr361 et Ser363 remplacés par des alanines, des anticorps ciblant ces résidus phosphorylés ont permis de confirmer la perte de cette phosphorylation. Cela a pour conséquence une diminution de l'internalisation à la suite de la stimulation par le DPDPE (Mann et al., 2020).

GRK2 et GRK3 fonctionnent en synergie pour phosphoryler dans un premier temps S363, en 2 minutes, puis dans un second temps pT361 après 5 minutes d'activation de HEK293 par du DPDPE (Mann et al., 2020). Dans le **Tableau 10**, nous pouvons constater qu'*in vitro*, il semble y avoir un lien entre la phosphorylation des deux sites S363 et T361 et l'internalisation du récepteur, qui suit une corrélation linéaire (Mann et al., 2020). Toutes les internalisations sont bloquées par la naloxone, ainsi que les phosphorylations (Mann et al., 2020).

La phosphorylation participe à la désensibilisation du récepteur, il ne peut alors plus être activé. La proportion de phosphorylation est relative à la désensibilisation de la réponse DOR, y compris la voie de l'adénylate cyclase et de l'inhibition des canaux  $Ca_{v2}$  (Mann et al., 2020).

La déphosphorylation est assurée par PP1, une protéine phosphatase ciblant spécifiquement les serines et thréonines.

Mais il a été récemment montré en modèle de culture primaire de neurones par Jullié et collaborateurs que la phosphorylation de l'extrémité C-ter de DOR n'est pas nécessaire à son internalisation ni à la tolérance de sa réponse inhibitrice (Jullié et al., 2022).

Un autre rôle de GRK2, qui a été proposé par l'équipe de Brackley suite à des résultats en culture de neurones de GRD, est que la phosphorylation de GRK2 par AKAP-PKA maintient la kinase associée au récepteur, ce qui est décrit comme une cause de désensibilisation du récepteur (Brackley et al., 2017, 2016). Il est également intéressant de remarquer que le recrutement des  $\beta$ -arrestines est modulé par la localisation subcellulaire du récepteur, entre la membrane plasmique et l'appareil de Golgi (Crilly et al., 2021).

- ***Les phosphorylations de DOR in vivo***

Pradhan et ses collaborateurs n'ont pas observé de phosphorylation de la Serine S363 après traitement *in vivo* 20 minutes après l'administration d'ARM390, contrairement au SNC80

(Pradhan et al., 2009). Les expériences de Mann et collaborateurs montrent que dans le cerveau de souris, 15 minutes après l'administration de SNC80 à 10mg/kg une forte phosphorylation de S363 se développe, ainsi qu'une moins intense de T361. Quant au ARM390, cette fois encore, à 60mg/kg p.o. il produit une phosphorylation bien moindre de ces deux sites, quasiment nulle pour T361 (Mann et al., 2020). Dans ce modèle animal comme en modèle cellulaire, l'antagoniste opioïde naltrexone inhibe la phosphorylation de T361 et de S363

#### (iv) Recrutement des $\beta$ -arrestines

Les  $\beta$ -arrestines interagissent avec un très grand nombre de RCPG, dont DOR. Leur nom vient de leur fonction première : l'arrêt de la réponse de la protéine G. Suite à ces interactions et modifications du récepteur, la membrane va s'invaginer pour former des puits de clathrine, jusqu'à se refermer sur elle-même, devenant un endosome précoce. L'endosome précoce mature dans la cellule et évolue en endosome de tri. De là, deux devenir sont possibles pour son contenu : le recyclage pour lequel le récepteur est déphosphorylé et retourne à la membrane, ou l'évolution vers l'endosome tardif qui deviendra le lysosome. Par cette voie, les protéines seront dégradées (Hilger et al., 2018; Moore et al., 2007). Des modèles cellulaires de recrutement des  $\beta$ -arrestines (BRET) ou animaux (KO  $\beta$ -arrestine 1, KO  $\beta$ -arrestine 2) ont été mis au point pour étudier leur rôle (**Tableau 11**).

- ***In vitro***

L'association entre DOR et les  $\beta$ -arrestines est connue, il peut recruter les deux  $\beta$ -arrestines selon la façon dont il est activé. Cela dépendrait en partie de la phosphorylation qui est associée à son activation. En présence du récepteur non phosphorylé, la  $\beta$ -arrestine 2 serait principalement recrutée, alors qu'après phosphorylation on observerait aussi le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 1 (Charfi et al., 2014; Qiu et al., 2007). Cette nuance a été proposée comme explication des vitesses d'internalisation différentes pour les récepteurs (Gendron et al., 2019). Les  $\beta$ -arrestines impactent l'internalisation des récepteurs aussi bien si ils sont fortement que faiblement internalisants dans des cultures de neurones transfectées par siRNA  $\beta$ -arrestines 1 et 2 (Charfi et al., 2014).

- ***In vivo***

La  $\beta$ -arrestine 1 agirait comme une chaperonne associée au récepteur, qui contrôle le taux d'export de récepteur à la membrane et s'adapterait en fonction du ligand qui l'active (Cahill et al., 2016). Globalement, l'analyse des effets dus à la protéine G (activation des GIRK) et des

**Tableau 11** Effets de la délétion de  $\beta$ -arrestine 1 et 2 sur l'internalisation et la tolérance des récepteurs opioïdes.

	MOP		DOP	
	High-Internalizing	Low-Internalizing	High-Internalizing	Low-Internalizing
Arrestin 2 ( $\beta$ -arrestin 1) deletion	No reported effects on desensitization, resensitization, or tolerance	No observed effect on tolerance, or reported effects on desensitization or resensitization	High desensitization [26] High externalization [26] High efficacy and potency [19,26] Reduced acute tolerance [19]	No effect on efficacy/potency, or acute tolerance [19]
Arrestin 3 ( $\beta$ -arrestin 2) deletion	No observed effects on tolerance or desensitization, but resensitization was affected [20,31,112,113]	Low desensitization [27] High resensitization [112] Decreased tolerance [18,113]	No effect on desensitization or acute tolerance [19]	Low resensitization [19] Increased tolerance [19]

Agonistes utilisés : DOR fortement internalisant : SNC80 ; Faiblement internalisant : ARM390, JNJ20788560. MOR, fortement internalisant : fentanyl, DAMGO ; faiblement internalisant : morphine. Le mécanisme de tolérance et sa dépendance à l'arrestine peut différer selon les mesures de comportement effectuées, il ne faut pas généraliser les observations déjà faites à toutes les modalités non évaluées dans les références. Références : 19 : (Pradhan et al., 2016) 26 : (Mittal et al., 2013) 27 : (Mittal et al., 2012) 112 : (Dang et al., 2011) 113 : (Connor et al., 2015). Extrait de (Cahill et al., 2016)

effet dépendants de l'arrestine (internalisation) des divers agonistes DOR évalués a révélé une corrélation linéaire, suggérant que les agonistes DOR ne présentent pas de biais dans leur couplage intracellulaire (Mann et al., 2020).

- *Recrutement des  $\beta$ -arrestines par le SNC80*

Pradhan et ses collaborateurs ont montré que chez des animaux déficients pour  **$\beta$ -arrestine 1**, dans un modèle de douleur inflammatoire, le **SNC80** a un effet plus important, plus long et ne développe pas de tolérance analgésique lors de la deuxième injection, mettant en avant le rôle de cette protéine dans la limitation de la réponse delta opioïde (Pradhan et al., 2010). Cet effet est spécifique de DOR car bloqué par son antagoniste sélectif (Mittal et al., 2013). Par ailleurs, la  **$\beta$ -arrestine 1** est fortement régulée par la présence de douleur chronique. Sa déficience augmente l'effet du SNC80 sur la locomotion, de même que sur l'effet analgésique du SNC80 sans situation douloureuse (Mittal et al., 2012).

- *Recrutement des  $\beta$ -arrestines par ARM390*

Tous les agonistes DOR ne provoquent pas la même internalisation du récepteur, ni recrutement des arrestines. ARM390 ne semble pas entraîner leur recrutement et pourrait être qualifié d'agoniste biaisé  $\beta$ -arrestines. En effet, mise face au ARM390, la déficience en  $\beta$ -arrestine 1 ne change aucunement la réponse des animaux.

### **c) Recyclage ou dégradation : voies différentes selon l'agoniste**

Concernant DOR, son devenir après activation est discuté et dépendrait de l'agoniste qui l'a stimulé (Cahill et al., 2016). L'efficacité d'un agoniste à entraîner la séquestration de DOR a été utilisée pour prédire s'il va induire une tolérance analgésique rapide ou non *in vivo* (Gendron et al., 2016; Pradhan et al., 2010).

Bagheri-Tudashki et ses collaborateurs ont établi un lien entre les agonistes faiblement internalisant et la durée de l'analgésie aiguë (Bagheri Tudashki et al., 2020), en opposition avec les résultats obtenus par Pradhan et collaborateurs, qui constatait une analgésie plus courte pour le ARM390 faiblement internalisant par rapport au SNC80 dont l'effet dépasse 3h et qui est fortement internalisant (Voir **Tableau 10**) (Pradhan et al., 2010).

Le recyclage serait alors le mécanisme associé au maintien de l'analgésie lors d'injections répétées (Bagheri Tudashki et al., 2020).

#### **(i) Dégradation**

*In vitro*, lorsqu'un agoniste produit une internalisation rapide de DOR, il en découle généralement une dégradation de DOR, aussi bien en lignées immortalisées (Anastasia G. Henry et al., 2011; Whistler et al., 2002) que dans des cultures primaires de neurones (Pradhan et al., 2009).

#### **(ii) Ubiquitination**

Classiquement, l'ubiquitination est une étape importante dans la réponse adaptative des RCPG. Elle peut servir de protéine chaperonne pour d'autres protéines de ciblage et est couramment décrite comme menant le récepteur à la dégradation lysosomale (Rajagopal and Shenoy, 2018).

- **Unbiquitination de DOR *in vitro***

La lysyl-ubiquitination est connue comme entraînant la régulation protéolytique des récepteurs, en les adressant au corps multivesiculaire (MVB) puis au lysosome. L'ajout de l'ubiquitine peut agir à différents moments de la voie de dégradation et dépend du récepteur et du type cellulaire. Le récepteur DOR est pris en charge par le complexe ESCRT vers les lysosomes (**Figure 16**). Il a la particularité de pouvoir être différentiellement régulé selon la présence ou non d'ubiquitination.

Henry et collaborateurs ont montré que même lorsque l'ubiquitination de DOR est bloquée, son trafic peut être régulé. DOR peut être acheminé vers les vésicules intraluminales des MVB même sans ubiquitine. L'ubiquitination stimule mais n'est pas nécessaire à la protéolyse du récepteur, elle favorise sans être requise pour le passage de DOR de la membrane des MVB vers les vésicules intraluminales (Anastasia G Henry et al., 2011).

Le rôle de l'ubiquitine dans l'internalisation de DOR ne se trouve pas dans le tri précoce et n'exclut pas le récepteur de la voie de recyclage, il est important mais non requis pour l'internalisation et la dégradation de DOR (Anastasia G Henry et al., 2011; Hislop and von Zastrow, 2011).

Il a été montré depuis 20 ans que le SNC80 est responsable d'une dégradation du récepteur DOR allant jusqu'à 80% *in vitro* (Okura et al., 2003).

- **Unbiquitination de DOR *In vivo***

Une dégradation du récepteur fait suite à son activation par le SNC80, contrairement au traitement par ARM390 qui n'impacte ni la quantité ni l'activabilité du récepteur au niveau cérébral ou spinal (Pradhan et al., 2010). Plusieurs études ont montré une plus faible réponse de la protéine G en [<sup>35</sup>S]GTPγS suite à une stimulation répétée par du SNC80 (Emily M. Jutkiewicz et al., 2005; Pradhan et al., 2012).

### (iii) **Recyclage à la membrane plasmique**

La deuxième voie de devenir possible d'un RCPG est le recyclage à la membrane plasmique (**Figure 16**).

- **Recyclage de DOR *in vitro***

Le récepteur DOR est fortement sujet à l'internalisation à la suite de son activation par certains agonistes.

Il a été estimé que 60 à 70% de DOR internalisé peut être recyclé à la membrane et continuer d'être activé après le lavage de l'agoniste du milieu (Archer-Lahlou et al., 2009). DOR est montré comme de retour à la membrane 1h après stimulation par le SNC80 sur des cultures neuronales (Audet et al., 2012). Pour une même internalisation, ce recyclage dépendrait du type d'agoniste lié au récepteur, s'il est provoqué par une petite molécule ou un agoniste peptidique, par exemple le SNC80 ne permet pas de recyclage du récepteur en 30min alors que 50% sont de retour à la membrane suite à une internalisation équivalente par le DPDPE (Audet et al., 2012). Cette différence proviendrait de la capacité de l'*endothelin-converting enzyme-2* (ECE2) à dégrader certains agonistes peptidiques, mettant fin à l'activation du récepteur dans des cultures primaires de neurones (Gupta et al., 2014). L'acidité présente à l'endosome peut favoriser la dissociation ligand-récepteur et ainsi aider son recyclage (Mellman et al., 1986) (**Figure 16**).

La désensibilisation qui a lieu durant l'internalisation du récepteur suite à la stimulation par DPDPE implique la protéine Src (Archer-Lahlou et al., 2009).

L'équipe de Graciela Pineyro a récemment montré que DOR, après internalisation, peut toujours être recyclé à la membrane via Rab4 dans des lignées neuronales ou cellules immortalisées. Ce routage passerait par la protéine X interagissant avec ALG-2 (ALIX) et le complexe de Rab9/TIP47, qui permettrait de manière surprenante le recyclage de DOR, alors qu'il réside déjà dans l'endosome tardif. Cette voie de recyclage conduirait DOR vers la sortie de l'appareil de Golgi (le TransGolgi Network, TGN), puis vers la membrane plasmique par la voie classique d'exocytose (**Figure 16**). Ce serait alors indépendant du transporteur Rab4 et du complexe rétromère, qui constituent une voie de recyclage plus précoce proposée pour DOR (Charfi et al., 2018). L'internalisation est impactée *in vitro* par l'inactivation de Rab7, mais pas par celle de VPS35 (protéine impliquée dans le mécanisme du rétromère sélectif du cargo, trouvée dans l'interactome de DOR).

#### **D. Tolérance analgésique aux agonistes de DOR = mécanismes différents de MOR**

La tolérance est un mécanisme adaptatif présent pour de multiples RCPG. En particulier, les deux récepteurs opioïdes mu et delta développent une tolérance analgésique.

Les mécanismes décrits pour la tolérance analgésique de MOR sont une combinaison de désensibilisation, resensibilisation, internalisation, synthèse, stabilité de l'appareil de Golgi et modulation de l'adressage intracellulaire du récepteur (Cahill et al., 2016).

Mais bien que MOR et DOR soient tous deux des RCPG, leurs mécanismes de tolérances varient en de multiples points.

### **1) Tolérance *in vivo***

Lorsqu'elle est étudiée en modèle de douleur chronique, la tolérance analgésique de DOR est dépendante de deux critères principaux : l'agoniste administré (SNC80, ARM390) et leur fréquence d'administration. Pour le même agoniste SNC80, il a été montré qu'une administration répétée de 24h ne développait pas encore de tolérance analgésique, alors qu'en 12h ou 4h d'espacement entre les premières administrations, la tolérance causée est déjà maximale (Pradhan et al., 2016, 2010).

### **2) Superactivation de l'AMPC**

La réponse d'AMPC suite à l'administration de morphine est beaucoup moins affectée dans les cellules SH-SY5Y knock-down pour RGS4. Une explication à la tolérance analgésique DOR serait une potentialisation de la production d'AMPC lors d'une stimulation persistante de DOR, c'est la tolérance cellulaire (Gendron et al., 2019; Varga et al., 2003).

### **3) Internalisation par les $\beta$ -arrestines**

#### **a) Par SNC80**

Pradhan et collaborateurs ont montré que chez des animaux déficients pour la  $\beta$ -arrestine 1, dans un modèle de douleur inflammatoire, le SNC80 ne développe pas de tolérance analgésique lors de la deuxième injection, mettant en avant le rôle de cette protéine dans la réponse DOR (Pradhan et al., 2010). Par ailleurs, la  $\beta$ -arrestine 1 est fortement régulée en condition de douleur chronique (Mittal et al., 2013).

#### **b) Par ARM390**

En présence de SNC80, la déficience en  $\beta$ -arrestine 1 ne change aucunement la réponse nociceptive des animaux. Mais les souris KO pour la  $\beta$ -arrestine 2 nécessitent 24h pour retrouver une sensibilité au SCN80, l'absence de  $\beta$ -arrestine 2 augmente donc le temps de désensibilisation du récepteur. Dans ces mêmes animaux, une internalisation du récepteur, non présente chez les souris sauvages, se développe également suite à l'administration d'ARM390.

La  $\beta$ -arrestine 2 agirait comme une chaperonne qui contrôle le taux d'export de récepteur à la membrane de façon ligand-dépendante (Cahill et al., 2016). En son absence, Pradhan et

collaborateurs constatent une augmentation de la tolérance de DOR, aussi bien pour le SNC80 que pour ARM390 (Pradhan et al., 2016). Au contraire, la  $\beta$ -arrestine 1 semble cruciale dans le développement de la tolérance aiguë au SNC80 et au ARM390 (Vicente-Sanchez et al., 2016). L'absence de la  $\beta$ -arrestine 1 limite que son découplage de la protéine G et le développement de la tolérance chronique au SNC80 et la dégradation de DOR (Pradhan et al., 2016).

L'observation de tolérance analgésique aiguë a été associée à l'internalisation du récepteur (Pradhan et al., 2009). En effet, le ARM390 n'entraîne pas d'internalisation du récepteur (20 min, 12h ou 24h après injection), que ce soit dans le striatum, l'hippocampe, la moëlle épinière et les GRD (Pradhan et al., 2010, 2009) ni de tolérance analgésique aigue 12 ou 24h après la première administration, alors que le SNC80 présente une tolérance et une internalisation de DOR aussi bien dans l'hippocampe que dans les GRD 12h après la première administration.

Cette internalisation est corrélée à la phosphorylation de DOR provoquée par l'agoniste (Mann et al., 2020).

Les ligands biaisés pour la protéine G, c'est à dire activant la voie de la protéine G sans induire de recrutement de la  $\beta$ -arrestine, sont développés avec l'espoir de supprimer la tolérance analgésique DOR. En modèle de douleur chronique chez le rat, le PN6047 de structure proche du SNC80, avec la même affinité et la même spécificité que lui *in vitro*, recrute moins les  $\beta$ -arrestine 1 et  $\beta$ -arrestine 2 que le SNC80. *In vitro*, une diminution de recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2 a été observée en BRET par rapport à ARM390 (Conibear et al., 2020). Son effet analgésique a été illustré dans un modèle de douleur neuropathique, sans développer de tolérance durant 3 semaines d'administrations quotidiennes, et a un effet de type antidépresseur dans le test de nage forcée sans aucune apparition de convulsions.

#### **4) Mécanismes moléculaires de la tolérance aux agonistes de DOR**

Du fait des résultats dans les KO  $\beta$ -arrestine 1 d'absence de tolérance analgésique et des ligands biaisés protéine G, on sait que l'internalisation joue un rôle dans le développement de la tolérance analgésique. Mais l'hypothèse la plus explorée et à laquelle conduisent la majorité des études sur le mécanisme sous-jacent à la tolérance analgésique des agonistes de DOR est celle de la dégradation du récepteur.



Les liens entre internalisation et dégradation ne sont pas si simples, car on a montré qu'une ablation des 15 derniers acides aminés en C-ter de DOR, intracellulaires, qui sont responsables de la transmission du message lors de l'activation du récepteur, va complètement empêcher l'internalisation (Trapaidze et al., 1996), alors que la dégradation sera tout de même maintenue pour 50% (Cvejic et al., 1996). Bagheri-Tudashki décrit le recyclage comme associé à un maintien de l'analgésie avec des injections répétées grâce à des cultures de neurones primaires (Bagheri Tudashki et al., 2020).

Le recyclage du récepteur pourrait donc être à l'origine du maintien de l'analgésie *in vivo*. (Charfi et al., 2018). En effet, cette hypothèse est soutenue par l'accélération du développement de tolérance analgésique lorsque l'on ajoute au DPDPE du Y27632 (inhibiteur de ROCK, qui intervient dans la translocation du réseau transgolgien).

Pour expliquer cet adressage vers le lysosome, une autre protéine a été impliquée *in vitro* : la Protéine de Tri Associée aux Récepteurs couplés aux Protéines G (G-Protein coupled Receptor Associated Sorting Protein 1, GPRASP1).

## **IV. Rôle physiologique proposé de la G-Protein coupled Receptor Associated Sorting Protein 1**

### **A. Description générale de l'expression de GPRASP1**

GPRASP1, aussi appelée GASP-1, G-protein coupled receptor associated sorting protein 1, est une grande protéine cytoplasmique identifiée dans deux laboratoires dont le nôtre au début des années 2000 (Simonin et al., 2004; Whistler et al., 2002). Elle appartient à la famille des protéines GPRASP/ARMCX, dont les protéines de la sous famille 1, les GPRASP, sont décrites comme impliquées dans la régulation du trafic membranaire des RCPG. Parmi ses 1395 acides aminés qui constituent GPRASP1, on trouve répété 22 fois un motif de 15 acides aminés unique à ces protéines, appelé motif « GASP », qui a été décrit pour la première fois par notre équipe (Bornert et al., 2013) caractéristique de la sous-famille 1 (GPRASP1, GPRASP2, GPRASP3, ARCMX4 et ARMCX5) (Abu-Helo and Simonin, 2010; Kaeffer et al., 2021).

Elle est fortement exprimée dans le système nerveux central, le rein et les poumons. Toutes les aires cérébrales contiennent des transcrits de son ARNm, de même que la moëlle épinière. Comme toutes les protéines de la famille GPRASP/ARMCX, elle est codée par le bras court du

chromosome X, en donnant donc un seul allèle aux mâles. On ne la trouve que chez les mammifères.

Les indications de la localisation subcellulaire de GPRASP1 obtenues en modèle cellulaire grâce à l'expression de GPRASP1-mcherry nous indiquent qu'elle serait surtout cytoplasmique et partiellement retrouvée au niveau des endosomes (Roscioglione et al., 2014). Pour l'heure, aucun anticorps anti-GPRASP1 ne permet un marquage spécifique des tissus par immunohistochimie.

Les informations connues sur GPRASP1 et les neuf autres protéines de sa famille, leurs interactions protéines-protéines, leur probable rôle comme protéine d'échafaudage et leurs implications biomédicales connues ont été rassemblées dans la revue Kaeffer et al. 2021, présentée p74.

## **B. Les outils disponibles pour son étude**

Une partie de son rôle est décrit à l'aide de modèles génétiques, humains ou murins.

Pour étudier le rôle de GPRASP1, une forme tronquée de GPRASP1, nommée cGASP, considérée comme un dominant négatif, est utilisée comme outil pour mettre en avant l'implication de GPRASP1 dans les processus intracellulaires de régulation *in vitro*.

On a également eu recours à des siRNA ou shRNA dans les modèles cellulaires pour inactiver sélectivement GPRASP1, et permettre une réexpression maîtrisée de la protéine.

Un anticorps de lapin dirigé contre GPRASP1 a également été synthétisé et purifié par notre équipe (Zeder-Lutz et al., 2023), il a été notre outil pour détecter GPRASP1 dans les expériences présentées dans ce manuscrit de thèse (Résultats II Partie 2).

Deux lignées de souris KO-GPRASP1 ont été créées indépendamment, par l'équipe de Jennifer Whistler et la nôtre (Thompson et al., 2010a) (Boeuf et al., 2009). La première a eu recours à une délétion de l'exon 5 et la deuxième à une délétion de la séquence allant de l'exon 5 à l'exon 11. Elles ont permis d'explorer le rôle de GPRASP1 dans les mécanismes adaptatifs aux activations répétées de certains RCPG interagissant avec GPRASP1 *in vivo*, comme le récepteur cannabinoïde CB1 ou les dopaminergiques D1 et D2 (Thompson et al., 2010b) (Martini et al., 2010) (Boeuf et al., 2009).

## C. Les protéines interagissant avec GPRASP1

### 1) Les RCPG

Les interactants de GPRASP1 *in vitro* sont nombreux, et on y trouve plusieurs RCPG. GPRASP1 est la protéine qui interagit avec le plus de GPCR différents *in vitro*, dont DOR. Si l'interaction avec DOR est forte, elle est beaucoup plus faible pour MOR. Des expériences de GST pull-down ont montré que GPRASP1 a une forte interaction avec le récepteur cannabinoïde CB1 (Whistler et al., 2002), les récepteurs dopaminergiques (Bartlett et al., 2005; Boeuf et al., 2009), le récepteur aux chimiokines CXCR4 (Morales-Hernandez et al., 2020) et le récepteur sérotoninergique 5HT7 (Manfra et al., 2015).

### 2) Les protéines impliquées dans l'adressage intracellulaire du récepteur

GPRASP1 a été décrite comme interagissant avec DOR au sein d'un complexe, formé avec dysbindin, HRS (HGF-regulated tyrosine kinase substrate), G $\alpha$ S et Beclin2. Ces observations ont été faites *in vitro*. Parmi les autres protéines imputées dans la dégradation de DOR *in vitro*, quatre se trouvent dans l'interactome de GPRASP1 : HRS, G $\alpha$ S, Beclin2 and dysbindin (Roscioglione et al., 2014). Parmi eux, HRS fait partie du complexe ESCRT, qui oriente les RCPG vers la dégradation (Hislop and von Zastrow, 2011). La dysbindin est également impliquée dans le tri post-endocytaire du récepteur dopaminergique D2 et DOR (ce qui encourage malgré l'absence d'interaction directe la probabilité d'un complexe GPRASP1-dysbindin) et impliqué dans le tri intracellulaire des récepteurs associés. Beclin 2 a été mise en évidence pour son rôle dans la dégradation de DOR (He et al., 2013). Leur absence par Knock-down dans un modèle cellulaire a produit une diminution de la dégradation de DOR après activation, malgré une internalisation du récepteur.

### 3) Les connaissances sur l'implication de GPRASP1 dans les mécanismes adaptatifs de DOR

Le dominant négatif cGASP a été utilisé pour montrer que GPRASP1 est en interaction avec DOR (Whistler et al., 2002). Une compétition avec GPRASP1 a été observée lors d'essais de GST-pull down sur la partie C terminale du récepteur DOR. GPRASP1 interagit donc avec l'extrémité intracellulaire de DOR (Whistler et al., 2002). Plus tard, l'interaction GPRASP1-DOR a été confirmée par co-immunoprécipitation de lysat cellulaire de GPRASP1, exprimée de façon endogène dans des HEK (Thompson et al., 2010a). L'interaction de GPRASP1 avec

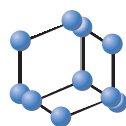
DOR se fait entre l'extrémité carboxyterminale intracellulaire du récepteur et par le domaine central de GPRASP1, portant les motifs répétés GASP, ainsi qu'avec les 50 derniers acides aminés de son extrémité Cter (Bornert et al., 2013).

Dans une situation de surexpression de GPRASP1, cGASP a l'effet opposé, il active la dégradation de DOR (Whistler et al., 2002).

En HEK surexprimant FLAG-tagged-DOR, 3h après l'activation de DOR par le DADLE, DOR est retrouvé en région périnucléaire, au niveau du lysosome. Si cGASP est ajouté, on ne trouve pas la dégradation obtenue par l'action de l'agoniste dans les cellules exprimant uniquement GPRASP1 et le récepteur n'est pas colocalisé avec les marqueurs du lysosome (Whistler et al., 2002). Si cGASP empêche la dégradation du récepteur en prenant la place de GPRASP1, il a été conclu que GPRASP1 a une part de responsabilité dans la dégradation du récepteur suite à son activation (Whistler et al., 2002).

## **V. Revue : GPRASP/ARMCX Protein Family: Potential Involvement in Health and Diseases Revealed by their Novel Interacting Partners**

## REVIEW ARTICLE


**BENTHAM  
SCIENCE**

# GPRASP/ARMCX Protein Family: Potential Involvement in Health and Diseases Revealed by their Novel Interacting Partners


 Juliette Kaeffler<sup>1</sup>, Gabrielle Zeder-Lutz<sup>1</sup>, Frédéric Simonin<sup>1,\*</sup> and Sandra Lecat<sup>1,\*</sup>
<sup>1</sup>Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

**Abstract:** GPRASP (GPCR-associated sorting protein)/ARMCX (ARMadillo repeat-Containing proteins on the X chromosome) family is composed of 10 proteins, whose genes are located on a small locus of the X chromosome except one. They possess at least two armadillo-like repeats on their carboxyl-terminal homologous sequence, but they can be subdivided on specific sequence features. Subfamily 1 (GPRASP1, GPRASP2, GPRASP3, ARM CX4 and ARM CX5) displays additional repeated motifs while a mitochondrial targeting transmembrane domain is present in subfamily 2 (ARM C10, ARM CX1, ARM CX2, ARM CX3 and ARM CX6). Although their roles are not yet fully understood, the recent identification of several interacting partners has shed new light on the processes in which GPRASP/ARMCX proteins are implicated. Among the interacting partners of proteins from subfamily 1, many are GPCRs. GPRASP1 binds trafficking proteins, such as Beclin2 and the Dysbindin-HRS-Gαs complex, to participate in GPCR post-endocytic sorting. Moreover, *in vitro* as well as *in vivo* experiments indicate that GPRASP1 is a critical player in the adaptive responses related to chronic treatments with GPCR agonists. GPRASP2 seems to play a key role in the signaling of the hedgehog pathway in the primary cilium through a Smoothened-GPRASP2-Pifo complex. Identified small compound inhibitors of this complex could treat drug-resistant smoothened derived cancer forms. Deletion of GPRASP2 in mice causes neurodevelopmental alteration and affects mGluR5 regulation, reflected by autism-like behavior. Several members of subfamily 2, in complex with TRAK2 and MIRO, are involved in the trafficking of mitochondria in axons and in the regulation of their size and division, influencing the cell cycle. The essential role of GPRASP/ARMCX proteins in cellular physiology is supported by human cases of deletions, causing male neonatal lethality by pulmonary delayed development, dysmorphic face, and psychiatric and intellectual impacts in females.

## ARTICLE HISTORY

 Received: August 11, 2020  
 Revised: October 28, 2020  
 Accepted: November 02, 2020

 DOI:  
 10.2174/156802662066201202102448


CrossMark

**Keywords:** Pharmacology, Signalling,  $\alpha$ -solenoid Scaffolding proteins, Membrane trafficking, Mitochondria dynamics, Ciliopathies, Neurite outgrowth.

## 1. INTRODUCTION

To participate actively in the transmission of a message in a signalling cascade, the protein involved, whether the receptor at the plasma membrane or all the subsequent effectors of the response, must be in the right place within the cell and at the right time. It must, therefore, be correctly addressed in the appropriate cell compartment and this proper targeting is tightly regulated. Proper targeting of organelles themselves can be determinant for efficient signaling, particularly in polarized cells such as neurons. Accessory proteins that regulate the dynamics of receptor targeting or that serve as scaffolds are the proteins that help to fulfil this goal of assembling all the partners in a nanocompartment in order to constitute an efficient functional signalosome.

In this special issue, "Receptors in health and diseases", we will review a specific family of proteins that gathers the

G Protein-coupled Receptor-Associated Sorting Proteins (GPRASP) and the ARMadillo repeat-Containing proteins on the X chromosome (ARMCX). This family is composed of ten members convincingly implicated either in G protein-coupled receptors (GPCR) trafficking and signaling or in mitochondria trafficking. We will focus on the discoveries of these past ten years, suggesting a scaffolding role for these proteins.

Evidence that GPRASP1 (alias GASP1, KIAA0443 and PIPS), GPRASP2 (also named GASP2 and HIP15), GPRASP3 (also known as GASP3, p60TRP and bHLHB9), ARM CX4 (GASP4), ARM CX5 (GASP5), ARM CX3 (GASP6 and ALEX3), ARM CX1 (GASP7 and ALEX1), ARM C10 (GASP8 and SVH), ARM CX2 (GASP9 and ALEX2) and ARM CX6 (GASP10) belong to a unique protein family has been reviewed by us previously [1; 2]. Briefly, these 10 proteins share a conserved and unique carboxyl-terminal domain of around 250 residues (with a minimum of 20% sequence identity with GPRASP1) that contains at least 2 armadillo-like repeats (Fig. 1). Except for ARM C10, they are each encoded by a single coding exon.

\*Address correspondence to this author at the Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS / Université de Strasbourg, 300 boulevard Sébastien Brant, CS 10413, 67412 Illkirch-Graffenstaden, Cedex, France; E-mails: [lecat@unistra.fr](mailto:lecat@unistra.fr) (S.L.); [simonin@unistra.fr](mailto:simonin@unistra.fr) (F.S.)

*ARMC10* is considered the common ancestor of the *GPRASP/ARMCX* gene family [3] since *ARMC10* homologs are present in all vertebrates exclusively, as early as in the teleost fish *Danio rerio*, while no homologs are found for the other *GPRASP/ARMCX* genes outside mammals. *ARMC10* gene is located on the human chromosome 7 and is encoded by several exons (seven coding exons; [2]) with up to 6 possible isoforms, 4 having been detected [4, 5]. A single coding exon for *ARMC10* exists on the human chromosome 3 but is referred to as a pseudogene in Pubmed Gene ID389137. It is not yet clearly established which of the two *ARMC10* copies gave rise to the gene family. Likewise, a pseudogene of human *ARMCX6* was proposed to serve as a redundant copy for facilitating gene conversion events to its neighboring *ARMCX6* gene [6]. Except for *ARMC10*, *GPRASP/ARMCX* genes are arrayed in tandem on the locus Xq22.1-q22.2 of the human X chromosome, in a region unique to Eutherian placental mammals [6]. Deletions in this region in humans have been linked to intellectual disabilities and other syndromes [7-9] that will be discussed below. Although *GPRASP/ARMCX* proteins seem ubiquitously expressed, they are all highly or predominantly expressed in the central nervous system [1] as is often the case for proteins encoded on the X chromosome [10]. Since the 2.3 Mb region Xq22.1-q22.2 is an innovation of placental mammals, it was speculated that *GPRASP/ARMCX* proteins, together with the other proteins encoded in this region, could be involved in the adaptive evolution of the neocortex that is also unique to mammals [6]. Interestingly with respect to the neocortex emergence, the 5'UTR of the three gene families repeated in tandem in the Xq22.1-q22.2 locus, *GPRASP/ARMCX* (nine members), *BEX* (Brain-Expressed X-linked, five members) and *TCEAL* (Transcription Elongation Factor A protein-Like also known as *WEX* for WWbp5-like X-linked, seven members) contain a highly similar DNA motif named BGW (for *BEX/GASP/WEX*) with no significant alignments outside mammalian sequences nor outside mammalian X chromosome. The exon coding regions of these 3 gene families have rapidly diverged, probably from the *ARMCX6* gene that, unlike other *GPRASP/ARMCX* genes, contains a three exon structure, similar to *BEX* and *WEX* genes, with the third exon encoding the entire protein [6]. The three protein families share functions in signaling, but the function of this particular BGW element has not yet been investigated.

In the following chapters, we will first discuss the reasons why *GPRASP/ARMCX* are probably scaffolding proteins with multiple repeated motifs that fold into structured domains (Armadillo-like repeats) or into Intrinsic Disordered domains. We will exhaustively list the protein partners of the *GPRASP/ARMCX* and, the interacting domains involved when identified. Secondly, the strong evidence for *GPRASP1* and *GPRASP2* involvement in GPCR sorting from endosomes and to the primary cilium, respectively, will be presented with evidence based on knockout mice and novel interacting partners. These results have functional implications in adaptation to chronic activation of G-protein coupled receptors, in hematopoietic stem cell repopulation and in ciliopathies. We will finally describe the experiments that have led to the discoveries of the mitochondrial *ARMCX* proteins as effectors of WNT signaling and as

metabolic sensors implicated in axon regeneration and survival via regulation of mitochondrial dynamics. Their putative roles in cancer and age-related neurological disorders will be discussed. This protein family includes underexplored molecular targets for drug discovery; hence several inhibitors targeting the protein-protein interface of *GPRASP2* with Smoothened could treat drug-resistant Smoothened derived cancer forms [11].

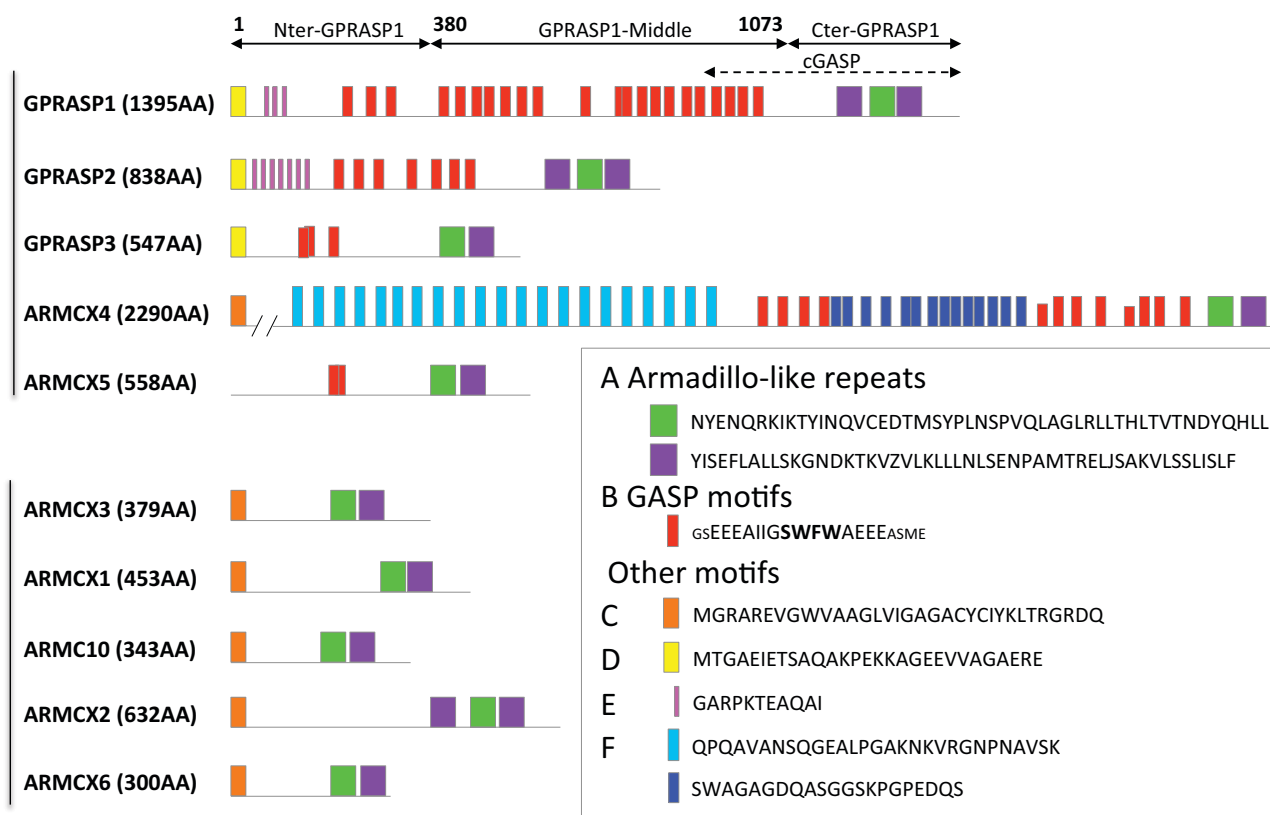
## 2. SEQUENCE ANALYSIS OF THE *GPRASP/ARMCX* PROTEIN FAMILY

*GPRASP1*, *GPRASP2*, *GPRASP3*, *ARMCX-1* to *-6* (Armadillo repeat-Containing X-linked proteins), and *ARMC10* have been originally classified as "GASP" family members by our team based on the sequence homology of their carboxyl-terminal (C-ter) 250 amino-acids ranging from 20 to 77% identity with *GPRASP1* [1]. We had further delineated 2 additional domains in these proteins, their amino-terminal part (N-ter) and a central region. For *GPRASP1*, we decomposed the protein as N-ter residues 1-379, *GASP1*-middle as residues 380-1073, and C-ter residues 1074-1395 (Fig. 1). For *GPRASP2*, we decomposed the protein based on homologies with *GPRASP1* as N-ter residues 1-353, *GPRASP2*-middle as residues 354-520, and *GPRASP2* C-ter residues 521-838. In our previous work, we have proposed to split the family into two-subfamilies based on the presence of a repeated motif only in the central region of subfamily 1 (*GPRASP1*, *GPRASP2*, *GPRASP3*, *ARMCX4* and *ARMCX5*) that we named GASP motif (Fig. 1) [1, 12]. This motif is unique to the *GPRASP/ARMCX* proteins.

For the purpose of this review, we have revisited the sequence similarities between the ten members of the human *GPRASP/ARMCX* proteins with the motif-based sequence analysis tools MEME Suite (for Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation; [13]). *MEME* discovers novel, un-gapped motifs that repeatedly occur in a group of related sequences. Individual *MEME* motifs do not contain gaps. Patterns with variable-length gaps are split by *MEME* into two or more separate motifs. With this method, we could strengthen the similarities between *GPRASP1* and *GPRASP2* and with bHLHB9 that we propose to rename *GPRASP3* (Figs. 1 and 2). *ARMCX4* belongs clearly to the *GPRASP* subfamily 1 due to its GASP motifs content, but in fact, it falls in between the two subfamilies. Its function has, however, never been studied so far. *MEME* represents motifs as position-dependent letter-probability matrices that describe the probability of each possible letter at each position in the pattern. The different motifs found in proteins of the *GPRASP/ARMCX* family are depicted in Fig. (2).

### 2.1. Armadillo-like Repeats in the C-ter Domain of all *GPRASP/ARMCX* Proteins

Convergent indications suggest that the conserved 250 residues C-ter domain of *GPRASP/ARMCX* proteins is composed of several armadillo-like repeats. This was not originally detected for the ten members of the family hence the name *ARMC* (Armadillo repeat-containing proteins) is only for *ARMCX4*, *ARMCX5*, *ARMCX3*, *ARMCX1*, *ARMC10*, *ARMCX2*, and *ARMCX6* [1, 2].



**Fig. (1).** Schematic representation of the ten members of the GPRASP/ARMCX proteins family with the motif locations as a result of sequences analysis with MEME SUITE.

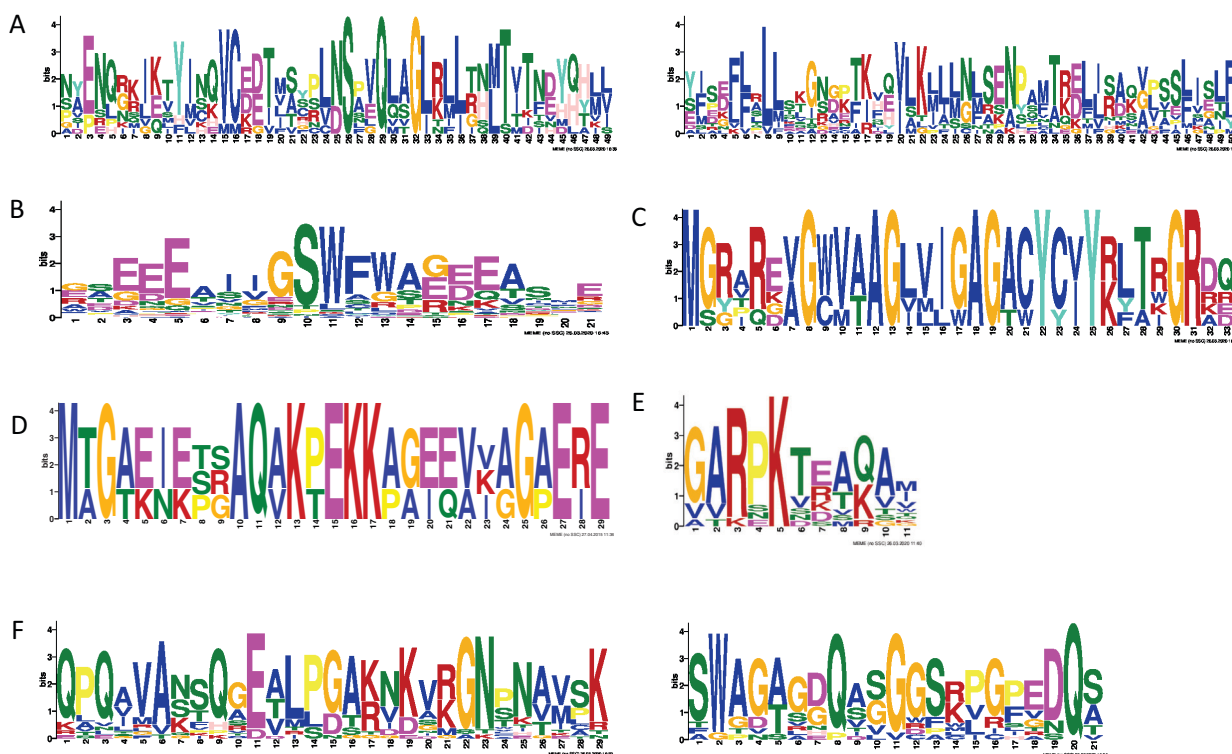
Motif-based sequence analyses were performed with all ten full-length human sequences from the Uniprot database (accession numbers in Table S1) and the MEME SUITE web application 5.1.1 [13]. The classic discovery mode was selected for six motifs with the site distribution option set to any number of repetitions (motifs from 6 to 50 amino acids width). Each motif is indicated as a colored block, the height of which is proportional to the  $-\log(p\text{-value})$ , indicating the overall strength of motif matches. The statistical significance of the 6 motifs (A, B, C, and F) was confirmed as their E-value was very low and smaller than  $1.7 \times 10^{-70}$  and p-values below  $2.87 \times 10^{-7}$  (p-value corresponds to the probability that an equal or better site would be found in a random sequence of the same length conforming to the background letter frequency). The family segregates in two subfamilies of five members each according to the presence or not of the previously described GASP motif (motif B; [2]). The ARM CX4 that stands in between both groups was not considered for further analysis of subfamily 1. Using the same procedure, the E motif emerged with a sufficient statistical E-value of  $4.4 \times 10^{-20}$  and p-values below  $8.62 \times 10^{-9}$ . Motif D was identified by comparing the N-ter extremities of GPRASP/ARMCX proteins and was characterized by MEME SUITE when the classic discovery mode was selected for 25 motifs instead of 6 of them. The sequence of each motif is presented as a letter-probability matrix in Figure 2. The location of the original GPRASP1 cGASP domain described in [16] is shown with dotted lines. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

The superfamily of armadillo repeat proteins are involved in various fundamental cellular processes, including vesicular transport and molecular signaling. Proteins within the different ARM subfamilies display a conserved architecture and provide a scaffold for the assembly of protein complexes with various functions [14]. Each armadillo repeat is composed of three alpha-helices and tandem armadillo (ARM) repeats form superhelical domains, which stack together and wrap around the interacting region of its partner [15]. While the identification of tandem repeats with high sequence similarities is easy, detecting Armadillo-repeats is more difficult and the level of detection by major domain databases was relatively poor when the GPRASP/ARMCX proteins were described. Nevertheless, biocomputing has now established that GPRASP/ARMCX proteins all share a common ARM-like domain at their C-termini, falling into the criteria of the

PFAM Domain of Unknown Function DUF634 now re-named Armadillo-like Arm\_2 (PF04826); while some articles proposed 3 armadillo repeats, others have identified up to 6 armadillo repeats. In a recent review, it was proposed that GPRASP1, GPRASP2, GPRASP3, and ARM CX6 encode proteins with five ARM repeats, the remaining members have an extra ARM repeat at the end of the C-ter region [15]. MEME software detects 2 to 3 Armadillo-like Arm\_2 (PF04826) PFAM motifs of around 50 amino-acids each in the C-ter domain of all GPRASP/AMRCX proteins (Figs. 1 and 2A).

## 2.2. The “GASP” Motifs in the Central Part of GPRASP/ARMCX Subfamily 1

Sequence analysis of the GPRASP/ARMCX proteins with the software MEME suite [13] confirms the multiple



**Fig. (2).** Sequences logos corresponding to the consensus amino-acid sequences determined by MEME SUITE analysis of the GPRASP/ARMCX family.

The relative sizes of the letters indicate their frequency in the sequences. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

occurrences of their specific GASP motif and defines a consensus sequence of twenty-one residues, the tetrapeptide SWFW forms a hydrophobic kernel surrounded by acidic residues, the fifteen most conserved residues form a core corresponding to the previously defined GASP motif. The GPRASP/ARMCX family can be divided into two subfamilies depending on the presence of the GASP motif [2, 12]. The central part of GPRASP1, GPRASP2, GPRASP3, ARM CX4, and ARM CX5 contains 22, 7, 3, 12, and 2 GASP motifs, respectively (Figs. 1 and 2B). Two GASP motifs are sometimes overlapping as the limits of acidic residues are shared with two close SWFW tetrapeptides. It happens twice in GPRASP1 and once in GPRASP3 and ARM CX5 (Figs. S1, S3 and S5).

To gain insight into the function of the GASP motifs, the orthologous mouse, rat, and human proteins were aligned using Clustal software: the three GASP motifs of GPRASP3 (Figure S3) and the two in ARM CX5 (Fig. S5) are highly conserved, suggesting a crucial functional role, whereas in GPRASP1, GPRASP2 and ARM CX4 (Figs. S1, S2 and S4, respectively) where there are more GASP motif repeats, some of them are very conserved as well, while others are missing or divergent from the consensus sequence.

### 2.3. Armadillo-like and GASP Repeats of GPRASP/ARMCX Proteins are Involved in Protein/Protein Interactions

The C-ter domain of GPRASP1 was originally identified from a yeast two-hybrid screen (2-HS) by the group of Mark

Von Zastrow and by our group as an interacting partner of the delta-opioid receptor (DOR; [1, 16]). The bait used in the two studies was the carboxyl-terminal intracellular tail (C-tail) of the human DOR. The identified binding domain was called cGASP and encoded residues 899-1395 of GPRASP1 [16] (Fig. 1), while the domain identified by our 2-HS encompassed residues 924 to 1395 of GPRASP1 [1]. Almost 30 GPCRs and/or GPCR C-tails were shown to interact with GPRASP1 (Table S1) [1, 2, 12, 17, 18]. cGASP that contains 3 arm2 PFAM motifs but also 4 GASP motifs was shown to bind to these receptors (GST pull down; affinity capture assays) and was proposed to compete as a dominant-negative mutant to disrupt GPRASP1-GPCR complexes [16]. As cGASP shares 62% identity with the C-ter region of GPRASP2, it was proposed that GPRASP1 and GPRASP2 may have similar functions [18]. Accordingly, 12 GPCRs and/or GPCR C-tails were identified to interact with GPRASP2 *in vitro* (Table S1) [1, 2, 18]. Later on, we showed by deletion analysis and site-directed mutagenesis that both the GASP motifs and the carboxyl-terminal domain containing putative armadillo repeats of GPRASP1 and GPRASP2 are critical for the interaction with C-tails of several GPCRs [12] (Table S1). We further showed that the central part of GPRASP1 (380-1073) interacts on its own *in vitro* with several GPCR C-tails ( $\beta$ -adrenergic receptors ADRB1 and ADRB2, DOR, cannabinoid receptor type 2 CNR2 and muscarinic M1R) as well as in cellular context with the overexpressed full-length receptors. In addition, we have demonstrated that the purified central domain of GPRASP1 interacts with purified full-length solubilized



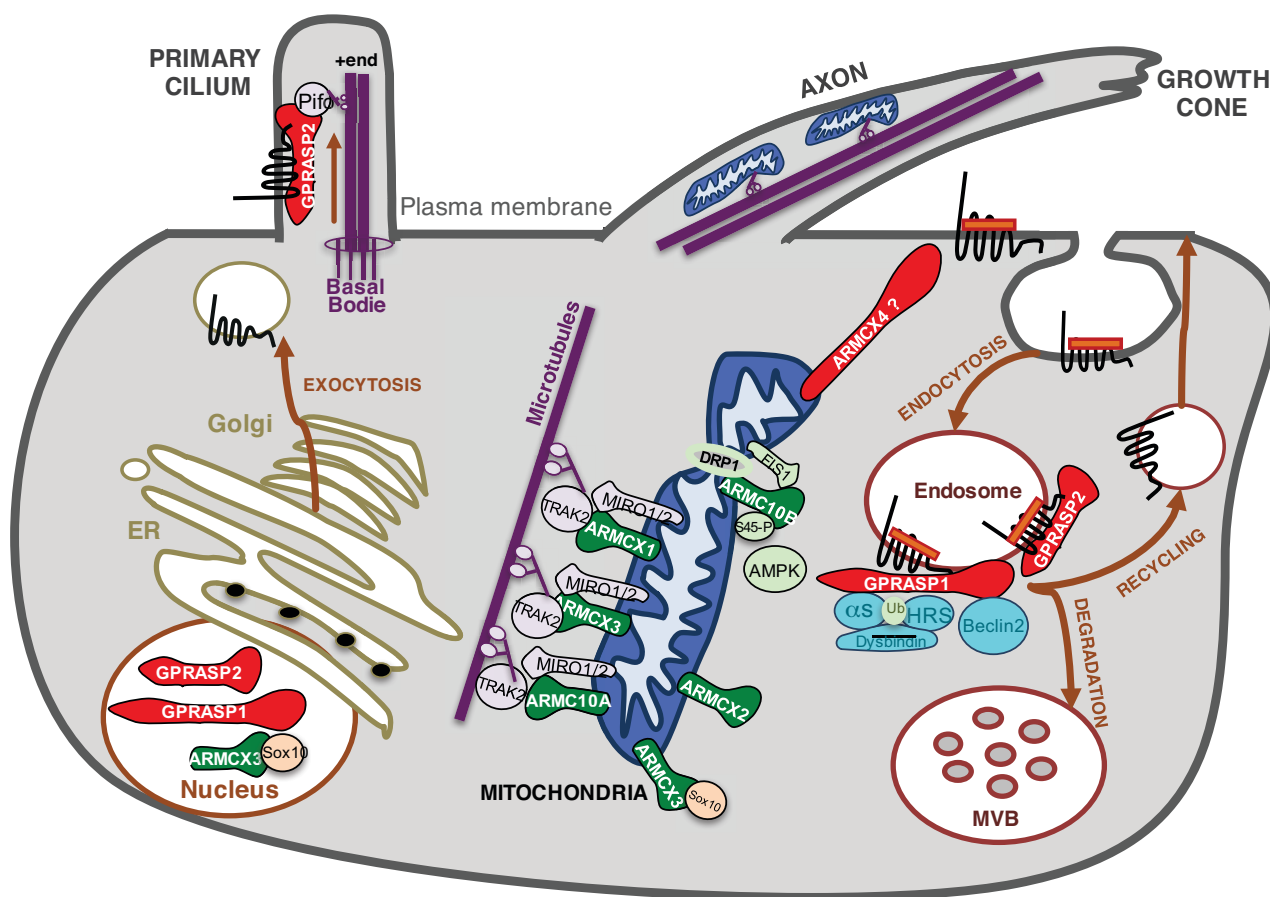
ADRB2 and CNR2 with an apparent affinity of 10 to 100nM [12] and that a small synthetic peptide of 20 amino acids derived from the GASP motif is capable of disrupting interactions between GPRASP1 or GPRASP2 and several GPCR C-tails [1, 12] (Table S1). When the two conserved GASP motifs of GPRASP2 were mutated, the interaction of GPRASP2 with GPCRs C-tails (ADRB1, M1, and CALCR) was lost as shown by GST-pull down experiments. In the same study, we also showed that GPRASP3, ARMCX5, and ARMCX1 can display significant interaction with several GPCRs C-tails. Although the region(s) in contact with these GPCRs remains to be discovered, the most likely candidates are the conserved carboxyl-terminal and the GASP repeats present in GPRASP3 and ARMCX5 [2, 12].

GPRASP1 was also found to interact with other proteins than GPCRs, including proteins implicated in GPCRs sorting at endosomes. Several fragments of GPRASP1 were identified as binding partners of the first 1-88 residues of the human Beclin2 protein in a yeast 2-HS: fragments 723-1011, 808-1069, 880-1167, 931-1190, 934-1211, and 1051-1324 of GPRASP1 [19]. Although it was not discussed in the study, the lack of overlap between fragment 723-1011 that is exclusively localized in the central part of GPRASP1 and contains

several GASP motifs and fragment 1051-1324 that covers mainly the ARM repeats extremity of GPRASP1, suggests to us that the interaction could take place at least with the two domains. The interaction was further confirmed by co-immunoprecipitation with either the cGASP fragment or the endogenously expressed GPRASP1. Despite the degree of identity between their C-ter domains, GPRASP2 was not found to co-immunoprecipitate with Beclin2 contrary to GPRASP1 (Table S1; Fig. 3) [19].

GPRASP1 was also identified in a two-hybrid screen as an interacting partner of the transcription factor period1 (Table S1) [20]. Several regions located within the N-ter and the central domains of GPRASP1 were shown to be critical for the interaction with this protein. The involvement of the GASP motif in this interaction has not been investigated so far.

The arm2 repeats containing C-ter domain of ARMCX3 were shown to be required for the interaction with the microtubule adaptor MIRO/TRAK2 complex by co-immunoprecipitation since the N-ter (1-106 residues) of ARMCX3 fused to GFP are not sufficient to interact with MIRO [3]. As ARMCX1, ARMCX2, and ARMC10 also interact with the MIRO/TRAK2 complex, it is most likely



**Fig. (3).** Scheme of the cellular functions of the GPRASP/ARMCX proteins.

Molecular complexes in which GPRASP/ARMCX proteins are engaged in membrane trafficking of GPCRs (targeting of Smoothed in the primary cilia and GPCRs sorting from the endosomes) or in mitochondria trafficking and dynamics. ER: endoplasmic reticulum, P: phosphorylation, site S45, MVB: Multivesicular bodies, Ub: ubiquitination. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

that the interaction is taking place within their homologous C-ter domain, although it has not been clearly found to be a direct interaction. Its C-ter domain also mediates the interaction of ARM CX3 with the 100 first residues of the transcriptional factor Sox10. Indeed, a truncated Myc-tagged N-ter (1-109 residues) ARM CX3 does not co-immunoprecipitate with Sox10 anymore [21].

To conclude this part, Armadillo-like and GASP repeats appear to represent essential regions of GPRASP/ARM CX proteins for their interaction with multiple partners.

#### **2.4. The Mitochondrial Targeting Signal Peptide and Transmembrane Domain of ARM C10, ARM CX4, ARM CX1, ARM CX2, ARM CX3, and ARM CX6 Proteins**

MEME detects a motif homologous in ARM C10, ARM CX1, ARM CX2, ARM CX3, ARM CX4, and ARM CX6 amino extremities from residues 1 to 33 (Figs. 1 and 2C). This motif encodes a transmembrane TM domain from residues 7 to 29 [3-5, 20, 22, 23]. Murine ARM CX5 was originally proposed to contain an N-ter transmembrane domain as well [3], but at least in human ARM CX5, it is not reported in UniProt, bioinformatics tools do not find a TM domain (example search with Constrained Consensus TOPology prediction server CCTOP) and there is no homology between the first residues of human ARM CX5 and those of the other ARM CX proteins.

Strong evidence indicates that the first residues of ARM C10, ARM CX1, and ARM CX3 serve as a targeting signal and transmembrane anchor to the outer membrane of mitochondria. Indeed, three independent groups have found ARM C10 to be localized to the mitochondria [4, 23-25]. The 4 different isoforms of ARM C10 were first described as Endoplasmic Reticulum ER proteins based on co-localization with calnexin of the C-terminally tagged ARM C10 with GFP. Looking back at the images of co-localization with the knowledge of its mitochondrial localization, it is probable that the co-localization between ARM C10 and calnexin was a misinterpretation [5]. Alternatively, maybe the co-localization is taking place at ER-mitochondria contact sites [26]. Myc-tagged overexpressed ARM C10 in HEK293 cells co-localizes with the MitoTracker dye staining for mitochondria [3]. Using the engineered ascorbate peroxidase system, ARM C10-V5-APEX2 overexpressed in HEK293T, HeLa, and U2OS cells was found to co-localize with the Mito-BFP protein in confocal immunofluorescence images and to be enriched in the outer membrane of mitochondria with most of the protein facing the cytosol [25]. Finally, the transmembrane TM domain of ARM C10 (residues 5-27) was found necessary for co-localization of the overexpressed ARM C10 with the mitochondrial marker TOM20 in HEK293T cells [23].

Myc-tagged ARM CX3 overexpressed in mouse olfactory bulb OBL21 cell line but not the ARM CX3 deleted from its residues 19 to 75, co-localizes with mitochondrial protein COXIV. Myc-tagged ARM CX3 was found in the mitochondrial purified fraction together with COXIV [21]. Specific polyclonal antibodies against the last ten residues of ARM CX3 (369-379 AA) detect punctate staining of the endogenous protein in hippocampal neurons at 15 DIV that partially co-localizes with the MitoTracker dye and a

MitDSRed fusion protein in confocal immunofluorescence images. It is detected in spots in the nucleus as well. Overexpressed ARM CX3 in HEK293 cells co-localizes with the MitoTracker and is found by electronic microscopy at the mitochondrial membranes [3]. A GFP-tagged ARM CX3 deleted from its extreme 1-12 residues was found in the nucleus, but the position of the GFP at the beginning of the fusion protein might have hindered the mitochondrial targeting [3]. More convincingly, the first 1 to 30 residues of ARM CX3 followed by a fused GFP are sufficient to target the GFP to mitochondria as seen by co-localization with MitoTracker [27].

Myc-tagged overexpressed ARM CX1 in HEK293 cells co-localizes with the MitoTracker dye staining for mitochondria [3]. The first 40 residues are necessary for ARM CX1-HA-tagged to co-localize with MitoDsRed marker in mouse cortical neurons [22].

Since the N-ter extremities of ARM C10, ARM CX1 and ARM CX3 and also the ones of the less characterized ARM CX2, ARM CX4 and ARM CX6 proteins are highly similar, it is probable that these 6 proteins are all targeted to the outer mitochondrial membrane via sequences within and/or around their transmembrane domain. Hence, it was shown that Myc-tagged overexpressed ARM CX2 and ARM CX6 in HEK293 cells also co-localize with the MitoTracker [3].

Additional evidences for mitochondrial localization are that ARM C10, ARM CX3 and ARM CX1 directly interact with the mitochondrial protein MIRO1 and MIRO2 (Table S1), (Fig. 3), ARM C10 was found to interact with a number of other peripheral or integral proteins of the outer mitochondrial membrane (Table S1, Fig. 3). Finally, ARM CX2 co-immunoprecipitates with the mitochondrial marker TOM22 as ARM CX3 does (Table S1; Fig. 3) [28].

#### **2.5. Nuclear Localization Signal (NLS) in GPRASP/ARM CX Proteins**

Several GPRASP/ARM CX proteins have been proposed to interact with transcriptional factors (ARM CX3 with Sox10, GPRASP1 with Period-1, GPRASP2 with TCF25, ARM C10 and ARM CX5 with p53, ARM CX1 with Myc; see Table S1), but no additional recent information on this subject is available [2] apart from that ARM CX1, ARM CX2 and ARM CX3 are affinity-purified with EZH2 and SUZ12 of the polycomb complex (Table S1) [29]. Our bioinformatics analysis led us to re-investigate the putative nuclear localization signal previously identified in the different members of GPRASP/ARM CX family and to confront them with experimental data regarding nuclear localization of the proteins. To this purpose, we have used NLStradamus and SeqNLS [30, 31].

The proteins that contain one or several putative NLS are GPRASP1 (in human, residues 313-337 in the N-ter domain and 372-394 in the central domain), GPRASP3 (in human, residues 35-47), ARM CX1 (in human, residues 158-180), ARM CX2 (in human, residues 35-49 and 279-301), ARM CX3 (in human, residues 89-108), and ARM CX4 (in human, residues 526-532). Human GPRASP2, ARM C10, ARM CX5 and ARM CX6 have no detectable NLS using the

two softwares. Murine ARM CX5 was originally proposed to contain an NLS on the basis of sequence analysis, but we did not detect it in human ARM CX5 [3]. Although the absence of a putative NLS does not preclude the concentration of a protein into the nucleus via interacting partners, ARM C10 has never been described in the nucleus. Indeed, SFB-ARM C10 and ARM C10-GFP were not observed in the nuclei of HEK293 and QSG-7701 cells, respectively [5; 23]. Similarly, ARM CX1 was not observed in the nuclei of mouse cortical neurons [22]. ARM CX3 has been clearly localized in the nucleus by several studies. Using myc-tagged-ARM CX3, a mutant lacking the TM domain was found in the nucleus of OBL21 cells [21]. Although using ARM CX3-GFP and different mutants in HEK293T cells, Serrat and colleagues did not describe ARM CX3 as being in the nucleus [4]. However, a GFP-delta1-12 ARM CX3 was localized in the nucleus of HEK293 cells and in chicken embryos spinal cord [3, 32] and anti-ARM CX3 detected endogenous ARM CX3 also in nuclei of cultured hippocampal neurons [3]. Finally, GPRASP2 was detected in nuclei extract of HeLa cells and was shown to be phosphorylated [33]. The phosphorylated residue in GPRASP2 is conserved in GPRASP1 and Period-1 was originally proposed to promote the translocation of GPRASP1 to the nucleus in cultured cells [20].

## 2.6. Other Motifs in GPRASP/ARMCX Proteins

### 2.6.1. A Homologous Motif in the Extreme N-ter Region of GPRASP1, GPRASP2, and GPRASP3

Our sequence analysis of GPRASP/ARMCX proteins with MEME algorithm allowed us to show that the first residues of GPRASP2 and GPRASP3 (1-29 amino acids) display 72.4 and 41.4 % identity with GPRASP1, respectively (Fig. 2D). This sequence is well conserved between human, mice, and rat orthologs (Figs. S1, S2 and S3). The analysis with the SeqNLS software indicated that this sequence could serve as NLS, although with low probability. The function of this well-conserved N-ter extremity has not yet been studied.

### 2.6.2. A Homologous Repeated Motif in the N-ter Domain of GPRASP1 and GPRASP2

It is interesting to note that GPRASP1 and GPRASP2 share another conserved motif in their N-ter part with more than 47.4% identity. Composed of 19 residues, it is repeated in tandem three times in GPRASP1 and seven times in GPRASP2 (Fig. 2E). No functional data have been assigned to this motif and it is unique to GPRASP1 and GPRASP2. The software SeqNLS detected with a low probability that it could serve as NLS. In large interactomic approaches, the TNF receptor-associated factor TRAF4 protein fished out the N-ter of human GPRASP1 (129-388) but it does not include these repeats (Table S1 and Fig. S1) [34].

### 2.6.3. Two Repeated Motifs Unique to the Central Part of ARM CX4

Finally, ARM CX4, the largest protein of the family that has not been yet studied by any research group, contains two additional motifs. According to MEME, one is composed of 29 residues and repeated in tandem 21 times (Fig. 2F). It precedes the GASP repeats in the central region of ARM CX4. Another motif, localized together with the GASP

motifs is present 13 times and is 21 residues long (Fig. 2F). Some of these repeats are conserved between human, mouse, and rat orthologs (Fig. S4).

### 2.6.4. Perspectives: A Scaffolding Role for GPRASP/ARMCX Proteins

GPRASP/ARMCX proteins, through their homologous C-ter domain, belong to the alpha-solenoid proteins. Alpha-solenoids are elongated flexible structural domains formed by alpha-helical repeats that can be sensitive to mechanical stretch forces and can mediate multiple interactions, at the same time, serving as scaffolding proteins [35, 36]. In GPRASP/ARMCX proteins, this domain, which is their most common feature, has been established to mediate some protein-protein interactions. It will be interesting to determine its three-dimensional structure, in addition, to pursuing research on its functional properties, particularly because in some studies, its contribution to the binding to partner proteins is mixed with the contribution of the GASP motifs.

Our previous review had subdivided the GPRASP/ARMCX protein family into two groups: those that contain the GASP motifs (subfamily 1: GPRASP1, GPRASP2, GPRASP3, ARM CX4 and ARM CX5) and those that do not (subfamily 2: ARM C10, ARM CX1, ARM CX2, ARM CX3, ARM CX6). This classification continues to hold a functional meaning with respect to GPCRs interaction as reviewed in this closing chapter and in the following chapter II, with ARM CX4 that somehow overlaps the boundary between the two subfamilies: ARM CX4, like the other members of the subfamily 2, contains a transmembrane domain that might target the protein to the outer mitochondrial membrane. The main functional studies on subfamily 2 concern mitochondrial trafficking and dynamics and will be described in chapter III.

While traditionally, protein function was viewed as dependent on defined folded three-dimensional structure, it appears that the N-ter and central domains of the GPRASP/ARMCX protein subfamily 1 are not folded into alpha-helices or beta-strands (if one run a secondary structure analysis of the proteins). These domains, thus, probably fall into the definition of Intrinsic Disordered Regions or IDRs. Disordered regions are often subjected to post-translational modifications and can expose short linear motifs available for protein-protein interactions [37]. Interestingly, GPRASP1, GPRASP2, GPRASP3 and ARM CX4 and ARM CX5, these IDRs are composed of both novel repeats of unknown function (Figs. 1 and 2) and of the GASP repeated motif that we have found to be necessary for interactions with GPCRs and probably with beclin2 as well. The number of GASP repeats varies between orthologs with a vast number of repeats (GPRASP1, GPRASP2, ARM CX4), indicating that rapid loss or gain of repeats occurred in evolution. At least in the subfamily 1 of GPRASP/ARMCX proteins, not only the carboxyl-terminal domain serves as a scaffold but probably the repeats in their amino-terminal and central domains as well. It remains to explore further the functional properties of these multiple kinds of repeats that are unique to this subfamily of proteins. For example, it would be interesting to pinpoint which domains of GPRASP1 can mediate the interaction with the subunit G $\alpha$ S of heterotrimeric G protein [38] and with the ESCRT protein

HRS [38, 39] and which domain of GPRASP2 is responsible for direct interaction with the primary cilium located Pifo protein (Table S1 and Fig. 3) [40].

In terms of drug discovery, protein-protein interactions are being explored either with inhibitors or with stabilizers despite the challenges to target large and flat protein interfaces [41, 42]. Since proteins with IDR are prevalent in eukaryotes, we think that these proteins and among them, the GPRASP/ARMCX family, are under-studied drug targets mainly because current strategies are often based on well-defined structures [43, 44]. With this review, we aim to emphasize the functional relevance of the GPRASP/ARMCX family in order to attract the attention of medicinal chemists and pharmacologists.

### 3. GPRASP/ARMCX SUBFAMILY 1 IN GPCR TRAFFICKING

The main functions of GPRASP/ARMCX subfamily 1 that have been studied are linked to GPCRs trafficking in order to regulate signaling and adaptation to GPCRs activation (Fig. 3). Since the last reviews on the subject [2, 45, 46], very interesting results on GPRASP1 and GPRASP2 and their novel interacting partners together with phenotypes in knockout mice as well as genetic mutations in humans have been reported that shed new light on the functions of GPRASP/ARMCX subfamily 1 (Table 1).

As described in chapter I, many interacting proteins of GPRASPs are G protein-coupled receptors (GPCRs). There are no less than 799 verified sequences of human GPCRs and they can be activated by an extraordinary diversity of ligands, including amino acids,  $Ca^{2+}$  ions, peptides, lipid-like substances, and large glycoprotein hormones [47]. The activated GPCR acts as a GTP exchange factor on the  $G\alpha$  subunit triggering the intracellular response cascades [48]. In order to have their large variety of activities and precise regulation of the cellular response, once synthesized, GPCRs must be correctly addressed to the plasma membrane or in specialized membrane compartments, such as primary cilium, synapses or mitochondria [49, 50]. At the cell surface, upon stimulation by agonists, most GPCRs undergo rapid desensitization and internalization into clathrin-coated pits due to post-translational modifications (phosphorylations, ubiquitinations), leading to the recruitment of  $\beta$ -arrestins. Following endocytosis in early endosomes, they can either be recycled back to the cell surface or directed towards multivesicular bodies MVB and lysosomes for degradation. A number of intracellular GPCR binding proteins contribute to this regulation cycle of GPCRs signaling [51]. *In vitro*, GPRASP1 has the largest spectrum of GPCRs interaction, almost as large as the one of  $\beta$ -arrestins (Table S1). But contrary to  $\beta$ -arrestins, in cells, the interaction of GPRASP1 with GPCRs is detected at steady-state with a scarce report of co-localization with GPCRs. The recent literature, however, has brought convincing evidence that GPRASP1 and GPRASP2 participate in the sorting of GPCRs from the endosomes and to the primary cilium, respectively.

#### 3.1. Role of GPRASP1 in GPCR Trafficking and *In Vivo* Consequences

This function of GPRASP1 has been the topic of the reviews published so far [2, 45, 46, 18]. Most studies have

evaluated the degradation of tagged-GPCRs overexpressed in cells using a plasma membrane protein biotinylation assay followed by a chase in order to trace the number of receptors after several minutes or hours of activation with agonists. Radiolabelled binding studies have also been used in different studies. The implication of GPRASP1 has been evaluated mostly by overexpression of the truncated cGASP protein, considered as a dominant-negative form of GPRASP1. Some more recent studies have used down-regulation of endogenous GPRASP1 using siRNA or shRNA. Finally, two research teams including ours have compared the down-regulation of GPCRs after chronic stimulation in WT versus GPRASP1 knockout mice and their behavioural consequences.

#### 3.1.1. Recent Studies Indicating a Role of GPRASP1 in GPCR Post-endocytic Sorting and in GPCR Signaling

##### 3.1.1.1. Interaction of GPRASP1 with the Delta-opioid Receptor (DOR) together with Dysbindin, HRS, G $\alpha$ S and Beclin2: *In Vitro* Effects on Activated DOR Targeting for Degradation

The cGASP truncated protein was first used in Mark Von Zastrow's laboratory in the seminal work on GPRASP1 in interaction with the delta-opioid receptor DOR [16]. cGASP was proposed to be a dominant-negative form of GPRASP1 based on the fact that it competes with GPRASP1 for DOR interaction both in GST-pull down assays using the C-tail of DOR and in co-immunoprecipitation experiments with cell lysates. cGASP was also found to have the opposite effect to overexpressed GPRASP1 on activated DOR down-regulation as measured by binding assays. Whistler and collaborators showed that in HEK293 cells overexpressing FLAG-tagged-DOR, in immunofluorescence assays, after 3h of agonist application, DOR was observed in the perinuclear region, widely co-localizing with the lysosomal markers LAMP1 and LAMP2. Using a biotin degradation assay, in HEK293 cells overexpressing cGASP together with FLAG-DOR, the amount of DOR was maintained in cGASP expressing cells 3 hours after agonist treatment, whereas the receptor was fully degraded in cells without cGASP expression. This indicated that cGASP expression inhibited the degradation of activated DOR [16]. GPRASP1 was, thus, proposed to be involved in promoting activated DOR degradation.

Other proteins have since been implicated *in vitro* to target DOR towards the lysosomes and interestingly, four of them interact directly or indirectly *in vitro* with GPRASP1: HRS,  $G\alpha$ S, Beclin2, and dysbindin (see Table S1 and Fig. 3). DOR is degraded *via* the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT). The ESCRT-0 complex is a heterodimer of HRS (HGF-regulated tyrosine kinase substrate) and STAM (Signal Transducing Adaptor Molecule). The ESCRT-0 localizes to the endosomal membrane and recognizes the mono-ubiquitin signals to lead the membrane protein target towards the intraluminal vesicles of the multivesicular bodies MVB and lysosomes [52, 53]. While some GPCRs are directly ubiquitinated for recognition by the ESCRT-0, such as the chemokine receptor CXCR4, the ubiquitination of DOR is not required for its degradation [54] and it is proposed that other ubiquitinated proteins binding to DOR serve as adaptors for the receptor to be recruited

**Table 1. Summary of the phenotypes observed in mice, in humans or in cells upon variation of expression of WT or mutant GPRASP/ARMCX proteins from subfamily 1 and their most characterized binding partners**

Subfamily 1 Members	Knock-out Mice Phenotype	Human Mutation & Phenotype	Human Deletion & Phenotype	Overexpression in Cell or Animal	Down-regulation in Cell or Animal	Interacting Proteins Potentially Implicated
<b>GPRASP1 (GASP1, KIAA0443, PIPS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>KO GPRASP1 : normal conditions</u></li> <li>- ↓ spontaneous vertical locomotion [66]</li> <li>- No impairment in locomotor response, coordination or other motor functions [65]</li> <li>- Impaired memory processes: delayed acquisition/expression of complex tasks [66, 95]</li> <li>○ KO GPRASP1 : chronic GPCRs activation</li> <li>- Loss of CB1 receptor analgesic tolerance [67]</li> <li>↓ total CB1R amount</li> <li>↓ degradation of activated CB1R [67]</li> <li>- ↓ hyper locomotor activity after repeated treatment with cocaine. [66, 65]</li> <li>- Absence of cocaine-induced NMDA and AMPAR potentiation [75]</li> <li><b>Controversy:</b> down-regulation of GPCRs <i>in vivo</i></li> <li>- ↑ degradation of dopaminergic and muscarinic receptors in the striatum upon chronic cocaine treatment [66]</li> <li>- ↓ degradation of activated D2R in the striatum upon chronic cocaine treatment [65]</li> <li>- <u>Deletion Xq22</u> (see GPRASP2) [94]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>GPRASP1 E1164G and K352*</u>: whole exome sequencing : missense or stop mutations in papillary thyroid cancer (3/11) [121]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>Xq22.1: 1.1Mb deletion</u> [7]: GPRASP2</li> <li>○ <u>Xq22.1: 1.1 Mb deletion</u> [9]: see GPRASP2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>In vitro</u></li> <li>- ↑ constitutive signalling of US28R [63]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>In vitro</u> :</li> <li>- ↓ constitutive degradation of US28 and ↓ production of inositol phosphate [63]</li> <li>- ↑ recycling of activated GPR55 [62]</li> <li>- ↓ degradation of activated dopaminergic D2 and D3 receptors [78]</li> <li>- ↑ CXCR4 at plasma membrane &amp; delay in its degradation after activation [59] Overexpression of GPRASP3</li> <li>- ↓ incretin dependent insulin secretion / signalling by GLP1R : ↓ of active GLP1R? [64]</li> <li>○ <u>In vivo</u></li> <li>- ↑ hematopoietic stem cells implantation [59]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>GPCRs</u></li> <li>- DOR [16]</li> <li>- CB1R [71, 70, 67]</li> <li>- D2R [76, 66, 65, 77]</li> <li>- US28 [63]</li> <li>- GPR55 [62]</li> <li>- 5HT7 [61]</li> <li>- GLP1R [64]</li> <li>- CXCR4 [59]</li> <li>○ <u>Trafficking complexes</u></li> <li>-DOR and D2R/dysbindin [39]</li> <li>-DOR and CXCR4 /Gas/HRS/dysbind in complex [38]</li> <li>-DOR and CB1R /Beclin2 [19, 72]</li> </ul>
<b>GPRASP2 (GASP2, HIP15)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>KO GPRASP2 : Intellectual disability and Autism Spectrum Disorder like behavior</u> [91]</li> <li>- Viable and born with Mendelian ratio</li> <li>- No significant alteration in motor function or anxiety but a slight increase of time spent in the center of the open field.</li> <li>- <b>Learning and memory impairments.</b></li> <li>- <b>Social impairments</b> [91]</li> <li>- Obesity with age</li> <li>- Alter hippocampal neuronal morphology: ↓ in dendritic arborization , ↓ total dendritic length in distal region of pyramidal neurons.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>GPRASP2 A573N</u> [86]</li> <li>c.1717_1718GC&gt;AA, p.A573N : <b>Missense mutation</b></li> <li>four hemizygous male patients and two heterozygous female carriers family</li> <li>- <b>Hearing loss</b></li> <li>- Abnormal auricular shapen bilateral ptosis,</li> <li>- Abnormally dilated internal auditory canal,</li> <li>- Incomplete separation of cochlea basal turn from the fundus</li> <li>- <b>Facial dysmorphism with bilateral palpebral ptosis</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>Xq22.1: familial 1.1Mb deletion :</u></li> <li><b>Mental retardation behavioral disorders</b> in female patients [7]</li> <li>12 genes deleted: <i>NXF5, ZMAT1, TCEAL2, TCEAL6, BEX5, NXF2, TMSB15A, NXF4, ARM CX5, GPRASP1, GPRASP2 and GPRASP3.</i></li> <li><b>mother &amp; daughter:</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>In vitro</u></li> <li>- ↑ dendritic arborization and length,</li> <li>- ↑ spine density, length and head diameter</li> <li>- ↑ mature dendrites</li> <li>- ↓ of mGluR5 at the plasma membrane [91]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>In vitro</u></li> <li>- ↑ CXCR4 at plasma membrane &amp; delay in its degradation after activation. Overexpression of GPRASP3 [59]</li> <li>- ↓ spine density, neuronal complexity and total dendritic length Reversed by co-expression of mGPRASP2 in Primary neuronal cell culture</li> <li>- Abnormal internalization of activated mGluR5, mGluR5 Antagonist (MPEP) prevents reduction in</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>GPCRs</u></li> <li>-mGluR5 [91]</li> <li>-CXCR4 [59]</li> <li>-Smoothened/Pif0 complex [11, 40]</li> </ul>

(Table 1) contd....

Subfamily 1 Members	Knock-out Mice Phenotype	Human Mutation & Phenotype	Human Deletion & Phenotype	Overexpression in Cell or Animal	Down-regulation in Cell or Animal	Interacting Proteins Potentially Implicated
<b>GPRASP2 (GASP2, HIP15)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Striking effect on apical neuronal arborization</li> <li>- ↓ field excitatory post synaptic potentials in CA1 hippocampus area with no alteration of presynaptic functions</li> <li>- ↓ amplitude of AMPA receptor-mediated miniature excitatory postsynaptic currents</li> <li>- ↓ density of mature spines in apical regions [91]</li> <li>- ↓ mGluR5 amount [91]</li> <li>○ <u>Deletion Xq22</u> [94]</li> <li><u>DelA</u></li> <li><b>Male :</b></li> <li>- Neonatal lethality by acute respiratory failure</li> <li>- Cleft palate.</li> <li>- Lung development delay</li> <li><b>Female heterozygous:</b></li> <li>- 45% Neonatal lethality</li> <li>- Rare cleft palate,</li> <li>- Postnatal growth delay and</li> <li>- Spontaneous seizures, epilepsy</li> <li><u>DelC Xq22 0.35Mb:</u> 8 genes deleted [94]</li> <li><b>ARMCX5, GPRASP1 GPRASP2 and GPRASP3</b> (orthologs in the Xq22.1 human deletion, Grillo <i>et al.</i> 2010, Cao <i>et al.</i> 2016) + <i>ARXES1, ARXES2, BEX2, NXF3</i> (no human orthologs in the Xq22.1 human deletion)</li> <li><b>Male :</b></li> <li>- Neonatal lethality by respiratory failure,</li> <li>- Cleft palate</li> <li><b>Female :</b></li> <li>- Rare cleft palate,</li> <li>- Epilepsy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>GPRASP2 I791K</u></li> <li>Potentially involved in schizophrenia [90]</li> <li>○ <u>Missense mutation</u></li> <li>Intellectual disability and Autism Spectrum Disorder: [89]</li> <li>3 genes mutated in one female:</li> <li>- GPRASP2 R812C,</li> <li>- SEMA3F R679W,</li> <li>- SCN11A frameshift</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Short stature, brachycephaly, coarse face, - epilepsy &amp; borderline personality disorder.</li> <li><b>Son:</b> spontaneous death at 15 days</li> <li><b>Daughter:</b></li> <li>- Asphyxia and cleft palate at birth, micro-brachycephaly, general hypotonia, unspecific periventricular white matter laceration</li> <li>Hypertrichosis, distal muscle hypotrophy, scoliosis and facial dysmorphisms (small forehead, thick lips, smooth philtrum and low ears)</li> <li>- ASD with stereotypic movements and self-mutilation</li> <li>○ <u>Xq22.1: 1.1Mb deletion</u> [9]:</li> <li>17 genes of <b>ARMCX6, ARM CX3, ARM CX2, NXF5, ZMAT1, TCEAL2, TCEAL6, BEX5, NXF2, -NXF2B</b> (paralog), <b>TCP11X2, TMSB15A, NXF4, ARM CX5, GPRASP1, GPRASP2 and GPRASP3</b></li> <li>- <b>male infant:</b> failure to thrive, hypoglycemia, subtle dysmorphic features, umbilical hernia, hypotonia with spasticity in the lower extremities, focal enlargement of the frontal temporal lobe on cerebral MRI,</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>neuronal arborization and recovers spine density , increase of mGluR5 surface and blocks DHPG-mediated changes in receptor levels [91]</li> <li>○ <u>In vivo</u></li> <li>- ↑hematopoietic stem cells implantation [58, 59]</li> </ul>	

(Table 1) contd....

Subfamily 1 Members	Knock-out Mice Phenotype	Human Mutation & Phenotype	Human Deletion & Phenotype	Overexpression in Cell or Animal	Down-regulation in Cell or Animal	Interacting Proteins Potentially Implicated
<b>GPRASP3 (GASP3, bHLHB9, p60TRP)</b>	o Deletion Xq22 (see GPRASP2) [94]	o <u>Alzheimer disease</u> [122]: - ↓ GPRASP3 in patients' brain with sporadic AD - Influence on NNT1 (new neurotrophin-1) and p48ZnF (p48-zinc-finger-protein) signalling	and respiratory failure with thoracic insufficiency syndrome, tracheomalacia, and laryngomalacia o <u>Xq22.1: 1.1Mb deletion</u> [7]: see GPRASP2 o <u>Xq22.1: 1.1 Mb deletion</u> [9]: see GPRASP2	o <u>In vitro</u> : - ↑ neurogenesis [123] o <u>In vivo</u> : - Affects neuro-protective capacities - ↑ synaptogenesis Inhibiting Bace1 & Psen - Improve cognitive functions [123]	o <u>In vitro</u> : - Modulates the expression and cleavage of pivotal CNS regulator proteins. - activation of apoptosis (↑ activation of Caspase 3 and ↑ annexin-V-PI cells) [123]	-
<b>ARMCX4 (GASP4)</b>	No KO mice	- <i>Patients: whole exome sequencing</i> : Passenger gene in endometrial cancer c.6167C>A, p.P2056H [124]	-	-	-	-
<b>ARMCX5 (GASP5)</b>	- Deletion Xq22 (see GPRASP2) [94]	-	- <u>Xq22.1: 1.1Mb deletion</u> [7]: see GPRASP2 - <u>Xq22.1: 1.1 Mb deletion</u> [9]: see GPRASP2	-	-	-

↑: increase; ↓: decrease; AD: Alzheimer disease; CNS: central nervous system.

by the ESCRT machinery [46]. Dysbindin was first proposed to be such an adaptor protein for DOR targeting towards the ESCRT complex, and it is the target for ubiquitination by the ubiquitin ligase TRIM32 [39]. Concerning DOR regulation, dysbindin depletion up-regulated total FLAG-DOR level, as well as cell surface localized one. Finally, its depletion slightly slowed down the degradation of activated FLAG-DOR after 4 hours [39]. In addition, HA-tagged-dysbindin was found to co-immunoprecipitate with EGFP-GPRASP1 and with myc-tagged HRS in HEK293 cells. It was also shown to co-localize with Cherry-tagged-HRS on intracellular organelles, probably endosomes [39].

Christine Lavoie's team has since proposed that GPRASP1 forms a complex with HRS/dysbindin and surprisingly with the heterotrimeric G $\alpha$ s subunit [38]. Indeed, among other GPCRs, the flag-tagged DOR cell surface expression was increased in G $\alpha$ s knock-down cells depleted by siRNA [38]. While treatment by agonists induced degradation of DOR, knock-down of G $\alpha$ s reduced its degradation and DOR accumulated in early endosomes instead of lysosomes 2h after activation. The authors proposed that G $\alpha$ s is crucial for the sorting of DOR in the intraluminal vesicles of MVB for lysosomal degradation. In COS transfected cells, mCherry-tagged-GPRASP1 could sometimes be detected on intracellular vesicles in co-localization with both GFP-G $\alpha$ s and endogenous HRS. In addition, Myc-tagged dysbindin was found to co-localize with G $\alpha$ s-GFP and endogenous HRS on endosomal structures as well. While G $\alpha$ s directly interacted in GST-pull down assays with GPRASP1 and dysbindin, GPRASP1 was found to directly interact with HRS [38]. Therefore, GPRASP1 seems to participate in a multicomponent complex involved in DOR sorting to MVBs. Dr. Lavoie's team has lately proposed that G $\alpha$ s contains a Ubiquitin-Interacting Motif (UIM) necessary for its

role with the ESCRT machinery [55]. Interestingly, G $\alpha$ s has also been proposed to regulate the sorting of other receptors than GPCRs, such as the EGFR [56, 57].

In an independent study, Beclin2, another binding partner of GPRASP1, has been implicated in DOR degradation [19]. In Beclin2 knock-down cells, DOR was not further degraded after stimulation but stayed in intracellular compartments. A Beclin2 I80S mutant did not bind GPRASP1 in co-immunoprecipitation experiments. Very elegantly, using complementation assay of siRNA depleted Beclin2 cells, overexpression of WT Beclin2 could rescue degradation of activated DOR but not overexpression of the Beclin2 I80S mutant. This suggested that Beclin2 interaction with GPRASP1 is necessary for targeting DOR towards the lysosomes. The authors also showed that GPRASP1 does not take part in the autophagy process, together with Beclin2 (Table S1 and Fig. 3) [19].

If the importance of the GPRASP1/HRS/ G $\alpha$ s /dysbindin complex, on one hand, and GPRASP1/Beclin2 complex, on the other hand, is established in cells for activating DOR sorting to lysosomes, it is not yet known whether Beclin2 interacts with other proteins of the complex and the spatio-temporal organization of the interactions in the complexes remains to be determined (Fig. 3 and Table 1). In addition, the effect of GPRASP1 on DOR signaling *in vivo* has not been studied so far.

### 3.1.1.2. GPRASP1 is a Negative Regulator of Hematopoietic Stem Cells Transplantation via Chemokine Receptor CXCR4 Regulation

The fascinating role of GPRASP1 in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) has been discovered by the team of Dr. Shannon McKinney-Freeman [58, 59]. In the first study, the goal of the team was to iden-

tify proteins regulating hematopoietic stem and progenitor cell transplantation. Indeed, HSPC graft is the only curative treatment available for many forms of leukemia [60]. Databases of HSPC gene expression and the results of RT-qPCR experiments with bone marrow samples were analyzed. The information of gene expression variation was extracted and correlated to a phenotype of bone marrow repopulation *in vivo* thanks to associated shRNA-transfected HSPCs transplanted in irradiated mice. Among the 17 gene regulators of HSPC repopulation identified in this screen, there were two proteins of the GPRASP/ARMCX family: ARMCX1 and GPRASP2. In addition, they were the only two genes for which knock-down increased the HSPC bone marrow repopulation instead of decreasing it [58].

The role of GPRASP2 was further investigated in a study that included its closest homolog, GPRASP1, in the experimental set-up leading to identical results for both genes (ARMCX1 was not further studied). The phenotype of HSPC bone marrow repopulation was confirmed for both genes independently [59]. The authors observed an increase in survival of HSPCs in GPRASP1 or GPRASP2 knock-down cells [58, 59]. When both genes were silenced together, there was no further increase in bone marrow repopulation by the transplanted HSPC. Nevertheless, very importantly, there was compensation in each knockout cells with overexpression of their homolog GPRASP3. Down-regulation of GPRASP3 had a cumulative effect in increasing further bone marrow repopulation by either GPRASP1-KO HSPCs or GPRASP2-KO HSPCs without any effects on WT HSPCs. Next, the authors decided to investigate if the endogenously expressed chemokine CXCR4 receptor was the target of the negative effect of GPRASPs on the HSPC bone marrow repopulation because this GPCR is known to be implicated in HSPCs homing. Flow cytometry was used to look at the amount of endogenous CXCR4 by immunolabeling at the cell surface and in the intracellular compartment due to permeabilization. The results are complex, but the most convincing data are that the total CXCR4 level is increased 72h after knockdown of either GPRASP1 or GPRASP2 in HSPC as compared to control and that this seems to be due to a diminution of constitutive CXCR4 degradation (slightly longer half-life of CXCR4 measured in the presence of cycloheximide [59]). Finally, the team of Dr. McKinney-Freeman showed that GPRASP gene deletion in CXCR4 knockout HSPCs did not lead to an increase in survival and no enhancement effect in bone marrow repopulation by the transplanted HSPCs as compared with control cells. This result strongly suggests that CXCR4 is a key player in the mechanism of implantation modulated by GPRASP1 or GPRASP2 [59, 60].

Interestingly, in *in vitro* experiments, CXCR4 degradation has been shown to be dependent on G $\alpha$ s [38] but independent of Beclin2 [19]. The interaction between GPRASP2 and GPRASP3 with G $\alpha$ s or HRS has not been investigated so far, but GPRASP2 does not bind Beclin2 [19].

### **3.1.1.3. GPRASP1 and Down-regulation of the Serotonin Receptor 5HT7 and of the Cannabinoid Related Receptor GPR55 In Vitro**

cGASP was used in recent studies to investigate GPRASP1 in GPCRs degradation. The serotonin receptor 7

(5HT7) is targeted by psychiatric treatments, such as clozapine, which surprisingly causes an inhibition of the G protein signaling pathway and simultaneous internalization of the receptor followed by its degradation. In cGASP transfected HEK293 cells, the normal clozapine-induced down-regulation of the 5HT7 receptor after 24h of treatment was prevented, as if GPRASP1 was needed to induce its degradation [61]. However, this team could not sufficiently knock-down GPRASP1 in HEK293 using siRNA to confirm and conclude about the effect of GPRASP1 deficiency. The use of cGASP as the only tool to decipher the role of GPRASP1 in GPCR degradation is questionable because first, it is usually expressed at a much higher level than the endogenous GPRASP1; second, it is not excluded that it can interfere with the protein-protein interactions between other GPRASPs and third, due to its size, it might cause steric hindrance blocking the interaction of the GPCRs with other proteins necessary for their proper post-endocytic targeting. More convincingly, in HEK93 cells overexpressing a flag-tagged cannabinoid related receptor GPR55 that co-immunoprecipitated with GPRASP1, GPRASP1 shRNA did not influence the internalization of the receptor, but it promoted its recycling to the plasma membrane instead of its degradation after 45min of agonist treatments [62]. This result suggests that GPRASP1 plays a role in the sorting of the endocytosed GPR55 towards its degradation.

### **3.1.1.4. GPRASP1 and the Signaling of the Viral Chemokine Receptor US28 and of the Glucagon-like Peptide Receptor GLP1R**

The human cytomegalovirus produces 4 GPCRs, including the chemokine-like receptor US28. When expressed in cells, this receptor is constitutively active and accumulates in late endosomes and lysosomes following internalization. The US28R can bind GPRASP1 [63]. In cGASP transfected cells or GPRASP1-knock-down cells transfected with flag-tagged US28R, the lysosomal degradation of the receptor was slowed-down. In addition, there was a modification of the constitutive signaling pathway of US28R in cGASP transfected cells or in the absence of GPRASP1, with unexpectedly, a decrease in the G $\alpha$ q pathway (decrease in production of inositol phosphate) and of further downstream signaling events (decrease in NF-KB and CREB transcription factors target expression). Inversely, overexpression of GPRASP1 increased constitutive signaling of US28R and could rescue the decrease in signaling in GPRASP1 shRNA infected cells [63]. These data suggest that GPRASP1 could participate in intracellular signaling in addition to targeting GPCRs towards degradation. One of the latest studies looked at another GPCR partner of GPRASP1: the glucagon-like peptide receptor 1 [64]. When activated, this receptor causes insulin release by pancreatic  $\beta$  cells, but as for many other GPCRs, its activation induces its endocytosis. That is why the team looked particularly after the proteins already known to participate in GPCR trafficking. They tested the knock-down effect by RNAi of proteins implicated in post-endocytosis GPCRs trafficking using a functional assay: an incretin-stimulated insulin secretion test to evaluate the response of the overexpressed GLP1R in  $\beta$  pancreatic cells. Surprisingly, knock-down of GPRASP1 induced lower insulin secretion, suggesting that, like for US28R, GPRASP1 is involved in GLP1R-associated signaling [64].



### 3.1.2. GPRASP1 in the Adaptations Associated with Chronic Stimulation of GPCRs In Vivo

Dr. Whistler's team and, independently, our team, have generated GPRASP1 knockout mice, allowing us to investigate the behavioral consequences of GPRASP1 absence together with its function in activated receptors down-regulation *in vivo* [65, 66]. Experimental models that were selected for the studies were chronic stimulations of GPCRs for which GPRASP1 was implicated in the degradation process *in vitro* and for which repeated activation by exogenous agonist administration *in vivo* were described to lead to adaptive responses, including tolerance to anti-nociception or sensitization to hyperlocomotion [65, 67]. GPRASP1-KO mice showed a clear decrease in these adaptive responses (Table 1).

#### 3.1.2.1. Attenuated Analgesic Tolerance to Chronic Cannabinoid CB1 Receptor Stimulation in GPRASP1-KO Mice

The development of analgesic tolerance is well known in the case of chronic stimulation of the mu-opioid receptor with opiates. At the behavioral level, it corresponds to a decrease in the analgesia obtained by the same dose of the agonist molecule after several injections [68, 69]. Activation of CB1R with agonists also leads to anti-nociception and to the development of tolerance upon chronic activation. The role of GPRASP1 in CB1R analgesia and tolerance was tested by injecting the CB1R agonist WIN55,212-2 for consecutive days in GPRASP1 knockout mice. On day 1 and day 7, behavioral tests were performed to measure thermal anti-nociception, motor incoordination, and hypothermia. Acute response to CB1R agonist was almost unchanged in the absence of GPRASP1 [67, 70]. After repeated agonist administration, tolerance to the WIN55,212-2 was detected in all behavioral tests in WT animals, while there was no tolerance to the agonist in thermal analgesia and motor incoordination in GPRASP1-KO mice. It is worth to note that tolerance to hypothermia still developed in GPRASP1-KO mice.

The amount of CB1R binding sites in the spinal cord and cerebellum of WT and GPRASP1 knockout mice was compared using radiolabelled ligand [67]. Intriguingly, before activation, there was a reduced number of CB1R in the spinal cord of GPRASP1-KO mice as compared with WT mice [67]. After repeated treatment with the WIN55,212-2 agonist, there was a significant diminution of the number of CB1R in the spinal cord of WT mice. In GPRASP1-KO mice, there was no difference in receptors number after the treatment in the spinal cord. These data tend to confirm earlier studies performed *in vitro* and *in vivo* [67, 71]. GPRASP1, thus, appeared as a key player in the mechanism of endogenous adaptation following chronic activation of CB1R by promoting activated CB1R down-regulation.

One of the interacting partners of GPRASP1, Beclin2, has been implicated in CB1R homeostasis *in vivo* [19, 72]. Indeed, in brains of Beclin2 heterozygous (+/-) mice, there was an increased amount of CB1R at steady state as measured using western blot against endogenous CB1R [24]. In a second paper, the team of Dr. He showed that Beclin2 +/- mice had a decrease in the activated CB1R receptor degradation [72]. This result was confirmed by the knockdown of Beclin2 using siRNA in cells transfected with CB1R, where

the receptor stayed in the endosome instead of being addressed to the lysosomes after 1 hour of agonist stimulation, confirming the role of Beclin2 in the post-endocytic trafficking of CB1R [72]. Very interestingly, Beclin2 heterozygous +/- mice also had a decrease in the CB1R agonist tolerance correlated with a decrease in receptor degradation as measured by 14 days WIN55, 212-2 agonist injection in a thermal anti-nociception assay [72]. Elegantly, the authors reasoned that if Beclin2 forms two distinct functional complexes, one with GPRASP1 that triggers lysosomal sorting of CB1R and one that participates in autophagy, one could manipulate GPRASP1/Beclin2 complex levels *in vitro* and *in vivo*. By using small compounds that they discover to induce early initiation of autophagy, the GPRASP1/Beclin2 complex was diminished as measured by co-immunoprecipitation in HEK293 cells and in mouse brain [72]. Finally, co-administration of these molecules, inducers of autophagy together with the CB1R agonist, had a reducing effect on the WIN-induced antinociceptive tolerance. These results suggest that one could reduce tolerance by inducing autophagy.

#### 3.1.2.2. Attenuated Sensitized Hyper Locomotor Response to Chronic Cocaine Treatment in GPRASP1-KO Mice

Drugs of abuse cause long-lasting alterations in dopaminergic neurotransmission. Repeated exposure to psychostimulants promotes a progressive and stable enhancement of drug-induced hyper locomotor stimulation. This phenomenon of "behavioral sensitization" is thought to underlie aspects of addiction in which dopamine receptors play an essential role. The other neuronal receptors which have been evaluated in GPRASP1-KO mice were, therefore, the dopaminergic receptors [65; 66]. Cocaine is an inhibitor of monoamine reuptake, including dopamine and acetylcholine [73, 74], which leads to an increased concentration and residence time of monoamines in the synaptic cleft resulting in sustained activation of their receptors. In two independent studies with GPRASP1-KO mice, including ours, slightly different modes of cocaine administration were used in order to activate dopaminergic receptors either intraperitoneal daily administration of cocaine (15mg/kg) for 5 days [65], or cocaine infusions (1mg/(kg\*infusion)) for 10 consecutive days in self-administration experiment [66]. In our study, hyper locomotor activity induced by an acute cocaine administration was significantly reduced in GPRASP1-KO as compared to WT mice [66], while no difference was observed in the Thompson and collaborator's study [65]. Conversely, both studies observed that upon chronic administration of cocaine, the sensitization to hyper locomotor activity was significantly reduced in GPRASP1-KO as compared to WT animals [65, 66]. In a second model of cocaine self-administration, we observed that the rate of acquisition of self-administration was significantly impaired in the absence of GPRASP1, but the reinforcing effects of cocaine were equivalent between WT and deficient mice that reached the threshold of acquisition [66].

The role of GPRASP1 on the D2R signaling response following repeated cocaine treatment was next explored by electrophysiological recordings on ventral tegmental area neurons [75]. Interestingly, the daily administration of cocaine for 5 days caused desensitization of D2 receptors in the VTA neurons of WT mice but not in GPRASP1-KO mice.

Therefore, D2R signaling is restored in GPRASP1-KO mice [75].

Although a similar behavioral phenotype was observed in the two GPRASP1 knockout lines following repeated administration of cocaine, divergent results were reported concerning dopaminergic receptor degradation. In the Thompson and collaborator's study, the cocaine treatment, instead of causing a decrease, as in WT mice, revealed a significant increase in the striatal D2 receptors labeled in radioligand binding assays in GPRASP1-KO mice, correlated with an increase of the D2R: D1R ratio [65]. These results are in agreement with earlier studies performed *in vitro* using cGASP in HEK293 cells and *in vivo* using anti-GPRASP1 antibodies [76] and in neuronal SH-SY5Y cells with siRNA against GPRASP1 [77, 78] that suggested that GPRASP1 was implicated in dopaminergic D2R degradation. Intriguingly, GPRASP1-KO mice had a lower quantity of D2R at steady state [65]. Yet, we have studied the number of D1R, D2R, and muscarinic receptors in response to chronic cocaine treatment in our line of GPRASP1-KO mice, and we have found the opposite [66]. In our hands, in the striatum and other brain areas, after a chronic self-administration of cocaine, the level of dopamine and muscarinic receptors were more down-regulated in GPRASP1-KO mice than in WT littermates. Of note, we did not detect differences between WT and GPRASP1-KO mice in the total amount of receptors before activation [66], contrary to the other study [65]. Our data are in agreement with the role of GPRASP1 in post-endocytic sorting of D2R, but in favoring their recycling rather than their degradation [66].

At the molecular levels, two partners of GPRASP1, dysbindin, and G $\alpha$ s, have been implicated in activated D2R post-endocytic sorting: siRNA against dysbindin selectively affected total cell surface of D2R but not of D1R, in the absence of activation in cells. Upon activation, while internalization kinetics of D2 receptors were not modified by siRNA against dysbindin, proteolysis of D2R was slowed down [39]. In addition, cell surface expression of the flag-tagged D2R was increased in G $\alpha$ s knock-down cells depleted by siRNA although no experiments on activated D2R receptors were conducted in this study [38]. The brains of Beclin2 heterozygous (+/-) mice had an increased amount of D2R as measured using western blot against endogenous D2R [19].

### 3.2. GPRASP2 in GPCR Trafficking and *In Vivo* Functions

#### 3.2.1. Interaction of GPRASP2 with Smoothened/Pifo: *In Vitro* and *In Vivo* Effects on Smoothened Targeting to the Primary Cilium

The primary cilium is a structure present in almost all mammalian cells, including neurons [79]. It is a microtubule-based organelle that is erected from the plasma membrane with the basal body composed of the mother centriole of the centrosome. The primary cilia are not mobile and work as mechano-, osmo- and chemo-sensory units. Their role in the development and maintenance of homeostasis is critical. Their dysfunction leads to different pathologies, called ciliopathies, which can lead to skeletal, neurodevelopmental, and cognitive deficits, as well as to obesity. This vast array of potential phenotypic deficits is most probably due to the

fact that signals passing through the primary cilium are numerous and necessary for the development of the cell and the organs. Several signaling pathways take place at the primary cilium, such as Hedgehog and its receptor Smoothened, Wnt and its receptor Frizzled, PDGFR, Notch, TGF- $\beta$ , mTOR. A number of GPCRs have been found targeted to the primary cilium as well [80]. For example, dopaminergic D1, D2 and D5 receptors, galanin GalR2 and GalR3, neuropeptide FF NFFR1, QRFPR, PRLHR and Kiss1R, serotonin 5-HT6R [81]. The role of GPCRs in the cilium activity and development and viability is crucial [82-84]. For example, serotonin receptor 5-HT6 and the dopaminergic receptors are needed for the primary cilium homeostasis.

The group of Dr. Heiko Lickert has identified GPRASP2 as a binding partner for Pifo (or Pitchfork), [40]. Having before discovered that Pifo is implicated in primary cilium disassembly with consequences on embryonic development [85], the authors conducted an interactome study of Pifo using co-precipitation followed by mass-spectrometry analyses in order to further characterize its molecular function. Pifo interacted and was co-localized with  $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -Tubulin and microtubule-dependent motor proteins. In addition, GPRASP2 was identified as a putative partner and the interaction was confirmed by GST pull-down assay ([40]; Table S1 and Fig. 3). Since the Cilium Targeting Motif of some GPCRs has been identified as the cytoplasmic helix VIII, the same domain where GPRASP1 is proposed to bind to the C-tail of GPCRs, the authors tested whether Smoothened targeting to primary cilium was dependent on a GPRASP2/Pifo complex. HA-tagged GPRASP2 could co-precipitate His-tagged-Smoothened and inversely tagged-Smoothened co-precipitated GPRASP2. A mutant Smoothened receptor defective in ciliary targeting with mutations in its helix VIII C-tail 545W/546R did not co-precipitate with GPRASP2. Activation of Smoothened by its agonist SonicHedgehog (SHH) slightly increased GPRASP2 co-precipitation with the receptor. Pifo was only detected in co-precipitation with Smoothened if GPRASP2 was overexpressed and the interaction was increased in presence of SHH. The conditional Pifo knockout or GPRASP2 knock-down in ciliated mouse primary limb bud cultures did not affect their primary cilia morphology and assembly. But in Pifo knockout cells, rapid Smoothened targeting the primary cilium upon SHH activation was reduced as seen by quantitative live-cell imaging of primary ciliated cells expressing RFP-Smoothened. In RNAi knock-down GPRASP2 cells, there was a reduction both in Smoothened and in Pifo targeting to the primary cilium. In conclusion, GPRASP2 bridges Smoothened and Pifo to target them in the cilium (Table S1 and Fig. 3) [40]. Experiments also suggested post-translational modifications of GPRASP2 and Pifo upon Smoothened activation that stabilized the proteins and increased their quantities rapidly.

In a parallel study, Jung and collaborators reported the identification of ten small molecules from the Prestwick library already in clinical or pre-clinical development using a high-content screening for inhibitors of Smoothened targeting to the primary cilium [11]. All compounds were found to inhibit SHH signaling. Eight out of ten inhibitors were characterized as interfering with the Smoothened/GPRASP2 interaction. This was first seen by NMR studies to verify the direct interaction between GPRASP2 and C-tail Smoothened

peptides (residues 539 to 552). The negative control peptide contained residues 545W/546R mutated that reduced GPRASP2 binding affinity. Then it was confirmed in cells by co-immunoprecipitation. These inhibitors have been proposed to have the potential to treat drug-resistant Smoothed derived cancer forms as tested in pancreatic primary tumor cells [11].

Interestingly, a mutation in GPRASP2 was found in a five-generation Chinese family with an X-linked recessive syndromic hearing loss. The mutation (2 bp missense mutation c.1717\_1718GC>AA, p.A573N) was present in four hemizygous male patients and two heterozygous female carriers [86]. The male patients suffered from hearing loss with an abnormal auricular shape, dilated internal auditory canal, and incomplete separation of cochlea basal turn from the fundus. They also displayed facial dysmorphism with bilateral ptosis (Table 1). GPRASP2 mRNA was expressed in numerous structures of the mouse cochlea. The authors suggested that the GPRASP2 deleterious mutation could be the cause of the disability.

Interestingly, a number of ciliopathies present hearing loss (Usher syndrome, Bardet-Biedl syndrome, Alström syndrome) and even facial dysmorphisms (Joubert syndrome), and Hedgehog signaling is important for hair cell differentiation in the cochlea development for hearing ability [87]. Interestingly, Pifo, like ARMC10, the ancestor of the GPRASP/ARMCX protein family, has appeared in evolution with chordates [85]. Finally, beta-arrestins are proposed to target Smoothed to the primary cilium [88], but several redundant pathways seem to exist since the  $\beta$ -arrestin1 or  $\beta$ -arrestin2 KO mice do not appear to have Smoothed signaling-defective phenotypes.

### 3.2.2. Behavioral Consequences of GPRASP2 Deletion in Mice: Autism Spectrum Disorder-like Phenotype

In addition to the GPRASP2 A573N mutation that might be the cause of hearing loss in humans, other GPRASP2 single nucleotide mutations have been identified in schizophrenic or autistic patients (Table 1) [89, 90]. Considering that GPRASP2 interacts with a number of GPCRs *in vitro* (Table S1), GPRASP2-KO mice have been generated and investigated for neuro-developmental phenotypes [91].

At P20, GPRASP2 knockout mice did not seem to have mRNA compensation for any *GPRASP/ARMCX* genes in the brain (no amplification of ARMCX5 mRNA). Behavioral evaluation of GPRASP2 deficient mice highlighted learning and memory deficits in those animals, as well as a decrease in preference index for social interactions and an increase in stereotypical behaviors (grooming, digging, scrabbling), corresponding to Autistic Spectrum Disorders (ASD) and Intellectual Disabilities (ID) like behaviors [91].

At protein level, GPRASP2 was found highly expressed in the hippocampus and hypothalamus. In the hippocampus of GPRASP2 knockout mice, the CA1 pyramidal neuron morphology was altered with a reduction in dendritic arborization and a decrease in total dendritic length in their distal regions. Considering the fact that (i) the metabotropic glutamate receptor mGluR5 contributes to synaptic plasticity and circuit development, (ii) in animal models of ASD and ID there is abnormal mGluR5-mediated synaptic plasticity, and

(iii) the deletion of the scaffolding proteins anchoring mGluR5 in the synapse caused perturbation of synaptic communication and ASD as well [92], Edfawy and colleagues have studied if mGluR5 can be found in a complex with GPRASP2 and if a perturbation of mGluR5 signaling contributes to the phenotypes observed in GPRASP2-KO mice [91]. First, the effect of cellular variation of expression was studied in the mouse hippocampal neuronal HT-22 cell line. GPRASP2 and mGluR5 actually co-immunoprecipitated, and this association was stable after 30min of mGluR5 agonist treatment. Interestingly, 5 min agonist treatment increased the co-localization of GPRASP2 with the lysosomal marker LAMP1 [91]. Second, when GPRASP2 was knock-down by shRNA in primary cultures of rat hippocampal neurons, neuronal complexity and total dendritic length were significantly reduced, and it was accompanied by an increase in mGluR5 cell surface expression as measured by immunolabeling. Using a mGluR5 antagonist on GPRASP2-deficient neurons, the reduction of arborization was inhibited and the spine density recovered. After half an hour of agonist treatment, while there was significant degradation of mGluR5 levels in WT cells, there was no significant difference in total mGluR5 in shRNA-GPRASP2 primary rat hippocampal neurons. The authors concluded that a loss of GPRASP2 perturbs the normal mechanism of receptor degradation upon agonist-mediated activation. Inversely, GPRASP2 overexpression increased neuronal dendritic arborization and dendritic length and it was accompanied by a reduction in cell surface mGluR5 [91]. In hippocampal slices, patch-clamp observations revealed an enhanced mGluR-long-term depression in GPRASP2-KO mice versus WT littermates [91].

Altogether, these data suggest that the absence of GPRASP2 is linked to neurodevelopmental abnormalities by increasing the surface availability of mGluR5 and reducing dendritic complexity, spine density, and synaptic maturation. More generally, there was a decrease in the post-synaptic density thickness and in the amplitude of the excitatory post-synaptic potentials [91].

### 3.3. Human Xq22.1 1.1Mb Deletion Encompassing Several GPRASP/ARMCX Genes : Phenotype and Mice Models

#### 3.3.1. Mental Retardation and Congenital Abnormalities in Xq22.1 Deletion in Human

A human deletion of 1.1Mb on the X chromosome was described to encompass four genes of the ARMCX/GPRASP protein subfamily 1. A mother and her daughter had a missing sequence of 12 genes *NXF5*, *ZMAT1*, *TCEAL2*, *TCEAL6*, *BEX5*, *NXF2*, *TMSB15A*, *NXF4*, *ARMCX5*, *GPRASP1*, *GPRASP2*, and *GPRASP3* [7]. An interesting point is that a son had died 15 days after birth from a breathing failure. The microdeletion was associated with many physical and behavioral symptoms. The patients were described with short stature, facial dysmorphisms (small forehead, smooth philtrum, and low ears), brachycephaly, coarse face, hypertrichosis, distal muscle atrophy, and severe muscle hypotonia. At the neurological level, the mother showed mental retardation, epilepsy, and borderline personality disorder, while the daughter had ASD with stereotypic movements and self-

mutilation behavior. The daughter also showed asphyxia at birth and a cleft palate was surgically corrected at 1 year of age. The authors suggested a role of the NXF5 gene in the symptoms but recognized that other deleted genes might contribute as well.

Next, a similar deletion of 17 genes, of which seven genes belonged to the GPRASP/ARMCX protein family, was identified in a 25-weeks old male infant (*ARMCX6*, *ARMCX3*, *ARMCX2*, *NXF5*, *ZMAT1*, *TCEAL2*, *TCEAL6*, *BEX5*, *NXF2*, *NXF2B*, *TCP11X2*, *TMSB15A*, *NXF4*, *ARMCX5*, *GPRASP1*, *GPRASP2*, and *GPRASP3*, [9]. He had dysmorphic features, hypotonia with spasticity, enlargement of the frontal temporal lobe, but also respiratory failure with thoracic insufficiency syndrome. The mother of the patient had an intellectual disability that could not be further examined.

### 3.3.2. Mice Models of the Human Xq.22.1 1.1Mb Deletion: Implication of *ARMCX5*, *GPRASP1*, *GPRASP2* and *GPRASP3* in Epilepsy, Respiratory Failure, Postnatal Development Delay, and Cleft Palate

To elucidate the genes responsible for the abnormalities observed in the human patients with the Xq22.1 1.1mb deletion, similar deletions were characterized in mice [93, 94]. A first deletion, called DelA, was designed to correspond to the entire Xq22.1 1.1Mb deletion between *NXF2* and *NXF3* gene described by Grillo and collaborators with 20 genes deleted. A major obstacle encountered was that the males were not viable. Neonatal death due to an acute respiratory failure was caused by a delay in lung development. Another specificity observed on male fetuses was a cleft palate [94]. Concerning females, only heterozygous survived, with a ratio of 45% of neonatal lethality and only a quarter survived to childhood. A general growth delay compared to wild-type littermates was observed after birth and epilepsy. A rare part exhibited a cleft palate. To narrow down the critical genes giving these phenotypes, two deletions were further generated, DelB that encompasses *Nxf2* to *Tmsfb15a* and a 0.35Mb deletion DelC, which includes *ARMCX5*, *GPRASP1*, *GPRASP2*, and *GPRASP3* genes and four genes with no corresponding orthologs in the human Xq22.1 deletion: *Arxes2*, *Arxes1*, *Bex2*, and *Nxf3*. The DelB mice showed a normal viability and no epilepsy or cleft palate, whereas the DelC males had respiratory failure, neonatal lethality, and cleft palate and heterozygous female develop epilepsy, partial post-natal lethality, post-natal developmental delay, and cleft palate in a similar ratio than the Xq22.1 human mimicking deletion DelA [94]. The variability of phenotypes in individual DelA and DelC heterozygous females is likely attributed to skewed X inactivation. The authors concluded that *ARMCX5*, *GPRASP1*, *GPRASP2* and *GPRASP3* were the putative genes for which deletion causes these defects observed in human patients as well [7, 9].

Considering that GPRASP1-KO mice, in a global aspect, had no abnormalities and a normal male to female ratio, histological studies revealed no alteration of the nervous system and normal behavior in home cage conditions [66], GPRASP1 is most likely not involved in the phenotypes observed in the DelC deletion. Only a slight impairment in procedural memory tasks was described [95]. In their model of GPRASP1-KO mice, Thompson and collaborators did not

observe any difference either in locomotor response, in motor coordination, or other motor functions compared to wild-type littermates [65]. In the case of GPRASP2-KO mice, the mutant mice were viable and had a normal sexual ratio [91]. On the other hand, the ASD observed in humans could be associated with GPRASP2 since GPRASP2-KO mice display such syndromes [91]. Cleft palate has not been reported for the GPRASP2-KO mice despite the fact that both Hedgehog signaling [96] and Pifo [97] have been hypothesized to be implicated in palate development. There are no *ARMCX5*-KO or *GPRASP3*-KO mice described so far. The team of Dr. Klaus Heese reported as unpublished data that only female of *GPRASP3*-KO mice had been obtained [98]. As neither *GPRASP1*-KO nor *GPRASP2*-KO have been reported to display a deficit in lung development, it would be interesting to study the role of *ARMCX5* and *GPRASP3* in this process.

### 3.4. Perspectives for GPRASP/ARMCX Subfamily 1: Targeting GPCRs in the Right Place at the Right Time

GPRASP1 and GPRASP2, together with their novel protein partners, are the two proteins of GPRASP/ARMCX subfamily 1 that have been best characterized. Cellular and animal models, displaying molecular and behavioral consequences, gave very strong evidence of their role in GPCRs targeting to different organelles, endosomal sorting for both proteins, and Smoothened targeting to primary cilium concerning GPRASP2.

In large interactomics studies, GPCRs have not been found in interaction with GPRASP/ARMCX proteins (Table S1). The main reasons could be technical: GPCRs are not abundant membrane proteins and could, therefore, fall under the threshold defined to select major binders using mass spectrometry approaches. In addition, the interactions might be with low affinity but high avidity due to multiple binding sites of the interacting repeats. One could generalize and expect that GPRASP/ARMCX subfamily 1 might be part of several multiprotein complexes with all their interactants not being much enriched in the pool identified by the criteria used in the mass spectrometric analysis. The interactions of GPRASP/ARMCX proteins with GPCRs seem constitutive and not much change has been reported upon signaling activation. Only GPRASP2 has been described to become stabilized due to an uncharacterized post-translational modification upon Smoothened activation and enriched at the lysosomal membrane [40]. Clearly, further studies on the regulation of proteins of the GPRASP/ARMCX subfamily 1 are needed.

It has been firmly established that GPRASP1 contributes to the development of some or most adaptive processes following chronic activation of at least two GPCRs *in vivo*, D2R (sensitization to hyperlocomotion) and CB1R (tolerance). It probably does so in serving as a scaffolding protein that assembles heterotrimeric G $\alpha$ S subunit together with the ESCRT-O complex protein HRS and at least dysbindin (for D2R) or Beclin2 (for CB1R) around the GPCR to be targeted to the lysosome. Nevertheless, while it seems probable that GPRASP1 contributes to lysosomal targeting after activation in cells overexpressing GPCRs, when receptors are endogenously expressed, the effect of the lack of GPRASP1 on the

total number of receptors or at the cell surface is less clear. Since it has been discovered during the last decade that GPCR signaling can also come from intracellular compartments, including endosomes [99], it would be interesting to investigate whether GPRASP1 also serves as a scaffolding protein for signaling at the level of endosomes.

Overall, if we consider the results of the different *in vivo* studies that were conducted with GPRASP1 deficient mice, it is tempting to speculate that inhibiting GPRASP1 could be beneficial to lower some of the adverse effects associated with chronic administration of GPCR agonists. While one might have expected some redundant effects between GPRASP1 and GPRASP2 due to their high sequence identity and some commonly identified protein partners, the GPRASP1-KO mice display a clear phenotype. In addition, GPRASP2 was not found overexpressed in GPRASP1 deficient mice, excluding a putative compensation effect [66].

GPRASP2-KO mice have autistic spectrum disorder-like phenotype at least partly due to an increase in mGluR5 cell surface expression in hippocampal neurons. Since a number of ciliopathies cause ID, one could also test if targeting of Smoothed or other GPCRs to the primary cilium is altered in these GPRASP2-KO mice.

If human pathologies seem to put in light a major involvement of the other members of the subfamily 1, ARM CX5 and GPRASP3, further studies are limited by the lack of knockout mice. Yet, the putative lethality of GPRASP3 constitutive deletion in mice is a clue for a major implication of this protein in normal developmental processes.

#### **4. GPRASP/ARMCX SUBFAMILY 2: ARM CX10-ARM CX PROTEINS AND THEIR ASSOCIATED PROTEINS MIRO/TRAK2 MOTOR COMPLEX AND MFF/FIS1/DRP1 FISSION COMPLEX IN MITOCHONDRIAL TRAFFICKING**

The main functions of ARM CX10-ARM CX proteins that have been studied are linked to mitochondrial trafficking along microtubules in complex with mitochondrial Rho-GTPase proteins MIRO associated with TRAK2 (Fig. 3) in order to regulate neuronal proliferation and survival and neurite outgrowth (Table 2).

##### **4.1. Mitochondria Dynamics**

Mitochondria within the cells play important roles as a producer of ATP, controlling intracellular calcium, mediating apoptosis, and being the center of many metabolic pathways. Mitochondria are dynamic and can adopt multiple shapes, being remodeled by both fusion and fission events governed by GTP-dependent dynamin related proteins. While fusion is proposed to be protective and anti-apoptotic, probably by allowing the mixing of components in between damaged and healthy mitochondria, fission of damaged mitochondria precede their degradation by mitophagy and can precede apoptosis.

The proteins Mitofusin MFN-1 and MFN-2 form homo- and heterodimers, and their conformations are changed by GTP hydrolysis to fuse the outer mitochondrial membrane [100].

The regulator of mitochondrial fission is Dynamin-related Protein (DRP1). In a dynamin-like manner, DRP1 forms a spiral around the fission site, and GTP hydrolysis reduces helical pitch and occurs at the endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria contact sites. There are four DRP1 adaptor proteins that have been identified on the outer mitochondrial membrane: mitochondrial fission factor (MFF), mitochondrial dynamics proteins of 49 kDa and 51 kDa (MiD49 and MiD51) and Fission 1 (FIS1) [100].

Mitochondria also need to be targeted to different parts of the cell, for example, during mitosis or where energy is most needed [101-103]. In neurons, pre- and post-synaptic domains, the initial axon segment, nodes of Ranvier, and growth cones are enriched in mitochondria. Their movements occur along the microtubules for long distances or along the actin cytoskeleton [104]. In mature cultured neurons, one-third of axonal mitochondria are mobiles. The mobile mitochondria can move bi-directionally [105]. Axonal microtubules have their plus end towards the distal part and dendritic microtubules have mixed polarities. MIRO proteins are specific integral mitochondrial adaptors from the outer membrane that recruit microtubules kinesin plus-end motors via their binding to the kinesin binding homologs TRAK1 and TRAK2 [24, 106, 107]. There are two MIRO family members in mammals, MIRO1 and MIRO2, that share around 60% identity. These proteins are composed of two Rho-GTPase domains that surround two EF-Hand calcium-binding domains. TRAK1 and TRAK2 interact with the first GTPase domain of MIRO. The mitochondria transport can be regulated mainly by ATP/ADP levels and by calcium. An increase in calcium can stop mitochondrial movements and the EF-hand domains of MIRO probably play a major role in this regulation.

There is a strong cross-talk between mitochondria transport and their fission-fusion dynamics, and obviously, these mechanisms are finely tuned by extracellular signals, such as neurotransmitters and growth factors. Mitochondrial dynamics also coordinate cell differentiation and growing evidence demonstrates that mitochondria could act as a center of intra and extracellular signals to coordinate signaling pathways, such as Notch, Wnt, and YAP/TAZ during development [103, 108].

##### **4.2. Role of MIRO/TRAK2 Motor Complex and DRP1/Fis1/MFF Fission Complex with ARM CX10, ARM CX3, and ARM CX1 on Mitochondrial Dynamics**

MIRO1, in complex with TRAK2, interacts with ARM CX10 [4], ARM CX3 [3] and ARM CX1 (Table S1) [22]. The interaction, at least for ARM CX3, is lost at high calcium concentration (2mM) and a mutant MIRO1-myc-tagged lacking its two EF-Hands calcium binding motifs still co-immunoprecipitates with ARM CX3-GFP, but this interaction becomes insensitive to intracellular calcium level, thus confirming a regulation by calcium ions [3].

The seminal article on the function of ARM CX proteins at the outer mitochondrial membrane comes from the group of Dr. Eduardo Soriano, who studied new genes involved in brain development and neuronal plasticity (Table 2 and Fig. 3) [3]. Two main phenotypes on mitochondria were found upon expression of ARM CX proteins: perinuclear aggrega-

**Table 2. Summary of the phenotypes observed in mice, in humans or in cells upon variation of expression of WT or mutant GPRASP/ARMCX proteins from subfamily 2 and their most characterized binding partners.**

Subfamily 2 Members	Human Mutation & Phenotype	Human Deletion & Phenotype	Overexpression in Cell or Animal	Down-regulation in Cell or Animal	Interacting Proteins Potentially Implicated
<b>ARMCX3</b> (GASP6, ALEX3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>Variation of expression in cancer</u> [114]</li> <li>- ↓ of expression: development of non-small cell lung cancer, adverse clinical outcome</li> <li>- ↑ E-cadherin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Xq22.1: 1.1Mb deletion [9]: 17 genes of <i>ARMCX6</i>, <i>ARMCX3</i>, <i>ARMCX2</i>, <i>NXF5</i>, <i>ZMAT1</i>, <i>TCEAL2</i>, <i>TCEAL6</i>, <i>BEX5</i>, <i>NXF2</i>, <i>-NXF2B</i> (paralog), <i>TCP11X2</i>, <i>TMSB15A</i>, <i>NXF4</i>, <i>ARMCX5</i>, <i>GPRASP1</i>, <i>GPRASP2</i> and <i>GPRASP3</i></li> <li>- <b>male infant:</b> failure to thrive, hypoglycemia, subtle dysmorphic features, umbilical hernia, hypotonia with spasticity in the lower extremities, focal enlargement of frontal temporal lobe on cerebral MRI, and respiratory failure with thoracic insufficiency syndrome, tracheomalacia, and laryngomalacia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li><b>Two mitochondrial dynamics phenotypes:</b></li> <li>1- Perinuclear aggregates</li> <li>2- Decrease in the pool of moving mitochondria</li> <li>- ↓ velocity [3]</li> <li>○ <i>In vivo</i></li> <li><b>In chicks embryo</b></li> <li>- ↓ progenitor cells proliferation in neural tubes[32]</li> <li>- ↓ Wnt signaling [32]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li>1- Small mitochondria [3]</li> <li>2- ↓ pool of moving mitochondria</li> <li>- No effect on velocity [3]</li> <li>○ <i>In vivo</i></li> <li>- ↓ 30% of dividing neural tube cells by ShRNA in chicks embryo HH12 [32]</li> </ul>	- Miro1/Miro2/TRAK2 complex [3]
<b>AMRCX3</b> [21]	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li>- ↑ Sox10 at the mitochondria</li> <li>○ - ↑ transcriptional activity of Sox10</li> </ul>	-	-
<b>ARMCX1</b> [22] (GASP7, ALEX1)	-	None reported	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li><b>One mitochondrial dynamics phenotype:</b></li> <li>- ↑ pool of moving mitochondria</li> <li><b>Neurons:</b></li> <li>- ↑ pool of axon growing</li> <li>- ↑ length of axons</li> <li>- 45% increase in neuronal survival after injury</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li><b>Neurons:</b></li> <li>- ↓ axon regeneration and neuronal survival after injury</li> </ul>	- Miro1 [22]
<b>AMRCX1</b> [116]	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <u>Variation of expression in cancer</u></li> </ul>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rescues the cell apoptosis induced by miR-106b inhibitor</li> <li>- ↑ phosphorylation of JAK1 and STAT3</li> </ul>	-	-
<i>ARMC10</i> (GASP8, SVH, <b>ARMC10A</b> )	-	None reported	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li><b>Two mitochondrial dynamics phenotypes:</b> [4]</li> <li>1-Perinuclear aggregates less in neurons than in HEK293 cells</li> <li>2- ↓ moving mitochondria</li> <li>-Velocity unchanged</li> <li><b>Neurons :</b></li> <li>- ↓ amyloid beta mitochondrial fragmentation and neuronal cell death [27]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li>- ↓ moving mitochondria [4]</li> </ul>	- Miro1/Miro2/TRAK2 complex [4]
<b>ARMC10B</b> [23] (GASP8B, SVH-B)  <b>ARMC10B Ser45E</b>	-	None reported	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li><b>Two mitochondrial dynamics phenotypes:</b></li> <li>- Mitochondrial aggregation</li> <li>- ↑ mitochondrial fission</li> <li>- Transition to mitophagy? [23]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li>- <b>No effect of AMPK activator on mitochondrial fission</b> [23]</li> </ul>	- DRP1/Fis1/MFF complex [23]

(Table 2) contd.....

Subfamily 2 Members	Human Mutation & Phenotype	Human Deletion & Phenotype	Overexpression in Cell or Animal	Down-regulation in Cell or Animal	Interacting Proteins Potentially Implicated
ARMC10B [5]	-	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vivo</i></li> <li>-Accelerated growth rate and tumorigenicity in nude mice</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li>- Apoptosis</li> </ul>	-
ARMCX2 (GASP9, ALEX2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Variation of expression in cancer [115]</li> <li>○ <u>Hypermethylation of CpG</u> in cisplatin resistant ovarian cancers [115]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Xq22.1: 1.1Mb deletion [9]; see GPRASP2 and ARMCX3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li>-Altered mitochondrial network (data not shown; [3])</li> <li>○ <i>In vivo</i></li> <li>- Damaged liver sample, correlated with the degree of damage [125]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vivo</i></li> <li>Ovarian differentiation [126]</li> </ul>	-
ARMCX6 (GASP10)	None reported	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Xq22.1: 1.1Mb deletion [9]; see GPRASP2 and ARMCX3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>In vitro</i></li> <li>-Altered mitochondrial network (data not shown; [3])</li> </ul>	-	-

↑: increase; ↓: decrease; AD: Alzheimer disease; CNS: central nervous system

tion and effect on the motile pool of mitochondria in neurites.

Upon myc-tagged ARMCX3 (but also ARMCX1, ARMCX2, ARMCX6 and ARMC10) protein overexpression in HEK293 cells and in primary hippocampal neurons, the mitochondrial network was systematically altered. The mitochondria were clustered, and for 30 % of the HEK293 cells and 23% of neurons expressing ARMCX3, mitochondria converged in one big perinuclear aggregate [3]. The severity of the phenotype was correlated with the level of expression of ARMCX3. Mitofusin1 overexpressing cells have been reported to display this phenotype as well. In neurites, mitochondria were also longer and larger. Nevertheless, no change in the rate or dynamic of mitochondria fusion was detected using photoactivable mitofusin1 in cells overexpressing or with down-regulation of ARMCX3. The aggregation phenotype was also found to be independent of the interaction with MIRO1 since down-regulation of MIRO1 did not block the phenotype [3] and since the overexpression of the N-ter extremity of ARMCX3 alone (1-30 AA) was sufficient to trigger mitochondrial aggregation [27].

A second phenotype was found in neurons overexpressing ARMCX3: a reduction in the percentage of moving mitochondria, in their velocity and distance covered, both in anterograde and retrograde transport [3]. ShRNA against ARMCX3 in neurons caused smaller mitochondria in neurites, a reduction in the number of moving mitochondria both in their anterograde and retrograde transport, without affecting the velocity or the distance run by each individual mitochondria. The reduction in the motile fraction of mitochondria is thus observed in both overexpression and downregulation conditions. In this initial work, it was not reported if the effect on the mobile fraction of mitochondria was dependent on MIRO/TRAK2 complex [3].

Very importantly, other mitochondrial functions were tested in this experimental model of overexpression of myc-tagged ARMCX3: no effect was found on oxygen consumption or DNA copy number in HEK293 cells and on COX/citrate synthase ratio and mitochondrial membrane potential in neuronal cells. Using mitochondria-targeted aequorin/GFP fusion protein to measure mitochondrial calcium concentration, no effect of ARMCX3 overexpression was

found on calcium uptake into mitochondria triggered by calcium released from ER stock or from digitonin permeabilized plasma membrane [3]. Since the elevation of calcium triggers the loss of interaction of ARMCX3 with MIRO, it is maybe difficult to test the effect of ARMCX3 on mitochondrial calcium homeostasis.

The same research group published similar but weaker phenotypes concerning the ARMC10 protein overexpression (Table 2 and Fig. 3) [4]: mitochondrial aggregation was strong in HEK293 cells but weaker in neurons as compared with the previously reported effect of overexpressing ARMCX3. However, the level of expression of the two proteins was not compared between the studies. The mitochondria were also slightly larger in ARMC10 overexpressing cells. Concerning the percentage of motile mitochondria in axons of ARMC10 overexpressing hippocampal neurons, as for ARMCX3, there was a marked decrease. The velocity of the moving mitochondria were not modified contrary to overexpression of ARMCX3 despite the fact that ARMC10 also interacts with the MIRO/Trak2 complex. Again, overexpression and down-regulation of ARMC10 lead to the same phenotype of mitochondria motile fraction: shRNA against all the messengers encoding ARMC10 also reduced the pool of motile mitochondria in axons [4].

Independently, in an elegant study in HEK293T and U2OS cells, ARMC10 was found to play a role in mitochondria dynamics, but the results and the protein partners described are somehow the opposite (Table 2 and Fig. 3) [23]. Although an aggregation phenotype was observed, the effect of the most abundant form of wild-type ARMC10 (the short isoform B of 308 residues) overexpression was found to drastically increase mitochondrial fission. The protein partners of ARMC10 identified are the crucial fission complex proteins DRP1, its recruiting protein FIS1 and its regulator MFF. Although an interactome of ARMC10 was conducted in HEK293T cells with a BioID2-tagged ARMC10 and identification by BioID2-mass spectrometry, apart from the mitochondrial fission complex, the entire results have not been disclosed. Therefore, the interaction with the MIRO/TRAK2 complex cannot be confirmed from this article [23]. The fraction of motile mitochondria were not analyzed in this study either. The difference between the two studies is that it

is not the same ARMC10 isoform that was used for the functional studies: full-length isoform A [4] or ARMC10 isoform B that lacks residues 47-81 from the NH<sub>2</sub>-terminal region [23]. Concerning the aggregation phenotype, however, the two studies led to convergent results reporting a small fraction of mitochondrial aggregation in overexpressing ARMC10 U2OS cells. Chen and collaborators analyzed it further by looking at mitophagy upon perturbation of cellular energy homeostasis [23]. Indeed, degradation of mitochondria by autophagosomes could occur in steps, first of fission, then aggregation leading to mitophagy. Using microtubule-associated protein 1 light chain LC3 staining for autophagosomes, LC3 puncta were co-localized with the mitochondrial TOM20 marker only in ARMC10 overexpressing U2OS cells and not in ARMC10 deleted cells [23]. The authors concluded that ARMC10 might play a role in the transition to mitophagy.

Finally, ARMCX1 overexpression in explant cultures of adult mice retinal ganglion cells and in cultured embryonic cortical neurons was found to increase the mitochondrial motile fraction and the moving frequency of the entire pool of mitochondria, probably by recruiting stationary mitochondria into the motile pool [22]. This effect required ARMCX1 localization to the organelle since the overexpression of ARMCX1 lacking its TM targeting domain did not show any effect.

ARMCX1, thus, seems to have the opposite effect than ARMC10 and ARMCX3 on the motile mitochondria dynamics in neurites when overexpressed. To our knowledge, experiments have not been performed to investigate whether this opposite effect is due to differences in the calcium dependency of the interaction between ARMC10 or ARMCX1 with the MIRO proteins, for example.

### **4.3. ARMC10/ARMCX Proteins are Effectors of Receptor Signaling Converging on Mitochondria in Order to Regulate Neurites Outgrowth, Cell Proliferation, and Survival**

In neurons, where ARMC10/ARMCX proteins are particularly enriched, mitochondria are transported along the axon, sometimes for long distances, in order to provide energy and calcium buffering. The mitochondria concentrate on the active growth cone when the axon is growing, implicating that mitochondrial transport is regulated in order to sustain axonal growth [109].

In the context of nerve injury, researchers have developed a model of neuronal cell cultures with high axonal regenerative capacity. This is the case for the group of Dr. Zhigang He [110, 111]. Comparing the gene expression profile between injured adult retinal ganglion cells (RGCs) with a poor regenerative ability or those mutated in PTEN/SOCS3 that have the high regenerative ability, none of the genes previously known to regulate mitochondrial transport, such as MIRO proteins, were found to be modulated. But ARMCX1 was upregulated in PTEN/SOCS3 RGCs three days after injury [22, 111]. In the subsequent in-depth study, ARMCX3, ARMCX5 and ARMCX6 were not found to be upregulated in these conditions [22]. In addition to promoting mitochondrial movement, mitochondrially localized ARMCX1 triggered an increase in the number of axons

growing out of adult retinal PTEN<sup>-/-</sup> explants as assessed by immunolabelling of axons with the Tuj1 labeling (not observed with non-mitochondrial ARMCX1 deleted from its TM domain). ARMCX1 overexpression also significantly increased the average length of the longest neurites of embryonic cortical neurons. In a model of axon and neuronal regeneration from wild-type adult RGCs after an optic nerve crush injury, mitochondrially localized overexpressed ARMCX1 induced a significant higher number of regenerating axons after 15 days. A 45% increase in neuronal survival was found with ARMCX1 wild-type but not ARMCX1 deleted from its TM domain (Table 2) [22]. Finally, ARMCX1 knock-down reduced axon regeneration and neuronal survival in the model where it was found overexpressed (i.e., in injured adult retinal ganglion cells, RGCs mutated in PTEN/SOCS3 that have the high regenerative ability). This phenotype was correlated with the effect on reduced motile mitochondria [22].

Several proteins regulating mitochondria dynamics are mutated in familial forms of neurological degenerative diseases (Charcot Marie-Tooth disease, Parkinson, Alzheimer and Huntington diseases). Mutations in mitofusins Mfn2 protein are the most common cause of the axonal form of the neurological disorders observed in Charcot-Marie-Tooth disease, triggering an increase in mitochondrial fusion [100]. Loss of Parkin or its partner PINK1 results in an early-onset form of hereditary Parkinson's disease. The E3 ligase Parkin ubiquitinates the mitofusins MFNs that are then degraded by p97 in a proteasome-dependent manner. This is required for mitophagy. Alteration of mitophagy could then contribute to the loss of dopaminergic neurons in Parkinson's diseases [100]. The amyloid-beta fragment of Alzheimer's disease has been described to induce mitochondrial fission that is believed to contribute to neuronal dysfunction and death. While indeed, treatment of hippocampal neurons in culture with 2 $\mu$ M of A $\beta$  induced mitochondrial fragmentation, overexpression of isoform A of ARMC10 completely abolished this effect and induced a significant reduction (66%) in the number of neuronal cell death [4].

ARMC10 has also been convincingly found to be a substrate of the 5'AMP-activated protein kinase AMPK to regulate mitochondrial dynamics [23]. AMPK is a heterotrimeric kinase (twelve possible combinations of isoforms) that is a sensor of AMP/ATP or ADP/ATP ratios and, thus, of cell energy level. Upon activation, it switches on the production of ATP and switches off its consumption. It can also be regulated by several signaling pathways receiving positive inputs, for example, from Liver-kinase B1 (LKB1) and negative inputs, for example, upon an increase of intracellular calcium via the phosphatase PP2A or of cAMP via the Protein Kinase PKA [112, 113]. In conditions of prolonged energy stress, AMPK triggers mitochondria fission and then mitophagy. In a search for a novel AMPK substrate, the global phosphoproteome was compared between wild-type HEK293 cells and double knockout for the two isoforms of the catalytic subunits of the AMP kinases, AMPK $\alpha$ 1 and AMPK $\alpha$ 2. Treatment with the activator of AMPK, triggered more mitochondria fission in WT HEK293 cells than in double KO AMPK1 $\alpha$ 1/2 cells confirming that AMPK stimulates mitochondria fission. 109 phosphosites with higher phosphorylation in WT cells after treatment with the AMPK activator



A769662 as compared with double-KO cells were identified, 32 of which were within an AMPK consensus motif suggesting direct phosphorylation by AMPK. Two different peptides with phospho-Serine 45 of ARMCX10 were detected and the significance of this phosphorylation was further studied on mitochondrial fusion/fission dynamics (Table 2 and Fig. 3) [23].

Upon transient expression, either of the most abundant forms of wild-type ARMC10 (the short isoform B of 308 residues) or of an ARMC10B S45E mimicking S45 phosphorylation, mitochondria fission was more increased with the ARMC10B S45E than with the WT-ARMC10B [23]. In U2OS cells lacking ARMC10 via CRISPR-Cas9 technology, the treatment with the AMPK activator A769662 failed to increase mitochondria fission. The fission phenotype could be rescued by overexpression of either WT-ARMC10B or S45E mutation but not by overexpression of ARMC10B S45A. Surprisingly, this absence of mitochondria fission in ARMC10 knockout HEK293 or U2OS cells contributed to a defect of cell survival after glucose starvation, rescued by ectopic expression of WT-ARMC10B but not of ARMC10B S45A. Phosphorylation of ARMC10B by AMPK that triggers mitochondrial fission, thus, seems necessary for cell survival upon glucose starvation [23]. It would be interesting to study the effect of the ARMC10B S45 phosphorylation on the regulation of mitochondrial motile fraction in neurons, since ATP/ADP levels can regulate mitochondrial movements.

Of note, in the original study of the discovery of ARMC10 isoforms, this particular isoform B of ARMC10 has been implicated in cancer progression [5]. An up-regulation of this variant by RT-qPCR was detected in 60% of the patient samples with hepatocellular carcinomas (28 out of 46). Overexpression of ARMC10B in human liver cell line QSG-7701 seemed to trigger an accelerated growth rate and tumorigenicity in nude mice, although no statistics were given neither the numbers of mice tested. Finally, depletion of ARMC10 by antisense oligonucleotides in hepatoma cell line BEL-7404 induced apoptosis [5], (Table 2). Therefore, there could be a link between cell growth rate and mitochondrial dynamics regulation by ARMC10 localized at the outer mitochondrial membrane. Since other ARMCX protein levels are dysregulated in cancer [114-116], their mitochondrial functions could be involved.

Wnt activation of the seven-transmembrane receptor Frizzled regulates organ development and aberrant signaling of this ligand/receptor pair triggers tumorigenesis. Several papers have started to look at the possible roles of mitochondrial ARMC10 and ARMCX3 in neuronal development, but these attempts need further analysis. Briefly, the non-canonical Wnt, through PKC signaling, has been proposed to regulate ARMCX3 degradation leading to altered mitochondrial dynamics. The half-life of ARMCX3 in the presence or absence of Wnt over-secretion was not measured, but total overexpression of myc-tagged ARMCX3 was reduced upon co-expression with Wnt-1 ligand or its receptor Frizzled2 in HEK293 cells [4]. The authors observed that activation of the PKC kinase by TPA blocks the Wnt effect of diminishing total ARMCX3 overexpression, but no direct phosphorylation of the protein was tested.

To further analyze the potential roles of ARMC10/ARMCX proteins in early neural development, the group of Dr. Soriano chose the chick embryo spinal cord developmental model [32], (Table 2). Birds, including chicken, express only the ARMC10 ancestor protein. According to the Hamburger and Hamilton 46 chronological stages of chick embryo development, ARMC10 was found to be expressed in the chick embryo using *in situ* hybridization at HH12 (low expression), at HH19 (preferential expression in the dorsal regions), and HH24 stages in mitotically active neural precursor cells. The riboprobe for hybridization used did not distinguish between the isoforms. SHRNA directed against ARMC10 were electroporated at HH12 embryo's stage and, in the neural tubes, only a slight decrease of 30% in cells dividing was found, as labeled by incorporation of BrdU, suggesting that ARMC10 isoforms are required for neuronal cell progenitor proliferation [32]. Then, a comparison was performed between overexpression of the full-length murine ARMC10 or ectopic overexpression of murine ARMCX3: forced ARMC10 or ARMCX3 expression reduced progenitor cell proliferation while only forced ectopic ARMCX3 expression but not ARMC10 expression promoted neural maturation. Expression of ARMCX3 deleted of its 12 first residues necessary for mitochondria localization had no effect showing that ARMCX3 mitochondrial localization is required to control progenitors proliferation and neuronal differentiation. The data suggest that tight regulation of the amount of ARMC10 can guarantee normal progression through the cell cycle. The authors also reported an inhibitory effect of overexpression of murine ARMC10 or ARMCX3 on the WNT/beta-catenin-induced Tcf/LEF transcriptional activity and inversely an activation effect upon down-regulation of endogenous ARMC10. Nevertheless, the effect was observed both on basal activity and following beta-cateninCA induction, so it is not an effect directly at the transcriptional level and it is not clear what the mechanism is [32].

Of note, ARMCX3 was found convincingly to interact with the developmental regulatory transcription factor Sox10 [21], (Table 2 and Fig. 3), which is implicated in neuronal differentiation. These two proteins are co-expressed in the mouse brain and spinal cord, in OBL21 cells, in C6 rat glioma and in Hela cells, while their mRNA is not expressed in Neuro-2A cells. The interaction that takes place between the C-ter domain of ARMCX3 and the first 100 residues of Sox10 was found to have two main effects *in vitro*. Ectopic overexpression of myc-tagged wt-ARMCX3 in Neuro-2A cells increased the mitochondrial localization of Sox10. This was not the case when myc-tagged ARMCX3 deleted from its C-ter domain was expressed. In addition, the transcriptional activity of Sox10 as measured with a reporter promoter was increased only when the ARMCX3 interacting domain with Sox10 was present [21].

Since the interaction with Sox10 occurs via the conserved C-ter domain of GPRASP/ARMCX proteins, it might seem interesting to study further the potential interactions between the two families of proteins with the reserves that the first 100 residues of Sox10 that interact with ARMCX3 are localized before the conserved High Mobility Group HMG domain of the Sox proteins.

#### 4.4. Perspectives for GPRASP/ARMCX Subfamily 2: Under Studied Regulators of Mitochondria Dynamics

ARMC10, ARMCX1, ARMCX3 are the three proteins of the subfamily 2 together with their mitochondrial protein partners that have been best characterized. The aggregation of mitochondria that have been reported upon their overexpression could be linked to mitophagy, but it needs further study, and at least in the case of ARMCX3, it is independent of MIRO1 interaction (although MIRO2 role in depleted MIRO1 cells was not investigated).

While overexpression of ARMC10 and ARMCX3 leads to a diminution of the pool of motile mitochondrial fraction, inversely, overexpressed ARMCX1 increases this pool with the implication in axon regeneration. This phenotype is probably linked to interaction with the MIRO/TRAK microtubules adaptor complex. Interestingly, the roles of MIRO1 and MIRO2 have been recently challenged since deletion of MIRO1 alters retrograde mitochondrial movement, but co-deletion of MIRO1 and MIRO2 does not alter kinesin-TRAK-directed mitochondrial movement along the microtubule (anterograde movement); it affects coupling of mitochondria to the actin cytoskeleton [24]. Further studies on GPRASP/ARMCX subfamily 2 are needed to better characterize their function and their putative redundancy in regulating mitochondrial dynamics.

Interestingly, MIRO clusters were recently shown to link cristae organization to the mitochondrial transport machinery but also to regulate ER-mitochondria contact sites where fission takes place [26]. MIRO proteins are also implicated in the mitotic redistribution of the mitochondrial network to regulate cell proliferation [106, 24]. A role in the regulation of mitochondrial fission could at least partly explain why subfamily 2 has been implicated in cell division and cancer progression. ARMCX1, ARMCX2 and ARMCX3 were originally named ALEX for ARM-protein-Lost-in-Epithelial-Cancers-on-chromosome-X [114-116]. The ARMC10B isoform, implicated in cancer progression, seems to directly recruit mitochondrial fission proteins, in addition, to associate with the MIRO complex [5, 23]. A striking post-translational modification of ARMC10B in response to energy level through the AMPK has been precisely described and it is likely that other signaling pathways converge on ARMC10/ARMCX proteins to regulate mitochondria dynamics [23].

Can mitochondrially targeted proteins of GPRASP/ARMCX subfamily 2 bind to GPCRs like subfamily 1 does? Although GPCRs can be found in this organelle, [117-120] they are proposed to have the ligand-binding site facing the cytosol and their C-tail facing the inter-membrane space of the mitochondria. Clearly, ARMCX4 belongs to subfamily 1 and contains GASP motifs implicated in GPCRs interaction together with the carboxyl-terminal domain, but it shares with subfamily 2 a transmembrane-targeting domain that, considering its sequence homology, probably functions as a signal for mitochondrial localization. One could thus speculate that, even transient, contact sites between mitochondria and other organelles could allow some interaction between the mitochondria localized GPRASP/ARMCX proteins and GPCRs, in the proper orientation with their C-tail available in the cytoplasm. Moreover, ARMCX1 was shown to display

low interaction with the C-tail of some GPCRs in *in vitro* GST-Pull down assay [12].

Interestingly, ARMCX1, together with GPRASP2, was shown to be implicated in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cells [58]. At the opposite of most of the other targets, a knock-down of ARMCX1 or of GPRASP2 increased the HSPC repopulation of the bone marrow. But the functions of the two proteins could be distinct because, as reviewed, the lack of GPRASP2 was further shown to contribute to enhanced cell survival while, in contrast, knock-down of ARMCX1 had no significant effect on cell cycle or apoptosis [58].

Despite the fact that mitochondria dynamics can be altered in diseases such as age-related neurodegeneration, there is so far no mutation described in human families related to subfamily 2 of GPRASP/ARMCX proteins. Interestingly, in the male infant reported with the Xq22.1 1.1Mb deletion by Cao and collaborators, *ARMCX6*, *ARMCX3*, *ARMCX2* from subfamily 2 were among the 17 deleted genes [9]. Hypoglycemia, umbilical hernia, tracheomalacia, and laryngomalacia are abnormalities that were not described in the mother and daughter carrying the 1.1Mb deletion with intact *ARMCX6*, *ARMCX3*, and *ARMCX2* genes [7].

#### CONCLUSION

In conclusion, GPRASP/ARMCX proteins formed two distinct subfamilies with GPRASP1/GPRASP2 from subfamily 1 clearly implicated in GPCRs membrane trafficking and ARMC10/ARMCX3/ARMCX1 from subfamily 2 implicated in mitochondria trafficking and dynamics. Future work is needed at the molecular, cellular, and animal levels to better understand their implication in pathophysiological conditions such as ciliopathies, cancer, neuronal development, age-related neurological development, and chronic treatment with drugs activating GPCRs.

#### LIST OF ABBREVIATIONS

5-HT6, 5-HT7	= Serotonin Receptor 6, 7
AAV	= Adeno-associated Virus
ADRB1	= Beta1 Adrenergic Receptor,
ALEX	= ARM-protein-Lost-in-Epithelial-Cancers-on-chromosome-X
AMPK	= 5'AMP-activated Protein Kinase
ARMC	= Armadillo Repeat-containing Protein
ARMCX	= Armadillo Repeat-containing X-linked Proteins
ASD	= Autistic Spectrum Disorders
ATP	= Adenosine Triphosphate
BEX	= Brain-Expressed X-linked
bHLHB9	= Basic Helix-loop-helix Domain Containing Class B, 9
C-tail	= Cytoplasmic Carboxyl Terminal Domain of GPCR
C-ter	= Carboxyl-terminal

CALCR	= Calcitonin Receptor	M1	= Muscarinic 1 Receptor,
CB1R	= CNR1, Cannabinoid receptor type 1	Mb	= Megabase
CB2R	= CNR2, Cannabinoid receptor type 2	MEME	= Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation
CCTOP	= Constrained Consensus TOPology prediction Server	MFF	= Mitochondrial Fission Factor
cGASP	= Domain from Residues 899 to 1395 of GPRASP1	MFN-1, MFN-2	= Mitofusin 1, 2
COX	= Cyclooxygenase	mGluR5	= Metabotropic Glutamate Receptor 5
CREB	= CAMP Response Element-binding protein	MIRO	= Mitochondrial rho GTPase
CXCR4	= C-X-C Chemokine receptor type 4	mRNA	= Messenger RNA
D1R	= Dopaminergic Receptor Type 1	MVB	= Multivesicular Bodies
D2R	= Dopaminergic Receptor Type 2	Myc	= Myelocytimatosi Protooncogene
D3R	= Dopaminergic Receptor Type 3	NF-KB	= Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells
D4R	= Dopaminergic Receptor Type 4	NFFR1	= Neuropeptide FF Receptor 1
D5R	= Dopaminergic Receptor Type 5	NLS	= Nuclear Localisation Signal
DNA	= Deoxyribonucleic Acid	N-ter	= Amino-terminal
DOR	= Delta-opioid Receptor	PFAM	= Protein Families Database
DRP1	= Dynamin-related Protein 1	Pifo	= Pitchfork
ER	= Endoplasmic Reticulum	PINK1	= PTEN-induced Kinase 1
ESCRT	= Endosomal Sorting Complexes Required for Transport	PKA	= Protein Kinase A
FIS1	= Fission 1	PTEN	= Phosphatase and Tensin Homolog
FZ4	= Frizzled 4 Receptor,	RGC	= Retinal Ganglions Cells
GalR2, GalR3	= Galanin Receptor 2, 3	RT-qPCR	= Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
G $\alpha$ s	= Stimulatrice Alpha G Protein	SHH	= SonicHedgehog
GFP	= Green Fluorescent Protein	shRNA	= Short Hairpin RNA
GLP1R	= Glucagon-like Peptide Receptor 1	siRNA	= Small Interfering RNA
GPCR	= G Protein Coupled Receptor	Smo	= Smoothened Receptor
GPR55	= Cannabinoid Related Receptor	SOCS3	= Suppressor of Cytokine Signalling 3
GPRASP	= GPCR Associated Sorting Protein	Sox10	= SRY-related HMG-box
GST	= Glutathione S-transferase	TAZ	= Transcriptional Co-activator with PDZ-binding Motif
GTP	= Guanosine Triphosphate	TCEAL	= Transcription Elongation Factor A protein-Like
GTPase	= Guanosine Triphosphate Hydrolase	TCF25	= Transcription Factor 25
HEK293	= Human Embryonic Kidney Cells	TM	= Transmembrane
HRS	= HGF-regulated Tyrosine Kinase Substrate, part of the ESCRT-0 Complex	TPA	= Tissue Plasminogen Activator
HSPC	= Hematopoietic Stem and Progenitor Cells	TRAF4	= TNF Receptor-associated Factor
ID	= Intellectual Disability	TRAK2	= Trafficking Kinesin-binding Protein 2
IDRs	= Intrinsic Disordered Regions	Tuj1	= Neuron-specific Class III $\beta$ -tubulin Protein
KO	= Knockout	TXA2	= Thromboxane A2 Receptor
LAMP1, LAMP2	= Lysosomal-associated Membrane Protein 1, 2	U2OS	= Human Bone-osteocarcinoma Epithelial Cells
LKB1	= Liver-kinase B1	UIM	= Ubiquitin-Interacting Motif

UTR	=	Un-transcribed Region
WEX	=	WWbp5-like X-linked
WT	=	Wild-type
YAP	=	Yes-associated Protein

### CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

### FUNDING

This work was supported by the CNRS, the Région Grand-Est, the LABEX Medalis (ANR-10-LABX-0034, Programme d'investissement d'avenir) and the graduate school of pain EURIDOL of the University of Strasbourg (ANR-17-EURE-0022, Programme d'investissement d'avenir).

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

### REFERENCES

- Simonin, F.; Karcher, P.; Boeuf, J.J.-M.; Matifas, A.; Kieffer, B.L. Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J. Neurochem.*, **2004**, *89*(3), 766-775. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02411.x> PMID: 15086532
- Abu-Helo, A.; Simonin, F. Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs). *Pharmacol. Ther.*, **2010**, *126*(3), 244-250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.03.004> PMID: 20394773
- López-Doménech, G.; Serrat, R.; Mirra, S.; D'Aniello, S.; Somorjai, I.; Abad, A.; Vituriera, N.; García-Arumí, E.; Alonso, M.T.; Rodriguez-Prados, M.; Burgaya, F.; Andreu, A.L.; García-Sancho, J.; Trullas, R.; Garcia-Fernández, J.; Soriano, E. The Eutherian *Armcx* genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2. *Nat. Commun.*, **2012**, *3*, 814. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1829> PMID: 22569362
- Serrat, R.; Mirra, S.; Figueiro-Silva, J.; Navas-Pérez, E.; Quevedo, M.; López-Doménech, G.; Podlesniy, P.; Ulloa, F.; Garcia-Fernández, J.; Trullas, R.; Soriano, E. The *Armc10/SVH* gene: genome context, regulation of mitochondrial dynamics and protection against A $\beta$ -induced mitochondrial fragmentation. *Cell Death Dis.*, **2014**, *5*, e1163-e1163. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.121> PMID: 24722288
- Huang, R.; Xing, Z.; Luan, Z.; Wu, T.; Wu, X.; Hu, G. A specific splicing variant of SVH, a novel human armadillo repeat protein, is up-regulated in hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.*, **2003**, *63*(13), 3775-3782. PMID: 12839973
- Winter, E.E.; Ponting, C.P. Mammalian BEX, WEX and GASP genes: coding and non-coding chimaerism sustained by gene conversion events. *BMC Evol. Biol.*, **2005**, *5*, 54-67. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-5-54> PMID: 16221301
- Grillo, L.; Reitano, S.; Belfiore, G.; Spalletta, A.; Amata, S.; Bottitta, M.; Barone, C.; Falco, M.; Fichera, M.; Romano, C. Familial 1.1 Mb deletion in chromosome Xq22.1 associated with mental retardation and behavioural disorders in female patients. *Eur. J. Med. Genet.*, **2010**, *53*(2), 113-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.01.001> PMID: 20096387
- Yamamoto, T.; Wilsdon, A.; Joss, S.; Isidor, B.; Erlandsson, A.; Suri, M.; Sangu, N.; Shimada, S.; Shimojima, K.; Le Caignec, C.; Samuelsson, L.; Stefanova, M. An emerging phenotype of Xq22 microdeletions in females with severe intellectual disability, hypotonia and behavioral abnormalities. *J. Hum. Genet.*, **2014**, *59*(6), 300-306. <http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2014.21> PMID: 24646727
- Cao, Y.; Aypar, U. A novel Xq22.1 deletion in a male with multiple congenital abnormalities and respiratory failure. *Eur. J. Med. Genet.*, **2016**, *59*(5), 274-277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.03.004> PMID: 26995686
- Mácha, J.; Teichmanová, R.; Sater, A.K.; Wells, D.E.; Tlapáková, T.; Zimmerman, L.B.; Krylov, V. Deep ancestry of mammalian X chromosome revealed by comparison with the basal tetrapod *Xenopus tropicalis*. *BMC Genomics*, **2012**, *13*, 315. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-13-315> PMID: 22800176
- Jung, B.; Messias, A.C.; Schorpp, K.; Geerloff, A.; Schneider, G.; Saur, D.; Hadian, K.; Sattler, M.; Wanker, E.E.; Hasenöder, S.; Lickert, H. Novel small molecules targeting ciliary transport of Smoothed and oncogenic Hedgehog pathway activation. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 22540. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22540> PMID: 26931153
- Bornert, O.; Möller, T.C.; Boeuf, J.; Candusso, M.-P.; Wagner, R.; Martinez, K.L.; Simonin, F. Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. *PLoS One*, **2013**, *8*(2), e56336. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056336> PMID: 23441177
- Bailey, T.L.; Boden, M.; Buske, F.A.; Frith, M.; Grant, C.E.; Clementi, L.; Ren, J.; Li, W.W.; Noble, W.S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, *37*(Web Server issue), W202-W208. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp335> PMID: 19458158
- Striegl, H.; Andrade-Navarro, M.A.; Heinemann, U. Armadillo motifs involved in vesicular transport. *PLoS One*, **2010**, *5*(2), e8991. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008991> PMID: 20126549
- Gul, I.S.; Hulpiau, P.; Saeyn, Y.; van Roy, F. Metazoan evolution of the armadillo repeat superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2017**, *74*(3), 525-541. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-016-2319-6> PMID: 27497926
- Whistler, J.L.; Enquist, J.; Marley, A.; Fong, J.; Gladher, F.; Tsuruda, P.; Murray, S.R.; Von Zastrow, M. Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science*, **2002**, *297*(5581), 615-620. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1073308> PMID: 12142540
- Heydorn, A.; Søndergaard, B.P.; Ersbøll, B.; Holst, B.; Nielsen, F.C.; Haft, C.R.; Whistler, J.; Schwartz, T.W. A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(52), 54291-54303. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M406169200> PMID: 15452121
- Moser, E.; Kargl, J.; Whistler, J.L.; Waldhoer, M.; Tschische, P. G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. *Pharmacology*, **2010**, *86*(1), 22-29. <http://dx.doi.org/10.1159/000314161> PMID: 20693822
- He, C.; Wei, Y.; Sun, K.; Li, B.; Dong, X.; Zou, Z.; Liu, Y.; Kinch, L.N.; Khan, S.; Sinha, S.; Xavier, R.J.; Grishin, N.V.; Xiao, G.; Eskelinen, E.-L.; Scherer, P.E.; Whistler, J.L.; Levine, B. Beclin 2 functions in autophagy, degradation of G protein-coupled receptors, and metabolism. *Cell*, **2013**, *154*(5), 1085-1099. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.035> PMID: 23954414
- Matsuki, T.; Kiyama, A.; Kawabuchi, M.; Okada, M.; Nagai, K. A novel protein interacts with a clock-related protein, rPer1. *Brain Res.*, **2001**, *916*(1-2), 1-10.

- [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02857-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02857-8) PMID: 11597585
- [21] Mou, Z.; Tapper, A.R.; Gardner, P.D. The armadillo repeat-containing protein, ARMCX3, physically and functionally interacts with the developmental regulatory factor Sox10. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*(20), 13629-13640. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M901177200> PMID: 19304657
- [22] Cartoni, R.; Norsworthy, M.W.; Bei, F.; Wang, C.; Li, S.; Zhang, Y.; Gabel, C.V.; Schwarz, T.L.; He, Z. The mammalian-specific protein armcx1 regulates mitochondrial transport during axon regeneration. *Neuron*, **2016**, *92*(6), 1294-1307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.060> PMID: 28009275
- [23] Chen, Z.; Lei, C.; Wang, C.; Li, N.; Srivastava, M.; Tang, M.; Zhang, H.; Choi, J.M.; Jung, S.Y.; Qin, J.; Chen, J. Global phosphoproteomic analysis reveals ARMC10 as an AMPK substrate that regulates mitochondrial dynamics. *Nat. Commun.*, **2019**, *10*(1), 104. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-08004-0> PMID: 30631047
- [24] López-Doménech, G.; Covill-Cooke, C.; Ivankovic, D.; Halff, E.F.; Sheehan, D.F.; Norkett, R.; Birsá, N.; Kittler, J.T. Miro proteins coordinate microtubule- and actin-dependent mitochondrial transport and distribution. *EMBO J.*, **2018**, *37*(3), 321-336. <http://dx.doi.org/10.15252/embj.201696380> PMID: 29311115
- [25] Lee, S.-Y.; Kang, M.-G.; Park, J.-S.; Lee, G.; Ting, A.Y.; Rhee, H.-W. APEX fingerprinting reveals the subcellular localization of proteins of interest. *Cell Rep.*, **2016**, *15*(8), 1837-1847. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.064> PMID: 27184847
- [26] Modi, S.; López-Doménech, G.; Halff, E.F.; Covill-Cooke, C.; Ivankovic, D.; Melandri, D.; Arancibia-Cárcamo, I.L.; Burden, J.J.; Lowe, A.R.; Kittler, J.T. Miro clusters regulate ER-mitochondria contact sites and link cristae organization to the mitochondrial transport machinery. *Nat. Commun.*, **2019**, *10*(1), 4399. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-12382-4> PMID: 31562315
- [27] Serrat, R.; López-Doménech, G.; Mirra, S.; Quevedo, M.; Garcia-Fernández, J.; Ulloa, F.; Burgaya, F.; Soriano, E. The non-canonical Wnt/PKC pathway regulates mitochondrial dynamics through degradation of the arm-like domain-containing protein Alex3. *PLoS One*, **2013**, *8*(7), e67773. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067773> PMID: 23844091
- [28] Liu, C.; Lin, C.; Yao, J.; Wei, Q.; Xing, G.; Cao, X. Dynamic expression analysis of armc10, the homologous gene of human GPRASP2, in zebrafish embryos. *Mol. Med. Rep.*, **2017**, *16*(5), 5931-5937. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2017.7357> PMID: 28849214
- [29] Oliviero, G.; Brien, G.L.; Waston, A.; Streubel, G.; Jerman, E.; Andrews, D.; Doyle, B.; Munawar, N.; Wynne, K.; Crean, J.; Bracken, A.P.; Cagney, G. Dynamic protein interactions of the polycomb repressive complex 2 during differentiation of pluripotent cells. *Mol. Cell. Proteomics*, **2016**, *15*(11), 3450-3460. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M116.062240> PMID: 27634302
- [30] Lin, J.-R.; Mondal, A.M.; Liu, R.; Hu, J. Minimalist ensemble algorithms for genome-wide protein localization prediction. *BMC Bioinformatics*, **2012**, *13*, 157. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-157> PMID: 22759391
- [31] Nguyen Ba, A.N.; Pogoutse, A.; Provar, N.; Moses, A.M. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, **2009**, *10*, 202. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-202> PMID: 19563654
- [32] Mirra, S.; Ulloa, F.; Gutierrez-Vallejo, I.; Martí, E.; Soriano, E. Function of armcx3 and armc10/svh genes in the regulation of progenitor proliferation and neural differentiation in the chicken spinal cord. *Front. Cell. Neurosci.*, **2016**, *10*, 47. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2016.00047> PMID: 26973462
- [33] Beausoleil, S.A.; Jedrychowski, M.; Schwartz, D.; Elias, J.E.; Villén, J.; Li, J.; Cohn, M.A.; Cantley, L.C.; Gygi, S.P. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*(33), 12130-12135. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404720101> PMID: 15302935
- [34] Rozan, L.M.; El-Deiry, W.S. Identification and characterization of proteins interacting with Traf4, an enigmatic p53 target. *Cancer Biol. Ther.*, **2006**, *5*(9), 1228-1235. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.5.9.3295> PMID: 16969126
- [35] Fournier, D.; Palidwor, G.A.; Shcherbinin, S.; Szengel, A.; Schaefer, M.H.; Perez-Iratxeta, C.; Andrade-Navarro, M.A. Functional and genomic analyses of alpha-solenoid proteins. *PLoS One*, **2013**, *8*(11), e79894. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079894> PMID: 24278209
- [36] Andrade, M.A.; Perez-Iratxeta, C.; Ponting, C.P. Protein repeats: structures, functions, and evolution. *ScienceDirect*, **2001**, *134*, 117-131.
- [37] van der Lee, R.; Buljan, M.; Lang, B.; Weatheritt, R.J.; Daughdrill, G.W.; Dunker, A.K.; Fuxreiter, M.; Gough, J.; Gsponer, J.; Jones, D.T.; Kim, P.M.; Kriwacki, R.W.; Oldfield, C.J.; Pappu, R.V.; Tompa, P.; Uversky, V.N.; Wright, P.E.; Babu, M.M. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*(13), 6589-6631. <http://dx.doi.org/10.1021/cr400525m> PMID: 24773235
- [38] Rosciglione, S.; Thériault, C.; Boily, M.-O.; Paquette, M.; Lavoie, C. Gas regulates the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Nat. Commun.*, **2014**, *5*, 4556. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5556> PMID: 25089012
- [39] Marley, A.; von Zastrow, M. Dysbindin promotes the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors to lysosomes. *PLoS One*, **2010**, *5*(2), e9325. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009325> PMID: 20174469
- [40] Jung, B.; Padula, D.; Burtscher, I.; Landerer, C.; Lutter, D.; Theis, F.; Messias, A.C.; Geerlof, A.; Sattler, M.; Kremmer, E.; Boldt, K.; Ueffing, M.; Lickert, H. Pitchfork and gprasp2 target smoothed to the primary cilium for hedgehog pathway activation. *PLoS One*, **2016**, *11*(2), e0149477. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149477> PMID: 26901434
- [41] Modell, A.E.; Blosser, S.L.; Arora, P.S. Systematic targeting of protein-protein interactions. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2016**, *37*(8), 702-713. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.008> PMID: 27267699
- [42] Mabonga, L.; Kappo, A.P. Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. *Biophys. Rev.*, **2019**, *11*(4), 559-581. <http://dx.doi.org/10.1007/s12551-019-00570-x> PMID: 31301019
- [43] Ambadipudi, S.; Zweckstetter, M. Targeting intrinsically disordered proteins in rational drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, **2016**, *11*(1), 65-77. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2016.1107041> PMID: 26549326
- [44] Neira, J.L.; Bintz, J.; Arruebo, M.; Rizzuti, B.; Bonacci, T.; Vega, S.; Lanás, A.; Velázquez-Campoy, A.; Iovanna, J.L.; Abián, O. Identification of a drug targeting an intrinsically disordered protein involved in pancreatic adenocarcinoma. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 39732. <http://dx.doi.org/10.1038/srep39732> PMID: 28054562
- [45] Magalhaes, A.C.; Dunn, H.; Ferguson, S.S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *165*(6), 1717-1736. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x> PMID: 21699508
- [46] Dores, M.R.; Trejo, J. Atypical regulation of G protein-coupled receptor intracellular trafficking by ubiquitination. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2014**, *27*, 44-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2013.11.004> PMID: 24680429
- [47] Lagerström, M.C.; Schiöth, H.B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, *7*(4), 339-357. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2518> PMID: 18382464
- [48] Hilger, D.; Masureel, M.; Kobilka, B.K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2018**, *25*(1), 4-12. <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7> PMID: 29323277
- [49] Jong, Y.I.; Harmon, S.K.; O'Malley, K.L. Intracellular GPCRs Play Key Roles in Synaptic Plasticity. *ACS Chem. Neurosci.*, **2018**, *9*(9), 2162-2172. <http://dx.doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00516> PMID: 29409317
- [50] Weinberg, Z.Y.; Puthenveedu, M.A. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by plasma membrane organization and endocytosis. *Traffic*, **2019**, *20*(2), 121-129. PMID: 30536564
- [51] Maurice, P.; Guillaume, J.-L.; Benleulmi-Chaachoua, A.; Daulat, A.M.; Kamal, M.; Jockers, R. GPCR-interacting proteins, major players of GPCR function. *Adv. Pharmacol.*, **2011**, *62*, 349-380.

- <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385952-5.00001-4> PMID: 21907915
- [52] Wollert, T.; Hurley, J.H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, **2010**, *464*(7290), 864-869.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature08849> PMID: 20305637
- [53] Schmidt, O.; Teis, D. The ESCRT machinery. *Curr. Biol.*, **2012**, *22*(4), R116-R120.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028> PMID: 22361144
- [54] Hislop, J.N.; von Zastrow, M. Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors. *Traffic*, **2011**, *12*(2), 137-148.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01121.x> PMID: 20854416
- [55] Li, X.; Létoirneau, D.; Holleran, B.; Leduc, R.; Lavigne, P.; Lavoie, C.  $G\alpha$  protein binds ubiquitin to regulate epidermal growth factor receptor endosomal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, *114*(51), 13477-13482.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1708215114> PMID: 29192023
- [56] Zheng, B.; Lavoie, C.; Tang, T.-D.; Ma, P.; Meerloo, T.; Beas, A.; Farquhar, M.G. Regulation of epidermal growth factor receptor degradation by heterotrimeric Galphas protein. *Mol. Biol. Cell*, **2004**, *15*(12), 5538-5550.  
<http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0446> PMID: 15469987
- [57] Beas, A.O.; Taupin, V.; Teodorof, C.; Nguyen, L.T.; Garcia-Marcos, M.; Farquhar, M.G. Gas promotes EEA1 endosome maturation and shuts down proliferative signaling through interaction with GIV (Girdin). *Mol. Biol. Cell*, **2012**, *23*(23), 4623-4634.  
<http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e12-02-0133> PMID: 23051738
- [58] Holmfeldt, P.; Ganuza, M.; Marathe, H.; He, B.; Hall, T.; Kang, G.; Moen, J.; Pardieck, J.; Saulsberry, A.C.; Cico, A.; Gaut, L.; McGoldrick, D.; Finkelstein, D.; Tan, K.; McKinney-Freeman, S. Functional screen identifies regulators of murine hematopoietic stem cell repopulation. *J. Exp. Med.*, **2016**, *213*(3), 433-449.  
<http://dx.doi.org/10.1084/jem.20150806> PMID: 26880577
- [59] Morales-Hernández, A.; Benaksas, C.; Chabot, A.; Caprio, C.; Ferdous, M.; Zhao, X.; Kang, G.; McKinney-Freeman, S. GPRASP proteins are critical negative regulators of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **2020**, *135*(14), 1111-1123.  
<http://dx.doi.org/10.1182/blood.2019003435> PMID: 32027737
- [60] Chute, J.P. Stem cell engraftment within our G(P)RASP. *Blood*, **2020**, *135*(14), 1077-1078.  
<http://dx.doi.org/10.1182/blood.2020005117> PMID: 32243516
- [61] Manfra, O.; Van Craenenbroeck, K.; Skieterska, K.; Frimurer, T.; Schwartz, T.W.; Levy, F.O.; Andressen, K.W. Downregulation of 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptors by the atypical antipsychotics clozapine and olanzapine. role of motifs in the c-terminal domain and interaction with gasp-1. *ACS Chem. Neurosci.*, **2015**, *6*(7), 1206-1218.  
<http://dx.doi.org/10.1021/cn500339p> PMID: 25706089
- [62] Kargl, J.; Balenga, N.A.; Platzer, W.; Martini, L.; Whistler, J.L.; Waldhoer, M. The GPCR-associated sorting protein 1 regulates ligand-induced down-regulation of GPR55. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *165*(8), 2611-2619.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01562.x> PMID: 21718301
- [63] Tschische, P.; Moser, E.; Thompson, D.; Vischer, H.F.; Parzmair, G.P.; Pommer, V.; Platzer, W.; Schwarzbraun, T.; Schaidler, H.; Smit, M.J.; Martini, L.; Whistler, J.L.; Waldhoer, M. The G-protein coupled receptor associated sorting protein GASP-1 regulates the signalling and trafficking of the viral chemokine receptor US28. *Traffic*, **2010**, *11*(5), 660-674.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01045.x> PMID: 20102549
- [64] Buenaventura, T.; Kanda, N.; Douzenis, P.C.; Jones, B.; Bloom, S.R.; Chabosseau, P.; Corrêa, I.R., Jr; Bosco, D.; Piemonti, L.; Marchetti, P.; Johnson, P.R.; Shapiro, A.M.J.; Rutter, G.A.; Tomas, A. A Targeted RNAi screen identifies endocytic trafficking factors that control glp-1 receptor signaling in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*, **2018**, *67*(3), 385-399.  
<http://dx.doi.org/10.2337/db17-0639> PMID: 29284659
- [65] Thompson, D.; Martini, L.; Whistler, J.L. Altered ratio of D1 and D2 dopamine receptors in mouse striatum is associated with behavioral sensitization to cocaine. *PLoS One*, **2010**, *5*(6), e11038.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011038> PMID: 20543951
- [66] Boeuf, J.; Trigo, J.M.; Moreau, P.-H.; Lecourtier, L.; Vogel, E.; Cassel, J.-C.; Mathis, C.; Klosen, P.; Maldonado, R.; Simonin, F. Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.*, **2009**, *30*(5), 860-868.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06865.x> PMID: 19712096
- [67] Martini, L.; Thompson, D.; Kharazia, V.; Whistler, J.L. Differential regulation of behavioral tolerance to WIN55,212-2 by GASP1. *Neuropsychopharmacology*, **2010**, *35*(6), 1363-1373.  
<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2010.6> PMID: 20164830
- [68] Waldhoer, M.; Bartlett, S.E.; Whistler, J.L. Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, **2004**, *73*, 953-990.  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940> PMID: 15189164
- [69] Roeckel, L.-A.; Le Coz, G.-M.; Gavériaux-Ruff, C.; Simonin, F. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience*, **2016**, *338*, 160-182.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.029> PMID: 27346146
- [70] Tappe-Theodor, A.; Agarwal, N.; Katona, I.; Rubino, T.; Martini, L.; Swiercz, J.; Mackie, K.; Monyer, H.; Parolaro, D.; Whistler, J.; Kuner, T.; Kuner, R. A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J. Neurosci.*, **2007**, *27*(15), 4165-4177.  
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5648-06.2007> PMID: 17428994
- [71] Martini, L.; Waldhoer, M.; Pusch, M.; Kharazia, V.; Fong, J.; Lee, J.H.; Freissmuth, C.; Whistler, J.L. Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *FASEB J.*, **2007**, *21*(3), 802-811.  
<http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7132com> PMID: 17197383
- [72] Kuramoto, K.; Wang, N.; Fan, Y.; Zhang, W.; Schoenen, F.J.; Frankowski, K.J.; Marugan, J.; Zhou, Y.; Huang, S.; He, C. Autophagy activation by novel inducers prevents BECN2-mediated drug tolerance to cannabinoids. *Autophagy*, **2016**, *12*(9), 1460-1471.  
<http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2016.1187367> PMID: 27305347
- [73] Giros, B.; el Mestikawy, S.; Bertrand, L.; Caron, M.G. Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett.*, **1991**, *295*(1-3), 149-154.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81406-X](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(91)81406-X) PMID: 1765147
- [74] Kilty, J.E.; Lorang, D.; Amara, S.G. Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science*, **1991**, *254*(5031), 578-579.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1948035> PMID: 1948035
- [75] Madhavan, A.; Argilli, E.; Bonci, A.; Whistler, J.L. Loss of D2 dopamine receptor function modulates cocaine-induced glutamatergic synaptic potentiation in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.*, **2013**, *33*(30), 12329-12336.  
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0809-13.2013> PMID: 23884939
- [76] Bartlett, S.E.; Enquist, J.; Hopf, F.W.; Lee, J.H.; Gladher, F.; Kharazia, V.; Waldhoer, M.; Mailliard, W.S.; Armstrong, R.; Bonci, A.; Whistler, J.L. Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*(32), 11521-11526.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0502418102> PMID: 16049099
- [77] Cho, D.; Zheng, M.; Min, C.; Kwon, K.; Shin, C.; Choi, H.; Kim, K. ARF6 and GASP-1 Are Post-Endocytic Sorting Proteins Selectively Involved in the Intracellular Trafficking of Dopamine D<sub>2</sub> Receptors Mediated by GRK and PKC in Transfected Cells: Post-Endocytic Pathways of Dopamine D<sub>2</sub> Receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **2013**, *168*, 1355-1374.  
<http://dx.doi.org/10.1111/bph.12025> PMID: 23082996
- [78] Thompson, D.; Whistler, J.L. Dopamine D<sub>(3)</sub> receptors are down-regulated following heterologous endocytosis by a specific interaction with G protein-coupled receptor-associated sorting protein-1. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*(2), 1598-1608.  
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.158345> PMID: 21030592

- [79] Gerdes, J.M.; Davis, E.E.; Katsanis, N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*, **2009**, *137*(1), 32-45.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.023> PMID: 19345185
- [80] von Zastrow, M.; Williams, J.T. Modulating neuromodulation by receptor membrane traffic in the endocytic pathway. *Neuron*, **2012**, *76*(1), 22-32.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.022> PMID: 23040804
- [81] Omori, Y.; Chaya, T.; Yoshida, S.; Irie, S.; Tsujii, T.; Furukawa, T. Identification of G protein-coupled receptors (GPCRs) in primary cilia and their possible involvement in body weight control. *PLoS One*, **2015**, *10*(6), e0128422.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128422> PMID: 26053317
- [82] Mykytyn, K.; Askwith, C. G-Protein-coupled receptor signaling in cilia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2017**, *9*(9), a028183.  
<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a028183> PMID: 28159877
- [83] Garcia, G., III; Raleigh, D.R.; Reiter, J.F. How the ciliary membrane is organized inside-out to communicate outside-in. *Curr. Biol.*, **2018**, *28*(8), R421-R434.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.010> PMID: 29689227
- [84] Pala, R.; Alomari, N.; Nauli, S.M. Primary cilium-dependent signaling mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*(11), 2272.  
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms18112272> PMID: 29143784
- [85] Kinzel, D.; Boldt, K.; Davis, E.E.; Bartscher, I.; Trümbach, D.; Diplas, B.; Attié-Bitach, T.; Wurst, W.; Katsanis, N.; Ueffing, M.; Lickert, H. Pitchfork regulates primary cilia disassembly and left-right asymmetry. *Dev. Cell*, **2010**, *19*(1), 66-77.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.005> PMID: 20643351
- [86] Xing, G.; Yao, J.; Liu, C.; Wei, Q.; Qian, X.; Wu, L.; Lu, Y.; Cao, X. *GPRASP2*, a novel causative gene mutated in an X-linked recessive syndromic hearing loss. *J. Med. Genet.*, **2017**, *54*(6), 426-430.  
<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104320> PMID: 28096187
- [87] Tateya, T.; Imayoshi, I.; Tateya, I.; Hamaguchi, K.; Torii, H.; Ito, J.; Kageyama, R. Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea. *Development*, **2013**, *140*(18), 3848-3857.  
<http://dx.doi.org/10.1242/dev.095398> PMID: 23946445
- [88] Kovacs, Jeffrey J.; Whalen, E.J.; Liu, R.; Xiao, K.; Kim, J.; Chen, M.; Jiangbo, W.; Chen, W.; Lefkowitz, R.J.  $\beta$ -arrestin-mediated localization of smoothed to the primary cilium. *Science*, **2008**, *320*, 1777-1781.
- [89] Butler, M.G.; Rafi, S.K.; Hossain, W.; Stephan, D.A.; Manzardo, A.M. Whole exome sequencing in females with autism implicates novel and candidate genes. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*(1), 1312-1335.  
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms16011312> PMID: 25574603
- [90] Piton, A.; Gauthier, J.; Hamdan, F.F.; Lafrenière, R.G.; Yang, Y.; Henrion, E.; Laurent, S.; Noreau, A.; Thibodeau, P.; Karemera, L.; Spiegelman, D.; Kuku, F.; Duguay, J.; Destroismaisons, L.; Jolivet, P.; Côté, M.; Lachapelle, K.; Diallo, O.; Raymond, A.; Marineau, C.; Champagne, N.; Xiong, L.; Gaspar, C.; Rivière, J.-B.; Tarabeux, J.; Cossette, P.; Krebs, M.-O.; Rapoport, J.L.; Addington, A.; Delisi, L.E.; Motttron, L.; Joobar, R.; Fombonne, E.; Drapeau, P.; Rouleau, G.A. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, **2011**, *16*(8), 867-880.  
<http://dx.doi.org/10.1038/mp.2010.54> PMID: 20479760
- [91] Edfawy, M.; Guedes, J.R.; Pereira, M.I.; Laranjo, M.; Carvalho, M.J.; Gao, X.; Ferreira, P.A.; Caldeira, G.; Franco, L.O.; Wang, D.; Cardoso, A.L.; Feng, G.; Carvalho, A.L.; Peça, J. Abnormal mGluR-mediated synaptic plasticity and autism-like behaviours in *Gprasp2* mutant mice. *Nat. Commun.*, **2019**, *10*(1), 1431.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09382-9> PMID: 30926797
- [92] De Rubeis, S.; He, X.; Goldberg, A.P.; Poultney, C.S.; Samocha, K.; Ciccek, A.E.; Kou, Y.; Liu, L.; Fromer, M.; Walker, S.; Singh, T.; Klei, L.; Kosmicki, J.; Shih-Chen, F.; Aleksic, B.; Biscaldi, M.; Bolton, P.F.; Brownfeld, J.M.; Cai, J.; Campbell, N.G.; Carracedo, A.; Chahrouh, M.H.; Chiochetti, A.G.; Coon, H.; Crawford, E.L.; Curran, S.R.; Dawson, G.; Duketis, E.; Fernandez, B.A.; Gallagher, L.; Geller, E.; Guter, S.J.; Hill, R.S.; Ionita-Laza, J.; Jimenez Gonzalez, P.; Kilpinen, H.; Klauck, S.M.; Kolevzon, A.; Lee, I.; Lei, I.; Lei, J.; Lehtimäki, T.; Lin, C.-F.; Ma'ayan, A.; Marshall, C.R.; McInnes, A.L.; Neale, B.; Owen, M.J.; Ozaki, N.; Parellada, M.; Parr, J.R.; Purcell, S.; Puura, K.; Rajagopalan, D.; Rehnström, K.; Reichenberg, A.; Sabo, A.; Sachse, M.; Sanders, S.J.; Schafer, C.; Schulte-Rüther, M.; Skuse, D.; Stevens, C.; Szatmari, P.; Tammimies, K.; Valladares, O.; Voran, A.; Li-San, W.; Weiss, L.A.; Willsey, A.J.; Yu, T.W.; Yuen, R.K.C.; Cook, E.H.; Freitag, C.M.; Gill, M.; Hultman, C.M.; Lehner, T.; Palotie, A.; Schellenberg, G.D.; Sklar, P.; State, M.W.; Sutcliffe, J.S.; Walsh, C.A.; Scherer, S.W.; Zwick, M.E.; Baret, J.C.; Cutler, D.J.; Roeder, K.; Devlin, B.; Daly, M.J.; Buxbaum, J.D. DDD Study; Homozygosity Mapping Collaborative for Autism; UK10K Consortium. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, **2014**, *515*(7526), 209-215.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature13772> PMID: 25363760
- [93] Zhou, J.; McCarrey, J.R.; Wang, P.J.A. A 1.1-Mb segmental deletion on the X chromosome causes meiotic failure in male mice. *Biol. Reprod.*, **2013**, *88*(6), 159.  
<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.112.106963> PMID: 23677977
- [94] Zhou, J.; Goldberg, E.M.; Leu, N.A.; Zhou, L.; Coulter, D.A.; Wang, P.J. Respiratory failure, cleft palate and epilepsy in the mouse model of human Xq22.1 deletion syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **2014**, *23*(14), 3823-3829.  
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu095> PMID: 24569167
- [95] Mathis, C.; Bott, J.-B.; Candusso, M.-P.; Simonin, F.; Cassel, J.-C. Impaired striatum-dependent behavior in GASP-1-knock-out mice. *Genes Brain Behav.*, **2011**, *10*(3), 299-308.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00666.x> PMID: 21091868
- [96] Shin, J.-O.; Song, J.; Choi, H.S.; Lee, J.; Lee, K.; Ko, H.W.; Bok, J. Activation of sonic hedgehog signaling by a Smoothed agonist restores congenital defects in mouse models of endocrine-cerebro-osteodysplasia syndrome. *EBioMedicine*, **2019**, *49*, 305-317.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.016> PMID: 31662288
- [97] Li, S.; Jin, S.; Jin, C. The correlative hypotheses between Pitchfork and Kif3a in palate development. *Med. Hypotheses*, **2019**, *126*, 23-25.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2019.03.005> PMID: 31010494
- [98] Heese, K. G proteins, p60TRP, and neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.*, **2013**, *47*(3), 1103-1111.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-013-8410-1> PMID: 23345134
- [99] Lobingier, B.T.; von Zastrow, M. When trafficking and signaling mix: How subcellular location shapes G protein-coupled receptor activation of heterotrimeric G proteins. *Traffic*, **2019**, *20*(2), 130-136.  
<http://dx.doi.org/10.1111/tra.12634> PMID: 30578610
- [100] Tilokani, L.; Nagashima, S.; Paupe, V.; Prudent, J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.*, **2018**, *62*(3), 341-360.  
<http://dx.doi.org/10.1042/EBC20170104> PMID: 30030364
- [101] Frezza, C. The role of mitochondria in the oncogenic signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2014**, *48*, 11-17.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.12.013> PMID: 24397955
- [102] McBride, H.M.; Neuspiel, M.; Wasiak, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.*, **2006**, *16*(14), R551-R560.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054> PMID: 16860735
- [103] Noguchi, M.; Kasahara, A. Mitochondrial dynamics coordinate cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2018**, *500*(1), 59-64.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.094> PMID: 28634072
- [104] Saxton, W.M.; Hollenbeck, P.J. The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.*, **2012**, *125*(Pt 9), 2095-2104.  
<http://dx.doi.org/10.1242/jcs.053850> PMID: 22619228
- [105] Millecamps, S.; Julien, J.-P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2013**, *14*(3), 161-176.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3380> PMID: 23361386
- [106] Kanfer, G.; Courthéoux, T.; Peterka, M.; Meier, S.; Soste, M.; Melnik, A.; Reis, K.; Aspenström, P.; Peter, M.; Picotti, P.; Kornmann, B. Mitotic redistribution of the mitochondrial network by Miro and Cenp-F. *Nat. Commun.*, **2015**, *6*, 8015.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9015> PMID: 26259702
- [107] Kay, L.; Pienaar, I.S.; Cooray, R.; Black, G.; Soundararajan, M. Understanding miro gtpases: implications in the treatment of

- neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.*, **2018**, 55(9), 7352-7365.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-0927-x> PMID: 29411264
- [108] Giacomello, M.; Pyakurel, A.; Glytsou, C.; Scorrano, L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2020**, 21(4), 204-224.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7> PMID: 32071438
- [109] Smith, G.M.; Gallo, G. The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Dev. Neurobiol.*, **2018**, 78(3), 221-237.  
<http://dx.doi.org/10.1002/dneu.22546> PMID: 29030922
- [110] Park, K.K.; Liu, K.; Hu, Y.; Smith, P.D.; Wang, C.; Cai, B.; Xu, B.; Connolly, L.; Kramvis, I.; Sahin, M.; He, Z. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science*, **2008**, 322(5903), 963-966.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1161566> PMID: 18988856
- [111] Sun, F.; Park, K.K.; Belin, S.; Wang, D.; Lu, T.; Chen, G.; Zhang, K.; Yeung, C.; Feng, G.; Yankner, B.A.; He, Z. Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature*, **2011**, 480(7377), 372-375.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature10594> PMID: 22056987
- [112] Cheng, J.; Zhang, T.; Ji, H.; Tao, K.; Guo, J.; Wei, W. Functional characterization of AMP-activated protein kinase signaling in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, 1866(2), 232-251.  
 PMID: 27681874
- [113] Wauson, E.M.; Dbouk, H.A.; Ghosh, A.B.; Cobb, M.H.G. G protein-coupled receptors and the regulation of autophagy. *Trends Endocrinol. Metab.*, **2014**, 25(5), 274-282.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.006> PMID: 24751357
- [114] Du, Z.; Wu, J.; Wang, J.; Liang, Y.; Zhang, S.; Shang, Z.; Zuo, W. MicroRNA-1298 is downregulated in non-small cell lung cancer and suppresses tumor progression in tumor cells. *Diagn. Pathol.*, **2019**, 14(1), 132.  
<http://dx.doi.org/10.1186/s13000-019-0911-4> PMID: 31801557
- [115] Zeller, C.; Dai, W.; Steele, N.L.; Siddiq, A.; Walley, A.J.; Wilhelm-Benartzi, C.S.M.; Rizzo, S.; van der Zee, A.; Plumb, J.A.; Brown, R. Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. *Oncogene*, **2012**, 31(42), 4567-4576.  
<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.611> PMID: 22249249
- [116] Zhu, Z.; Yang, Q.; Zhang, B.; Wu, W.; Yuan, F.; Zhu, Z. miR-106b promotes metastasis of early gastric cancer by targeting alex1 *in vitro* and *in vivo*. *Cell. Physiol. Biochem.*, **2019**, 52(3), 606-616.  
<http://dx.doi.org/10.33594/000000043> PMID: 30907988
- [117] Abadir, P.M.; Foster, D.B.; Crow, M.; Cooke, C.A.; Rucker, J.J.; Jain, A.; Smith, B.J.; Burks, T.N.; Cohn, R.D.; Fedarko, N.S.; Carey, R.M.; O'Rourke, B.; Walston, J.D. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, 108(36), 14849-14854.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1101507108> PMID: 21852574
- [118] Belous, A.; Wakata, A.; Knox, C.D.; Nicoud, I.B.; Pierce, J.; Anderson, C.D.; Pinson, C.W.; Chari, R.S. Mitochondrial P2Y-Like receptors link cytosolic adenosine nucleotides to mitochondrial calcium uptake. *J. Cell. Biochem.*, **2004**, 92(5), 1062-1073.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20144> PMID: 15258927
- [119] Bénard, G.; Massa, F.; Puente, N.; Lourenço, J.; Bellochio, L.; Soria-Gómez, E.; Matias, I.; Delamarre, A.; Metna-Laurent, M.; Cannich, A.; Hebert-Chatelain, E.; Mulle, C.; Ortega-Gutiérrez, S.; Martín-Fontecha, M.; Klugmann, M.; Guggenhuber, S.; Lutz, B.; Gertsch, J.; Chaouloff, F.; López-Rodríguez, M.L.; Grandes, P.; Rossignol, R.; Marsicano, G. Mitochondrial CB<sub>1</sub> receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.*, **2012**, 15(4), 558-564.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nn.3053> PMID: 22388959
- [120] Suofu, Y.; Li, W.; Jean-Alphonse, F.G.; Jia, J.; Khattar, N.K.; Li, J.; Baranov, S.V.; Leronni, D.; Mihalik, A.C.; He, Y.; Cecon, E.; Wehbi, V.L.; Kim, J.; Heath, B.E.; Baranova, O.V.; Wang, X.; Gable, M.J.; Kretz, E.S.; Di Benedetto, G.; Lezon, T.R.; Ferrando, L.M.; Larkin, T.M.; Sullivan, M.; Yablonska, S.; Wang, J.; Minnigh, M.B.; Guillaumet, G.; Suzenet, F.; Richardson, R.M.; Poloyac, S.M.; Stolz, D.B.; Jockers, R.; Witt-Enderby, P.A.; Carlisle, D.L.; Vilardaga, J-P.; Friedlander, R.M. Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, 114(38), E7997-E8006.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1705768114> PMID: 28874589
- [121] Fang, Y.; Ma, X.; Zeng, J.; Jin, Y.; Hu, Y.; Wang, J.; Liu, R.; Cao, C. The profile of genetic mutations in papillary thyroid cancer detected by whole exome sequencing. *Cell. Physiol. Biochem.*, **2018**, 50(1), 169-178.  
<http://dx.doi.org/10.1159/000493966> PMID: 30278442
- [122] Heese, K.; Yamada, T.; Akatsu, H.; Yamamoto, T.; Kosaka, K.; Nagai, Y.; Sawada, T. Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. *J. Cell. Biochem.*, **2004**, 91(5), 1030-1042.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20010> PMID: 15034937
- [123] Mishra, M.; Heese, K. P60TRP interferes with the GPCR/secretase pathway to mediate neuronal survival and synaptogenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, **2011**, 15(11), 2462-2477.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01248.x> PMID: 21199326
- [124] Chang, Y-S.; Huang, H-D.; Yeh, K-T.; Chang, J-G. Identification of novel mutations in endometrial cancer patients by whole-exome sequencing. *Int. J. Oncol.*, **2017**, 50(5), 1778-1784.  
<http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2017.3919> PMID: 28339086
- [125] Klaas, M.; Kangur, T.; Viil, J.; Mäemets-Allas, K.; Minajeva, A.; Vadi, K.; Antsov, M.; Lapidus, N.; Järvekülg, M.; Jaks, V. The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 27398.  
<http://dx.doi.org/10.1038/srep27398> PMID: 27264108
- [126] Smith, C.A.; McClive, P.J.; Sinclair, A.H. Temporal and spatial expression profile of the novel armadillo-related gene, Alex2, during testicular differentiation in the mouse embryo. *Dev. Dyn.*, **2005**, 233(1), 188-193.  
<http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.20309> PMID: 15759267



## Supplementary Materials

# GPRASP/ARMCX Protein Family: Potential Involvement in Health and Diseases Revealed by their Novel Interacting Partners

Juliette Kaeffer<sup>1</sup>, Gabrielle Zeder-Lutz<sup>1</sup>, Frédéric Simonin<sup>1,\*</sup> and Sandra Lecat<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR7242 CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France*

## Legends of supplementary table and Figures

### Table S1

#### List of the binding partners identified for each of the ten members of the GPRASP/ARMCX protein family

This table was derived initially from the BioGRID repository web site <https://thebiogrid.org/> and was completed manually according to the literature. A number of the interacting proteins in this table have been identified by high throughput techniques and some of them have not yet been confirmed by other techniques

**Figure S1** Sequence alignment of the human, murine and rat GPRASP1. The boxes indicate frame of the different motifs from sequences analysis with MEME SUITE

**Figure S2** Sequence alignment of the human, murine and rat GPRASP2. The boxes indicate frame of the different motifs from sequences analysis with MEME SUITE

**Figure S3** Sequence alignment of the human, murine and rat GPRASP3. The boxes indicate frame of the different motifs from sequences analysis with MEME SUITE

**Figure S4** Sequence alignment of the human, murine and rat ARMCX4. The boxes indicate frame of the different motifs from sequences analysis with MEME SUITE

**Figure S5** Sequence alignment of the human, murine and rat ARMCX5. The boxes indicate frame of the different motifs from sequences analysis with MEME SUITE



```

606
GPRASP1_human  SCDTMQGAEEEEPIIGSWFWTRVEACVEGVNSKSSLEDKEEAM-IPCFGAKEEVSMKHG 657
GPRASP1_mouse  CSDIMAG-AEEEEPIIGPWFwakVDNSVEAEVNSKSSLEDEEEPIRSPWFGAREQTDMKYA 653
GPRASP1_rat    CSDIMAG-AEEEEPIIGPWFwakVDNSVEAEVNSKSSLEDEEEPIRSPWFGAREQPNMKYA 653
..* * * ***** **::: ..* *****:** : * **::: **:::

666
GPRASP1_human  TGVRRCRFMAGAEETNNKSCFWAEKEPCMPYAGGGSWKSRPEEEEDIVNSWFWSRKTYTKPE 717
GPRASP1_mouse  AGIRYKPMAEAEEDANKKSCVWA-KEPCLYPTNRECLKSTLGEKEDTVDPLWSNMYPRTK 712
GPRASP1_rat    AGVGYKPMAEAEANANKKSCVWA-KEPCLYPTNRESLKSTLGEKEDTVDPLWSNMYPRTE 712
:* : * **:::***.* *****:**. . * ** ** * : * **::: * : :

742
GPRASP1_human  AIIGSWLWATEESNIDG-TGEKAKILTEEETIINSWFWKEDE-AISEATDREESREAEAE 775
GPRASP1_mouse  TIIGSWLWAAEEGNIDDETGEKIKLPTLEDNAFNWSWFKENEESIVEAPKREEFRFEAEAE 772
GPRASP1_rat    TIIGSWLWAAEEGNIDDETGEEIKLPTLEDNVFNWSWFKENEETVVEAPNREESKFEAEAE 772
:* *****:**.*** ** * ** * : : ** * ** * : : * . ** :*****

804
GPRASP1_human  GDIIGSWFWAGGEDRLEPAAREEDRIAAEKEGIVGSWFGAREETIRREAGSCSKSSPK 835
GPRASP1_mouse  EDIIGSWFWAGDEDRFEPAAKINEENKIASDEEDTVGSWFWGNE----- 816
GPRASP1_rat    EDIIGSWFWAGDEDRFQPAAKIKEENKIAPEDEDTVGSWFWGKE----- 816
*****:**:**. * ** * ** * ** * ** * ** * **

836
GPRASP1_human  AEEEEVIIGSWFWEAEASPEAVAGVGFESKPGTEEEEITVGSWFWPEEEASIQAGSQAVE 895
GPRASP1_mouse  -----EASLEAVRRGTFESAPGIKEE-KVTGSWFWTDK-AKVGAGSQTV- 858
GPRASP1_rat    -----EASVEAVKGGTFESVSGIKEE-KATGSWFWTDK-AKIGAGPQTV- 858
*** ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

900
GPRASP1_human  EMESETEETIFGSWFDGKEVSEELGPPCVSKFEDDEEMIVESWFWSRDKAIKETGTVA 955
GPRASP1_mouse  ETGSETEEEAIFESLIWAAKKDSIQAGVVKRVSKFKDDGNIAGSWLWSSDKATKEAKTLI 918
GPRASP1_rat    ETGSETEDEAIFESLIWAAKKDSMQIGVNRVSKFKDEGE-GIESWLWSGDKATTESKTVT 917
* *****:** * : * . * : * * ** * ** * : : : **:* ** * . * : *

962
GPRASP1_human  TCESKPENEEGAIVGSWFEAEDEVDRITDNGSNCGRSLADEDEAIVGSWFWAGDEAHFE 1015
GPRASP1_mouse  VSEASPENGKESVVKFGSRAKDEVINKTIGSGDNCKHS---TEAETIVGAWFWEGDEASFE 975
GPRASP1_rat    VSESSPENGKESIVKFGSRAKDEVINKTIGSGDNCKFS---TEAESIVGPFWFWEGDEASFE 974
..* : ** : : * . * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

995
GPRASP1_human  SNPSPVFRAICRSTCSVEQEPDPSRRPQSWEEVTVQFKPGPWGRVGFPSISPFRRFPKEAA 1075
GPRASP1_mouse  SNPVPVCKAVCEPESSAEHEPDPSRRPQSWDEVTVQFKAGPWGKAGFPPMNPFRFPKEAA 1035
GPRASP1_rat    SNPVPVCKAAACEPESSTEHEPDPSRRPQSWDEVTVQFKPGPWGKAGFPSLNPFRRFPKEAA 1034
*** ** * : * . * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

SLFCMFGGKPRNMVLSPEGEDQESLLQDPQSPPEFPFQYDPSYRSVQEIREHLRAKEST 1135
GPRASP1_human
GPRASP1_mouse  SLFAEMFGGKPKLVEVGPE-----REPEPQFPFQYDPSYRSVREIREHLKARESA 1085
GPRASP1_rat    SLFAEMFGGKPKLVEVGTE-----REPEPQFPFQYDPSYRSVREIREHLKARESA 1084
***.*****: : . * : * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

A. Armadillo-like repeats
GPRASP1_human  EPSSSCNCIQCELKIGSEFEELLMLMEKIRDFFIHEISKIAMGMRASQFTRDFIRDS 1195
GPRASP1_mouse  QPENWSCNCIQCELRIKIGSEFEELLMLMDRNRDFFIHEISKIAMGMRGASQFTRDFIRNS 1145
GPRASP1_rat    QAENWSCNCIQCELRIKIGSEFEELLMLMDRNRDFFIHEISKIAMGMRGASQFTRDFIRNS 1144
: * . *****:*******:**: **********.*****:**

```

## 1226 A. Armadillo-like repeats

```

GPRASP1_human  GVVSLIETL LNYPSSRVRTS FLENMIRMAP PYPNLNIIQTYICKVCEETLAYSVDSPEQL 1255
GPRASP1_mouse  GVVSLIEAL LNYPSSRVRTR FLENMVRMAP PYPDLNMIETYVCQICEDTFDYDLDSPDQL 1205
GPRASP1_rat     GVISLIEAL LNYPSSRARTAFLENMIQMAP TYPDLNMIETYVCQVCEDTFDYDLSSDQL 1204
**::****:*:*****.* ** *****::*** **::***::***::***::***:*.:**:**

A. Armadillo-like repeats

GPRASP1_human  SGIRMI RHL TTTT DYHTLV ANMSGFLS LLATGNAKTR FHV LKMLLN LSENLFMTKELLS 1315
GPRASP1_mouse  SGLTMITHL TATS DYHKVW VNYLAGFF YLLNSGNTKTR FHV LKLLLNL SENLVMTKRLLV 1265
GPRASP1_rat     SGLTMITHL TTTF DYHKVW WAYLAGF YLLNSGNTTTTR FHV LKLLLNL SESLVMTKRLLI 1264
**: ** ***: * ***: * *:*** ** :*: * *****:*****.* ***.**

GPRASP1_human  AEA VSEF IGLF IREETNDNIQIVLAIFENIGNNIKKETVFSDDD-----FNIEPLIS 1367
GPRASP1_mouse  TDSVSEFMDLIR EESDENIQIVLAIFETISKHIQKEALFSDDDDDDEEEDAVNLEPFIS 1325
GPRASP1_rat     TDSVSEFMALFIREESDENIQIILAIFENISKNIQKEALFADDEEEEEEEEAVNLEPLIS 1324
:::****: *:*::***::***:*****.* ..::***::***::***: **.*:**:**

GPRASP1_human  AFHKVEKFAKELQGKTDNQNDFEGDQEN 1395
GPRASP1_mouse  AFREA EKIAKELKRKPGNQKAP----- 1347
GPRASP1_rat     AFREA EKFAKELKRKTDDQKSP----- 1346
**::.*:**:****: * .:**: *

```

# Figure



A. Armadillo-like repeats

```
GPRASP2_human EFEEFLLLLMDKIRDPFIHEISKIAMGMRSASQFTRDFIRDSGVVSLIETILNYPSSRVRT 656
GPRASP2_mouse EFEELLLLMDRIRDPFIHEIAKIAMGMRTASQFTRDFIRDSGVVSLIEALMNYPSSRVRT 646
GPRASP2_rat EFEEFLLLLMDRIRDPFIHEISKIAMGMRGASQFTRDFIRNSGVVSLIEALMNYPSSRART 656
****:****:*****:***** *****:*****:****:***** **
```

A. Armadillo-like repeats

```
GPRASP2_human SFLENMIHMAFPYPNLNMIETFICQVCEETLAHSVDSLEQLTGIRMLRHLTMTIDYHTLI 716
GPRASP2_mouse NFLENMVHMAFPYPNLNMIETFICQVCEETLSHSVNSPEQLTGMRMLRHLTITTDYHVLI 706
GPRASP2_rat AFLENMIEMAFPYPDLNMIETFICQVCEETLSHSVNSPEQLTGMRMLRHLTITTDYHTLI 716
*****:*****:*****:***** ***** ***** ***** **
```

```
GPRASP2_human ANYMSGFLSLLTTANARTKFHVLKMLLNLSNPVAKKLFSAKALSI FVGLFNIEETNDN 776
GPRASP2_mouse ANYVSGFLALLTTGDARTKFHVLKMLLNLSDNPMVAKKLFSAKALSI FVGLFNIEETNDN 766
GPRASP2_rat ANYISGFLALLTTGDARTKFHVLKMLLNLSDNPMVAKKLFSAKALSI FVGLFNIEETNDN 776
**:*:****:****:*****:*****:***** ***** ***** *****
```

```
GPRASP2_human IQIVIKMFQNI SNIIKSGKMSLIDDDFSLEPLISAFREFEELAKQLQAQIDNQNDEPVGQ 836
GPRASP2_mouse IQIVIKMFQNI SNIVKSGAMSLIDDDFSLEPLVSAPHEFEELAKQLQIQIDNQNDEEGQ 826
GPRASP2_rat IQIVIKMFQNI SNIVKSGAMSLIDDDFSLEPLVSAPHEFEELAKQLQIQIDNQNDEPEGQ 836
*****:****:****:*****:****:***** *****:**** **
```

```
GPRASP2_human QS 838
GPRASP2_mouse -- 826
GPRASP2_rat -- 836
```

# Figure

## Motif D

GPRASP3\_human MAGTKNKTRAQAKTEKKAIIQAKAGAEREATGVVVRPVAKTRAKAKAKTGSKTDAVAEMKA 60  
GPRASP3\_mouse MTGSKNKARAQAKLEKRASAQARAVAEREAAANANRGAGKSRDKGKGKAGSKSDAVADEVKA 60  
GPRASP3\_rat MTGSKNKARAQAKLEKRASAQAKAAAEREAAANAGRAGAGKNRDKGKGKAGSKTDAVAEAKA 60  
\*.:\*::\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*:\*: \*\*\*: \* \*\*\*: \*.. \* ..\* \* \* \* \*::\*\*\*\*\* \*\*

GPRASP3\_human VSKNKVVAETKEGALSEPKTLGKAMGDFTPKAGNESTSS<sup>100</sup>TCKNEAGTDAWF<sup>112</sup>WAGEEATIN 120  
GPRASP3\_mouse GSKGKVVAETKEGARPE<sup>100</sup>SKALVKGTSDFNHRTENKFARS<sup>112</sup>TRKDKPSSDNWF<sup>112</sup>WAGEDSGIN 120  
GPRASP3\_rat GSKSKVVAETKEGARPE<sup>100</sup>SKAVAKGTSDFNHKAENKYARS<sup>112</sup>ARKDKPSSDSWF<sup>112</sup>WAGEDSGIN 120  
\*\_\* .\*\*\*\*\* \* \*:: \* .\*\* .:: \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \*

GPRASP3\_human SWFWNGEEAGNS<sup>167</sup>STK-NDKPEIGAQVCAEELEPAAGADCKPRSGA<sup>167</sup>EEEEENVIGNWFW 179  
GPRASP3\_mouse SWFWKGEELSNN<sup>167</sup>SVAKCENKPSTSIQ--ARAEEPAPRTSHKSRSGA<sup>167</sup>EEEEENVIGNWFW 178  
GPRASP3\_rat SWFWKGEEVSN<sup>167</sup>SVAKCENKPSTSIQ--ARVEEHTPRTSHKSRSGA<sup>167</sup>EEEEENVIGNWFW 178  
\*\*\*\*:\* \* \_ . : \* : : \* . \* \* . \* : . : \* \*\*\*\*

GPRASP3\_human EGDDTSFD<sup>238</sup>PNPKPVSRIVKPQPVEINEKNRPKDWSEVTIWPNA<sup>238</sup>PAVTPAVLGF<sup>238</sup>FRSQAPS 239  
GPRASP3\_mouse EGDDTGF<sup>238</sup>DPKPVFKIVKQPVEINEKDRPKDWSEVTIWPKAPAV<sup>238</sup>TPAVLGY<sup>238</sup>RSQDSS 238  
GPRASP3\_rat EGDDTGF<sup>238</sup>DPKPVFKIVKQPVEINEKDRPKDWSEVTIWPKAPAV<sup>238</sup>TPAVLGY<sup>238</sup>RSQDSS 238  
\*\*\*\*\* \*\* :\*\*\*\* :\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\* \*

GPRASP3\_human EASPPSYIVLASA<sup>291</sup>EENACSLPVATA<sup>291</sup>CRPSR<sup>291</sup>NRSCSQPI<sup>291</sup>PECRF<sup>291</sup>SDPCI<sup>291</sup>QTI<sup>291</sup>DEIR<sup>291</sup>RQI 299  
GPRASP3\_mouse EARSSSYIVLASNEE<sup>291</sup>ETST-----AC--TKN<sup>291</sup>TRSSLQ<sup>291</sup>SIPEY<sup>291</sup>PF<sup>291</sup>GS<sup>291</sup>DPCI<sup>291</sup>QTL<sup>291</sup>DEIR<sup>291</sup>QQI 291  
GPRASP3\_rat EGRPSSYIVLASNEE<sup>291</sup>ETST-----TC--TKN<sup>291</sup>TRSSLQ<sup>291</sup>PIPEY<sup>291</sup>PF<sup>291</sup>GS<sup>291</sup>DPCI<sup>291</sup>QTL<sup>291</sup>DEIR<sup>291</sup>QQI 291  
\*\_ \*\*\*\*\* \*\*::: : \* : :\*\*\*\* \* \*\* \*\_\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*

GPRASP3\_human RIREVNGIKPFAC<sup>351</sup>PCKMECYMDSEEF<sup>351</sup>EKLVSLLKSTTD<sup>351</sup>PLIHKIARIAMGVHNVHPFAQE 359  
GPRASP3\_mouse KIREENGIKPFAC<sup>351</sup>PCKLECYLDSPEFE<sup>351</sup>EKLVNILKSTTD<sup>351</sup>PLIHKIAQIAMGIHKVHPFAQE 351  
GPRASP3\_rat KIREENGIKPFAC<sup>351</sup>PCKMECYLDSPEFE<sup>351</sup>EKLVNILKSTTD<sup>351</sup>PLIHKIAQIAMGIHKVHPFAQE 351  
:\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*:\* \*\*\*\*\*\_\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

GPRASP3\_human FINEVGVVTLIESLLS<sup>411</sup>FPSP<sup>411</sup>EMR<sup>411</sup>KKTVITLN<sup>411</sup>PSSGDERQ<sup>394</sup>RKIELHV<sup>394</sup>KHMCKETMSFPLNS 419  
GPRASP3\_mouse FINEVGVVTLIESLLS<sup>411</sup>FSSPE<sup>411</sup>VS<sup>411</sup>IKKAVITLN<sup>411</sup>SSGDDRY<sup>394</sup>NKVEFHV<sup>394</sup>KHMCKETVSFPLNS 411  
GPRASP3\_rat FINEVGVVTLIESLLS<sup>411</sup>FSSPE<sup>411</sup>VS<sup>411</sup>IKKAVITLN<sup>411</sup>SSGDDR<sup>394</sup>QMV<sup>394</sup>EFHV<sup>394</sup>KHMCKETVSFPLNS 411  
\*\*\*\*\* \*\*\*: \*.: \*.: \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

GPRASP3\_human PGQQSGLKILGQL<sup>471</sup>TTDFVHHYIV<sup>445</sup>ANYSFSEL<sup>445</sup>FHLLSSGNCKTRNLV<sup>445</sup>LKLLNMSENPTAAR 479  
GPRASP3\_mouse PGQQSGLKIIGQL<sup>471</sup>TTE<sup>445</sup>SVHHYIV<sup>445</sup>VSYSFSEL<sup>445</sup>FHLLSQGNRKT<sup>445</sup>RN<sup>445</sup>LKLVFLNMSENPKAAR 471  
GPRASP3\_rat PGQQSGLKIIGQL<sup>471</sup>TTE<sup>445</sup>SVHHYIV<sup>445</sup>VSYSFSEL<sup>445</sup>FHLLSQGNRKT<sup>445</sup>RN<sup>445</sup>LKLVFLNMSENPKAAR 471  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

GPRASP3\_human DMINMKALAALKLIF<sup>531</sup>NQKEAKANLVS<sup>531</sup>GVAIFINI<sup>531</sup>KEHIRKGSIV<sup>531</sup>VVDHLSYNTLMAIFRE 539  
GPRASP3\_mouse DMINMKALAALKLIF<sup>531</sup>NQKEAKANLVS<sup>531</sup>SAVAIFINI<sup>531</sup>KEHIRKGSIV<sup>531</sup>VVDHLSYNTLTAIFRE 531  
GPRASP3\_rat DMINMKALAALKLIF<sup>531</sup>NQKEAKANLVS<sup>531</sup>SAVAIFINI<sup>531</sup>KEHIRKGSIV<sup>531</sup>VVDHLSYNTLTAIFRE 531  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

GPRASP3\_human VKEIIETM 547  
GPRASP3\_mouse VKGIIERM 539  
GPRASP3\_rat VKGIIERM 539  
\*\* \*\* \*



# Figure

**MOTIF C**

Armcx4\_human MGRIQEVGWVITAGLVIWAGTCYIYKFTKGRVQSVRTLARNGSTVKMETVVGVSQTLAI 60  
 ARMCX4\_mouse MGRVQDVGWATAGLVIWAGTCYCIYRLTKGRVQSVSGHARNGSRIETETVVGGEQNQTLAT 60  
 Armcx4\_rattus MGRVQDVGWATAGLVIWAGTCYCIYRLTKGRVQSVSGLARNGSRIETETMVGEQNQTLAT 60  
 \*\*\*:\*:\*\*.\*\*\*\*\* \*\*::\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* :: \*\*:\* \* .\*\*\*\*

Armcx4\_human NEAEIKTKP--QVEIGAETGARSPPRAEVETKATAIAIHRANSQAKAMVGAEPETQSESK 118  
 ARMCX4\_mouse SEAMAGREAE TRVKTEPETGEGGEPVAEVDKVPVLRSSGNCQAKTMLEEEIETQSETS 120  
 Armcx4\_rattus SEAMAGREAE TRIKTEPESGEGGEPVAEVDKVPVLRPSDNCQAKTMLEEEIETQSETS 120  
 .\*\* : ::: \*\* . \* \*\*\*: \* . :. \* .\*\*\*:\* : \* \*\*\*\*\*:.

Armcx4\_human VVAGTLVMTAEVTLTEVKAKAREVAMKEAVTQTDAAEAGKIVKKEAVTQTKAKAWALVAKT 178  
 ARMCX4\_mouse SLVETVMTEAVTLTESTSQAKEVIMKEAVTQTDAAEAEVGGKKEAVTQTKAKAWAMAGRA 180  
 Armcx4\_rattus SLVETVMAEAVTLTESTSQAKEVIMKEAVTQTDAAEAEVGGKKEAVTQTKAKAWAMAGRA 180  
 :. \*:\*\*:\*\*\*\*\* :::\*\*:\*:\*\*\*\*\* : \*\*\*\*\*:.....

Armcx4\_human EAKREAMTQTKAETHILAEKETEINRVMVTQSETLAVPREVAKMGATNKTIGIVDETKTRA 238  
 ARMCX4\_mouse EVKKEAMTQTKAEARTLAEKETEINRVTVIQSEVLAVTKEVVKIGTMNETGVVAEAMIRP 240  
 Armcx4\_rattus EVKKEAMTQTKAEHTLDEKETEINRVTVIQSEVLAVTKEVVKIGSMNETGIVAEATMRS 240  
 \* .:\*:\*\*\*\*\*: \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* .\*\* :\*\*:\*: \*:\*\*:\* \* : \*

241 **MOTIF F** 281

Armcx4\_human LEETVSVAKTQSEARPGATVDARGNPNMGSRVAVGVDKMSCAQSQAVTKIQGDDMPGTGV 298  
 ARMCX4\_mouse LEETVSVIRIQSEARLDAAVDTKENLNDMSVVTGVDTKSCAQSQAVAIIQNDMAGAEA 300  
 Armcx4\_rattus LEETLAVPRIQSEARLDATVATKENPNDSLVAAGVDKMSYAAQSQAVTIVKNDDMAGAET 300  
 \*\*\*\*\*: \* \*\*\*\*\* .\*\* : \* \* . \* \*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\* : : \* \* \* \* : .

Armcx4\_human EDMGNCKTMSRAESGADTRASAQPQIFAKTQTEAIPGAKIDAGGNTNAMCKVAGADVRA 358  
 ARMCX4\_mouse D-KEDLKNMSKAGSGIDMKVPGQPHIAANNLAEAVPGAKNDAWDNAKDICEAE--ADIRT 357  
 Armcx4\_rattus DNQEDLKNMSKAGSGVDMKASGQPHTAASILAEAVPGAKNDAWDNANDICEAE--TDIRT 358  
 : : \*:\*\*: \* \* \* :. \*\* : \* . :\*\*\*\*\* \*\* .\*\* : :. :\*\*\*:

361 401

Armcx4\_human C-IQPQTVAKKQAEVTSGARVDGRGNTNVISKAITGADMRAAAQPPQAVASTHAEAMSDAK 417  
 ARMCX4\_mouse CLIQSETVAKIETEATSSATMDGGKDANA--KAMTDVN-VTDTQPQAVTSDQTEAMPDAK 414  
 Armcx4\_rattus CIIQPETVAKIEAEATSGAMMDGGEAAV--KAMTDAD-VTDTQPQVTSQTEAMPDAK 415  
 \* \*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* .\*\*\*\*\* : : \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

433 473

Armcx4\_human VKNRGNPNAMTKAGAKANLRANSQVEALPDARDKSRGNPNVMAKVG DGT DMLSCTQPQLV 477  
 ARMCX4\_mouse VKGKGNASAMAKAGAKANTKTSSQTDALPDAGDKNRS DNNVTAKAETGIDMVSCTQTEPV 474  
 Armcx4\_rattus VKGKGNASALAKAGAKANTKTNLQTDALSDPGDKNRS DNNVMAKAE TGI DMVSPTQTEPV 475  
 \* .\*\* .\*\*\*\*\* \*\* : : \*

509

Armcx4\_human ASVQADTILSDGKIKVRGNVNTMPKEGAGVDMIAQGMASQSGEALPNTRGKARGKAKAKCK 537  
 ARMCX4\_mouse AKDNANT-----TSKE-----GAQATGQSQGEALPNTKGKARGKAKAKCK 514  
 Armcx4\_rattus AKDNANT-----TSKE-----GAQATAQSQGEALPNTKGKARGKAKAKCK 515  
 \* .\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

549 589

Armxc4\_human TGPGMDMKTCTQPQAGVKTPAEALLDSRVDGRGNPNATSKAGTKADQRVCGQPLVVANPQ 597  
 ARM CX4\_mouse AAAGTDTKTCAQPQAGTKTQAEALSDSKVDSKSDSNGVSKAGAKADQKASGQPQPVANCQ 574  
 Armxc4\_rattus AAAGTDTKTCAQPQAGTK--AEALSDSKVDSKSDSNAVSKAGAKADQKACGQPQPVVNCQ 573  
 :. \* \* \* \* :\*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . \* \* \* \* :\*\*\*\*\*:..\*\* \* \* \*

629

Armxc4\_human GEALPGAKNKVKGPNHTVLKVGAGEGTTDSAQPEAVVSFQGEALLGKKNVKGNPNVVLK 657  
 ARM CX4\_mouse NEALPGTKNKVKGNPNPTPKTEAGTATTSS----- 604  
 Armxc4\_rattus NEVLPGTKNKVKGNPNPMPKTEAGTAPTSS----- 603  
 .\*.\*\*\*:\*\*\*\*\*: \* . \* \* . \* \*

669 709

Armxc4\_human AEVGEGAMGTAQLQIMASSKGEALLDSKNKVKGNSNAVSKAGAGTDTTGSVQPQIVANSQ 717  
 ARM CX4\_mouse -----AQTNV-TSSQ 613  
 Armxc4\_rattus -----AQTNVVSSSQ 613  
 . \* : : . \* \*

749

Armxc4\_human GEVLPGAKNKIRGNPTTVPNSGVGPYTTDSARLQAVANSQGEVLPGAKNKVKANLNAVSK 777  
 ARM CX4\_mouse GETTPGAKNKAKGNRNSVPKAGAGPDTTGSAQSQTVANSHSEALPGAKNKVKSNVVPK 673  
 Armxc4\_rattus GETTPGAKNKAKGNRNSVPKAGAGPDTTGSAQSQTVASSHSEALPGAKNKVKSNPN-VPK 672  
 \*\* . \* \* \* \* : \* \* : \* \* : \*

789 829

Armxc4\_human AEAGMGATGVSQPQAVANSHCETLPGAKNKVRGNWNAVSKAGAGMDTRGSAQPQAVANSQ 837  
 ARM CX4\_mouse AEAGVGAC---PQSVPASQGTALTGTKTQKVKGNSSAVSKPDAGAGTMGSAHAKTAANSQ 729  
 Armxc4\_rattus AEAGVGAC---PQSVAAASQGIALTGTKTQKVKGNSSAVSKQDTGAGTMGSAHAKAVANSQ 728  
 \* \* \* \* : \*

869

Armxc4\_human GEVLPGAKNKVKGPNVVSFKAGAREDTVGSIQPQVLASSQRETLPGARNKVKGNSNVVSK 897  
 ARM CX4\_mouse GETLPGSKNKVKGNSNAVPIAEAGAGTTEPMQ----- 761  
 Armxc4\_rattus GETLPGSKNKVKGNSNAVPIAEAGAGTTDCIQ----- 760  
 \*\* . \*

909 949

Armxc4\_human AGAREDTMGSAQPQVVANSQRETLPGARNKVKGNSNAISKAEAGAGIMGSVQVQVASFQ 957  
 ARM CX4\_mouse -----PQAEALLGARNKVKGNSNSVPKAESGAST---ILALASSQ 798  
 Armxc4\_rattus -----PQAEALLGARNKARGNSSVPKAESGAST---ILALASSQ 797  
 \*

989

Armxc4\_human GEVLPGAKNKVRGNSNAVPKAEAGADTVGSAQPQAVANSQSETLLGARNKVKGNTIAVPK 1017  
 ARM CX4\_mouse AEALLGARNKVRGSSNAAPKAEAGVGARGSAQSQAVVSSQNEALLGARNKIRSNAG--TK 856  
 Armxc4\_rattus AEALLGARNKVRGSSNATPKAEAGVGRGCAQSQAVVSSQNETLLGARNKIRSNAG--TK 855  
 \*

1029

Armxc4\_human AGTGAGTRHSAQPQIVAGSQGETLPGARDKSMSTSEAEATAEDEAYAKPEAEAMPTSESE 1077  
 ARM CX4\_mouse SGARTGTRGSAQPQAVVSSQNEALLGARDKGLSSSQVEATGDNRVYAKPMVGAVPASEMV 916  
 Armxc4\_rattus SGARTGTRSSAQPQAVVSSQNETLLGARDKGLSSSQVEATAONRIYAKPMVAAPTSEMV 915  
 : \* : \*

1131

Armxc4\_human GSGTQACRKTQPNIHYYWNGIGVEDWIAAERWIKFRFQTMGDWENSVSWAEDENEAS 1137  
 ARM CX4\_mouse T-----VAGAQPNVHDYYWNGIGVEDWIAAERWIKFRFQTI DG DWENSVSWEDESGAT 970  
 Armxc4\_rattus T-----VAGTQPNIHYYWNGIGVEDWIAAERWIKFRFQTI DG DWENSVSWEEDSGAS 969  
 : \*

1170

Armxc4\_human IGSWSGA-SDKAGIIRSWAVACDETSVKSWAGARAENNVGIGTWARAGEQASGGLWAGGQ 1196  
 ARM CX4\_mouse IGPWTGAANDKAGLVSSWAVACDESSIKSWTGARPENEVALGSWVSAGDQATGAIWAGAQ 1030  
 Armxc4\_rattus IGPWSGA-NDKAGVVSSWAVACDETSIKSWTGARTDNEVALGSWVGAGDQASGALWAGAQ 1028  
 \*

**B. GASP motifs**

```

                                1214                                1256
Armxcx4_human    TSEGTWAGDKASGGAWTGAENQASGGSWALAGNQAIIGELWAAGQASDGSWPGGQASGVSW 1256
ARMCX4_mouse     TTDGTWVADKASAGSWTGAENQISAGSWVVSNGNQAIAGPWAVSQVTDGSWPAVQASGVSW 1090 6
Armxcx4_rattus   TSEGTWVGDKATAASWTGAENQITAGSWVVSNGNQAIAGPWAVSQVSDGSWPTVQASGVSW 1088 0
*:***.***:..** ***** :.***.:.*****. **..*:.***** ***** 8

                                1303 MOTIF F
Armxcx4_human    VGEFAIGGSWTGAENQASEGSSWAGAGAGNMSSVSYWAGVVDQAGGSSWAGTSDQSGGSK 1316
ARMCX4_mouse     VVDQA-TGTWVAENQITGAVSWAG--AGNIVSIGYWTGAVDQTNAVSWTGTTDQVGVVEVK 1147 6
Armxcx4_rattus   VVDQA-TGTWVAENQITGAVSWAG--AGNIVSIGYWTGAVDQTNAVSWTGTSDQVGGEAK 1145 7
* ::* *:* ** *:* ** *:* ** *:* ** *:* ** *:* ** *:* ** * 5

                                1328                                1352                                1376
Armxcx4_human    PRFEDQASGEGSWAGAGGQASGGSM LGPEDQSSGRSWADTADQASGGSR LGHVDQSSGGA 1376
ARMCX4_mouse     PRFEDQASEKGSWVAVGAVQTSGETRLGSEDQSSGRSWTETVDQANAASRLGTVDQAGGTS 1207 6
Armxcx4_rattus   PRFEDQASEKGSWTV--VQTSGETSRLGSEDQSSGRSWTEAVDQTSAAASRLGTVDPAAGTS 1203 7
***** :** .*** : ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * . * 3

Armxcx4_human    WAGTL-----DQSGGSKPRFENQITTEEG 1400
ARMCX4_mouse     WAGTGDQVGGVSTSGSADQSSSGSWAGTRNLAGERSWIGTGDQSDGAAKPFFENQITSEEG 1267 0
Armxcx4_rattus   WVGIGDQTVGGSTSGSAEQSGSGSWAGTRNLAGERSWIGTGDQPDGATKPSFENQITSEEG 1263 7
* ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * 3

                                1401                                1425                                1449
Armxcx4_human    SWAGAGGQAGGSKVGPEDQSSGRSWANSGDQISGGFLVGVLDQANGGSWTIGAGHPASVG 1460
ARMCX4_mouse     SWAGTIGQPSGGSKSVSEASQAGRSWADSADQLSGGFLVGPLDQANGESQPVSGELAA-- 1325 0
Armxcx4_rattus   SWTGTIGQPSGGSKSVSEDSAAARSWTDSGDQLSGGFLVGPLDQASSESQPVSGEMAA-- 1321 5
**** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * 1

                                1474                                1498
Armxcx4_human    PKPIFEDQVSGRGSWADAREQVVGDSRLGLRDQSSGDSWAGTGDQASGWFCVCPGSQIN- 1519
ARMCX4_mouse     ---SGVDQTSGGGCTWIGSGDQSGGESRLGPRDQSSNGESWPGTGDQIGGWYCTYTGQTIG 1382 9
Armxcx4_rattus   ---SGVDQTSGGGCTWIGSGDQSGGESRLGPRDQSSNGESWPGTGDQISGWYCTYTGQTIG 1378 2
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * 8

                                1522                                1560
Armxcx4_human    GGSWGGASGQDVGGSRPGPTNQSSAGSWDPSGQVSGSCWTIGAGAVDQAGGCSKPGFEDQ 1579
ARMCX4_mouse     GGPWVGVSQDVGGPKPVHMQATGGAWLGTGTQVSAVSWTIG----DQVGGCSKPGFEDQ 1438 9
Armxcx4_rattus   GGSWVGPGAQDVGGSKPVHMQTSGGAWLGTGTQVSAVSWTIG----DQVGGCPKPGFEDQ 1434 8
** * * . ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * 4

                                1585                                1610                                1634
Armxcx4_human    AIGGGFWPGAGDQTGGSRPGS-EDQSSGIGSWGVAGGQVLGGARPGPADQSSGGSWAGT 1638
ARMCX4_mouse     AIGGGFWAGAGDQTTGGSRPAVSEDQSSGGVSWGGAGGHVIGGSR---TDQSSGTISWPGM 1495 8
Armxcx4_rattus   TIIGGGFWAGAGDQTTGGSRPAVSEDQSSAGVSWGGTGAHVIGGS---TDQSSGGSWPGM 1490 5
:***** ***** ***** . ***** . ** * :.***: :***** ** * 0

                                1662
Armxcx4_human    GNQSSGRSWIGPGDQAVDCSKPEFEDQACGGSWAGAGSQAAGESWAGSRPGNEAIGGSR 1698
ARMCX4_mouse     GSQVSGGSWIGSVDQTSIGCTKSGFEDQTCAGGSWVGTGEQTSIGISWPGSRASNEASGGSR 1555 8
Armxcx4_rattus   GNQVSGGSWIGPVDQTSIGCTKSGFEDQSCGGSWAGAGDQTSIGESWPGSRASNEASGGSR 1550 5
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * 0

                                1700                                1736
Armxcx4_human    MSEDQATGGSWARSEDQASGRFQVSEFEVEANEGFWFGPGAFAVIGSWCWTEEKADIVSR 1758
ARMCX4_mouse     LDPQDQASGGSWIRSEDQASGRFLVSAEVEANEGFWFGPGSEAFIGSWCWTEEAT-IIPV 1614 8
Armxcx4_rattus   LDSQDQAGGGSWIRSEDQASGRFLVSAEVEANEGFWFGPGSEAFIGSWCWTEEAT-IIPV 1609 4
: :*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * 9
: . :*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * : * 9

```



2164 A. ARMADILLO-Like repeats

Armxc4_human	LIRHLTITSEYQHMTNYISEFLRLLTVGSGETKDHVLGMLLNFSKNPSMTKDLLIANAP	2206
ARMCX4_mouse	LIKHLTITSEYQHMTNYISEFLRLLALGSGETKDHVLGMLVNFNPSMTRDLLIANAP	2272
Armxc4_rattus	LIRHLTITSEYQHMTNYISEFLRLLALGSGETKDHVLGMLVNFNPSMTRDLLIANAP	2260
	*****	
Armxc4_human	TSLINIFSKKETKENILNALSLENINYHFKRRAKAFTQDKFSKNSLYFLFQRPKACAKK	2266
ARMCX4_mouse	TALINIFSKKETKENILNALLLFENINRHFKKRGKTYPQDRFSKISLYFLFQRPKACAKK	2332
Armxc4_rattus	TALINIFSKKETKENILNALLLFENINHHFKKKRGKTYPQDRFSKISLYFLFQRPKACAKK	2320
	*.*****	
Armxc4_human	LRALAAECNDPEVKERVELLISKL	2290
ARMCX4_mouse	LRALAADCSDPEVKERVEVLINKL	2356
Armxc4_rattus	LRALAADCSDPEVKEKVEVLINKL	2344
	*****;.*****;.*****;.*****;.*****	

# Figure

ARMCX5_human	MVDSGTEARARGKAEAGLQDGISGPATARVNGKTQAEAVAEAEELKTESVTQAKAGDGAMT	60
ARMCX5_mouse	MIGSKTKRKAREESGASSKPGTNSPANAKGKAKNQTTKAVKAEPKEEWGNQAEARDEAVA	60
ARMCX5_rat	MIGSKTKKKAREESGSPSPKPGTNSPANAKGKGGQTNKGGKAEPKVEWGNQAEARDGAVA	60
	*.:* *: **: : . : * ..**.*: :.* *: : ** * * .***: * * **:	
ARMCX5_human	RTHTVITYREAMAVTREVIKVEDTTKTRVMVETKTPLAERSIVPQTKSKAMPMSRVSTVT	120
ARMCX5_mouse	RTQPAISTEPKTVTWKVKKKDKTNARVMAQAKTELPAGPALVPHTKSDALPTSVVITVT	120
ARMCX5_rat	RTQPVVTEPKTVTWKVKKKDKTNRVTAQAKTELLAEPALVPHTKSDALPPSVLITVT	120
	**.: . * **: * * :*.:*** :.***: * :***:***.*: * * : **	
ARMCX5_human	KSEVKVVAVIEANIRSYAKSHDKANTGSRPD-----	151
ARMCX5_mouse	KSEVKIDTGIASLKGAAKATDKRSIKQKPEIKKEVCVKS RAGDKAKEVCVKSSAGDKAK	180
ARMCX5_rat	KSEVKVDTGGEPSVKGSAKANDKHSIKHKSEIKKEVCVRSRAGDKA-----	166
	*****: : * :... ** : * . : : 163 <b>B. GASP motifs</b> 178	
ARMCX5_human	-----RREETSIGMKSSDEDEENICSWFWTGEEPSVGSWFWPEEE	191
ARMCX5_mouse	EVCVKSRAGDKAKEVCVKSRAGDKASIVINTTDEDEDYVCSWFWTGEEPSVGSWFWPEE	240
ARMCX5_rat	-----SNVNTTDEDEDYVCSWFWTGEEPSVGSWFWPEE	201
	* .: : .***: .*****:*****:*****:***	
ARMCX5_human	TSIQVYKPLPKIQEKPKPTHKPTLTIKQKVIASRRARYIVLVPVPEGGEQSLPPEGNWTLV	251
ARMCX5_mouse	NPIQVYQPPPKEVEEPPEPDTFDYALKKKA AAWLGRFIVLVPVIEEPQPSLPDGNWTLV	300
ARMCX5_rat	NSIQAYQPPPKEVEEPPEPDTDFDALKKKA AAWLGRFIVLVPVIEEPQPSLPPEGNWTLV	261
	. **.*:* **:***:***: .. :.***: . ** *.*:*****: * : *****:*****	
ARMCX5_human	ETLIETPLGIRPLTKIPPYHGPPYQTLAEIKKQIRQREKYGNPKACHCKSRGFSLEPHE	311
ARMCX5_mouse	ATLIETPLGIRPLTKIPPYGGPYFQTLADLNQIREKEKYGNPNTRCCKSRTFSLEPVD	360
ARMCX5_rat	ATLIETPLGIRPLTKIPPYGGPYFQTLADLNQIREKEKYGNPKTRCCKSRTFSLEPVE	321
	*****:*****:***:*****:***:*****:***:***** ***** :	
<b>A. Armadillo-like repeats</b>		
ARMCX5_human	FDKLVALKLTKDPFIHEIATMIMGISPAYPFTQDIHDVGITVMIENFVNNPNVKEHPG	371
ARMCX5_mouse	FDKLVALKLTTRDPFIHEIATMIMGISPAYPFTQDIVHDVGITVMIENFVNNPNAKKYPR	420
ARMCX5_rat	FDKLVALKLTTRDPFIHEIATMIMGISPAYPFTQDIVHDVGITVLIENFVNNPNAKKYPR	381
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***:***	
<b>A. Armadillo-like repeats</b>		
ARMCX5_human	ALSMVDDSSSESSEEPKSGESYIHQVCKGIISCP LN SPVQLAGLKLGLHLSIKFEDHYVIT	431
ARMCX5_mouse	TLNINAN-PDAPEEVKETEAHVNKVC RDILCCPLNCSVQVEELKLLVSLSVKFDYHHVVI	479
ARMCX5_rat	NLNLAN-PDAPEEVRETEAHVNKVC RDILSCPLNCSVQVEELKLLVSLSVKFDYHHVVI	440
	*.: : : ** : . * :*****:*.***. * : ***** * :***: * :***:	
ARMCX5_human	SYIPDFLTLNKGSVKTKFYVLKVF SCLSKNHANTRELISAKVLSLVAPFNKNESKANI	491
ARMCX5_mouse	YYVRYFISLLNKGSVKIKFQILRVLLCLSKNQANTRELISAEMSSLVALFHKNESKANI	539
ARMCX5_rat	YYVRYFISLLNKGSVKIKFQILRVILCLSKNQANTRELISAEMSSLVAHFHKNESKANI	500
	*: *.:***** * * :*:* : *****:*****:***:***** * :*****	
ARMCX5_human	LNIIIEIFENINFQFKTKAKLFTKEKFTKSELISIFQEAQFGQKLQDLAHS DPVDRDKV	551
ARMCX5_mouse	LHIIIEIFENINFQFKKRAKLTKEKFTKSELISIFREAKEFDQKLQDLTDHS DPVDRDKV	599
ARMCX5_rat	LHIIIEIFENINFQFKKRAKLTKEKFTKSELISIFREAKEFDQKLQDLTDHS DPVDRDKV	560
	*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
ARMCX5_human	IRLILKL	558
ARMCX5_mouse	IRLILKL	606
ARMCX5_rat	IRLILKL	567
	*****	

# Objectifs du travail de thèse

Pour pouvoir envisager DOR comme nouvelle cible thérapeutique dans un traitement de la douleur chronique, il semble important de comprendre les mécanismes adaptatifs qui adviennent lors d'une stimulation répétée.

Plusieurs pistes sont explorées, avec le recrutement des arrestines et l'importance de la dégradation dans le développement de la tolérance analgésique. Plusieurs protéines impliquées dans l'adressage vers le lysosome sont décrites comme étant associées à DOR, dont GPRASP1. Des études *in vitro* ont montré qu'elle participait à la dégradation de DOR suite à son internalisation.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'explorer le rôle de GPRASP1, aussi bien au niveau moléculaire que comportemental, dans le développement de la tolérance analgésique aux agonistes du récepteur delta opioïde. Les travaux portent principalement sur l'effet du SNC80, particulièrement connu pour engendrer une tolérance analgésique et une forte dégradation du récepteur.

Pour pouvoir réaliser les expériences de biochimie dans des animaux déficients pour GPRASP1, nous avons tout d'abord croisé la lignée KO-GPRASP1 avec les animaux Knock in DOR-eGFP, de sorte à obtenir une nouvelle lignée double mutante DOR-eGFP/KO-GPRASP1.

Les résultats obtenus sur l'étude de la réponse au SNC80 feront l'objet d'un article, en préparation. Des analyses de spectrométrie de masse viendront le compléter avant soumission.

Les travaux réalisés durant la thèse ont également exploré le développement de la tolérance analgésique et de la dégradation du récepteur suite à l'administration de l'agoniste biaisé pour le recrutement des  $\beta$ -arrestines, le ARM390. N'ayant pas observé de mécanismes adaptatifs ni d'impact de GPRASP1 sur la réponse à cet agoniste, nous n'avons pas exploré aussi loin ce pan du projet.





# Résultats



## I. Partie 1 : Les mises au point expérimentales

Pour pouvoir réaliser les travaux qui vous sont présentés dans les parties 2 et 3, il a été nécessaire de réaliser quelques mises au point expérimentales préalablement. Les expériences de biochimies. L'ajout d'une GFP sur DOR permet une détection du récepteur par des anticorps, cependant il reste peu exprimé dans le système nerveux, et sa détection dans de petites structures comme la moelle épinière et les ganglions rachidiens dorsaux a nécessité une optimisation de protocole. L'analyse de l'interactome du récepteur dans le cerveau requiert une co-immunoprécipitation préalable, qui a elle aussi nécessité de peaufiner la méthode employée couramment pour les lysats cellulaires et de s'assurer que nous parvenions à avoir des résultats aussi propres que nos collaborateurs.

### A. Évaluation des méthodes de lyse par Bioprep et par ultra Turrax

#### 1) Enjeux de la mise au point de la lyse des tissus murins

Au laboratoire, la méthode de lyse utilisée traditionnellement pour réaliser des préparations de membranes d'organes était basée sur un broyage à l'**ultra Turrax** (IKA<sup>TM</sup> Ultra Turrax DI18 Dispersor, Taquara, Brésil).

Cela nécessitait de **décongeler** préalablement les organes, de les traiter **un à un** (plusieurs minutes par échantillon au total) avec un risque de manque de **répétabilité** de la qualité de la lyse et de réaliser un lavage soigneux entre chaque échantillon afin de limiter les **contaminations** entre échantillons. Pour les préparations de membranes, aucun inhibiteur de protéase n'est mis dans la solution, le risque de dégradation des protéines est donc accru avec le temps de préparation de l'échantillon.

La mise au point de broyage par un homogénéiseur à billes réfrigéré (Bioprep-24R Allsheng, Hangzhou, Chine) a donc semblé une optimisation intéressante pour **limiter la variabilité** de lyse, les risques de contaminations entre les échantillons et accélérer l'expérience, diminuant ainsi les risques de dégradation de l'échantillon.

L'homogénéiseur bioprep-24R permet d'utiliser aussi bien des tubes de 2mL que des tubes de 5mL, permettant d'ajuster le volume au type d'échantillon à lyser, avec une agitation allant jusqu'à 4200 rpm dans une enceinte réfrigérée à 4°C.

Il existe également de nombreuses billes, variant en composition (verre, céramique ou métal) et en taille (de 0,2 à 6mm), de sorte à pouvoir adapter leurs propriétés au type d'organe à lyser.

Cet appareil permet également de réaliser des cycles multiples, d'une durée et d'une vitesse variable.

J'ai donc mis au point des conditions de lyses adaptées spécifiquement au cerveau, la moëlle épinière et aux ganglions rachidiens dorsaux en jouant sur tous ces paramètres.

## 2) Paramètres évalués pour la lyse des tissus

Les modalités différentes qui ont été testées pour le broyage des différents organes vous sont présentées dans les tableaux suivants :

**Tableau 12** Paramètres évalués lors de la mise au point de la lyse par bioprep-24R sur cerveau

Paramètres ayant été modifiés	Paramétra ge 1	Paramétra ge 2	Paramétra ge 3	Paramétra ge 4	Caractère critique de ce paramètre
Taille de tube	2mL	5mL			Tubes 2mL petits pour un cerveau, besoin de le couper en 2 donc décongeler
Volume de tampon	0,5mL	1mL	1,5mL	3mL	1,5mL ne laisse pas beaucoup de surnageant après centrifugation
Réfrigération à 4°C	Non	Oui			Limite les dégradations protéiques dans les tampons sans inhibiteurs de protéases
État de l'organe	Décongelé	Congelé			Si congelé : casse plus facilement face aux billes froides. Besoin de plus d'une minute de lyse si décongelé
Billes utilisées	1,4mm céramique	3mm			1,4mm donnent une meilleure lyse que 3mm
Quantité de billes utilisées	5 Insuffisant	10 Bien	15 Bien	20 Bien	5 un peu insuffisant, mais à partir de 10 billes, lyse sans laisser de morceaux

<b>Nombre de cycle</b>	2	1	2		2 courts pour limiter l'échauffement
<b>Temps de cycle (s)</b>	40	10	15	12	
<b>Temps de pause (s)</b>	Non	5			
<b>Cycle additionnel du culot</b>	Non	Oui			Lyse du culot permet d'extraire une plus grande quantité de protéines
<b>Vitesse de l'agitation</b>	3500	4260 (max)			Nécessaire d'être à 4200 pour obtenir un broyage complet des tissus
<b>Quantité moyenne de protéines obtenue par organe</b>	20 à 30mg	10mg de membranes			Rendements protéiques au moins équivalents à l'ultraturax
<b>Paramètres ayant été modifiés</b>	<b>Paramétrage 1</b>	<b>Paramétrage 2</b>	<b>Paramétrage 3</b>	<b>Paramétrage 4</b>	<b>Caractère critique de ce paramètre</b>
<b>Détergents pendant le broyage</b>	Non	Oui			Non pour les préparations de membranes, oui pour les co-immunoprécipitations
<b>Type de billes GFP trap</b>	Magnétiques chromotek	Magnétiques miltenyi	Agarose chromotek		Selon objectif de l'expérience
<b>Quantité de billes GFP trap pour quantité de protéines</b>	10	20	30	40	40µL pour 10mg
<b>Temps d'hybridation</b>	ON	45min	1h	1h30	
<b>Appareil de broyage</b>	Ultra turrax	Dounce	Bioprep		

En rouge : conditions retenues pour les expériences suivantes.

L'utilisation de zones cérébrales enrichies en DOR a également été tentée, bulbes olfactifs et striatums, sans donner une augmentation du ratio de DOR/protéine interagissante obtenue pour une quantité de mg de protéines similaire.

**Tableau 13** Paramètres évalués lors de la mise au point de la lyse par Bioprep® sur moëlle épinière.

Paramètres ayant été modifiés	Paramétrage 1	Paramétrage 2	Paramétrage 3	Paramétrage 4
<b>Taille de tube</b>	2mL	1,5mL		
<b>Volume de tampon</b>	350	450	500	750
<b>Réfrigération à 4°C</b>	Non	Oui		
<b>État de l'organe</b>	Décongelé	Congelé		
<b>Billes utilisées</b>				
	1,4mm céramique			
<b>Quantité de billes utilisées</b>	5 Bien	10 Bien		
<b>Nombre de cycle</b>	2	1		
<b>Temps de cycle (s)</b>	10	12	15	
<b>Temps de pause (s)</b>	Non	5		
<b>Cycle additionnel du culot</b>	Non	Oui		
<b>Vitesse de l'agitation</b>	4260 (max)			
<b>Quantité moyenne de protéines obtenue par organe</b>	20 à 30mg	10mg de membranes		
<b>Détergents pendant le broyage</b>	Non	Oui		
<b>Type de billes GFP trap</b>	Magnétiques Chromotek			
<b>Quantité de billes GFP trap pour quantité de protéines</b>	5	10	20	
<b>Temps d'hybridation</b>	ON	45min	1h	1h30
<b>Composition du tampon :</b>				
<b>Base</b>	HEPES	Tris HCl		
<b>NaCl</b>	150mM	500mM		
<b>Détergents</b>	coIP	RIPA		
	Après le broyage	Pendant le broyage		
<b>Inhibiteurs</b>	Protéases			
<b>pH</b>	7,4			

En rouge : conditions retenues pour les expériences suivantes.

**Tableau 14** Paramètres évalués lors de la mise au point de la lyse par bioprep-24R sur ganglions rachidiens dorsaux.

Paramètres ayant été modifiés	Paramétrage 1	Paramétrage 2	Paramétrage 3	Paramétrage 4					
<b>Taille de tube</b>	2mL	1,5mL	1mL						
<b>Volume de tampon</b>	250	300	500	600	750	1000			
<b>Réfrigération à 4°C</b>	Non	Oui							
<b>État de l'organe</b>	Décongelé	Congelé							
<b>Billes utilisées</b>	0,6mm verre	1,4mm céramique							
<b>Quantité de billes utilisées</b>	0,25g	5	10	15					
		Bien	Bien						
<b>Nombre de cycle</b>	2			3			4		
<b>Temps de cycle (s)</b>	10	12	15	15-15-30	30s	20-20-30	15-15-15-30	15	
<b>Temps de pause (s)</b>	5								
<b>Cycle additionnel du culot</b>	Non								
<b>Vitesse de l'agitation</b>	4260 (max)								
<b>Quantité moyenne de protéines obtenue par organe</b>	100-200µg/animal								
<b>Type de billes GFP trap</b>	Magnétiques Chromotek®								
<b>Quantité de billes GFP trap pour quantité de protéines</b>	5	10	20						
<b>Temps d'hybridation</b>	ON	45min	1h	1h30					
<u>Composition du tampon :</u>									
<b>Base</b>	HEPES								
<b>NaCl</b>		500mM							
<b>Détergents</b>		RIPA							
	Après le broyage	Pendant le broyage							
<b>Inhibiteurs</b>	Protéases								
<b>pH</b>	7,4								

Dans l'objectif de réaliser des co-immunoprécipitations de DOR-eGFP et d'avoir une méthode la plus douce possible pour maintenir les complexes protéiques associés à DOR-eGFP, un broyage à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce a également été testé.

### 3) Points critiques à prendre en compte pour le broyage des tissus et l'obtention de l'optimisation de l'échantillon protéique

Pour une lyse avec l'homogénéiseur à billes réfrigéré bioprep, il s'est révélé crucial que l'organe soit encore **congelé** lors du premier cycle. Le tube de lyse et les billes de lyse sont préalablement refroidis à -80°C, le tampon est maintenu à 4°C et les organes ne sont sortis de la carboglace qu'au tout dernier moment, quand on ajoute le tampon juste avant de les placer dans le rotor.

Lorsqu'une qualité de broyage et une quantité de protéines satisfaisantes ont été atteintes, avec un homogénat de consistance comparable aux lyses obtenues par ultra turrax, des préparations de membranes ont été réalisées et comparées par **Western Blot** (DOR-eGFP et GPRASP1 sur 50µg de protéines) ainsi que par mesures de liaison par ligand radiomarqué « **binding** » (courbe de saturation de <sup>3</sup>H-deltorphine II). Nous avons donc pu nous assurer que les récepteurs ainsi concentrés étaient **comparables en quantité et en qualité** à ceux obtenus lors d'un broyage par Ultra Turrax et permettraient de réaliser les mêmes études biochimiques.

**La concentration en sel NaCl** a également dû être prise en compte pour optimiser l'extraction et la concentration de DOR-eGFP par immunoprécipitation. Une meilleure extraction protéique (quantité de protéine obtenue après lyse pour un cerveau ainsi que quantité de DOR retenue lors de l'immunoprécipitation) lorsque la lyse se fait en présence de 500mM NaCl, cependant la qualité des interactions protéiques et de GPRASP1 co-immunoprécipité avec DPR est, elle, inversement proportionnelle à la concentration en sel.

Le **temps d'hybridation** sur les billes GFP-trap pour la concentration de DOR-eGFP a également été comparé, 1h ou overnight (ON), et une plus grande quantité de récepteurs était retenue par une hybridation plus longue, ce qui est plus intéressant dans les conditions où la quantité détectée est faible (moëlle épinière et GRD).

## B. Préparations de membranes de cerveaux

### 1) L'objectif

Un protocole était déjà établi au laboratoire pour extraire les fragments membranaires d'un cerveau. Mon objectif a uniquement été de simplifier et de raccourcir l'étape du broyage, en permettant avec le Bioprep d'homogénéiser jusqu'à 12 cerveaux simultanément pour une meilleure homogénéité, avec moins de risques de contamination. La même sonde n'étant pas



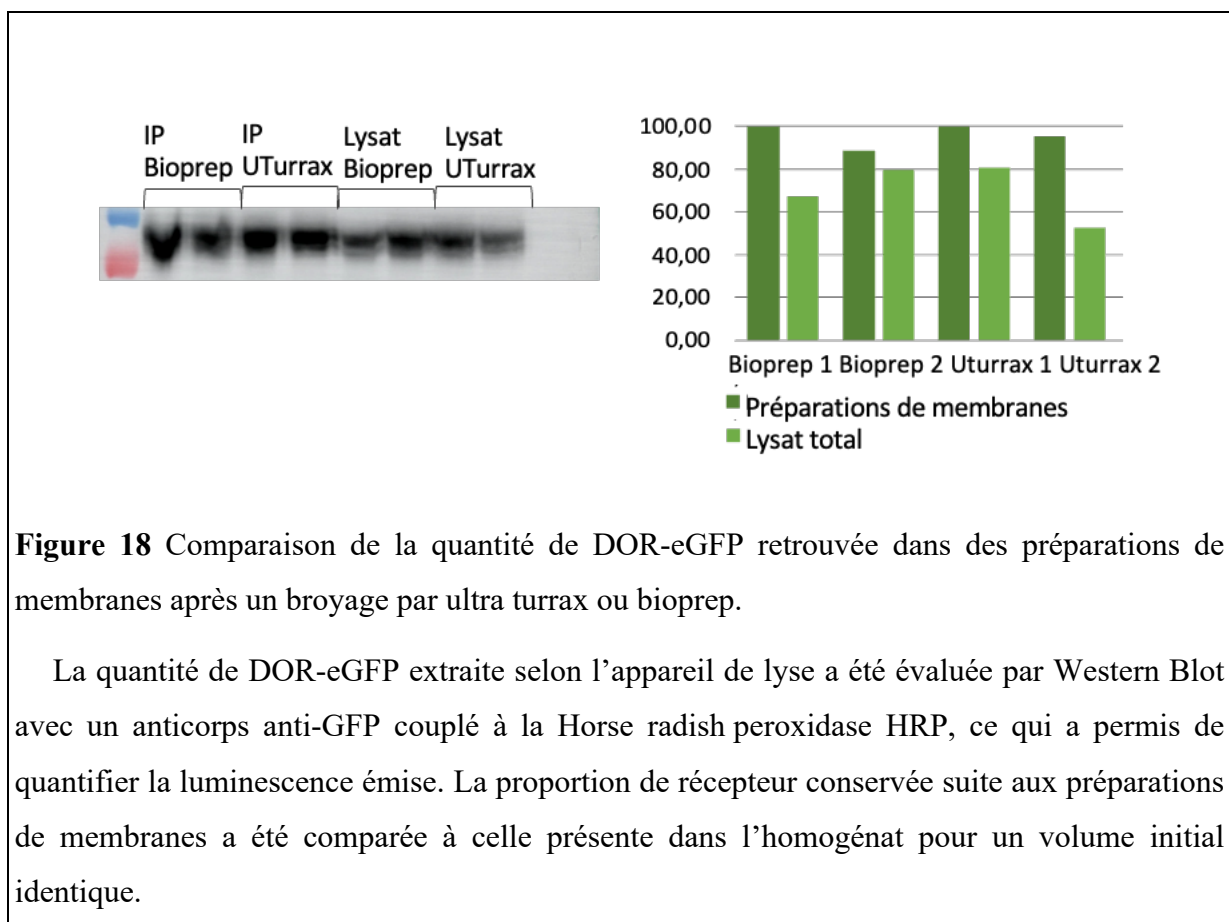
pongée dans tous les échantillons successivement, il y a moins de risques d'erreurs et moins d'étapes de transvasement.

### 2) Composition du tampon de lyse

Le tampon utilisé pour la préparation de membranes de cerveau contient 1mM d'EDTA et 0,25mM de sucrose dans 50mM de Tris HCl pH 7,4.

### 3) Broyage par Bioprep-24R

Le cerveau encore congelé est lysé dans 1,5mL de tampon de lyse avec 10 billes de céramique 1,4mm.



Deux cycles de 15 secondes à 4200rpm sont réalisés, avant une centrifugation à 500g 10min 4°C. Une fois le surnageant prélevé, 1,5mL de tampon sont ajoutés au culot qui est lysé une nouvelle fois à 15sec 4200rpm. L'homogénat obtenu est centrifugé 10min à 1100g. Deux ultracentrifugations successives sont réalisées au lieu d'une seule afin de faire une étape de lavage des membranes dans le but d'éliminer éventuellement des traces de ligand froid résiduelles suite au traitement des animaux. Le dosage protéique est réalisé par la méthode de Bradford avant de congeler les échantillons.

Les quantités protéiques extraites sont similaires (20 à 30 mg de protéines par cerveau) et pour une quantité mise en jeu identique, le nombre de DPM (désintégrations par minutes) de liaison spécifique du ligand radioactif détectant DOR (Bmax d'environ 2000 DPM, soit 150fmol/mg de protéines) ou l'intensité de luminescence obtenus en Western Blot sont comparables (**Figure 18**).

## **C. Immunoprécipitations**

### **1) L'objectif**

Le but de l'immunoprécipitation dans notre contexte est de concentrer DOR dans un petit volume, pour pouvoir en déposer une plus grande quantité en Western Blot. Nous souhaitons être capables d'observer un signal suffisant pour déceler le DOR-eGFP résiduel dans le cas où le récepteur est dégradé suite au traitement par le SNC80. Mais les RCPG sont des protéines faiblement exprimées, c'est pourquoi on trouve peu de DOR dans les extraits protéiques totaux de la partie lombaire de la moëlle épinière (ventrale et dorsale) et dans les GRD. L'immunoprécipitation avec des billes anti-GFP (soit couplées à de l'agarose soit des billes magnétiques) permet de concentrer la totalité des récepteurs présents dans la moëlle lombaire en seulement 30µL qui seront déposés dans un gel d'acrylamide puis révélés par Western blot avec un anticorps dirigé contre la eGFP. Il a même fallu rassembler les 8 GRD lombaires de 2 animaux pour détecter un signal GFP basal de DOR-eGFP dans ces extraits protéiques dans 200 à 400µg de protéines

### **2) Composition du tampon pour l'immunoprécipitation**

Pour les immunoprécipitations, une concentration **de 500mM** en NaCl a été retenue, en présence d'inhibiteurs de protéases.

Le tampon RIPA ( *RadioImmunoPrecipitation Assay*, 1% NP40, 0,25% sodium déoxycholate et 0,1%SDS) permet une meilleure extraction de DOR-eGFP, dans un tampon 20mM HEPES pH7,4 avec des inhibiteurs de protéases.

Les concentrations en détergents présents dans ce tampon nous ont poussés à changer de méthode de dosage protéique car elles atteignaient les limites acceptées par le réactif de Bradford, et à utiliser à la place un dosage BCA (Pierce<sup>TM</sup> BCA protein assay, 23225, Thermo Scientific).

### 3) Extraits de moëlle épinière

#### a) Broyage

Initialement, par crainte de la mousse formée à la suite de l'agitation vigoureuse lors du broyage, celui-ci était réalisé dans un tampon sans détergent. Les dosages des moëlles des souris traitées ou non au SNC80 ont été réalisés dans ces conditions.

Après discussion notre collaborateur, Dr. Philippe Hammann, de la plate-forme de protéomique de Strasbourg-Esplanade, il est apparu que les détergents génèrent certes une grande quantité de mousse, mais qui peut être éliminée par une centrifugation à 12 000g de 10min et que le rendement d'extraction est un peu plus élevé dans les conditions avec détergents durant la lyse. Les moëlles épinières de la cohorte ARM390 ont donc été broyées en présence de détergents.

Le broyage est fait en présence de **5 billes en céramique de 1,4mm, dans 350µL de tampon de lyse.**

Deux cycles de lyse de 12 secondes à 4200RPM, dans un appareil refroidi à 4°C, avec une interruption de 5sec entre les cycles. Si la lyse est réalisée sans détergent, la centrifugation est de 500g pendant 10min. Si la lyse est réalisée directement avec détergents la centrifugation est de 12 000g pendant 10min.

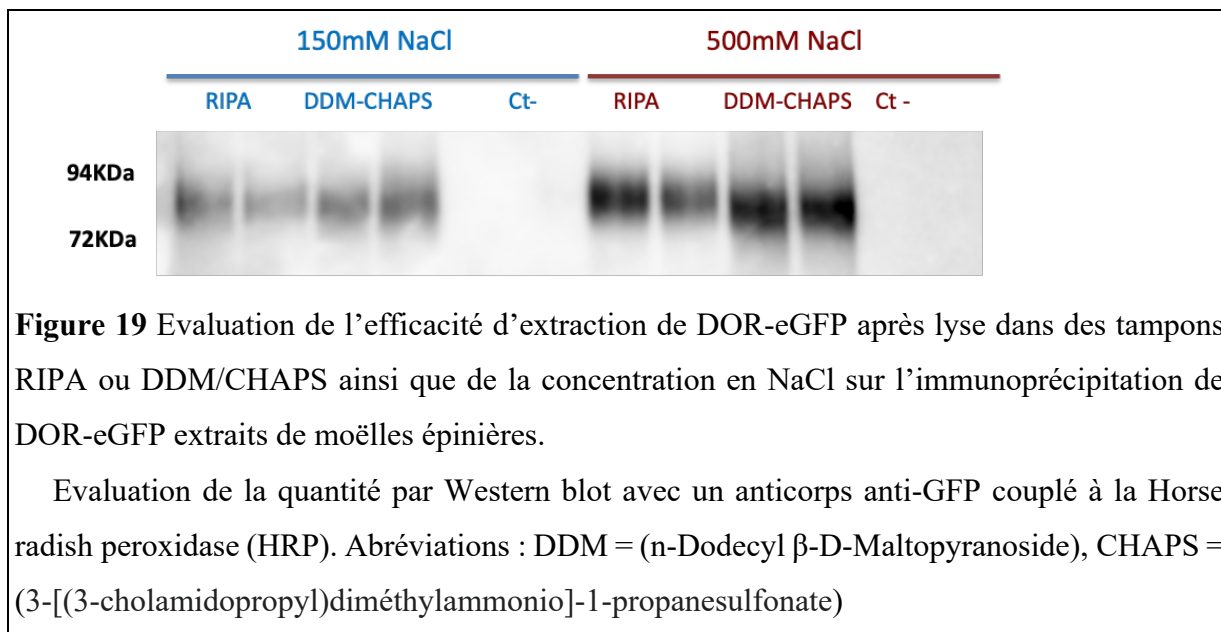
Le surnageant est ensuite prélevé et la quantité de chaque détergent adaptée au volume est ajoutée, avant de compléter tous les échantillons par du tampon de lyse complet, de sorte à avoir un volume de lyse d'1,2mL pour chacun.

La lyse par les détergents est poursuivie sur roue à 4°C durant une heure, puis les éléments non solubilisés sont sédimentés dans le culot à 16 000g durant 15min (4°C).

Un dosage protéique BCA est réalisé sur le surnageant pour déterminer la quantité totale de protéines extraites et ajuster le volume déposé sur les billes GFPtrap® lors de chaque expérience, de sorte à avoir une concentration protéique identique mise en jeu dans chaque IP qui sera ensuite déposée sur un même gel d'acrylamide et révélé sur un même Western blot.

## b) Immunoprécipitation du DOR-eGFP extrait des moëles épinières

Pour leur facilité d'utilisation et un rendement d'« extraction » similaire, nous avons pour ces expériences eu recours aux billes Chromotek magnétiques GFP-trap®, 20µL pour une moëlle, soit 500µg de protéines par échantillon.



## 4) Extraits de ganglions rachidiens dorsaux

### a) Broyage

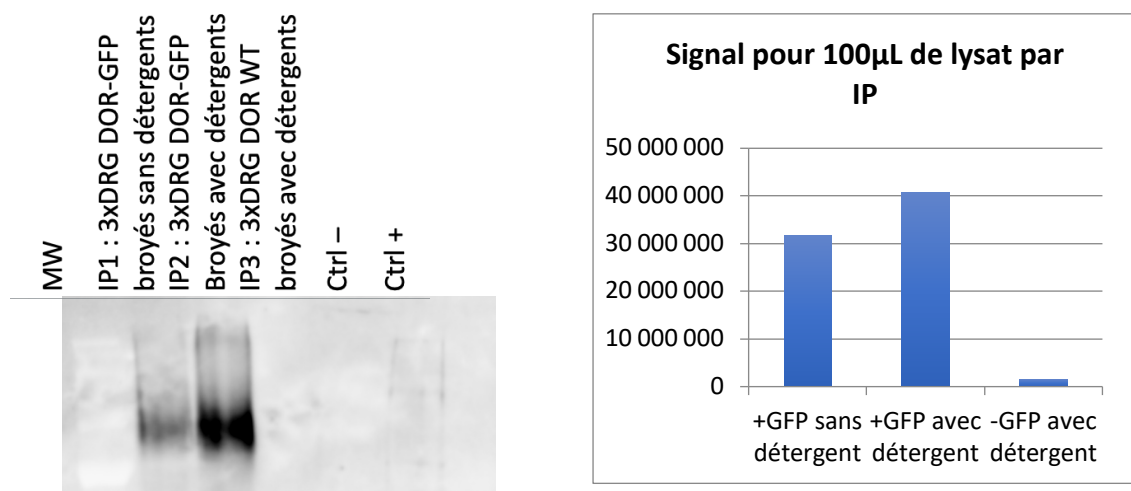
Les ganglions rachidiens dorsaux (GRD) sont composés des corps cellulaires des neurones sensoriels périphériques. Ils sont tous regroupés en une boule et les deux fibres nerveuses en partent en un point. Ils sont prélevés avec le moins de fibres possibles (coupées à environ 1mm du GRD), mais cette structure est donc assez fibreuse, et les billes en céramique de 1,4mm ne parvenaient pas à les casser efficacement. La solution fut d'utiliser des billes de verre de 0,6mm. 250mg de billes additionnées à 350µL de tampon contenant du détergent a permis de ne presque plus avoir de résidus fibreux après deux cycles de broyage.

Par ailleurs, étant très petits (environ 1mm pour un GRD), ils décongèlent très rapidement lorsqu'ils ne sont plus enfouis dans la carboglace. Il était donc particulièrement important d'avoir des tubes et billes de lyse préalablement refroidis et d'ajouter le tampon à la toute dernière seconde.

Une centrifugation de 10min à 12 000g est réalisée sur ces lysats pour éliminer du surnageant qui sera prélevé les tissus non broyés et les billes très fines.

### b) Immunoprécipitation du DOR-eGFP extrait des GRD

Pour obtenir un signal détectable, il faut utiliser les GRD lombaires d'au moins deux animaux homozygotes DOR-eGFP. Cela correspond à environ 300µg de protéines dans un volume de 1000µL. Une quantité normalisée de protéines est mise en contact avec 15µL de billes magnétiques GFP-trap durant une nuit.



**Figure 20** Essai de lyse des ganglions rachidiens dorsaux avec et sans détergents.

Les organes ont été lysés au bioprep-24R avec des billes de verre 0,6mm dans un tampon sans ou avec détergent (RIPA). Le récepteur DOR extrait a été immunoprécipité sur des billes GFP-trap magnétiques puis révélé par Western Blot à l'aide de l'anticorps anti-GFP-HRP. Le signal obtenu a été rapporté à la quantité de lysat utilisée pour l'immunoprécipitation, l'extraction de DOR-eGFP semble plus importante lors d'une lyse en présence de détergent.

## D. Co-immunoprécipitations de DOR-eGFP et des complexes protéiques associés

### 1) L'objectif des co-immunoprécipitations : problématique et différence de l'immunoprécipitation

Les co-immunoprécipitations ont été réalisées dans le but d'isoler le récepteur DOR-eGFP du cerveau avec les protéines partenaires. Il faut donc extraire le récepteur tout en maintenant les liaisons protéines-protéines autant que possible, aussi bien faibles que fortes.

## 2) Conditions évaluées pour visualiser l'interaction DOR-eGFP et GPRASP1 par co-immunoprécipitation révélée par Western Blot

**Tableau 15** Évaluation des paramètres importants pour la co-immunoprécipitation de GPRASP1 avec DOR-eGFP

<u>Conditions de broyage</u>				
<b>Appareil de broyage</b>	Dounce	Ultra turrax	Bioprep	
<b> Tubes bioprep</b>	2mL	5mL		
<b>Volume de tampon</b>	1,5mL + 1,5mL	3mL + 3mL		
<b>Nb billes bioprep</b>	10	15	20	
<u>Composition du tampon</u>				
<b>Tampon</b>	HEPES	TrisHCl		
<b>pH</b>	7,4	7,8		500
<b>NaCl</b>	50	150	300	
<b>Détergents</b>	Triton X100	RIPA	DDM CHAPS	
	Après le broyage	Pendant le broyage		
<b>Additifs</b>	Iodoacétamide	MgCl <sub>2</sub>	Zinc	
<b>Inhibiteurs</b>	Protéases	phosStop®		
<u>Conditions expérimentales</u>				
<b>Préclarification</b>	Non	30min 40µL		
<b>Nombre de lavages</b>	3	5		
<b>Temps d'hybridation des billes</b>	45min	1h	1h30	ON
<b>Concentration de l'anticorps anti-GPRASP pour détection en Western Blot</b>	1/ 10 000	1/ 5 000	1/ 3 000	

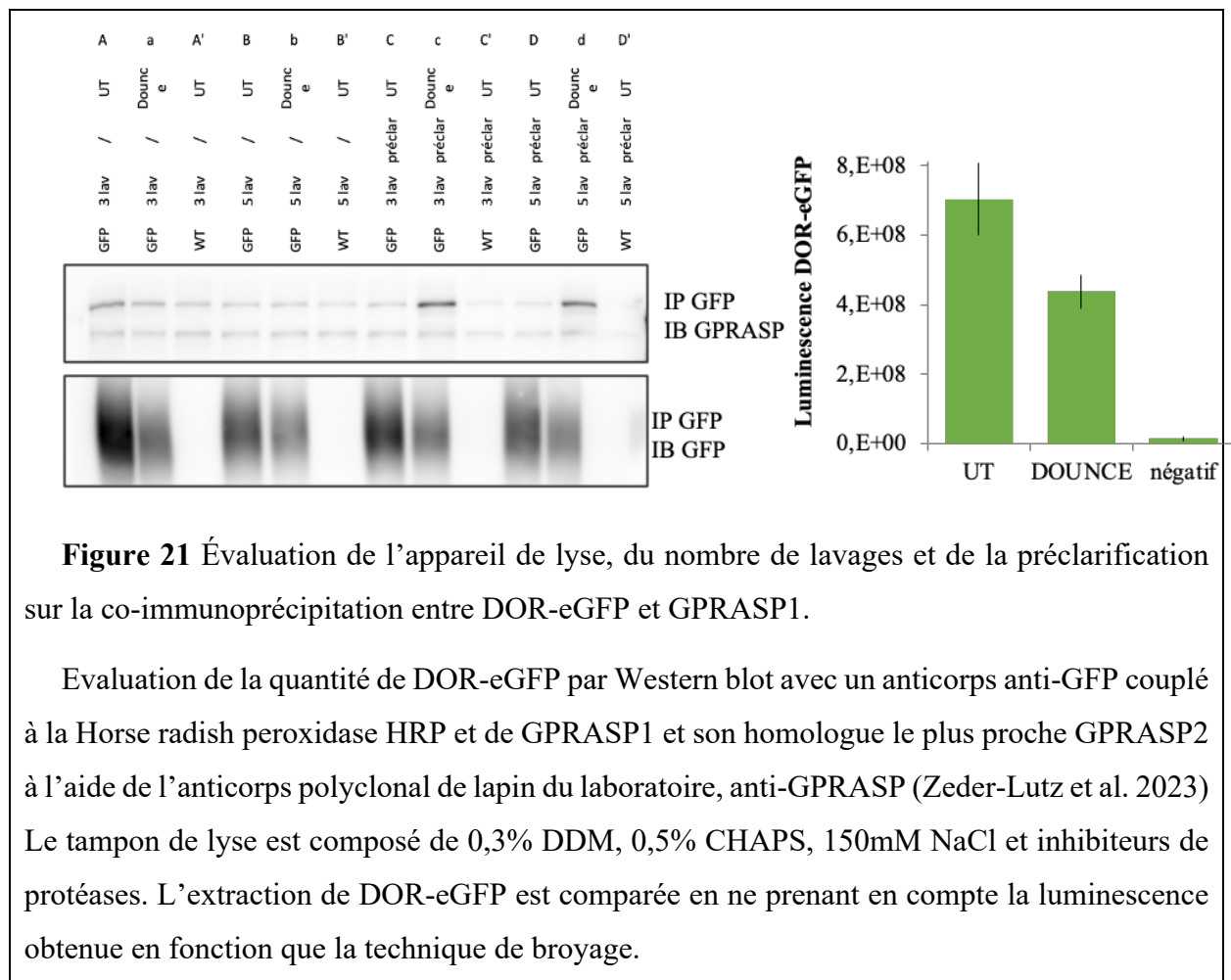
En rouge : conditions retenues pour les expériences suivantes.

## 3) Broyage des tissus murins

Après comparaison des résultats obtenus par lyse avec les homogénéiseurs de tissus Ultra Turrax®, Dounce et Bioprep®, le Dounce a montré une extraction de protéines plus faible, un broyage des tissus bien plus variable et un signal de DOR-eGFP immunoprécipité non amélioré, cette méthode a donc été abandonnée au profit du Bioprep. Le cycle de lyse établi est de 2 fois 15 secondes avec 20 billes de céramique et 3mL de tampon, interrompues par 5 secondes permettant un refroidissement du milieu. L'échantillon est une première fois centrifugé à 12 000g 10 min pour éliminer la mousse de sorte à prélever le surnageant contenant les protéines solubilisées, et le culot est à nouveau broyé 15 secondes avec 3mL de tampon additionnel et

centrifugé de même. Les détergents sont mis dès la lyse du tissu car ils permettent une meilleure extraction protéique.

La lyse est ensuite poursuivie une heure, avant de sédimenter les protéines non solubilisées par 15min de centrifugation à 16 000g. Le dosage protéique est réalisé par la méthode de Bradford.



#### 4) Évaluation de la composition optimale du tampon de lyse pour la co-immunoprécipitation de GPRASP1 avec DOR-eGFP

Des données préliminaires de co-immunoprécipitation de DOR-eGFP et GPRASP1 avaient déjà été établies par nos collaborateurs Dr. D. Massotte et le laboratoire des Dr. P. Marin et F. Vandermoere mais leur protocole expérimental exact était parcellaire. La reproduction de leur résultat a nécessité de nombreux essais. La composition en détergent était connue : 0,5% n-Dodecyl  $\beta$ -D-Maltopyranoside (DDM) et 0,3% 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS). Cette composition a donc été maintenue. Cependant, lors de nos

premières expériences un signal GPRASP1 presque aussi intense était observé également dans les échantillons contrôles négatifs DOR-WT, il a donc fallu optimiser toutes les conditions de co-immunoprécipitation.

Une concentration **de 50mM** en NaCl a été retenue, de même qu'un pH un peu plus basique pour stabiliser les liaisons, soit 50mM pH 7,8. Des **inhibiteurs de protéases et de phosphatases** ont été ajoutés sans perturber les interactions protéiques ni avec l'anti-GFP couplé aux billes agarose du GFP-trap,

De l'**iodoacétamide** 7,5mM s'est révélé essentiel pour détecter l'interaction spécifique de GPRASP1 dans des complexes protéiques avec DOR-eGFP selon le protocole utilisé par Granier et collaborateurs pour l'extraction et la purification du DOR à des fins d'étude structurales (Granier et al., 2012). L'iodoacétamide limite la formation de liaisons aspécifiques avec les cystéines libres.

Bien que l'ajout d'ions ait augmenté la quantité de GPRASP1 et GPRASP2 entraînée dans la co-immunoprécipitation avec DOR-eGFP, le magnésium et le zinc n'ont pas apporté d'amélioration à la spécificité du signal et n'ont donc pas été gardés dans la composition du tampon (la présence de zinc entraîne une interaction aspécifique très forte de GPRASP1 et GPRASP2 dans les protéines co-immunoprécipitant avec DOR-WT ou DOR-eGFP..

## 5) Billes GFP-Trap

Malgré la facilité d'utilisation accrue, il est apparu que les billes GFP-trap® magnétiques Chromotek aussi bien que les Miltenyi microbilles marquées par anti-GFP  $\mu$ MACS® gardaient un signal aspécifique de GPRASP1 et d'actine plus important que celui produit par les billes GFP-trap® agarose de Chromotek, aussi les billes GFP-trap® agarose ont été sélectionnées pour les expériences de co-immunoprécipitations.

Une étape de préclarification par des billes agarose « vides » a également été ajoutée pour diminuer le nombre de protéines présentes dans le milieu capables de s'adsorber sur la surface des billes.

Au cours de l'optimisation, des analyses préalables par spectrométrie de masse ont été réalisées par le Dr. P. Hammann, pour vérifier l'enrichissement de DOR-eGFP dans les co-immunoprécipitations et le nombre et la spécificité des complexes protéiques co-immunoprécipités.



## **6) Co-immunoprécipitation des complexes protéiques avec DOR-eGFP issus d'extraits de cerveau**

Dans une cohorte, chaque cerveau de souris a systématiquement été séparé après la lyse en deux co-immunoprécipitations après l'heure de lyse pour permettre des duplicats d'expérience. Les extractions de protéines donnant systématiquement plus de 20mg de protéine par cerveau, jusqu'à 30mg, 10mg de protéine dans 2,9ml de lysat ont été placés en présence de 40µl de billes GFP-trap® agarose ON à 4°C sur la roue.

## II. Partie 2 : Article. La tolérance analgésique DOR

### A. Introduction, contexte général

Dans les pistes d'amélioration de la prise en charge de la douleur chronique, le DOR pourrait être une cible intéressante à développer. Cependant, un développement de tolérance analgésique rapide est décrit suite à son activation répétée par ses agonistes, limitant son potentiel thérapeutique. Les hypothèses de mécanismes cellulaires sous-tendant la mise en place de la tolérance sont principalement basées sur l'internalisation rapide et massive suivie de la dégradation du DOR après sa stimulation. Lors d'une administration quotidienne de l'agoniste SNC80 à des souris, la tolérance analgésique est accompagnée d'une diminution de la quantité de DOR présent dans le système nerveux, aussi bien au niveau central (hippocampe, moëlle épinière) que dans les voies périphériques de transmission de la douleur (GRD) (Pradhan et al., 2010). Différentes protéines sont impliquées dans l'internalisation et l'adressage intracellulaire du DOR, on trouve parmi elles les  $\beta$ -arrestines et GPRASP1. GPRASP1 a montré *in vitro* un effet potentiateur de la dégradation du récepteur, mais ce phénomène n'a jamais été étudié en modèle animal, ni son impact sur la réponse analgésique aux agonistes DOR.

### B. Objectif

Compte tenu des connaissances sur l'implication de GPRASP1 dans la dégradation de RCPG, de la corrélation entre une dégradation de DOR suite à une stimulation répétée et du développement rapide d'une tolérance analgésique, nous avons voulu étudier dans un modèle animal l'importance de GPRASP1 dans le développement de la tolérance analgésique de DOR au SNC80. Cela a pu être réalisé grâce à des souris déficientes pour GPRASP1, ainsi que l'évaluation de la phosphorylation, l'internalisation et la dégradation de DOR à la suite de son activation. Pour réaliser cette étude nous avons utilisé 2 lignées de souris : les souris KO-GPRASP1 disponibles au laboratoire et une nouvelle lignée qui a été générée par croisement entre les souris knock-in DOR-eGFP et les souris KO-GPRASP1. L'utilité de travailler avec les souris DOR-eGFP résidait dans la possibilité de déterminer par plusieurs techniques la quantité de récepteurs dans les extraits de tissus murins.

### **C. Résumé des résultats**

Nous avons mis en évidence dans deux modèles de douleur chronique différents, grâce à des souris génétiquement déficientes pour GPRASP1, que cette protéine cytoplasmique est nécessaire au développement de la tolérance analgésique au SNC80. En revanche, les résultats de biochimie indiquent que, quelle que soit la méthode de dosage ou l'organe concerné, cette modification apparente de la tolérance ne provient pas d'une différence de dégradation du DOR-eGFP. Le mécanisme de phosphorylation de DOR-eGFP menant à la désensibilisation puis l'internalisation du DOR-eGFP est lui aussi maintenu dans les souris KO-GPRASP1.

Une différence faible mais significative a été mise en évidence par immunohistochimie dans la localisation subcellulaire de DOR-eGFP entre les souris sauvages et les souris KO-GPRASP1 avant activation. Ces résultats, qui restent à être confirmés par une autre technique suggèrent un rôle de GPRASP1 dans l'adressage du DOR dans les compartiments intracellulaires.

Tous les résultats indiquent que ce n'est pas la dégradation du DOR qui est responsable de la tolérance analgésique, et que 15% de DOR résiduels peuvent suffire à obtenir un effet analgésique maximal dans les souris KO-GPRASP1.

Ce manuscrit est rédigé et sera soumis dès que les analyses d'interactôme de DOR-eGFP par spectrométrie de masse dans différentes conditions de traitement des souris sauvages ou KO-GPRASP1 en cours d'analyse auront été finalisées.

### **D. Publication**

# The molecular mechanism of analgesic tolerance to agonist targeting the delta opioid receptor is dissociated from degradation of the receptor

Juliette Kaeffer<sup>1</sup>, Adam Medina<sup>1</sup>, Marie-Laure Straub<sup>1</sup>, Glenn-Marie Le Coz<sup>1</sup>, Raphaëlle Quillet<sup>1</sup>, Valérie Kugler<sup>1</sup>, Nathalie Petit-Demoulière<sup>1</sup>, Manon Gerum<sup>1</sup>, Gabrielle Zeder-Lutz<sup>1</sup>, Stéphane Doridot<sup>2</sup>, Johana Chicher<sup>3</sup>, Philippe Hammann<sup>3</sup>, Franck Vandermoere<sup>4</sup>, Philippe Marin<sup>4</sup>, Dominique Massotte<sup>5</sup>, Frédéric Simonin\* and Sandra Lecat\*

1 Biotechnologie et signalisation cellulaire (BSC), UMR7242, CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch, France

2 Chronobiotron, UAR3415, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

3 Plateforme protéomique Strasbourg Esplanade, FR1589 Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), CNRS, France

4 UMR5203 Institut de génomique fonctionnelle (IGF) CNRS, Université de Montpellier, France

5 UPR3212 Institut des neurosciences cellulaires et intégratives (INCI) CNRS, Université de Strasbourg, France

\*Sandra Lecat

**Email:** [lecat@unistra.fr](mailto:lecat@unistra.fr)

**Author Contributions:** Paste the author contributions here.

**Competing Interest Statement:** Disclose any competing interests here.

**Classification:**

Biological science, pharmacology (or neuroscience) *from: Agricultural Sciences; Anthropology; Applied Biological Sciences; Biochemistry; Biophysics and Computational Biology; Cell Biology; Developmental Biology; Ecology; Environmental Sciences; Evolution; Genetics; Immunology and Inflammation; Medical Sciences; Microbiology; Neuroscience; Pharmacology; Physiology; Plant Biology; Population Biology; Psychological and Cognitive Sciences; Sustainability Science; and Systems Biology*

**Keywords:** GASP, down-regulation, GPCR, G protein-coupled receptor, pain, neuroscience, pharmacology. There should be at least three and no more than five.

## **Abstract**

Agonists activating delta-opioid receptor (DOR) display analgesic properties with less adverse effects than morphine derivatives targeting mu-opioid receptor (MOR). However, analgesic tolerance to DOR agonists (loss of the analgesic effect) develops rapidly upon repeated DOR activation. GPRASP1, an intracellular protein that interacts with DOR, has been suggested to play a role in DOR degradation following its internalization *in vitro*, two determinants that could contribute to analgesic tolerance. Using GPRASP1-KO mice, GPRASP1 was now indeed found mandatory for the development of analgesic tolerance to the high-internalizing DOR agonist, SNC80, in two models of chronic pain, neuropathic and inflammatory and in two nociceptive modalities, mechanical and thermal. However unexpectedly, GPRASP1 was not found necessary for activated DOR degradation. Using a unique mouse line knock-out for GPRASP1 and knock-in for a fluorescent DOR-eGFP, the unaltered degradation of activated DOR-eGFP in brain from GPRASP1-KO mice was confirmed with two distinct methods (Western blot using anti-GFP antibodies and radiolabelled ligand binding). Chronically activated DOR-eGFP were also degraded to the same extent between WT and GPRASP1-KO mice in spinal cord and in dorsal root ganglion. Despite substantial degradation, the anti-hyperalgesic effects of SNC80 were mediated by the residual DOR-eGFP since it was abolished by pre-incubation with Naltrindole, a selective DOR antagonist. Activated DOR-eGFP were also desensitized to the same extent in WT and GPRASP1-KO mice in as much as phosphorylation was concerned. We finally analysed for the first time as a function of time after SNC80 activation, the interactome of DOR-eGFP from brain extracts.

## **Significance Statement**

Chronic pain is a major health issue. Morphine derivatives targeting MOR remain the gold standard clinical analgesics but induce severe side effects including analgesic tolerance that contributed to the death records during the opioid crisis in the US. We have investigated the molecular mechanism of analgesic tolerance to DOR agonists, that have potentials in treating chronic pain. We definitively establish that degradation of DOR is dissociated from the mechanism of analgesic tolerance and that GPRASP1 is central to the development of tolerance. Since

GPRASP1 interacts with a number of GPCRs *in vitro*, it could have a role in the development of adaptations to chronic use of drugs targeting other GPCRs than DOR.

## **Main Text**

### **Introduction**

Chronic pain is a serious health issue that concern 20% of adults in the Western countries (Rikard SM et al. 2023). For around 5-8% of adults it is subcategorized as High-Impact chronic pain (Zelaya et al., 2020)(Dahlhamer et al., 2018)(Fayaz et al., 2016)) because it has various psychological impacts and becomes crippling in everyday life. Many G-protein Coupled Receptors (GPCRs) are involved in the modulation of pain processes, including its initial detection and regulation as well as establishment and maintenance of chronic pain (Obeng et al., 2021)(Stone and Molliver, 2009)). Nowadays, opioids agonists targeting the mu opioid receptor (MOR) are still the most used analgesics. However, they display numerous side effects and their chronic use induces adaptive mechanisms such as tolerance and addiction, that exacerbate life-threatening side effects as observed with the opioid crisis in the US (Volkow and Blanco, 2021)(Humphreys et al., 2022).

The delta opioid receptor DOR is considered as an alternative drug target to treat chronic pain (Quirion et al., 2020). Consistent with its involvement in nociceptive regulation, DOR is located, in rodents as in human, in different regions of the nervous system involved in the modulation of nociception and pain including dorsal root ganglia, spinal cord, striatum and amygdala. Like MOR, it is associated with a  $G_{i/o}$  protein, inactivating nociceptive signal transmission (Kurose et al., 1983). Many studies have shown in persistent pain animal models (neuropathic, inflammatory, cancer and diabetic) that DOR stimulation by an agonist reverses hyperalgesia in mechanical as well as thermal modalities (Gavériaux-Ruff and Kieffer, 2011). Unlike drugs targeting MOR, agonists targeting DOR trigger neither constipation nor respiratory depression and display poor addictive properties (Chu Sin Chung and Kieffer, 2013). A major current limit to DOR targeting is the rapid development of an analgesic tolerance to daily administration with high-internalizing agonists such as the prototypical SNC80 (Pradhan et al., 2009a, 2010).

Tolerance refers to the reduction of the effect of a drug upon successive administrations. Analgesic tolerance to MOR agonists has been thoroughly studied and reviewed and probably depends both upon cellular tolerance including the decrease of functional MOR by desensitization and internalization through beta-arrestins and the reinforcement of counteracting signaling such as super-activation of the adenylate cyclase and upon adaptive modifications of the pain circuitry of the nervous system including the

development of opioid-induced hyperalgesia (Cahill et al., 2016; Khan and Mehan, 2021; Roeckel et al., 2016). Analgesic tolerance to MOR agonist is ligand-dependent and much efforts have been recently put towards developing G-protein biased-agonist instead of ligands activating both G-protein and beta-arrestins pathways (Kliwer et al., 2019)(Kelly et al., 2023). The molecular mechanisms regarding analgesic tolerance to DOR high-internalizing agonists is much less characterized and is so far proposed to be directly linked to rapid degradation of DOR into lysosomes (Pradhan et al., 2009b), (Pradhan et al., 2010)(Cahill et al., 2016) following its internalization by beta-arrestin1 (Pradhan et al., 2016; Vicente - Sanchez et al., 2018).

The molecular mechanism of DOR degradation has been mainly studied using *in vitro* assays with tagged-DOR expressed in heterologous cell system. One of the major proteins proposed to be involved in DOR degradation *in vitro* is the GPCR-associated Sorting protein 1 GPRASP1, a protein of 1395 aa in humans. Initial two-hybrid screens identified a 500 residues-long carboxyl-terminal domain of GPRASP1 as interacting with the C-tail of DOR by two independent groups (Whistler et al., 2002)(Simonin et al., 2004). This domain contains an armadillo-like repeat conserved between the 10 members of the GPRASP/ARMCX protein family and 3 of the 22 tandem GASP-motif repeats that mediate interaction with G-protein coupled receptors (Abu-Helo and Simonin, 2010)(Bornert et al., 2013; Kaeffer et al., 2021). In a previous study, Whistler and colleagues showed that overexpression of GPRASP1 in HEK293 cells could increase the amount of ligand-induced DOR degradation as measured in radioligand binding experiments while a C-terminal form of GPRASP1 acting as a dominant-negative mutant, was able to slow-down the degradation of the activated DOR (Whistler et al., 2002). The interaction between GPRASP1 and DOR was further confirmed *in vitro* in GST pull-down assays with the C-tail of DOR and *in vitro* translated radiolabeled GPRASP1 (Bornert et al., 2013; Whistler et al., 2002) and by co-immunoprecipitation (Simonin et al., 2004). Using the GST-pull-down assay, GPRASP1 was found, by the two teams independently, to display interaction with a large number of C-tail of GPCRs (Simonin et al., 2004)(Heydorn et al., 2004) and GPRASP1 has been further implicated in degradation of GPCRs *in vitro* including the degradation of the dopamine D2 and D3 receptor (Bartlett et al., 2005; Thompson and Whistler, 2011) and DOR (Whistler et al., 2002) by interacting with the ESCRT complex protein HRS and dysbindin (Marley and Von Zastrow, 2010; Rosciglione et al., 2014) and the degradation of the cannabinoid CB1 receptor (Martini et al., 2007; Tappe-Theodor et al., 2007) by interacting with Beclin2 (He et al., 2013; Kuramoto et al., 2016), for review see Kaeffer et al. 2021(Kaeffer et al., 2021).

The role of GPRASP1 in activated GPCRs degradation *in vivo* still needs clarification. Two teams generated independently GPRASP1-deficient mice including ours (Boeuf et al., 2009)(Thompson et al., 2010). Whistler's team observed an absence of activated GPCR degradation in GPRASP1-KO mice, concerning CB1 receptors (Martini et al., 2010) as well as D2 receptors (Thompson et al., 2010). But in our GPRASP1-KO mice, instead, a slight increase of activated D2R was observed in similar conditions of cocaine treatment

(Boeuf et al., 2009). On the other hand, using GPRASP1-KO mice, converging results from the two teams clearly establish the necessity of GPRASP1 in the development of adaptations following chronic activation of D2 and D3 receptors (Boeuf et al., 2009)(Thompson et al., 2010)(Schamiloglu et al., 2023) and in the development of analgesic tolerance to agonists targeting CB1 (Martini et al., 2010) , for review see Kaeffer et al. 2021). But so far, while DOR was the first GPCR discovered to interact with GPRASP1 *in vitro*, no study has been undertaken to understand the role of GPRASP1 in DOR signaling and trafficking *in vivo*.

In this context, our aim was to explore the role of GPRASP1 in the development of analgesic tolerance to the fast-internalizing agonist of DOR SNC80 and in the degradation of activated DOR *in vivo*, using a newly generated mouse line that expresses DOR as a fusion protein with the fluorescent eGFP fluorophore (DOR-eGFP knock-in mice (Erbs et al., 2015; Scherrer et al., 2006) and that is constitutively deficient for the expression of the GPRASP1 protein.

## Results

### ***GPRASP1 can be co-immunoprecipitated with DOR-eGFP from brain extracts (Fig. 1)***

In a first step, we wanted to ascertain that GPRASP1 can be found in interaction with DOR *in vivo*. As there is not yet any specific DOR antibodies available, we used DOR-eGFP knock-in mice that express the fluorescently-tagged DOR under the endogenous DOR promoter with no detectable alteration in mouse behavior (Pradhan et al., 2010, 2009b; Scherrer et al., 2006)(Faget et al., 2012) We immunoprecipitated DOR-eGFP from 10mg brain extracts of DOR-eGFP knock-in mice on GFP-Trap agarose beads and investigated whether GPRASP1 can be specifically detected from DOR-eGFP immunoprecipitates with in-house validated anti-GPRASP antibodies (Zeder-Lutz et al., 2023). As shown in [Figure 1](#), GPRASP1 could be detected from DOR-eGFP immunoprecipitates. This result indicates that GPRASP1 can interact with DOR-eGFP in brain from non-treated mice and that the eGFP, localized on the C-tail of DOR, does not seem to cause steric hindrance and to interfere with this protein-protein interaction. Of note, the closest homolog of GPRASP1, GPRASP2, was also significantly enriched in DOR-eGFP immunoprecipitates suggesting that GPRASP2 also interacts *in vivo* with DOR.

### ***Analgesic tolerance to repeated SNC80 injections is absent in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice in a model of neuropathic pain.***

We next studied the potential role of GPRASP1 in the development of analgesic tolerance to DOR agonist SNC80. To this purpose, we generated a new mouse-line by crossbreeding DOR-eGFP knock-in mice with GPRASP1-KO mice and studied the consequences of chronic SNC80 administration in a model of



neuropathy induced by the constriction of the sciatic nerve both in males and females. The anti-allodynic effect of SNC80 was evaluated everyday with von Frey filaments following injection of SNC80 during 9 days. First, we observed a basal sensitivity of the paw of  $1.9 \text{ g} \pm 0.06$  in DOR-eGFP/GPRASP1-KO males (Fig. 2A) and  $1.6 \text{ g} \pm 0.1$  in females (Fig. 2B). Similar values were obtained in DOR-eGFP/GPRASP1-WT. Three weeks after the surgery a strong allodynia was observed in both genotypes and both sexes (Fig. 2). The anti-allodynic effect of the first administration of SNC80 on day 1 (10mg/kg, i.p., 45 minutes before testing) was similar in WT and GPRASP1-KO mice both in males and in females. In DOR-eGFP/GPRASP1-WT animals the anti-allodynic action of SNC80 started to decline after the second administration of SNC80 and was completely absent from day 3 to day 9 in males and from day 3 to 7 in females (Fig. 2). Conversely, in DOR-eGFP/GPRASP1-KO males and females, the anti-allodynic effect of SNC80 was fully maintained throughout the experiment. In the same experiment, we also evaluated thermal allodynia on day 7 in males and on day 5 in females in the cold plate test (Fig. S1). In DOR-eGFP/GPRASP1-WT males, the number of paw lift was similar between vehicle and SNC80-treated groups but was significantly lower in DOR-eGFP/GPRASP1-KO males treated with SNC80. The female group of DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice also display a diminished number of paw lift upon SNC80 administration although it was not significant due to the high dispersion of the number of paw lifts in the vehicle group (Fig. S1B). Altogether, these data show that GPRASP1 is mandatory for the development of analgesic tolerance to the fast-internalizing DOR agonist SNC80 both in males and females with neuropathic pain.

***Analgesic tolerance to repeated SNC80 injections is absent in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice in a model of inflammatory pain.***

Next, an inflammatory pain model with Complete Freund Adjuvant's (CFA, 20 $\mu$ l, s.c.) injected at the base of the tail of male mice was investigated. To precipitate the development of analgesic tolerance, the two first administrations of the SNC80 agonists were spaced by 4 hours (Pradhan et al., 2009a) and then administration of SNC80 was once daily for 4 consecutive days. The results are presented with the number of SNC80 injections (5 in total). The brain, the spinal cord and the dorsal root ganglia were collected after the behavioral experiments, 6 hours after the fifth administration of SNC80, when its anti-hyperalgesic effect was over.

In the mechanical pain modality, basal nociceptive threshold as well as the hyperalgesia induced by CFA 3 days after its injection were similar in both DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice (Fig. 3A). The first SNC80 administration (10mg/kg, i.p.) displayed anti-nociceptive activity that was similar in DOR-eGFP/GPRASP1-WT and in DOR-eGFP/GPRASP1-KO. In DOR-eGFP/GPRASP1-WT, this anti-nociceptive activity started to decline after the second administration and was completely absent after administrations

3 to 5 while it was fully maintained in DOR-eGFP/GPRASP1-WT. We obtained the same results by measuring the thermal nociceptive threshold of the animals in the tail immersion test (Fig. 3B). These data show that analgesic tolerance to SNC80 fully developed in DOR-eGFP/GPRASP1-WT mice but not in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice. Finally, naltrindole (5mg/kg, i.p.) fully reversed the anti-nociceptive action of the fifth SNC80 administration in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice, demonstrating that it is due to the activation of DOR and not an off-target action (Fig. 3A and 3B). Moreover, we observed that acute anti-hyperalgesic effect and development of analgesic tolerance following repeated administrations of SNC80 were similar in DOR-eGFP (Fig S2A- S2D) and DOR-WT mice (e.g. non fluorescent DOR; Fig. S2B-S2E), as previously reported (Pradhan et al., 2010) and tolerance to SNC80 was absent in DOR-WT/GPRASP1-KO mice (Fig. S2C-S2F). Altogether, these data clearly highlight the mandatory role of GPRASP1 in the development of analgesic tolerance to chronic SNC80 in a model of inflammatory pain. Finally, as the analgesic response to SNC80 has already been shown to be higher in  $\beta$ -arrestin1 KO mice (Pradhan et al., 2016) ; (Vicente-Sanchez et al., 2018), we investigated the consequences of chronic administration of a lower and a higher dose of SNC80 (5mg/kg and 20 mg/kg, respectively) in DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice upon CFA-induced inflammation. Of note, higher doses of SNC80 than 30 mg/kg have been reported previously to potentially be lethal (Vicente-Sanchez et al., 2018). In this experiment, mechanical (Fig. 3C and 3D) and thermal pain modalities (Fig. S2G and S2H) were tested. The first injections of 5mg/kg and 20mg/kg of SNC80 displayed mechanical anti-nociceptive effect that was similar in DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice (Fig. 3C and 3D, respectively). At the fifth injection of SNC80 (5mg/kg and 20 mg/kg), a significant mechanical anti-nociception was still present in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice (Fig. 3D) but not in DOR-eGFP/GPRASP1-WT mice (Fig. 3C). For the dose of 20mg/kg, acute thermal anti-nociception was observed in both genotypes and the development of tolerance was completely absent in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice as compared to DOR-eGFP/GPRASP1-WT mice (Fig. S2G and S2H). For the dose of 5 mg/kg, no significant thermal anti-nociception was observed in both genotypes. Of note, all the mice treated with the 20mg/kg SNC80 first dose showed convulsion-like behavior that was not further characterized but tolerance to the convulsion-like effect of SNC80 developed to the same extent in both genotypes starting from the second SNC80 injection.

Overall, our results indicate that GPRASP1 is essential for the development of analgesic tolerance to SNC80 in two different models of persistent pain, and that the maintenance of the anti-hyperalgesic effect of SNC80 in GPRASP1-KO mice is mediated by DOR.

#### **SNC80-activated DOR-eGFP is similarly degraded in WT and GPRASP1-KO mice.**

In the next series of experiments, we investigated the consequences of the absence of GPRASP1 on the down-regulation of DOR after chronic SNC80 treatment *in vivo*. To explore the extent of DOR-eGFP

degradation between tolerant mice (WT) and still responding mice (GPRASP1-KO), we combined both radiolabeled ligand binding and Western blot experiments either on whole brain membranes or on immunoprecipitated DOR-eGFP from tissue extracts of the organs collected after the behavioral experiments. Saturations curves of  $^3\text{H}$ -Deltorphine II were established, for brain membrane extracts of each animal after the fifth administration of SNC80 10mg/kg (Fig. 4A). In vehicle treated animals, the  $K_D$  and  $B_{\text{max}}$  values for DOR-eGFP were similar in WT and GPRASP1-KO mice ( $K_D$  :  $2,7 \pm 0,89$  and  $4,2 \pm 1,33$  and  $B_{\text{max}}$   $100 \pm 17\%$  and  $120 \pm 13\%$ ) suggesting that GPRASP1 does not significantly influence the conformational state of DOR that binds to the radiolabeled ligand as well as the total amount of DOR-eGFP. As previously described (Pradhan et al., 2010), in DOR-eGFP mice, the receptor was massively degraded after the repeated treatment with SNC80 ( $B_{\text{max}}$  :  $19 \pm 6\%$  n=5). Surprisingly, we observed in DOR-eGFP/GPRASP1-KO brains the same extent of degradation of DOR-eGFP after repeated treatment, with more than 80% of receptor binding loss after SNC80 stimulation ( $B_{\text{max}}$ = $16.5 \pm 3\%$  n=5,  $p=0.0006$  vs KO-vehicle). Quantification of DOR with  $^3\text{H}$ -Deltorphine II in brain membranes of WT (non-fluorescent DOR) and GPRASP1-KO mice (Fig. S3A) showed the same level of DOR degradation in presence or absence of GPRASP1. Moreover, quantification of DOR-eGFP with  $^3\text{H}$ -Deltorphine II in brain membranes of animals treated with the lowest dose of SNC80 (5mg/kg) indicated less down-regulation but to the same extent in DOR-eGFP/GPRASP1-WT (degradation of 53% n=2,  $p=0,0003$  vs vehicle) and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice (degradation of 51% n=2,  $p=0,0023$ ), (Fig. S3B). There was also a dose/effect detected in brain of animals injected with 20mg/kg of SNC80 (between 80 and 87% of degradation in DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice, respectively; n = 2,  $p < 0,0001$  and  $0,0001$  vs vehicle of the same genotype, Fig. S3B).

As GPRASP1 has been previously reported to be critical for the sorting toward lysosomal degradation of different GPCRs including DOR *in vitro* (Whistler et al., 2002), we further quantified DOR-eGFP on brain membrane lysates of DOR-eGFP  $\pm$  GPRASP1-KO mice by Western blot with an anti-GFP antibody in order to avoid any bias associated with radioligand binding experiments. Extracts of DOR-WT mice were used as a negative control for the eGFP signal. As shown in Figure 4B, the quantification of the luminescent signals confirmed that the initial pool of DOR-eGFP was similar after CFA inflammation in the presence or absence of GPRASP1 (DOR-eGFP/GPRASP1-WT vehicle  $100 \pm 7.7\%$ ; DOR-eGFP/GPRASP1-KO vehicle  $98.4 \pm 6\%$ ) and that the decrease of DOR-eGFP after SNC80 treatments was similar in DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice (WT SNC80  $38.9 \pm 3.2\%$ , vs vehicle  $p < 0.005$ ; GPRASP1-KO SNC80  $31.7 \pm 3.2\%$ , vs vehicle  $p < 0.005$ , WT vs KO SNC80:  $p=0.97$  One way ANOVA). With this method, we also observed DOR degradation depends on the dose of SNC80 used, with around 53% and 45.6% of DOR-eGFP left at 5 mg/kg, decreasing to 30% and 25.6% at 20 mg/kg for DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO, respectively (Fig. S3C and S3D). As a control, GPRASP1 could be detected in the total brain membrane extracts of DOR-eGFP/GPRASP1-WT mice by Western blot with anti-GPRASP antibodies but not in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice (Fig. 4B). We observed no significant variation of

quantities of GPRASP1 detected between vehicle- and SNC80-treated mice. Interestingly, a band corresponding to GPRASP2 was also detected in the membrane fraction and no significant variation was observed between WT and GPRASP-KO mice or between SNC80-treated or control animals. Taken together, these results show that GPRASP1 is not necessary for DOR degradation in the brain upon chronic stimulation. Yet, they further indicate that after chronic SNC80 treatment there was sufficient DOR left in GPRASP1-KO mice to obtain a full anti-hyperalgesic effect of SNC80 (Figures 2 and 3).

Since the anti-hyperalgesia mediated by DOR originates to a large extent from Nav1.8 sensory neurons of the DRG projecting into the skin and the spinal cord (Gavériaux-Ruff and Kieffer, 2011) (Nozaki et al., 2012), we next investigated the role of GPRASP1 in DOR degradation in the first relay of pain (i.e. the spinal cord and DRG). GPRASP1 could be detected by Western blot with anti-GASP antibodies in the lumbar spinal cord (Fig. 4C) and DRG (Fig. S3E) total lysates of DOR-eGFP/GPRASP1-WT but not of DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice indicating that the protein is expressed in these tissues. Again, the GPRASP2 band was also detected in spinal cord and in DRG (Fig. 4C and Fig. S3E, respectively) with no significant variation between WT and GPRASP1-KO mice treated or not with SNC80. To quantify DOR in the lumbar spinal cord and DRG, DOR-eGFP was immunoprecipitated on GFP-trap agarose beads to concentrate the signal. In spinal cord extracts (Fig. 4C), the amount of DOR-eGFP quantified following Western blotting with an anti-GFP antibody conjugated to HRP was equivalent in vehicle-treated DOR-eGFP/GPRASP1-WT ( $100 \pm 4,9 \%$ ) and in vehicle-treated DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice ( $91 \pm 17 \%$ ). The down-regulation of DOR in lumbar spinal cord was as massive as in the brain after 5 administrations of SNC80 (10mg/kg, i.p.) and detected in both WT (DOR left:  $35 \pm 4\%$ ,  $p < 0.001$  vs vehicle group) and GPRASP1-KO mice (DOR left:  $28 \pm 4 \%$ ,  $p < 0.001$  vs vehicle group). In DRG, the quantity of DOR-eGFP was very low even when DRG of 2 mice were pooled for one immunoprecipitation on GFP-trap beads, excluding statistical measurements. However, a faint band corresponding to DOR-eGFP was systematically detected in DRG lysates of vehicle-treated mice in either DOR-eGFP/GPRASP1-WT or DOR-eGFP/GPRASP1-KO (Fig. S3E) while there was less detectable DOR-eGFP after SNC80 treatment in both genotypes, indicating that DOR degradation also takes place in primary nociceptors and is not critically influenced by the absence of GPRASP1.

Overall, our results of *in vivo* experiments and DOR quantification in DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice, show that GPRASP1 is mandatory for the development of analgesic tolerance to DOR agonist SNC80 but is not involved in SNC80-induced DOR degradation at all the levels of the nervous system involved in pain pathways. This suggests that contrary to the general assumption in the field, agonist-stimulated DOR degradation is not the main mechanism leading to analgesic tolerance to the high-internalizing DOR SNC80 agonist. Furthermore, contrary to the previously published *in vitro* experiments, GPRASP1 is not critically involved in DOR degradation *in vivo*.

**Plasma membrane DOR localization is slightly different in brain of DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice.**

The complex membrane trafficking of DOR has been implicated in the development of analgesic tolerance, since low-internalizing agonists or agonists that mediate fast recycling of DOR to the plasma membrane develop delayed or no analgesic tolerance (Bagheri Tudashki et al., 2020; Conibear et al., 2020; Nozaki et al., 2012; Pradhan et al., 2010, 2009b). We therefore decided to investigate if the absence of GPRASP1 had any effect on the subcellular localization of DOR-eGFP by immunohistochemistry following established protocols (Erbs et al., 2016; Faget et al., 2012). Brain slices of animals with CFA-induced inflammatory pain and chronically treated with SNC80 were collected 24 hours after the last administration of SNC80 (4 animals per group, 3 slices per animal). In the hippocampus, striatum, cortex and septum, neurons expressing DOR-eGFP were identified in WT and in GPRASP1-KO animals by fluorescence microscopy using the Nanozoomer Hamamatsu slide reader. The brain regions where we observed the presence of DOR-positive cells were similar in DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO animals, in inflammatory condition, with and without five SNC80 stimulations. Confocal microscopy allowed us to observe a different subcellular distribution of the DOR-eGFP signal between cells: sub-plasmalemmal for some of them, punctiform in the cytoplasm for others, or a mixed distribution (Fig. 5A). First, the global amount of DOR-eGFP intensities relative to the total cell surface were quantified per cell. There was no difference in the quantity of DOR-eGFP measured by this technique between vehicle-treated DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO animals, in agreement with the results obtained with the two biochemical methods used for quantifications of DOR-eGFP in total brain membranes. However, for the two SNC80-treated groups, independently of the genotypes, there was no significant reduction of the fluorescence intensities of the DOR-eGFP in DOR-expressing cells, despite that down-regulation of DOR was clearly detected with biochemical methods. This result suggests that after SNC80 treatments most DOR-eGFP expressing cells have probably an amount of DOR-eGFP that is too low to be detected from the background signal. These cells being excluded from the quantifications, the degradation of DOR-eGFP is therefore largely underestimated by immunohistochemistry (Fig. 5B).

We next evaluated the relative quantities of DOR-eGFP at the plasma membrane as compared to the total quantities of DOR-eGFP detected per cell. Cells of vehicle-treated DOR-eGFP/GPRASP1-WT animals had on average  $33 \pm 1\%$  ( $n = 66$ ) of DOR-eGFP localized at or close to the plasma membrane (Fig. 5C). Interestingly, in vehicle-treated DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice the proportion of DOR-eGFP sub-plasmalemmal signal was significantly reduced to  $28 \pm 1\%$  ( $n = 68$ ;  $p < 0.0001$ ) of the total cell fluorescence. This result suggests that DOR-eGFP might be in a different membrane compartment at steady state in inflamed DOR-eGFP/GPRASP1-KO as compared to inflamed DOR-eGFP/GPRASP1-WT mice. Note that the proportion of DOR-eGFP sub-plasmalemmal signal was also quantified after SNC80 treatment even so, as discussed before, the technique seemed not sensitive enough to detect all the activated DOR-eGFP

expressing cells. In the cells where DOR-eGFP fluorescence could be detected, the proportion of DOR-eGFP at the plasma membrane was similar between WT ( $23 \pm 0.7\%$  (n=70) 24h after the 5th treatment with SNC80) and GPRASP1-KO ( $24.9 \pm 0.7\%$ , n=77)

#### **Kinetics studies of the interactome of DOR-eGFP after SNC80 activation.**

In order to investigate further a potential difference of the membrane compartment of DOR-eGFP in the brain, in presence or absence of GPRASP1 and therefore a potential difference of the proteins in complex with DOR, we undertook interactomics studies of DOR-eGFP as a function of time before and after SNC80 activation. Since, between WT and GPRASP1-KO animals, differences in anti-hyperalgesic effects of SNC80 were already detected at the second dose of SNC80 either after a gap of 24h in the CCI neuropathic pain model (Fig. 2) or after a gap of 4h in the CFA-inflammatory pain model (Fig. 3A), a time-course of 8 time-points was designed, comprising two successive injections of SNC80 at 24h intervals. Mice received vehicle or CFA injection into the tail (20 $\mu$ l s.c.) 72h before SNC80 administration (10mg/kg, i.p.). Three brains were collected from the animals of the following groups: non-treated, CFA-inflamed, 15 min, 30 min, 2h, 4h, 24h after the first SNC80 injection and 30 min after the second injection in CFA-inflamed animals (Fig6A). The immunoprecipitations of DOR-eGFP were performed on 10 mg brain lysates with GFP-trap beads.

#### **Desensitization as measured by phosphorylation of the DOR-eGFP is similar between DOR-eGFP/GPRASP1-WT versus DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice.**

First, control immunoblots with 1/10 of the immunoprecipitated materials were run to verify the correct DOR-eGFP immunoprecipitations and to follow the kinetics of DOR-eGFP phosphorylation on two residues Threonine T361 and Serine S363 known *in vitro* to participate to the desensitization of DOR then to its internalization by beta-arrestins (Kouhen et al., 2000; Mann et al., 2020). Interestingly, DOR-eGFP degradation could already be detected since the intensity of the DOR-eGFP total signal at 24h post-SNC80 was around 20% lower than in CFA-vehicle groups (n= 6,  $82 \pm 18\%$  in DOR-eGFP/WT mice,  $71 \pm 15\%$  in DOR-eGFP/ GPRASP1-KO, of GFP basal signal of the same genotype, Fig. 6A and 6B). It was shown *in vivo* that the fast-internalizing SNC80 produces a strong phosphorylation on S363 and to a lesser extent on T361 after 20 minutes while low-internalizing agonists that trigger no tolerance are much less potent (Mann et al., 2020), but no precise kinetics have been published so far. The immunoblots showed a robust phosphorylation of DOR after SNC80 first stimulation (Fig. 6A). The amount of phosphorylation was quantified relative to the DOR-eGFP amount of each animal. As described previously, P-S363 (Fig. 6C) peaked at 15 min in WT mice (n=3) and decreased thereafter until back to basal level 2h after SNC80 injection. At the second SNC80 stimulation (CFA SNC80 24h+30min) P-S363 was equivalent to that of the first stimulation (CFA SNC80 30min). Importantly, the kinetics of P-S363 was not different between DOR-eGFP/ GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice. The phosphorylation of T361 displayed a different kinetics (Fig. 6A and 6D) since it reached its maximum 2h after SNC80 administration (CFA SNC 120min, n=3) and was still at high level

after 4h. At the second SNC80 stimulation (CFA SNC80 24h+30min) phosphorylation of T361 was not different from that of the first stimulation (CFA SNC 30min). Again, the kinetics of P-T361 was not different between WT and GPRASP1-KO mice. In conclusion, DOR was phosphorylated and dephosphorylated with the same speed and intensity in both genotypes. Together, these results suggest that during the time-course of 24h after SNC80 activation, part of DOR-eGFP had been desensitized, internalized and targeted to the lysosomes for degradation to the same extent in DOR-eGFP/ GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice and that at 24h post-activation DOR-eGFP were no more desensitized. Yet in the CFA-inflammatory pain model, the anti-hyperalgesic effect of SNC80 to a second SNC80 injection 4h post-SNC80 first injection was already reduced in WT animals as compared with no tolerance in GPRASP1-KO mice, suggesting that the role of GPRASP1 in the development of tolerance takes place already between the first 4 hours post-activation by SNC80.

#### **Constitutive interaction of GPRASP1 with DOR-eGFP.**

The blots with 1/10 of the immunoprecipitated materials were also immunostained with anti-GPRASP antibodies. The band for GPRASP1 was specifically detected with the DOR-eGFP immunoprecipitated material from DOR-eGFP/GPRASP1-WT mice at all the time-points and not from controls DOR-eGFP/GPRASP1-KO animals. Surprisingly, no significant variation in the amount of GPRASP1 associated with the activated DOR-eGFP could be observed at any time-points (Fig. 6E). On the contrary, a non-significant but reproducible decrease of the interaction of GPRASP1 with DOR-eGFP was observed in all immunoprecipitated material obtained from CFA-treated animals activated or not by SNC80 as compared to non-treated animals (Fig. 6E). This result suggests that GPRASP1 probably interacts with DOR in a constitutive manner and that the interaction of GPRASP1 and DOR was not increased upon activated DOR trafficking in the endocytic pathway up to 4h after SNC80 activation, when DOR-eGFP was still strongly phosphorylated on P-T361.

#### **Interactome of DOR-EGFP as a function of time after SNC80 activation (Table 1).**

Kinetics of the interactome of DOR upon activation with an agonist have already been studied *in vitro* (Lobingier et al., 2017) but *in vivo*, it has been characterized only in untreated animals (Degrandmaison et al., 2020). We therefore aimed to characterize the interactomes of DOR-eGFP from mice after CFA-inflammation establishment and 30 min after the first or the second SNC80 injections. To this purpose, previous co-immunoprecipitations of brains from three mice per group with GFP-Trap agarose beads and immunoprecipitated material were analyzed by mass spectrometry.

*The analysis of the results is yet to come. Independently of the results, whether we find a difference between WT and KO-GPRASP1 or not, the main points of the article remain and are here after discussed.*

## **Discussion**

### **GPRASP1 is mandatory for analgesic tolerance to SNC80.**

In the present study, we demonstrated the requirement of GPRASP1 in the development of analgesic tolerance to the high-internalizing DOR agonist SNC80 in mice since in both GPRASP1-KO mice, either with DOR-eGFP knock-in mice or with DOR-WT (non-fluorescent DOR mice), SNC80 gave a full anti-hyperalgesic effect at each daily injection in two models of chronic pain. Together with beta-arrestin 1, this is the second protein interacting with DOR reported to give a clear phenotype of reduction of analgesic tolerance to SNC80. Beta-arrestin 1 was also previously implicated in the development of analgesic tolerance to SNC80 using a model of inflammatory pain similar to ours but that injection of CFA was into the plantar surface of the hindpaw instead of the base of the tail (Pradhan et al., 2016; Vicente-Sanchez et al., 2018). Indeed, in beta-arrestin 1-KO mice an anti-hyperalgesic effect at each daily injection of SNC80 could be detected but the effect was not as efficacious as what we observed using GPRASP1-KO mice. This could be due to a difference in SNC80 doses used since in the study with beta-arrestin 1 KO mice, there was an increased in SNC80 efficacy at the first injection compared to WT-mice such that, in order to be in equipotent conditions, the SNC80 dose in WT mice was of 10mg/kg but reduced to 3mg/kg in beta-arrestin 1-KO mice (Vicente-Sanchez et al., 2018). In our inflammatory pain model, three SNC80 doses were tested and the results suggested that SNC80 was rather equipotent in the two genotypes: GPRASP1-KO mice showed a significant anti-hyperalgesic effect to SNC80 at the first injection of either 5mg/kg, 10mg/kg or 20mg/kg SNC80. In WT-mice, while the first administrations of either 10mg/kg or 20mg/kg SNC80 gave a significant anti-hyperalgesic effect, the first injection of 5mg/kg SNC80 gave an anti-hyperalgesic effect that was however not significant, suggesting that the efficacy of SNC80 is slightly increased in GPRASP1-KO mice. In any case, GPRASP1-KO mice developed no analgesic tolerance to daily injections of as low as 5mg/kg and as high as 20mg/kg SNC80, while analgesic tolerance developed in WT-mice at both 10mg/kg or 20mg/kg SNC80. Of note, also we did not properly measure it, WT and GPRASP1-KO mice both displayed convulsive-like effects upon injection of the first dose of 20mg/kg of SNC80, but this effect disappeared in the subsequent injections in both WT and GPRASP1-KO mice. Thus GPRASP1-KO mice probably displayed tolerance to the convulsive effect of SNC80. This convulsive effect of SNC80 was proposed to originate from DOR-expressing forebrain GABAergic neurons (Chu Sin Chung et al., 2015), to be independent of DOR/G-protein signaling (Dripps et al., 2018, 2017) and to be repressed by beta-arrestin 1 (Dripps et al., 2018). Thus, the signaling pathway of DOR leading to seizure appears to have a very different mechanism than the signaling leading to analgesia and it is therefore not so unexpected that GPRASP1 seems not implicated in the establishment of tolerance to seizure induced by SNC80.

Several functions of beta-arrestin 1 on DOR signaling have been proposed, one being its canonical function in triggering clathrin-mediated endocytosis of GPCR and the other being a repressor of DOR exocytosis from the trans-Golgi network upon a first activation by SNC80 (Mittal et al., 2013). The role of



beta-arrestin 1 in establishing analgesic tolerance is proposed to be dependent on internalization of activated DOR since low-internalizing DOR agonists trigger less analgesic tolerance (Cahill et al., 2016; Pradhan et al., 2010, 2009b; Vicente-Sanchez et al., 2018). As for beta-arrestin 1, the role of GPRASP1 is also proposed to take place during endocytosis but at a later step than beta-arrestins, at the level of sorting activated DOR towards the degradative pathway (Rosciiglione et al., 2014; Whistler et al., 2002). This is the reason why we next compared the quantity of DOR upon chronic SNC80 treatment in WT and GPRASP1-KO mice.

### **Analgesic tolerance to SNC80 might not be a consequence of DOR degradation**

The tissues of inflamed mice were collected 6h after the fifth SNC80 injections. Surprisingly, activated DOR was degraded to the same extent in brain of GPRASP1-KO compared to WT mice regardless of the technique used. Indeed, we have used two independent techniques to measure DOR amount: radiolabeled ligand-binding assays showed similar amount of DOR in brain membranes both of DOR-eGFP knock-in and DOR-WT (non-fluorescent DOR) mice activated by SNC80 or not, Western blots detecting DOR-eGFP with anti-GFP antibodies gave similar quantifications in brain membranes and in spinal cord. Depending on the method used, after the 5th SNC80 administration in brain membranes of GPRASP1-WT, 19% or 39% of DOR-eGFP were left and of GPRASP1-KO 16% or 32% of DOR-eGFP were left (binding or Western blot measurements respectively). The Western blot technique is probably more accurate in detecting all the DOR-eGFP independently of the receptor conformational state while an agonist was used as a radiolabelled tracer for the binding experiments probably detecting mainly high-affinity states of DOR. In the spinal cord, the extent of DOR-eGFP degradation was even higher with only 1/3 of the receptors remaining after chronic stimulation with SNC80 both in WT and GPRASP1-KO mice. As to the quantities of DOR-eGFP in the DRG, down-regulation of DOR-eGFP seemed to occur to the same extent in WT as in GPRASP1-KO mice but could not be quantified due to very faint bands. Importantly, in the SNC80 dose/effect experiment, the analyzed brains were collected at a later time point after the last SNC80 administration: down-regulation of DOR-eGFP was still detected 24h after activation of the receptor at the time where another SNC80 administration could have been performed. There was a dose/dependent degradation of DOR-eGFP with 20% versus 13% of total DOR-eGFP remaining after 20mg/kg SNC80 injections in WT mice as compared to GPRASP1-KO mice respectively (Western blot measurements of brain membranes). Although not significant, the amount of residual DOR-eGFP always appeared even smaller in GPRASP1-KO than in WT mice. Taken together, contrary to the general assumption in the field, our results strongly suggest that analgesic tolerance to SNC80 in WT mice seems not to be a direct consequence of down-regulation of DOR into lysosomes following its internalization. Indeed, it appears to us very unlikely that DOR-eGFP would be resistant to degradation in GPRASP1-KO mice only in a small and distinct subpopulation of GPRASP1 expressing cells, just the one cells at the origin of the analgesic effect of SNC80

perceived in behavioral experiments. Of note, also the extent of DOR-eGFP down-regulation has never been quantified in DRG, SNC80 triggers DOR-eGFP internalization in DRG as much as in other tissues investigated (Nozaki et al., 2012; Pradhan et al., 2009b). In addition, since a blockade of DOR by pre-treatment with the selective DOR antagonist naltrindol could abolish the analgesic effect of SNC80 occurring at the fifth injection of GPRASP1-KO mice, our results suggest that the residual DOR-eGFP in GPRASP1-KO mice was fully competent to trigger a complete analgesia while the similar amount of residual DOR-eGFP in WT mice might not be in an activatable state. This led us to investigate the extent of phosphorylation of DOR as a hallmark of desensitization.

### **Kinetics of phosphorylation unaltered between WT and GPRASP1-KO mice**

Several Ser and Thr localized in the C-tail of DOR could become phosphorylated upon SNC80 activation of the receptor, and phosphorylation of Ser363, as a primary site than, subsequently of Thr361, are occurring in cells within seconds than minutes respectively (Mann et al., 2020). However, *in vivo* no kinetics of phosphorylation of DOR with SNC80 were reported yet. Phosphorylation of Ser363 was proposed to be key to trigger internalization of DOR *in vitro* (Mann et al., 2020) although the dependence of phosphorylation has been questioned for presynaptic overexpressed DOR in cultured rat medium spiny neurons (Jullié et al., 2022). *In vivo* P-S363, and to a lower extent P-T361, was detected as early as 20 minutes after 10mg/kg SNC80 injection in mice (Pradhan et al. 2009, Mann et al. 2020). To follow DOR phosphorylation as a function of time, we designed and are now presenting for the first time, kinetics relevant to our results in the behavioral experiments on inflamed mice. A time-course of 8 time-points comprising two successive injections of SNC80 at 24h intervals was implemented. DOR phosphorylation was analyzed in brains of non-treated mice before or after CFA-inflammation establishment, at 15 min or 30 min, 2h, 4h, 24h after the first SNC80 injection or 30 min after the second injection. The choice of evaluating earlier time-points of SNC80 activation originates from the fact that, in our hand, we already detected differences in the efficacy of analgesic effect of SNC80 between WT and GPRASP1-KO mice at 4h after the first SNC80 injection in the CFA model of pain and at a second injection of SNC80 at 24h in the CCI pain model. Indeed, kinetics of development of tolerance to SNC80 can be a bit variable depending of the studies since Pradhan and collaborators reported no tolerance if the second injection was at a 24h-interval from the first one (Pradhan et al., 2009). As reported previously P-S363 of DOR-eGFP was maximal at 15 minutes post SNC80 first injection in brain of WT mice and it was not different in brain of GPRASP1-KO mice. Interestingly, P-S361 gave a maximal signal at 2h post SNC80 first injection that was still very high at 4h post SNC80 first injection again with no difference between WT and GPRASP1-KO mice. The whole kinetics of phosphorylation was not different between the two genotypes even 30 minutes after the second SNC80 injection. This suggests that the desensitization and rate of internalization of DOR-eGFP is the same in WT and GPRASP1-KO mice, in agreement with a role of GPRASP1 at a later compartment within the endocytic

pathway. Indeed, we did not detect any increase of GPRASP1 interaction with DOR measured by co-immunoprecipitation within the timeframe of this experiment.

#### **About the role of GPRASP1 : GPRASP1 is not necessary for activated DOR degradation**

Another important result of the present study is that we clearly established that GPRASP1 is not necessary for targeting DOR to degradation as discussed above and this is contrary to the hypothesis from previous *in vitro* studies (He et al., 2013; Marley and Von Zastrow, 2010; Whistler et al., 2002). On the contrary, the absence of GPRASP1 seems even to increase the level of degraded DOR-eGFP. We have already found the same results of an increased degradation in GPRASP1-KO mice concerning the activated dopaminergic D2R from the striatum membranes of cocaine-treated mice (Boeuf et al. 2009). Since we now show for the first time that GPRASP2 can also be found to co-immunoprecipitate with DOR *in vivo*, we cannot exclude that GPRASP2 might participate to the mechanism of DOR degradation. Indeed, it has been already shown to compensate for GPRASP1-deficiency in the sorting of CXCR4 to the plasma membrane (Morales-Hernandez et al. 2020). GPRASP2 is very similar in its N-ter and its C-ter to GPRASP1 (Kaeffer et al. 2021), but it is much shorter and with only 7 GASP motifs instead of 22 in GPRASP1. Nevertheless, in our experiments, GPRASP2 was not found to be expressed to a higher level in GPRASP1-KO mice compared to WT mice excluding a strong compensatory effect. In addition, GPRASP2 cannot interact with beclin2, a protein that was proposed to interact *in vitro* with GPRASP1 and to participate to DOR degradation *in vitro* (He et al. 2013) and to cannabinoid CB1R *in vivo* (Kuramoto et al., 2016). Therefore, in future experiments, It might be interesting to address the role of GPRASP2 in DOR signaling.

#### **Novel role of GPRASP1**

While we have indications from our immunohistochemistry analysis, that a proportion of DOR-eGFP might be in a different compartment after inflammatory priming between GPRASP1-KO mice compared to WT mice, the analgesic effect was similar between the two genotypes at the first SNC80 injection. Even the efficacy of SNC80 might slightly be increased in GPRASP1-KO mice injected with the 5mg/kg SNC80 dose. These results suggest that the intracellular localization of the receptor is not the major limiting factor for stimulating analgesia and it has indeed been observed *in vitro* that SNC80 can activate DOR in intracellular compartments such as in the Golgi apparatus or the endosomes (Stoeber et al., 2018). It has also been found that DOR in the endosomal compartment could contribute to the signaling for analgesia triggered by DOR activation (Jimenez-Vargas et al. 2020).

We can speculate that GPRASP1 would be a repressor of DOR signaling leading to analgesia in participating to changes that initiate cellular allostasis, as has been proposed previously in the case of beta-arrestins in contributing to analgesic tolerance to DOR and also MOR agonists (Cahill et al., 2016). We would

like to propose a model to explain the development of analgesic tolerance to agonists targeting DOR that conciliate the fact that low internalizing agonists of DOR or agonists that promote fast recycling of DOR due to an unstable interaction with beta-arrestins, trigger less analgesic tolerance (Audet et al., 2012; Bagheri Tudashki et al., 2020; Cahill et al., 2016; Conibear et al., 2020; Pradhan et al., 2010, 2009b; Vicente-Sanchez et al., 2018). We hypothesize that GPRASP1 could be required to trigger a negative feedback signalling that counteracts the analgesic effects through GPRASP1 and partner proteins at the level of endosomes, thus leading to the development of analgesic tolerance. This proposal is supported by indications from *in vitro* studies that loss of GPRASP1 expression can reduce GPCR signaling such as Gq-pathway, NFkB- and CREB-dependent transcriptional signaling of the viral chemokine receptor US28 and insulin secretion of the glucagon-like peptide GLP-1 receptor (Buenaventura et al., 2018; Kaeffer et al., 2021; Tschische et al., 2010). Finally, since GPRASP1 is involved in the development of adaptation to chronic agonist activation of other GPCRs (Boeuf et al., 2009; Martini et al., 2010; Thompson et al., 2010), GPRASP1 appears as a potential target for reducing adaptation effects to agonist drugs targeting GPCRs.

## Materials and Methods

### Compounds

The Complete Freund's Adjuvant (CFA, F5881) and Naltrexone hydrochloride (N3136) were obtained from Sigma Aldrich. Naltrindole hydrochloride (1S,2S,13R,21R)-22-(cyclopropylmethyl)-14-oxa-11,22-diazaheptacyclo[13.9.1.01,13.02,21.04,12.05,10.019,25]pentacosa-4(12),5,7,9,15,17,19(25)-heptaene-2,16-diol, ref HY-101177 ) and SNC 80 ((+)-4-[( $\alpha$ R)- $\alpha$ -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethyl benzamide, ref 07829J), were obtained from Interchim (Cayman chemical company, Ann Arbor, MI, USA). Radioactive [<sup>3</sup>H]-Deltorphine II was synthesized Perkin Elmer (NET1087959UC)

### Engineering of DOReGFP/GPRASP1-KO mice

DOReGFP/GPRASP1-KO mice were obtained by crossbreeding DOReGFP knock-in mice (Scherrer et al., 2006) and GPRASP1 knockout mice (Boeuf et al., 2009). Mice were bred in Chronobiotron (UAR3415, Strasbourg) until experiments. Animals were housed in groups of three to five per cage and kept under a 12 h/12 h light/dark cycle at 21 ± 1 °C with ad libitum access to food and water. Experiments were performed during the light-on phase of the cycle (10:00 am to 4:00 pm). Mice were habituated to the testing room and equipment and handled for two weeks before starting behavioral experiments. All experiments were carried out in strict accordance with the European guidelines for the care of laboratory animals

(European Communities Council Directive 2010/63/EU) and approved by the local ethical committee. All efforts were made to minimize animal discomfort and to reduce the number of animals used.

**Table 2. List of antibodies and conditions of use.**

Primary antibody	Concentration	Buffer	Fournisseur	Ref	Corresponding secondary antibody	Concentration	Buffer	Fournisseur	Ref
<b>GFP</b> -HRP goat polyclonal; 100µg(1mg/ml)	1/20000	5% Lait TBST	Abcam	Ab6663	No				
<b>GPRASP</b> (@GASP1 924- 1395 1,3µg/ml du 15/04/19 tube 5	1/5000 to 1/10000	5% Lait TBST	In house	Zeder et al. 2023	@Goat anti- rabbit HRP  Polyclonal IgG	1/10000	PBS 5% BSA	Jackson immunoresea rch	31503 5044
<b>Actine</b> mouse monoclonale	1/2500	5% Lait TBST	Genetex	GTX8255 9	Anti-Mouse HRP  Monoclonal IgG	1/25000	BSA 3%	Life Science products Cytiva GE Healthcare Amersham Buckinghamsh ire UK	NXA93 1U
<b>pS363</b> <b>DOR</b>	1/1000	5% BSA TBST	7TM Antibodies - Jena - Germany	) 7TM0317 B	Goat anti- Rabbit HRP	1/10000	3% BSA TBST		
<b>pT361</b> <b>DOR</b>	1/1000	5% BSA TBST		7TM0317 A					
<b>Anti-eGFP</b> rabbit serum rabbit polyclonal antibodies	1/1000		Invitrogene , Oregon, USA  Molecular Probes, Paisley, UK	A6455  Nr A- 6455	<b>Alexa fluor</b> 488  Goat anti rabbit IgG (H+L)	1/1000  Ou 1/2000?		Invitrogene, Oregon, USA Molecular Probes, Paisley, UK	A1103 4

### **Neuropathic pain model**

Neuropathic pain was induced by chronic constriction injury on the main branch of the right sciatic nerve, as described by Seltzer (Seltzer et al., 1990). Under general gas anesthesia with isoflurane (Induction 3%, maintenance 2,5%) and local analgesia with lidocaine (2mg/kg s.c. 5min prior incision, LID001 Lidor 20mg/ml, Centravet), the skin of the right leg (ipsilateral) was shaved and incised, the sciatic nerve was isolated, and 3 nodes were done with suture thread (Ethilon 5-0, ref F3209G, Ethicon, USA). It was then repositioned and the skin sewn back on. Control mice undergo the same procedure except the nodes on the nerve (sham group). During awakening, mice were placed on a warmed clean home cage. The surgical site and the weight were checked daily for three days after surgery and the overall health monitored for one week to detect any infection. Endpoints were determined before and validated by the ethical committee.

### **Assessment of mechanical allodynia**

Mechanical allodynia was assessed with von Frey filaments (Bioseb, Vitrolles, France), according the up & down method (Chaplan et al., 1994). Calibrated von Frey filaments were applied on the hind paw, starting at 0,4g. Depending on whether the animal responded to this stimulation, the higher or lower grammage filament is tested next. The response/non-response sequence was used to determine a sensitivity threshold. Before the surgery, mice had one week of acclimatization to the experimental device then basal threshold was evaluated 5 consecutive days. In neuropathic pain model, controlateral paw was used as internal control.

### **Assessment of thermal allodynia**

Thermal cold allodynia was evaluated with a cold plate apparatus. Mice were placed 5 min each on a plate cooled to 4°C, from which they cannot escape, and each paw lift was scored. basal sensitivity to cold of the animals was evaluated before the surgery using the same protocol.

### **Inflammatory pain model**

To induce an inflammatory pain, CFA was injected at the base of the tail (20µL, s.c., 24G needle with Hamilton syringe). Before injection, mice were accustomed to the manipulation and the test device during one week. The basal nociceptive threshold of the animals was then measured daily for 5 days. The development of hyperalgesia was observed 72h after the CFA injection. Mechanical hyperalgesia was measured with an instrumented rodents' pincher (RP1, Bioseb). A gradual pressure was applied to the base of the tail, near the site where the inflammatory agent was injected until the animal removes its tail, indicating the pressure necessary to induce a withdrawal reflex of the tail.

Warm thermal nociception was assessed by the tail immersion test. The distal two-thirds of the mouse tail were placed in water at 46,5°C. The time taken to observe the tail withdrawal reflex was monitored. All measures were done in triplicates during baseline and in duplicate during testing, mechanical and thermal nociception were evaluated on the same animals.

### **Treatment procedures**

Agonist treatment was performed when hyperalgesia or allodynia were established. In inflammatory pain model, hyperalgesia was evaluated by tail immersion test and tail pressure test before each SNC80 administration to assess the hyperalgesia of mice. The agonist, SNC80, was diluted in saline solution (NaCl 0,9%) and placed in acidic conditions (6mM HCl) at a concentration of 1mg/mL. In inflammatory pain model, two injections (10mg/kg, ip) were performed at four-hour intervals to induce analgesic tolerance, and then daily. Nociceptive threshold was evaluated 45min after each SNC80 administration (Pradhan et al., 2010, p. 20). Naltrindole (5mg/kg, sc,) was administered 20 min prior to SNC80 (Kremer et al., 2016). In neuropathic pain model, SNC80 (10mg/kg, ip) was administered daily, during 7 to 9 days. Mechanical allodynia was measured daily and for cold allodynia only one test was performed when analgesic tolerance was established. Animals were divided according to genotypes in equilibrate groups, from 8 to 12 mice per group.

### **Dissections**

Brains, spinal cords and DRG were collected 4 or 24 hours after the last behavioral measurement. For the biochemical analysis that needed lysis of the tissues (radioligand binding, Western blot, immunoprecipitation...), mice were killed by cervical dislocation, brain was removed, spinal cord collected by the flush method and DRG were dissected using micro-scissors. Organs were frozen on dry ice as soon as possible. For immunohistochemical section imaging experiments, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (100 mg/kg of Imalgène 1000 Boehringer Ingelheim Animal Health, Lyon, France + 10 mg/kg of Rompun 2% ; Bayer HealthCare, Kiel Germany, respectively) and perfused intracardially with flow rate of 10mL/min, during 2 min with Phosphate buffer saline (PBS, 137mM NaCl ; 2,7mM KCl ; 4,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O ; 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH = 7,3) to remove blood from the vascular system. Then tissues were fixed with PFA, 4% (from EM-15714-S 32%, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, UK) diluted in 1x PBS, for 5 minutes. Organs were post-fixed in the same PFA solution for 24h, cryoprotected in sucrose (30% diluted in PBS) for 24h at 4°C before being embedded in Cryomatrix (Optimal Cutting Temperature medium, ref 6769006, Thermo scientific, UK) and kept frozen at -80°C.

### **Brain membrane extracts**

1,5mL of ice-cold buffer (Tris HCl 50mM, EDTA 1mM, sucrose 0,25M; pH 7,4) were added to a freshly defrosted brain. Brain was grinded 3 times for 6 sec at speed 4 with and Ultraturrax and the device was rinsed with and additional 1,5mL of buffer, added to the lysate. The sample was centrifugated at 500g during 5min (4°C). The supernatant was collected and the pellet resuspended in 1,5mL of buffer prior to an additional grinding cycle. Grinding and rinsing were repeated as for the first cycle. The samples were centrifugated at 1100g for 10 min at 4°C. Supernatant was added to the first one collected. All samples were completed to 14mL and membrane fragments were pelleted by ultracentrifugation, at 40 000rpm 30min 4°C. A second ultracentrifugation was processed to clean any trace of agonist remaining on the cells. The pellet was then resuspended in 1,5 mL of buffer and homogenized with a Dounce. The protein concentration was quantified by the Bradford method, according to manufacturer instructions (Bradford reagent, ref B6916, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Membrane extracts were store at -80°C.

### **Binding experiments**

To proceed to quantification of DOR binding sites, <sup>3</sup>H-Deltorpin II and 100µg of brain membranes were incubated in binding buffer (50mM Tris HCl, 1mM EDTA) in absence or presence of 1 µM naltrexone hydrochloride during 2h at 25°C under agitation. The receptor-ligand complexes were filtered using a cell harvester apparatus (Brandel, Alpha Biotech Ltd, London, UK), on a glass fiber filters (Whatman GF/B; GE Healthcare, Saclay, France) preincubated with a polyethyleneimine solution containing 50mM Tris HCl pH 7,4 and 0,5% PEI (P3143, Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA). Filters were then placed in scintillation counting vial (S207-5, Snap Twist, Simport, Beloeil, Quebec, Canada) with 2,5 mL of scintillation cocktail (Ultima Gold, 6013159, Perkin Elmer, Boston, MA, USA). After 12 h of incubation the radioactivity in each tube was quantified by scintillation counting on a Tricarb 4810 apparatus. To determine the maximum of possible binding (B<sub>max</sub>), a range of concentrations of <sup>3</sup>H-Deltorpin II from 0,09nM to 6,4nM was used. Background was determined with 1µM naloxone hydrochloride. Once the B<sub>max</sub> determined by extrapolation of the saturation curve (on GraphPad Prism), samples from animals used for dose-effect evaluation were tested at a single saturating concentration of <sup>3</sup>H-Deltorpin II (4nM).

### **Immunoprecipitations**

Membrane proteins from the different samples were extracted in lysis buffer (50mM tris HCl pH7,4, 150mM NaCl, 1% Nondiet P40, 0,25% sodium deoxycholate, 0,1% sodium dodecylsulfate (SDS) containing protease inhibitors (Complete, Roche, ref: 11873580001). For lumbar spinal cord, 5 ceramic beads were used per animal. Tissue weight was between 10 and 20mg and 350µL of lysis buffer without detergents were added. Organs were kept frozen until the lysis in Bioprep-24R. They were grinded at 4°C



by 2 cycles of 12 sec at 4260 rpm, with a 5 sec interruption in between. The lysates were then centrifuged at 4°C for 10 min at 500g. The supernatant was collected and detergents were added according to the supernatant volume and the volume of each sample was then completed to 1.2 mL with complete lysis buffer. For the dorsal root ganglia, 6 to 8 lumbar DRG of 3 mice of the same genotype and treatment group were pooled in a single microtube. DRG were kept frozen as long as possible. The grinding was realized with 250 mg of glass beads (0,6mm) per sample and 350 µL of complete lysis buffer, in a tissue homogenizer Bioprep-24R cooled to 4°C, during 2 cycles of 15 seconds at 4260 rpm, with a 5 sec interruption in between. Samples were then centrifuged at 4°C for 10min at 16 000 g, to eliminate the foam before collecting the supernatant. A second round of lysis was performed with 350µL of buffer added to the pellet with the beads. Again, samples were centrifuged and supernatant added to the first collected. Volume was completed with lysis buffer to 1,2mL. For both spinal cord and DRG, samples were then placed for one hour at 4°C on a turning wheel and lysates were centrifugated for 15min at 16 000g (4°C) to eliminate the unsolubilized structures. Quantity of protein obtained after lysis was evaluated by Pierce™ BCA Protein Assay (23225, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). In each experiment replicate, an equal amount of proteins (around 0,5 mg for spinal cord and 0,2 to 0,4mg for DRG) was incubated with 20µL (spinal cord) or 15µL (DRG) of GFP-trap magnetic beads (GTMA-20, ChromoTek GmbH, Planned-Martinsried, Germany) for 16h at 4°C on a turning wheel. Beads were then washed three times with lysis buffer. Immunoprecipitated proteins were separated from the beads with 20 µL of 4X Laemmli buffer (50mM TrisHCl pH 6,8; 6mM urea; 6% of β-mercaptoéthanol; 3% of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS); bromophenol blue).

### **Western blot analysis**

Samples from brain membrane extracts or immunoprecipitation, were resolved by SDS-PAGE. Samples were mixed to 4X Laemmli buffer to obtain a final quantity of protein of 50 µg in 1X Laemmli buffer, shaken for 15min and heated for 3 min at 95°C just before being loaded on the gel. Gels were transferred to PVDF membranes (Immobilon R P, Membrane PVDF 0,45µm, IPVH00010, Merk Millipore, Darmstadt, Germany) by electrotransfer at 30V and 4°C in transfer buffer (25mM Tris HCl pH 7,4 ; 192mM glycine ; 0,01% SDS, 10% Ethanol). Membranes were then saturated in phosphate-buffered saline (PBS pH 7,4) containing 0,1% Tween and 5% non-fat dry milk (w/vol) for one hour before incubating with a primary antibody. Primary antibodies were incubated 2 to 3 hours at room temperature or ON at 4°C with shaking. If required, after 2 quick and 5 longs (5-5-15-5-5min) washes, the relevant secondary antibody coupled with horse radish peroxidase was incubated (1h at RT). Primary and secondary antibodies were diluted and incubated as described in **Table 2**. Chemiluminescence was used to reveal signal, by Immobilon<sup>R</sup> Western (Chemiluminescent HRP substrate, P90720 WBKLS0500, Merk Millipore, Burlington, Vermont, USA) on a luminescent image analyzer (Amersham Imager 680, GE Healthcare Bio-science AB, Uppsala, Sweden) and protein expression was quantified by ImageQuant<sup>TM</sup> TL software. If another antibody was revealed in the

same samples, membranes were desorbed with tris-glycine solution (0.2M HCl, 0.4M Glycine in PBS pH7,4) and rinsed with PBS before incubation with 5% milk buffer.

### **Co-immunoprecipitations**

Immunoprecipitations of DOR were done on samples from DOR-eGFP ± GPRASP1-KO mice collected and frozen in dry ice before storage at -80°C. All the procedure was performed at 4°C and samples kept on ice as much as possible. In a 5mL tube, frozen brain were placed with 20 ceramic beads (1,4 mm diameter), and 3 mL of lysis buffer, composed of 0,5% n-Dodecyl β-D-Maltopyranoside (DDM), 0,3% 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 7,5mM iodoacétamide, cOmplete™ protease inhibitor cocktail 1x (11873580001, Roche, Darmstadt, Germany), phosphatase inhibitor (PhosSTOP 4906837001, Sigma-aldrich, France) 20mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) pH7,8 and 50mM NaCl, were added to each brain just before grinding. 2 cycles of 15 sec at 4260 rpm with a 5 sec interruption in between were performed on bioprep-24R (Allsheng). Samples were then centrifuged at 12 000g for 10min to eliminate foam before collecting the supernatant. 3 mL of lysis buffer were then added to the pellet before a novel cycle of homogenization. Supernatants were then collected and incubated on a turning wheel at 4°C for 90 min. Debris not solubilized by lysis were then removed by centrifugation at 16 000 g 30 min at 4°C. A pre-clarification was realized on lysate with 40μL of empty agarose beads (Bab-20 from Chromotek) under on agitation during 30min. Supernatant was removed from beads by centrifugation for 5 min at 2500 g before and proteins were quantified by the Bradford method. 10 mg of proteins were then mixed with 40μL GFP-Trap agarose beads agarose (GTA-20, Chromotek) previously conditioned with the lysis buffer. Samples were then incubated for 16 h on a turning wheel at 4°C. The supernatant was removed after centrifugation at 5min at 2500g. Three washes (Wash buffer with the same composition than lysis buffer except inhibitors) were done prior to extract immunoprecipitated material from GFP-beads in elution buffer (50mM Tris HCl 50mM DTT 1% SDS 1mM EDTA, 0,005% bromophenol blue, 10%glycerol) in which samples were stored before analysis.

### **MS analysis**

#### ***In vivo* phosphorylation studies**

The kinetic of phosphorylation of DOR was assessed by Western blot on brain coimmunoprecipitations. DOR-eGFP ± GPRASP1-KO mice brains were collected from groups with no CFA-inflammation, CFA-inflammation and CFA-inflammation + SNC80 treatment (n=3 per group). A DOR-WT group was used as negative control. First, CFA (20μL, s.c.) was injected to induce inflammation and SNC80 (10mg/kg, i.p.) was administered three days later. Mice were sacrificed 15min, 30min, 2h, 4h and 24h after SNC80 injection. In a last group of animals, a second administration of SNC80 was performed 24h after the

first one and organs were collected 30min later. Brains were immediately frozen on dry ice and stored at -80°C. Immunoprecipitation experiments and SDS-PAGE were performed as described above. Phosphorylation of Threonine 361 and Serine 363 was revealed in two separate experiments with corresponding antibodies (**Table 2**).

### **Immunohistochemistry**

Brain and spinal cord sections were cut at 25 µm and DRG at 10 µm thick with a cryostat (Leica CM3050S) and stuck on slide (super frost plus Eprelia J1800AMNZ) at room temperature prior storing at -20°C. Immunohistochemistry experiments were performed as described (Erbs et al., 2015). Sections were permeabilized and saturated during 1 hour in the blocking solution (1x PBS pH 7,4, 0,5% Triton x100 (93443-500ML, Sigma, St Louis, MO, USA), 3% NGS (normal goat Serum PCN5000, Gibco, Frederick MD, USA, inactivated) and 1% Bovine serum albumin (BSA, A3912-100G Sigma, St Louis, MO, USA). Then, each slide was circled by hydrophobic barrier (EM-71312 SUPER PAP PEN, SMALL, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, UK) and incubated with primary antibody, diluted in blocking solution at the appropriate concentration, at 4°C overnight. After 3 washes of 5min, the secondary antibody conjugated to AlexaFluor488 was added and incubated for 2 hours at room temperature. After 3 washes, nucleus were stained by 4', 6- diamidino-2-phenylindole (DAPI) (D9542-1mg, Sigma, St Louis, MO, USA) at 0,5 µg/ml for 5 min, and after three washes, slices were mounted in Prolong Gold (Prolong gold antifade reagent P36930 Invitrogen Eugene, Oregon, USA) under borosilicate coverglasses (Ref 631-0146, VWR, Leuven, Belgium), dried for 12h at room temperature and store at 4°C until analysis.

### **Images acquisitions**

Global slides acquisition was performed as described (Erbs et al. 2016), with the slide scanner Nanozoomer 2 HT and fluorescence module L11600-21 (Hamamatsu Photonics, Japan). The light source LX2000 (Hamamatsu Photonics, Japan) is an ultra-high-pressure mercury lamp coupled to an optical fiber. The filter set was designed for DAPI and fluorescein detection and a single RGB acquisition was made in epifluorescence. Images taken with dry 20x objective (NA: 0.75) were converted in 40x with a lens converter (resolution 0,23µm/pixel). To quantify membrane receptors, positive neurons were imaged with confocal microscope (TCS SPEII scanner Leica) using 63x (Plan Apochromat NA : 1.40) oil immersion objective and acquired with LCS (Leica) software at the Plateforme d'Imagerie Quantitative (PIQ, Faculty of Pharmacy, Strasbourg). Pictures were acquired in 2048x2048 pixels. Fluorescent light EL6000 with lasers 405 (25mW for DAPI) and 562 (10mW for GFP) permitted an acquisition in sequential mode (single excitation beams) to avoid fluorescent emissions crosstalk.

### **Images analysis**

Global positive neurons were detected from Nanozoomer files with NDPview software. Cellular distribution of DOR-eGFP signal was quantified from confocal images (n=68-77) on Icy software, thanks to a macro described in (Wang et al., 2023). GFP-positive cells were selected and manually delimited, then GFP/Alexafluor488 fluorescence intensity was measured in the subplasmalemmal zone (4 pixels wide). To obtain a percentage, the subplasmalemmal fluorescent was multiplied by the compartment surface and then reported to whole cell fluorescence multiplied by the cell surface.

## Data analysis

Statistical analyses were performed with Graph-Pad Prism v5 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Two-way ANOVA (treatment genotype) analysis was used to compare the analgesic effect of SNC80 and tolerance development. One-way ANOVA analysis with multiple comparison followed by Tukey's *post hoc* analysis was performed to compare changes between SNC80 treated groups and vehicle from DOReGFP/GPRASP1-WT and DOReGFP/GPRASP1-KO.

## Acknowledgments

This work was supported by the CNRS, LABEX Medalis (ANR-10- LABX-0034, Programme d'investissement d'avenir), Région Grand Est and graduate school of pain EURIDOL of the University of Strasbourg, (ANR- 17-EURE-0022, Programme d'investissement d'avenir). We thank Chronobiotron, Plateforme d'Imagerie *in vitro*, PIQ and PCBIS platforms for technical assistance.

## References

Abu-Helo, A., Simonin, F., 2010. Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs). *Pharmacol Ther* 126, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.03.004>

Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., Amraei, M., Chabot-Doré, A.-J., Millecamps, M., Stone, L.S., Pineyro, G., 2012. Differential Association of Receptor-G $\beta\gamma$  Complexes with  $\beta$ -Arrestin2 Determines Recycling Bias and Potential for Tolerance of Delta Opioid Receptor Agonists. *J Neurosci* 32, 4827–4840. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012>

Bagheri Tudashki, H., Haddad, Y., Charfi, I., Couture, R., Pineyro, G., 2020. Ligand-specific recycling profiles determine distinct potential for chronic analgesic tolerance of delta-opioid receptor (DOPr) agonists. *J Cell Mol Med* 24, 5718–5730. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15234>

Bartlett, S.E., Enquist, J., Hopf, F.W., Lee, J.H., Gladher, F., Kharazia, V., Waldhoer, M., Mailliard, W.S., Armstrong, R., Bonci, A., Whistler, J.L., 2005. Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11521–11526. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502418102>

Boeuf, J., Trigo, J.M., Moreau, P.-H., Lecourtier, L., Vogel, E., Cassel, J.-C., Mathis, C., Klosen, P., Maldonado, R., Simonin, F., 2009. Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1-deficient mice. *Eur J Neurosci* 30, 860–868. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06865.x>

Bornert, O., Møller, T.C., Boeuf, J., Candusso, M.-P., Wagner, R., Martinez, K.L., Simonin, F., 2013. Identification of a Novel Protein-Protein Interaction Motif Mediating Interaction of GPCR-Associated Sorting Proteins with G Protein-Coupled Receptors. *PLoS One* 8, e56336.

Buenaventura, T., Kanda, N., Douzenis, P.C., Jones, B., Bloom, S.R., Chabosseau, P., Corrêa, I.R., Bosco, D., Piemonti, L., Marchetti, P., Johnson, P.R., Shapiro, A.M.J., Rutter, G.A., Tomas, A., 2018. A Targeted RNAi Screen Identifies Endocytic Trafficking Factors That Control GLP-1 Receptor Signaling in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes* 67, 385–399. <https://doi.org/10.2337/db17-0639>

Cahill, C.M., Walwyn, W., Taylor, A.M.W., Pradhan, A.A.A., Evans, C.J., 2016. Allostatic mechanisms of opioid tolerance beyond desensitization and downregulation. *Trends in Pharmacological Sciences* 37, 963–976. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.08.002>

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* 53, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)

Chu Sin Chung, P., Boehrer, A., Stephan, A., Matifas, A., Scherrer, G., Darcq, E., Befort, K., Kieffer, B.L., 2015. Delta opioid receptors expressed in forebrain GABAergic neurons are responsible for SNC80-induced seizures. *Behav Brain Res* 278, 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.029>

Chu Sin Chung, P., Kieffer, B.L., 2013. Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacol Ther* 140, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.003>

Conibear, A.E., Asghar, J., Hill, R., Henderson, G., Borbely, E., Tekus, V., Helyes, Z., Palandri, J., Bailey, C., Starke, I., von Mentzer, B., Kendall, D., Kelly, E., 2020. A novel g protein-biased

agonist at the  $\delta$  opioid receptor with analgesic efficacy in models of chronic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 372, 224–236. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.258640>

Dahlhamer, J., Lucas, J., Zelaya, C., Nahin, R., Mackey, S., DeBar, L., Kerns, R., Von Korff, M., Porter, L., Helmick, C., 2018. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 67, 1001–1006. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>

Degrandmaison, J., Abdallah, K., Blais, V., Génier, S., Lalumière, M.-P., Bergeron, F., Cahill, C.M., Boulter, J., Lavoie, C.L., Parent, J.-L., Gendron, L., 2020. In vivo mapping of a GPCR interactome using knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 13105–13116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917906117>

Dripps, I.J., Boyer, B.T., Neubig, R.R., Rice, K.C., Traynor, J.R., Jutkiewicz, E.M., 2018. Role of signalling molecules in behaviours mediated by the  $\delta$  opioid receptor agonist SNC80. *Br J Pharmacol* 175, 891–901. <https://doi.org/10.1111/bph.14131>

Dripps, I.J., Wang, Q., Neubig, R.R., Rice, K.C., Traynor, J.R., Jutkiewicz, E.M., 2017. The role of regulator of G protein signaling 4 in delta-opioid receptor-mediated behaviors. *Psychopharmacology* 234, 29–39. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4432-5>

Erbs, E., Faget, L., Ceredig, R.A., Matifas, A., Vonesch, J.-L., Kieffer, B.L., Massotte, D., 2016. Impact of chronic morphine on delta opioid receptor expressing neurons in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 313, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.022>

Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J.-L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M.-C., Koutsourakis, M., Vasseur, L., Veinante, P., Kieffer, B.L., Massotte, D., 2015. A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct* 220, 677–702. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0717-9>

Faget, L., Erbs, E., Le Merrer, J., Scherrer, G., Matifas, A., Benturquia, N., Noble, F., Decossas, M., Koch, M., Kessler, P., Vonesch, J.-L., Schwab, Y., Kieffer, B.L., Massotte, D., 2012. In vivo visualization of delta opioid receptors upon physiological activation uncovers a distinct internalization profile. *J Neurosci* 32, 7301–7310. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0185-12.2012>

Fayaz, A., Croft, P., Langford, R.M., Donaldson, L.J., Jones, G.T., 2016. Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies. *BMJ Open* 6,

e010364. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010364>

Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2011. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol* 22, 405–414. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32834a1f2c>

He, C., Wei, Y., Sun, K., Li, B., Dong, X., Zou, Z., Liu, Y., Kinch, L.N., Khan, S., Sinha, S., Xavier, R.J., Grishin, N.V., Xiao, G., Eskelinen, E.-L., Scherer, P.E., Whistler, J.L., Levine, B., 2013. Beclin 2 Functions in Autophagy, Degradation of G Protein-Coupled Receptors, and Metabolism. *Cell* 154, 1085–1099. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.035>

Heydorn, A., Søndergaard, B.P., Ersbøll, B., Holst, B., Nielsen, F.C., Haft, C.R., Whistler, J., Schwartz, T.W., 2004. A Library of 7TM Receptor C-terminal Tails: interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins erm-binding phosphoprotein 50 (EBP50), *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein(GASP). *J. Biol. Chem.* 279, 54291–54303. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406169200>

Humphreys, K., Shover, C.L., Andrews, C.M., Bohnert, A.S.B., Brandeau, M.L., Caulkins, J.P., Chen, J.H., Cuéllar, M.-F., Hurd, Y.L., Juurlink, D.N., Koh, H.K., Krebs, E.E., Lembke, A., Mackey, S.C., Ouellette, L.L., Suffoletto, B., Timko, C., 2022. Responding to the opioid crisis in North America and beyond: recommendations of the Stanford–Lancet Commission. *The Lancet* 399, 555–604. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02252-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02252-2)

Jullié, D., Benitez, C., Knight, T.A., Simic, M.S., von Zastrow, M., 2022. Endocytic trafficking determines cellular tolerance of presynaptic opioid signaling. *Elife* 11, e81298. <https://doi.org/10.7554/eLife.81298>

Kaeffer, J., Zeder-Lutz, G., Simonin, F., Lecat, S., 2021. GPRASP/ARMCX protein family: potential involvement in health and diseases revealed by their novel interacting partners. *Curr Top Med Chem* 21, 227–254. <https://doi.org/10.2174/1568026620666201202102448>

Kelly, E., Conibear, A., Henderson, G., 2023. Biased Agonism: Lessons from Studies of Opioid Receptor Agonists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 63, 491–515. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-052120-091058>

Khan, F., Mehan, A., 2021. Addressing opioid tolerance and opioid-induced hypersensitivity: Recent developments and future therapeutic strategies. *Pharmacology Research & Perspectives* 9, e00789. <https://doi.org/10.1002/prp2.789>

Kliwer, A., Schmiedel, F., Sianati, S., Bailey, A., Bateman, J.T., Levitt, E.S., Williams, J.T., Christie, M.J., Schulz, S., 2019. Phosphorylation-deficient G-protein-biased  $\mu$ -opioid receptors improve analgesia and diminish tolerance but worsen opioid side effects. *Nat Commun* 10, 367. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08162-1>

Kouhen, O.M., Wang, G., Solberg, J., Erickson, L.J., Law, P.Y., Loh, H.H., 2000. Hierarchical phosphorylation of delta-opioid receptor regulates agonist-induced receptor desensitization and internalization. *J Biol Chem* 275, 36659–36664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006788200>

Kremer, M., Salvat, E., Muller, A., Yalcin, I., Barrot, M., 2016. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience* 338, 183–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.057>

Kuramoto, K., Wang, N., Fan, Y., Zhang, W., Schoenen, F.J., Frankowski, K.J., Marugan, J., Zhou, Y., Huang, S., He, C., 2016. Autophagy activation by novel inducers prevents BECN2-mediated drug tolerance to cannabinoids. *Autophagy* 12, 1460–1471. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1187367>

Kurose, H., Katada, T., Amano, T., Ui, M., 1983. Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Journal of Biological Chemistry* 258, 4870–4875. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32507-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32507-9)

Lobingier, B.T., Hüttenhain, R., Eichel, K., Miller, K.B., Ting, A.Y., von Zastrow, M., Krogan, N.J., 2017. An approach to spatiotemporally resolve protein interaction networks in living cells. *Cell* 169, 350-360.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.022>

Mann, A., Liebetrau, S., Klima, M., Dasgupta, P., Massotte, D., Schulz, S., 2020. Agonist-induced phosphorylation bar code and differential post-activation signaling of the delta opioid receptor revealed by phosphosite-specific antibodies. *Sci Rep* 10, 8585. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65589-7>

Marley, A., Von Zastrow, M., 2010. Dysbindin Promotes the Post-Endocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors to Lysosomes. *PLoS ONE* 5, e9325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009325>

Martini, L., Thompson, D., Kharazia, V., Whistler, J.L., 2010. Differential Regulation of Behavioral Tolerance to WIN55,212-2 by GASP1. *Neuropsychopharmacol* 35, 1363–1373.



<https://doi.org/10.1038/npp.2010.6>

Martini, L., Waldhoer, M., Pusch, M., Kharazia, V., Fong, J., Lee, J.H., Freissmuth, C., Whistler, J.L., 2007. Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *FASEB J.* 21, 802–811. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7132com>

Mittal, N., Roberts, K., Pal, K., Bentolila, L.A., Fultz, E., Minasyan, A., Cahill, C., Pradhan, A., Conner, D., DeFea, K., Evans, C., Walwyn, W., 2013. Select g-protein-coupled receptors modulate agonist-induced signaling via a ROCK, LIMK, and  $\beta$ -arrestin 1 pathway. *Cell Rep* 5, 1010–1021. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.015>

Nozaki, C., Le Bourdonnec, B., Reiss, D., Windh, R.T., Little, P.J., Dolle, R.E., Kieffer, B.L., Gavériaux-Ruff, C., 2012.  $\delta$ -Opioid Mechanisms for ADL5747 and ADL5859 Effects in Mice: Analgesia, Locomotion, and Receptor Internalization. *J Pharmacol Exp Ther* 342, 799–807. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.188987>

Obeng, S., Hiranita, T., León, F., McMahon, L.R., McCurdy, C.R., 2021. Novel Approaches, Drug Candidates, and Targets in Pain Drug Discovery. *J Med Chem* 64, 6523–6548. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00028>

Pradhan, A.A., Perroy, J., Walwyn, W.M., Smith, M.L., Vicente-Sanchez, A., Segura, L., Bana, A., Kieffer, B.L., Evans, C.J., 2016. Agonist-specific recruitment of arrestin isoforms differentially modify delta opioid receptor function. *J. Neurosci.* 36, 3541–3551. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4124-15.2016>

Pradhan, A.A.A., Becker, J.A.J., Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Massotte, D., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2009a. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS ONE* 4, e5425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005425>

Pradhan, A.A.A., Becker, J.A.J., Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Massotte, D., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2009b. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS One* 4, e5425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005425>

Pradhan, A.A.A., Walwyn, W., Nozaki, C., Filliol, D., Erbs, E., Matifas, A., Evans, C., Kieffer, B.L., 2010. Ligand-Directed Trafficking of the  $\delta$ -Opioid Receptor *In Vivo*: Two Paths Toward Analgesic Tolerance. *J. Neurosci.* 30, 16459–16468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3748-10.2010>

- Quirion, B., Bergeron, F., Blais, V., Gendron, L., 2020. The Delta-Opioid Receptor; a Target for the Treatment of Pain. *Front Mol Neurosci* 13, 52. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00052>
- Roeckel, L.-A., Le Coz, G.-M., Gavériaux-Ruff, C., Simonin, F., 2016. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience, Nociception, Pain, and Analgesia* 338, 160–182. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.029>
- Rosciglione, S., Theriault, C., Boily, M.-O., Paquette, M., Lavoie, C., 2014. Gas regulates the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Nat Commun* 5, 1–11.
- Schamiloglu, S., Lewis, E., Keeshen, C.M., Hergarden, A.C., Bender, K.J., Whistler, J.L., 2023. Arrestin-3 Agonism at Dopamine D3 Receptors Defines a Subclass of Second-Generation Antipsychotics That Promotes Drug Tolerance. *Biol Psychiatry* S0006-3223(23)01092–2. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2023.03.006>
- Scherrer, G., Tryoen-Tóth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, Y.Q., Basbaum, A.I., Dierich, A., Vonesh, J.-L., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2006. Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9691–9696. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603359103>
- Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y., 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *PAIN* 43, 205. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)91074-S](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)91074-S)
- Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J.J.-M., Matifas, A., Kieffer, B.L., 2004. Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J. Neurochem.* 89, 766–775.
- Stoeber, M., Jullié, D., Lobingier, B.T., Laeremans, T., Steyaert, J., Schiller, P.W., Manglik, A., von Zastrow, M., 2018. A genetically encoded biosensor reveals location bias of opioid drug action. *Neuron* 98, 963-976.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.021>
- Stone, L.S., Molliver, D.C., 2009. In search of analgesia: emerging roles of GPCRs in pain. *Mol Interv* 9, 234–251. <https://doi.org/10.1124/mi.9.5.7>
- Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubino, T., Martini, L., Swiercz, J., Mackie, K., Monyer, H., Parolaro, D., Whistler, J., Kuner, T., Kuner, R., 2007. A Molecular Basis of Analgesic Tolerance to Cannabinoids. *Journal of Neuroscience* 27, 4165–4177. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5648-06.2007>

Thompson, D., Martini, L., Whistler, J.L., 2010. Altered ratio of D1 and D2 dopamine receptors in mouse striatum is associated with behavioral sensitization to cocaine. *PLoS One* 5, e11038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011038>

Thompson, D., Whistler, J.L., 2011. Dopamine D3 receptors are down-regulated following heterologous endocytosis by a specific interaction with g protein-coupled receptor-associated sorting protein-1. *J. Biol. Chem.* 286, 1598–1608. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158345>

Tschische, P., Moser, E., Thompson, D., Vischer, H.F., Parzmair, G.P., Pommer, V., Platzer, W., Schwarzbraun, T., Schaidler, H., Smit, M.J., Martini, L., Whistler, J.L., Waldhoer, M., 2010. The G-protein Coupled Receptor Associated Sorting Protein GASP-1 Regulates the Signalling and Trafficking of the Viral Chemokine Receptor US28. *Traffic* 11, 660–674. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01045.x>

Vicente-Sanchez, A., Dripps, I.J., Tipton, A.F., Akbari, H., Akbari, A., Jutkiewicz, E.M., Pradhan, A.A., 2018. Tolerance to high-internalizing  $\delta$  opioid receptor agonist is critically mediated by arrestin 2. *BJP* 175, 3050–3059. <https://doi.org/10.1111/bph.14353>

Volkow, N.D., Blanco, C., 2021. The Changing Opioid Crisis: development, challenges and opportunities. *Mol Psychiatry* 26, 218–233. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0661-4>

Wang, Q., Wolf, A., Ozkan, S., Richert, L., Mely, Y., Chasserot-Golaz, S., Ory, S., Gasman, S., Vitale, N., 2023. V-ATPase modulates exocytosis in neuroendocrine cells through the activation of the ARNO-Arf6-PLD pathway and the synthesis of phosphatidic acid. *Front Mol Biosci* 10, 1163545. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1163545>

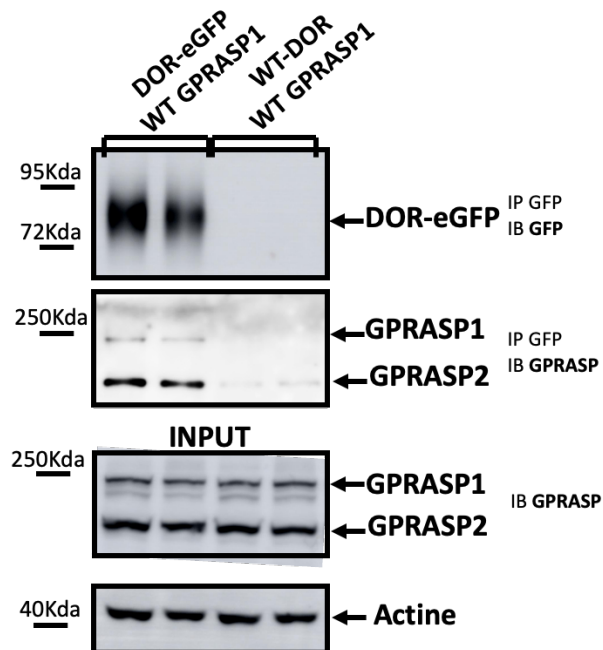
Whistler, J.L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S.R., von Zastrow, M., 2002. Modulation of Postendocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors. *Science* 297, 615–620. <https://doi.org/10.1126/science.1073308>

Zeder-Lutz, G., Bornert, O., Fellmann-Clauss, R., Knittel-Obrecht, A., Tranchant, T., Bouteben, S., Kaeffer, J., Quillet, R., Villa, P., Wagner, R., Lecat, S., Simonin, F., 2023. Characterization of anti-GASP motif antibodies that inhibit the interaction between GPRASP1 and G protein-coupled receptors. *Anal Biochem* 665, 115062. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115062>

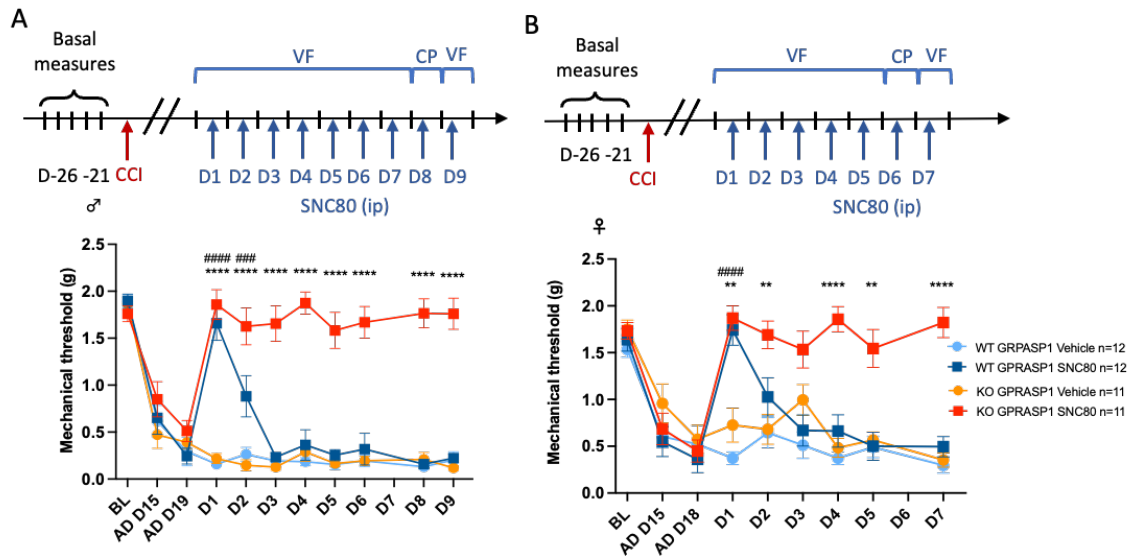
Zelaya, C.E., Dahlhamer, J.M., Lucas, J.W., Connor, E.M., 2020. Chronic Pain and High-impact Chronic Pain Among U.S. Adults, 2019. *NCHS Data Brief* 1–8.



## Figures and Tables

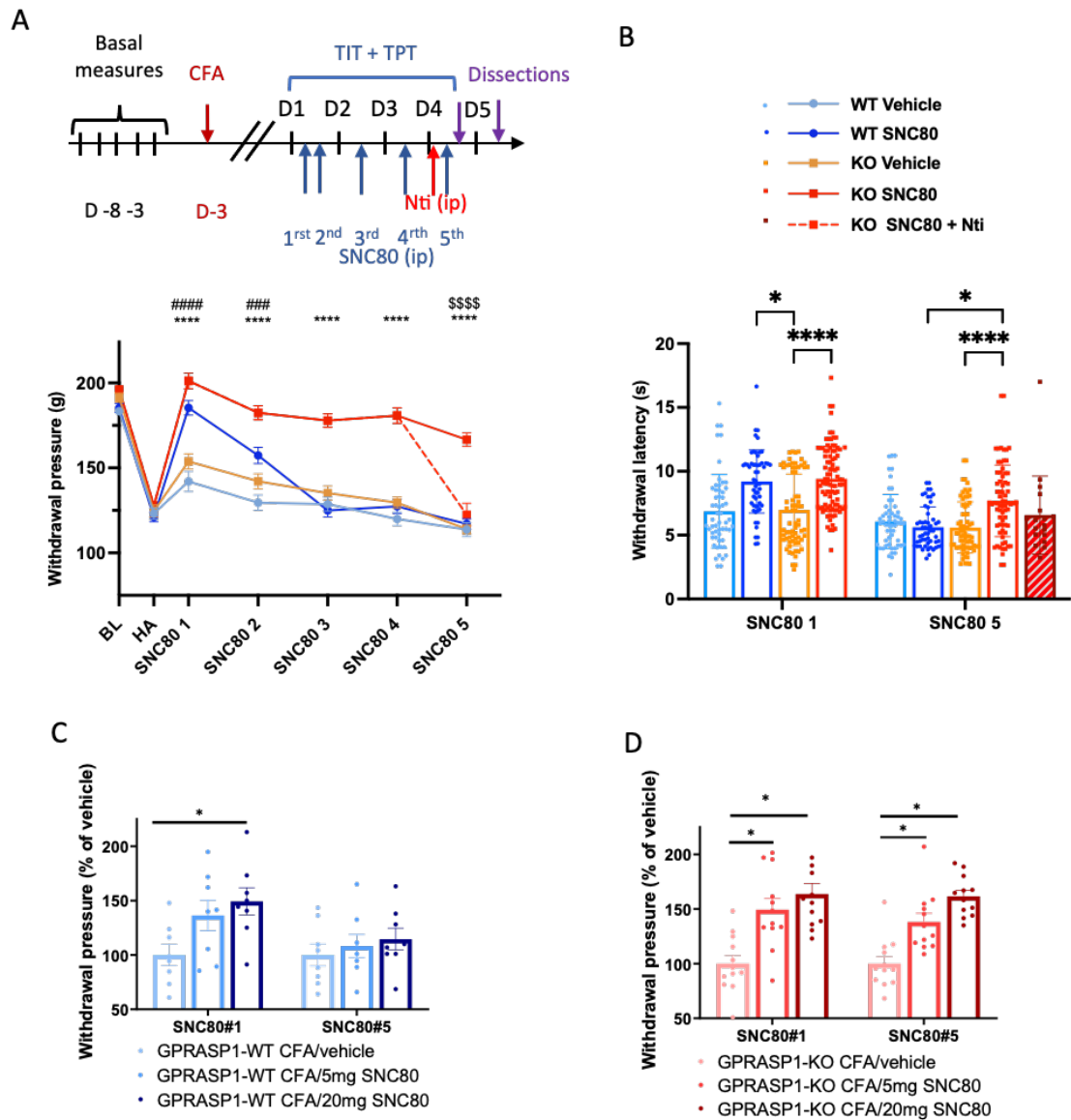


**Figure 1. GPRASP1 co-immunoprecipitates with DOR-eGFP from brain extracts of DOR-eGFP mice.** GPRASP1 co-immunoprecipitates with DOR-eGFP (lane 1 and 2) but not in negative control lysates expressing endogenous non-fluorescent WT-DOR (lane 3 and 4). Immunoprecipitation experiments were performed with agarose GFP-Trap beads using 10mg of proteins from DOR-eGFP and WT brain lysates. Co-immunoprecipitations were performed in duplicates.



**Figure 2. Analgesic tolerance to repeated SNC80 injections is absent in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice in a neuropathic pain model.**

Anti-allodynic effect and development of analgesic tolerance of SNC80 (10mg/kg, i.p.) have been studied on DOR-eGFP  $\pm$  GPRASP1-KO mice, in neuropathic pain model (CCI) by Von Frey test in two separate experiments on (A) males and (B) females. Measures, surgery (red arrow) and injections (blue arrow) are described for males (A) and females (B). After baseline measures, all mice received CCI surgery at right paw and allodynia development was assessed before SNC80 injections. BL: Baseline, AD: allodynia, D: day, CCI: chronic constriction injury, CP: cold plate test, VF: von Frey's test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM, (n = 11-12). Mixed effect analysis followed by a Tukey's multiple comparison post hoc test. # WT vehicle vs WT SNC80 \* KO vehicle vs KO SNC80. \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.0005, \*\*\*\*: p < 0.0001.

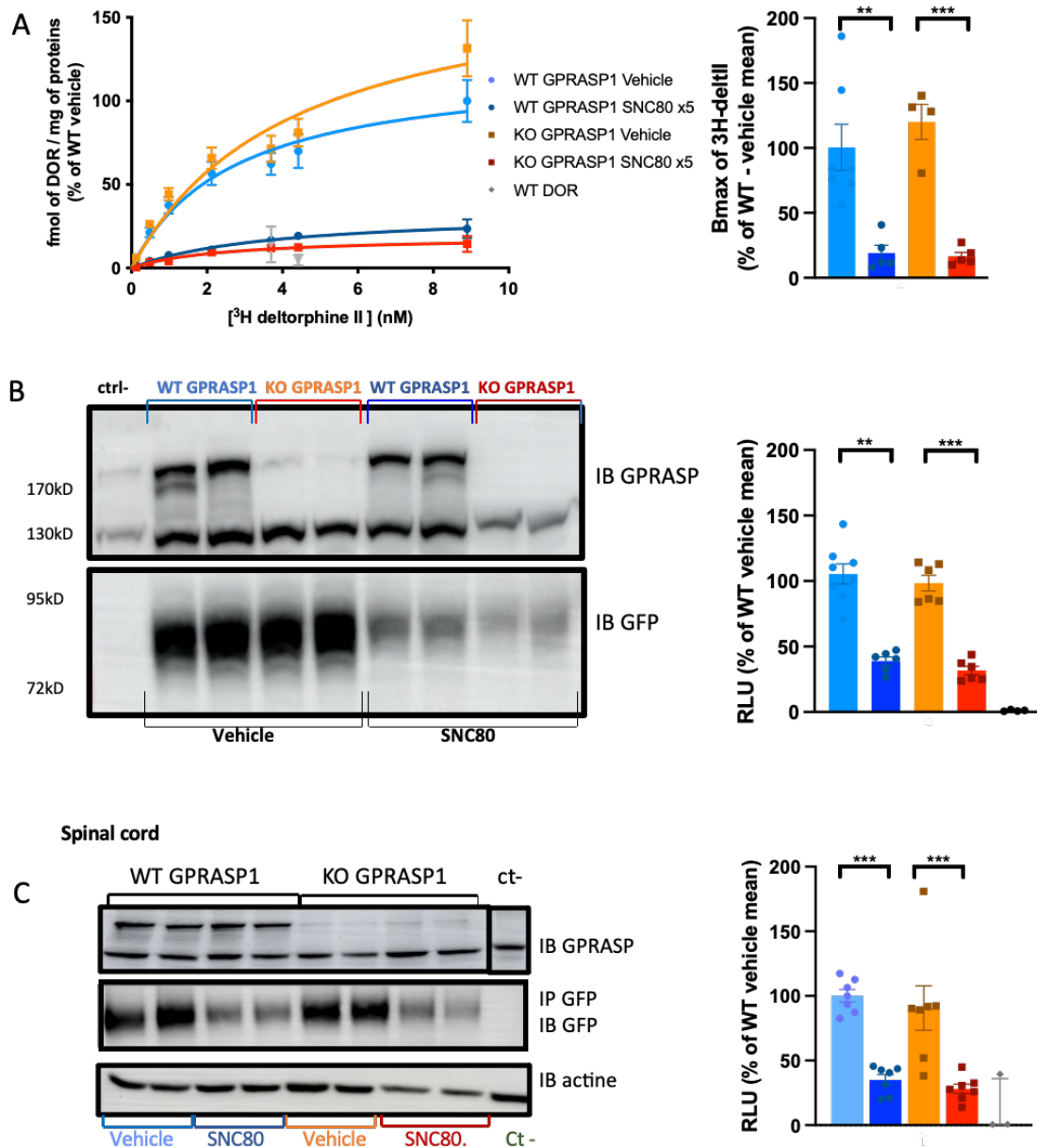


**Figure 3. Analgesic tolerance to repeated SNC80 injections is absent in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice in an inflammatory pain model.**

(A) Evaluation of analgesic tolerance in DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO male mice, after repeated administration of SNC80, in inflammatory pain model in mechanical nociception (tail pressure test) and (B) thermal nociception. Experimental design, with baseline measures prior to CFA administration (red arrow, 20 $\mu$ L of CFA s.c. in tail), followed 3 days later with SNC80 administration and consecutive measures (blue arrows, 10mg/kg i.p., measured 45min after injection). DOR specific response was assessed by selective antagonist naltindole co-administration (Nti, orange arrow, 5mg/kg i.p., 20min prior SNC80 injection). Brains, spinal cord and DRG were collected 6h after the last administration of SNC80 to proceed to biochemical analysis. (C, D) The dose-effect correlation of SNC80

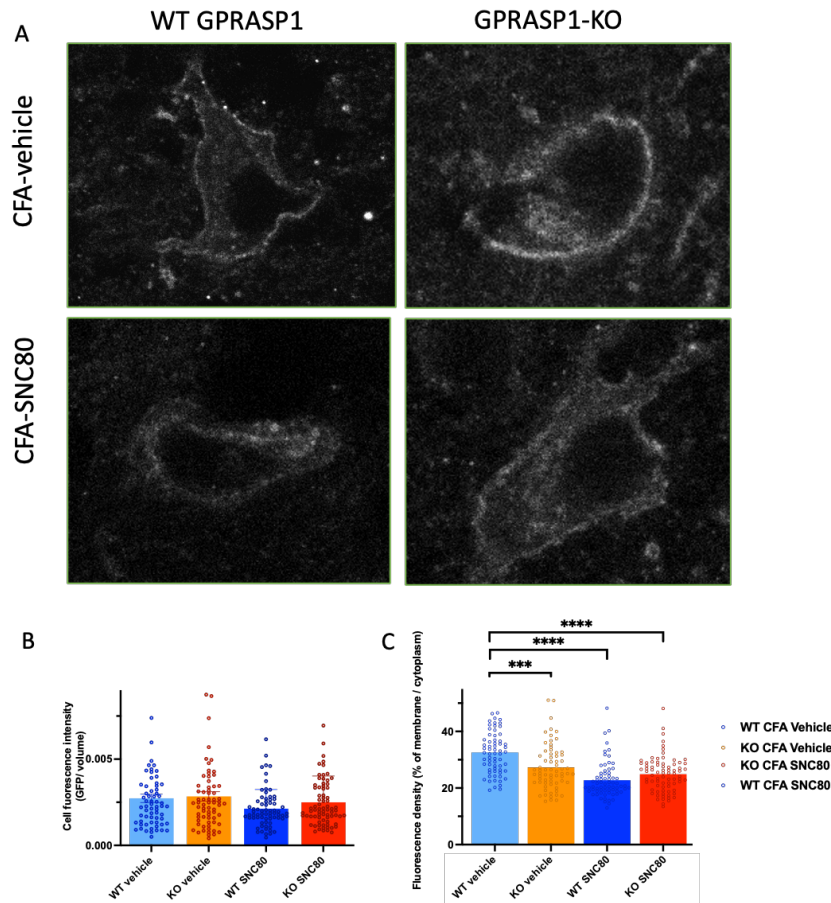
(5 ou 20mg/kg, i.p., evaluated 45min after administration) was evaluated in the same experimental design (A) by the tail pressure test, in DOR-eGFP/GPRASP1-WT mice (C) and in DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice (D). Values are represented as mean  $\pm$  SEM, (n= 8-9 for WT and n = 10-11 for KO). Statistical analysis by Two way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post hoc test, \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.0005, \*\*\*\*: p<0.0001.





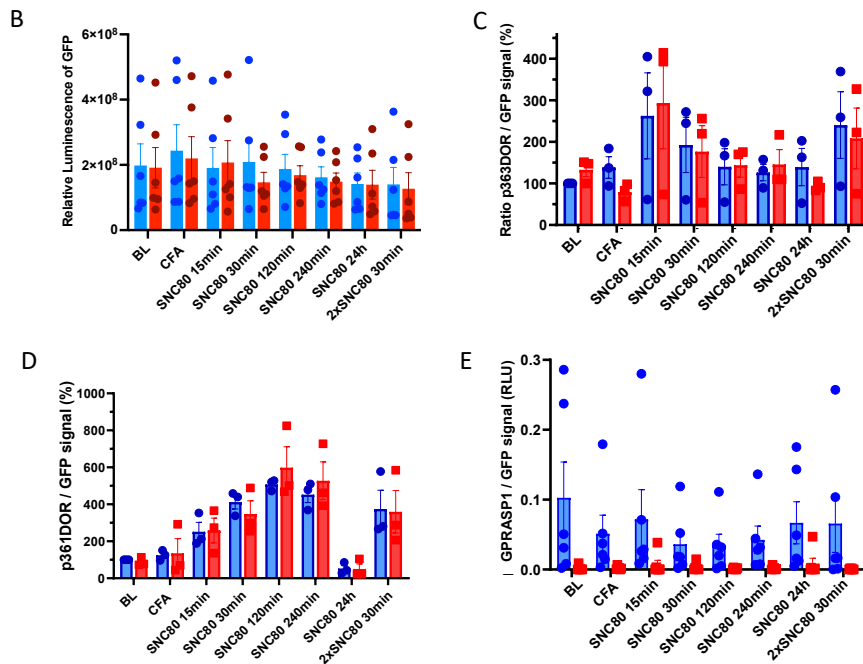
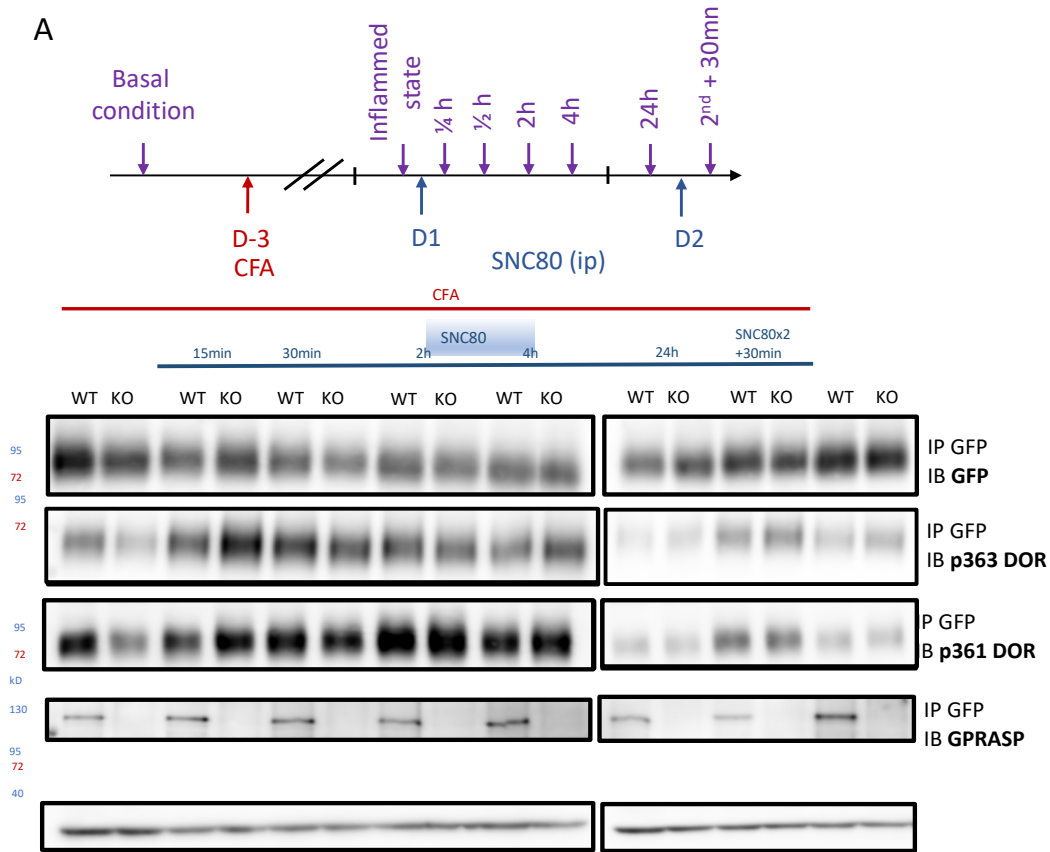
**Figure 4. SNC80-activated DOR is similarly degraded in DOR-eGFP/WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO**  
 Quantifications of DOR amount were performed (A, B) in the brain and (C) spinal cord of DOR-eGFP/GPRASP1-WT and DOR-eGFP/GPRASP1-KO treated with vehicle or SNC80. Brains and spinal cords were dissected out 6h after the fifth injection of SNC80 (A) Saturation curves of DOR-eGFP quantification in brain membranes by detection <sup>3</sup>H-deltorphin II bound to the receptor. Maximum binding (Bmax) was determined by extrapolation and expressed in % of the mean value of DOR-eGFP ( $\pm$ SEM), or (B) by detecting the GFP fused to the receptor with anti-GFP antibody in Western blot. Representative Western blots are shown (C) This degradation profile was confirmed by anti-GFP Western blots following GFP-immunoprecipitation of DOR-eGFP in the spinal cord. Representative

Western blots are shown. Means  $\pm$  SEM of n = 5-7 mice. Statistical analysis by One way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, \*\*: p < 0.01 \*\*\*: p < 0.001 \*\*\*\*: p < 0.0001.



**Figure 5. Plasma membrane DOR-eGFP localization is different in brain of DOR-eGFP/GPRASP1-WT versus DOR-eGFP/GPRASP1-KO mice.**

(A) Representative confocal images of DOR subcellular localization assessed by immunofluorescence of DOR (GFP revealed by anti-GFP and alexafluor 488) in brain slices of inflamed mice, 24h after the fifth SNC80 administration. (B) Total GFP intensity signal detected per cell, proportionally to the cell area (surface in pixels). (C) Proportion of DOR-eGFP in the sub-plasmalemmal compartment in percent of the whole fluorescence signal of the cell  $\pm$  SEM. N = 68-77 neurons were counted in each group. Statistical analysis by Two-way ANOVA analysis followed by Tukey's post hoc test. \*\*\*:  $p < 0.0005$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

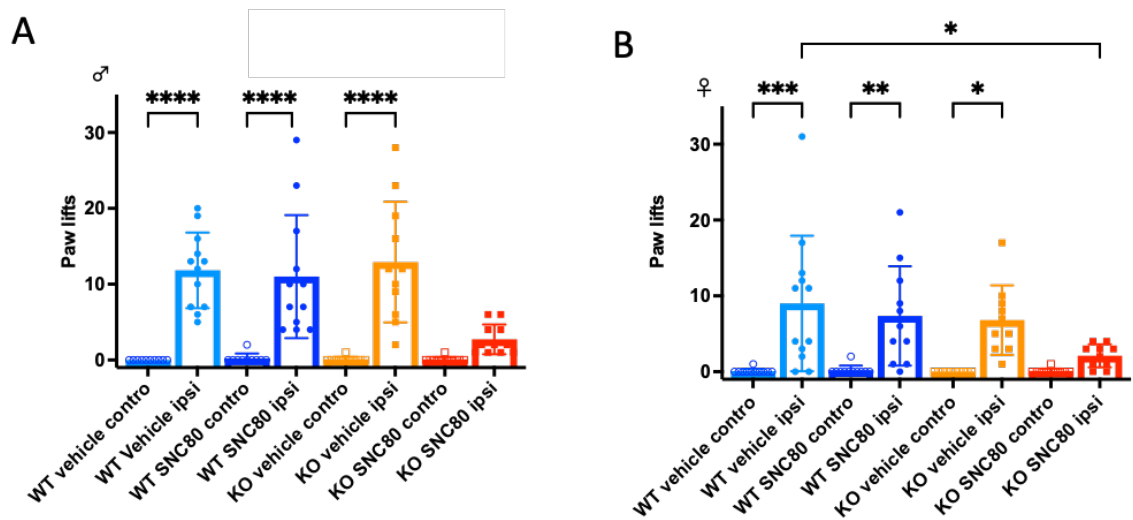


**Figure 6. Kinetics of DOR desensitization and of co-immunoprecipitation of GPRASP1 with DOR-eGFP as a function of time after SNC80 injections.**

Phosphorylation and degradation of DOR-eGFP were evaluated in inflamed condition and following one or two stimulations by SNC80 (10mg/kg, i.p.), and GFP-trap beads coimmunoprecipitation of DOR-eGFP from 10mg of protein brain extracts. (A) Representative Western blot of 1/10 of the

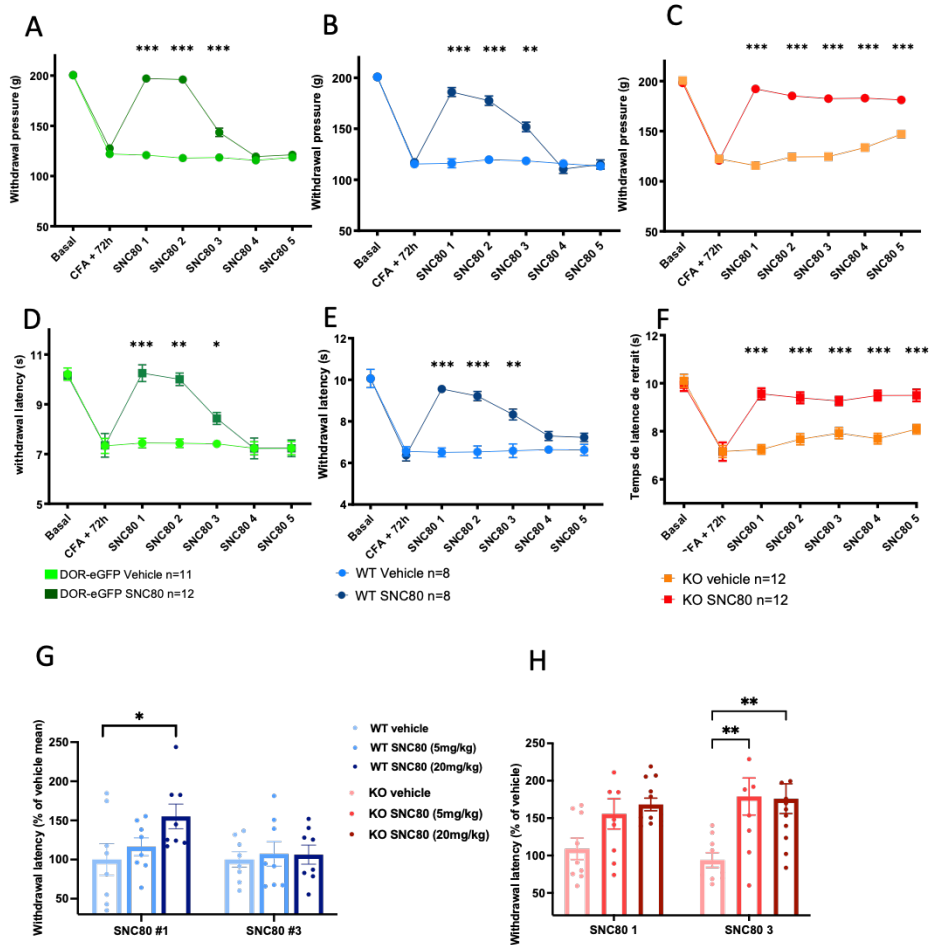
immunoprecipitated material. (B) No significant decrease of GFP could be seen after a single activation of DOR. (A, C) Phosphorylation of DOR-eGFP could be detected by Western blot. SNC80 produced a phosphorylation of 363 serine, maximal at 15min. (A,D) The 361 threonine was phosphorylated with a maximal at 2h after SNC80 administration to mice. (A,E). GPRASP1 was detected in association with DOR-eGFP in basal, inflamed and activated conditions.

SUPPLEMENTARY DATAS



**Supplementary figure 1: Anti-allodynic effect and development of analgesic tolerance to chronic SNC80 in DOR-eGFP ± GPRASP1-KO mice.** Anti-allodynic effect and development of analgesic tolerance to chronic SNC80 (10 mg/kg, i.p.) was studied neuropathic animals (CCI) by cold plate in two separate experiments on (A) males and (B) females. The ipsi paw was the right CCI paw and the contralateral was the left healthy paw. Cold allodynia was assessed at day 7 for males and day 5 for females, in each case analgesic tolerance was already established as measured with von Frey filaments.

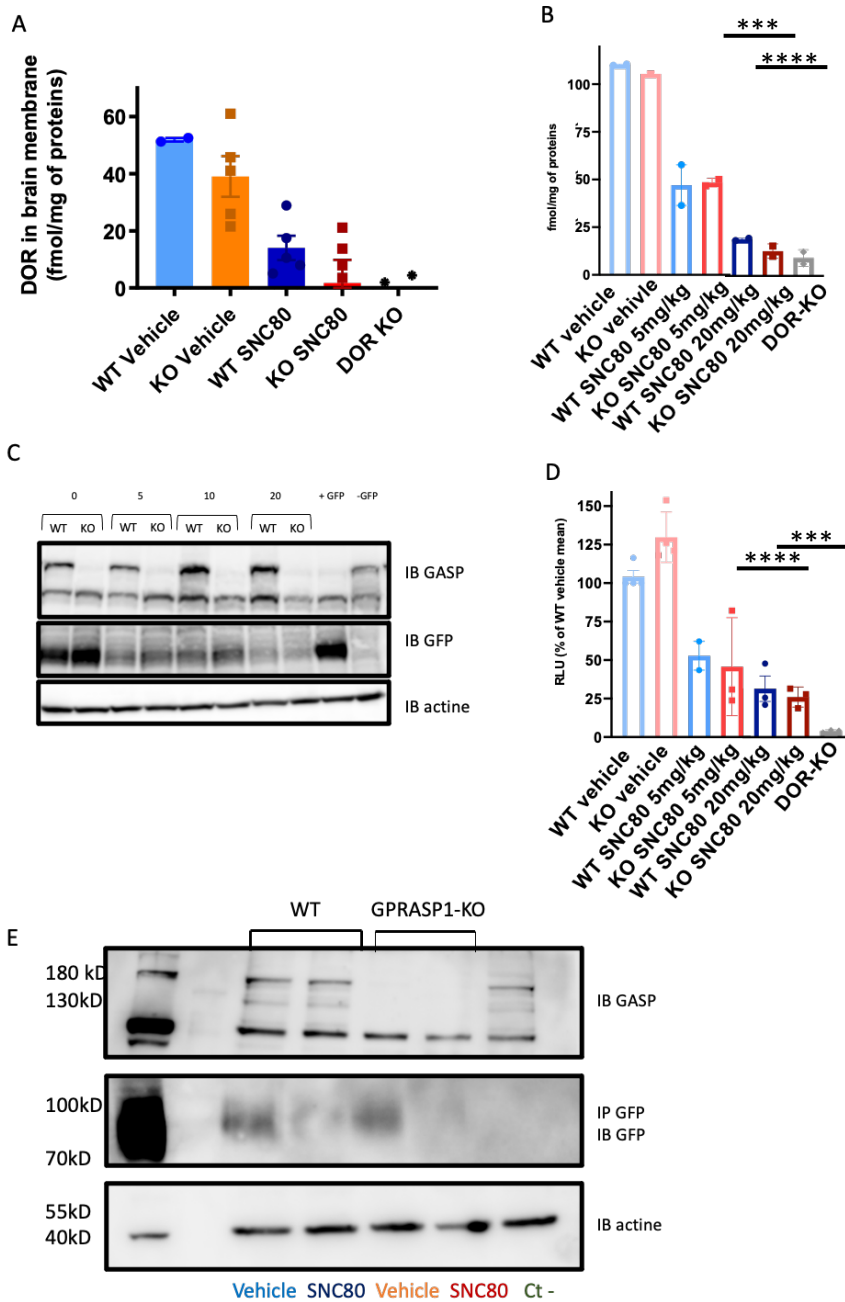
Data are shown as mean ± SEM with individual values. Statical analysis by One way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison post hoc test. P<0,05: \*, P< 0,005: \*\*, P< 0,0005: \*\*\*, P<0,0001: \*\*\*\*.



**Supplementary figure 2: SNC80 anti-hyperalgesic effect was equivalent in DOR-eGFP and non-fluorescent WT-DOR mice but impacted by GPRASP1 deficiency.**

In an inflammatory pain model (CFA 20 $\mu$ l s.c. in the tail), mice were treated with repeated administrations of SNC80 (10mg/kg, sc). (A, B, C) Analgesic response and tolerance development were followed by tail pressure test and (D, E, F) tail immersion test. (A,D) DOR-eGFP in green (n=11-12) and (B, E) non-fluorescent DOR-WT mice in blue (n=8) developed analgesic tolerance with the same kinetic, (C,F) but non-fluorescent DOR-WT/GPRASP1-KO mice in red (n=12) did not show any tolerance to the agonist effect.

(G, H) DOR-eGFP mice were challenged with various doses of SNC80 (5 and 20mg/kg i.p.), in the tail immersion test (46,5 $^{\circ}$ C) at the first and the third administration of SNC80. (H) DOR-eGFP/GPRASP1-WT mice showed analgesic tolerance to the third SNC80 administration (G) when DOR-eGFP/GPRASP1-KO developed no analgesic tolerance. One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post hoc test. P<0,05: \*, P< 0,005: \*\*.



**Supplementary figure 3 : Amount of DOR receptor in non-fluorescent DOR-WT brains and of DOR-eGFP in DRG with or without GPRASP1.**

(A) Quantity of non-fluorescent DOR-WT in brain (fmol/mg of protein) was evaluated by radioligand binding, (B) and compared between WT and GPRASP1-KO mice at a saturating concentration of  $^3\text{H}$ -Deltorphine II (4nM). Repeated administration of SNC80 (10mg/kg, ip, 5 times) induced a diminution of DOR binding sites in whole brain membranes. This proportion of degraded receptor in brain membranes was correlated with the dose of SNC80 administered, in radioligand binding experiments and (C) by Western blot. (D) The dose-dependent degradation was confirmed by quantification of



luminescence. (E)The degradation of DOR-eGFP was also assessed by Western blot after 5 administrations of SNC80 (10mg/kg i.p.) on immunoprecipitated DOR-eGFP with GFP-trap beads of DRG extracts (3 mice per sample).

### **III. Partie 3 : Évaluation de la mise en place de la tolérance analgésique suite à l'injection répétée de l'agoniste ARM390 entre les souris sauvages et les souris KO-GPRASP1**

#### **A. Intérêt de l'évaluation du ARM390**

Lors des expériences avec le SNC80 nous avons pu montrer que GPRASP1 est une protéine cruciale pour le développement de la tolérance analgésique, mais pas par la voie de la dégradation.

Nous nous sommes donc interrogés sur son impact dans la réponse à un autre agoniste de DOR, possédant des caractéristiques de tolérance et internalisation différentes.

Nous avons utilisé le ARM390, qui ayant la même affinité que le SNC80 pour DOR d'après la littérature (Pradhan et al., 2009) ne produit pas de tolérance analgésique aiguë (2 injections d'agoniste à 4h d'intervalle) mais produit une tolérance en traitement chronique similaire à celle du SNC80. Pradhan et collaborateurs ont montré que ARM390 ne produirait pas de désensibilisation transitoire lors d'un traitement aigu et pas d'internalisation ni de phosphorylation du DOR-eGFP ou d'internalisation de celui-ci (Pradhan et al., 2010). Ainsi, lors d'injections espacées de 12h, le SNC80 commence à montrer une tolérance dès la deuxième injection, contrairement au ARM390. De même, le SNC80 provoque une internalisation de DOR-eGFP lorsque l'administration est espacée de 12h, mais pas lorsqu'elle est espacée de 24h. Le ARM390 lui, n'entraîne jamais l'internalisation du récepteur dans les différents modèles évalués, ni de dégradation du récepteur ou de diminution de la réponse de la protéine G (Pradhan et al., 2010).

#### **B. Matériel et Méthode propres à l'étude de la réponse à l'agoniste ARM390**

##### **1) Composés :**

Le AR-M 1000390 hydrochloride ou ARM390, soit N,N-diéthyl-4-(phényl-pipéridine-4-ylidène-méthyl)-benzamide fourni par Astra Zeneca, a été solubilisé à 1mg/ml, soit 2,87mM, dans une solution saline NaCl 0,9%.

## **2) Animaux**

Les souris utilisées sont les DOR-eGFP KO-GPRASP1, décrites précédemment.

## **3) Modèles expérimentaux**

L'évaluation de l'effet analgésique et de la tolérance a été réalisée dans un modèle inflammatoire CFA, comme décrit précédemment dans la publication. L'ARM390 est injectée 45min avant la mesure, à 10mg/kg par voie intrapéritonéale (pas d'inflammation observée).

En fin d'expérience, les animaux ont été mis à mort 4h après la dernière administration par dislocation cervicale et les organes du système nerveux prélevés frais et congelés sur carboglace.

## **4) Préparation de membranes de cerveaux**

La préparation de membranes de cerveaux est faite avec une lyse au Bioprep mise au point en partie I.B, puis comme décrites dans la publication II.D.

## **5) Quantifications de DOR-eGFP par binding**

La quantification de récepteurs par liaison de radioligand est réalisée à l'aide de <sup>3</sup>H-deltorphine II, à une concentration de 4nM permettant d'atteindre la saturation des sites de liaison.

## **6) Quantification de DOR-eGFP par Western Blot**

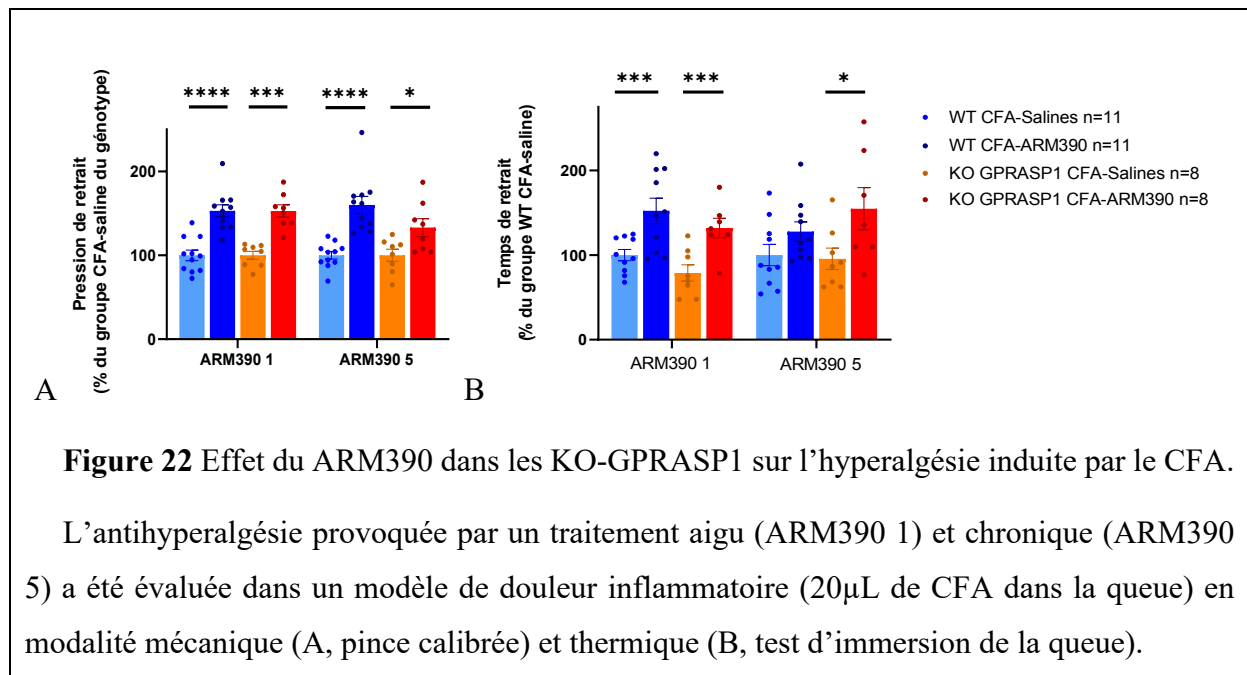
L'anticorps utilisé en Western-blot pour détecter DOR-eGFP les dérivés de la GFP est un anti-GFP-HRP, couplé à la Horse radish peroxidase (HRP, Abcam, référence : ab6663).

# **C. Résultats : ARM390 ne provoque ni tolérance analgésique ni dégradation de DOR dans les souris WT ou les souris KO-GPRASP1**

## **1) Pas de développement de tolérance analgésique suite à un traitement répété de ARM390 dans les souris sauvages et les souris KO-GPRASP1**

Le modèle de douleur persistante utilisé est l'hyperalgésie induite par une inflammation par injection de CFA dans la base de la queue. Après évaluation du seuil basal de sensibilité, l'hyperalgésie, similaire entre les animaux DOR-eGFP/GPRASP1-WT et DOR-

eGFP/GPRASP1-KO, est maximale 3 jours après l'injection de l'agent inflammatoire ( $120 \pm 7g$  en TPT et considérée en TIT à  $100 \pm 6\%$  pour les WT et  $113g \pm 5$  en TPT,  $79\% \pm 10$  chez les KO). Cette hypersensibilité est réversée avec un retour au seuil basal par une administration d'ARM390 chez les animaux sauvages ( $184 \pm 9g$  et  $127 \pm 11\%$  TIT) et déficients GPRASP1 ( $173 \pm 8g$  et  $131 \pm 11\%$  TIT). Cet effet est maintenu à la deuxième injection 4h après, dans les deux groupes, et il perdure au total sur les 5 administrations, une par jour de ARM390, avec une antihyperalgésie atteignant  $190 \pm 12g$  pour les WT ( $127\% \pm 11$  en TIT) et  $187 \pm 14g$  ( $155 \pm 25\%$  en TIT) pour les KO GPRASP1, contre  $119 \pm 5g$  et  $141 \pm 10g$  pour les groupes CFA-saline WT et KO-GPRASP1. Le ARM390 ne semble donc pas causer de tolérance analgésique dans ce modèle expérimental, ni en traitement aigu (2 injections en 4h) ni en traitement chronique (administration quotidienne pendant 4 jours), aussi bien en modalité mécanique que thermique (Figure 22 A et B respectivement), contrairement au SNC80.



## 2) Pas de dégradation de DOR-eGFP suite à un traitement répété de ARM390 dans les souris sauvages et les souris KO-GPRASP1

La quantité de récepteurs dans le **cerveau** a été évaluée **par test de radioliation** dans un premier temps, montrant une quantité de récepteurs après inflammation de  $67.4 \pm 3$  fmol/mg de protéines chez les animaux WT et  $80,9 \pm 9$  chez les animaux KO non traités, et de même  $66,4 \pm 4$  fmol chez les WT et  $66,6 \pm 10$  Chez les KO GPRASP1 stimulés par ARM390.

Après SDS-PAGE, la **bioluminescence** obtenue par Western Blot réalisé sur les membranes de cerveau était également équivalente dans les 4 groupes comparés (rapporté au signal d'actine de chaque échantillon :  $9,11 \pm 1,89$  RLU  $n = 7$  WT GPRASP1 CFA-saline (Figure 23A)  $6,82 \pm 0,51$   $n=5$  KO GPRASP1 CFA-saline, puis  $9,03 \pm 0,8$  %  $n=7$  pour les WT GPRASP1 après ARM390 et  $7,00 \pm 0,68$   $n=7$  pour les KO GPRASP2 CFA-ARM390 (**Figure 23B**).

La dégradation a également été évaluée par Western Blot dans la **moëlle épinière lombaire**, où DOR est exprimé dans les interneurons régulateurs. A ce niveau également, les animaux WT et KO GPRASP1 avaient un seuil basal équivalent (respectivement  $100 \pm 4,1\%$   $n=7$  et  $107 \pm 5\%$   $n=9$ ), et le traitement par ARM390 ne générant pas de modification significative de cette quantité de récepteurs chez les animaux compétents ( $108 \pm 5,4$  %  $n=8$ ) comme déficient pour GPRASP1 ( $100 \pm 6$  %  $n=8$  ; **Figure 23C**).

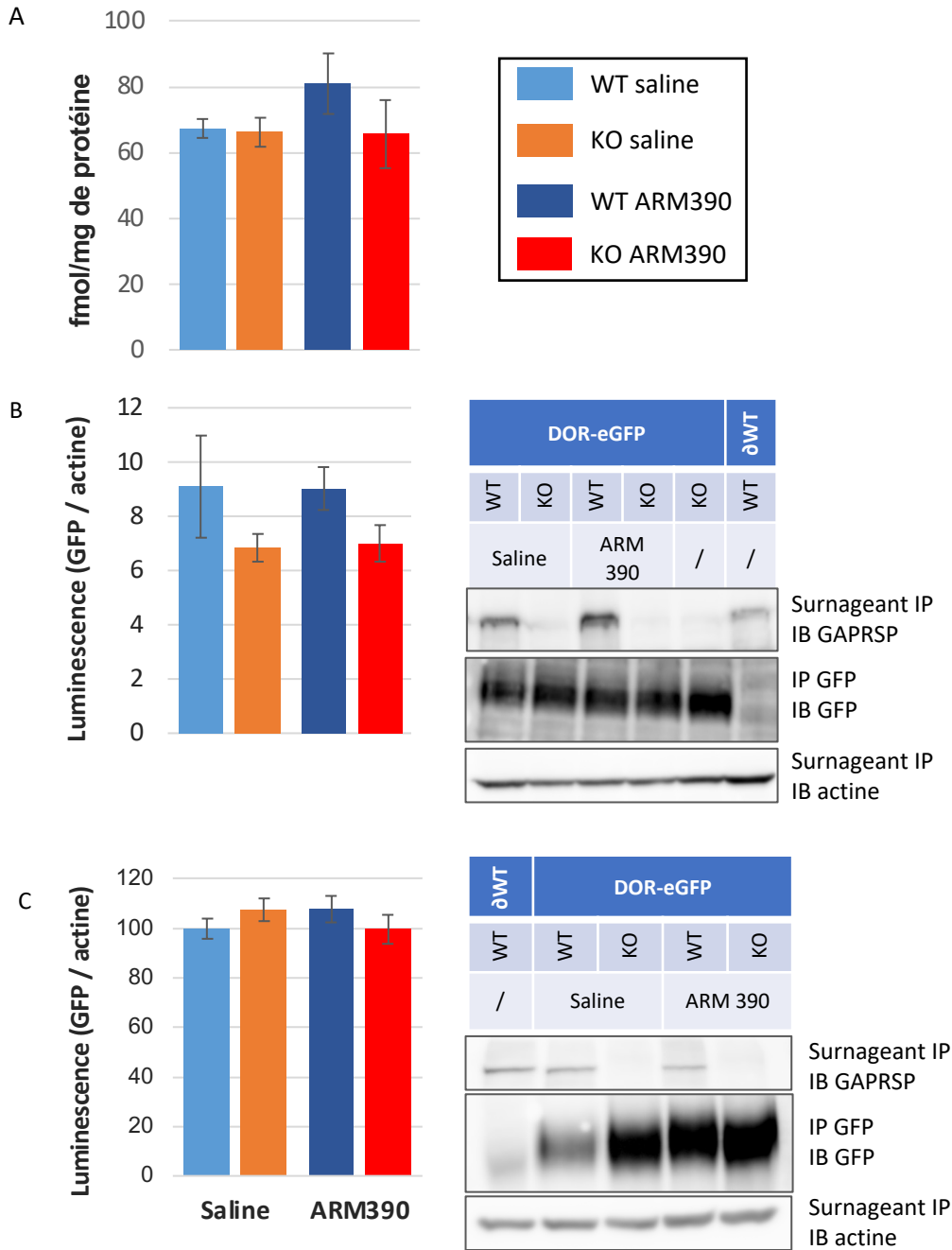
Les analyses biochimiques réalisées sur ces animaux montrent donc que ni au niveau du cerveau (binding et Western Blot) ni au niveau de la moëlle épinière, le récepteur n'est dégradé après 5 stimulations par ARM390 (**Figure 23**).

### 3) Conclusion sur le traitement répété par ARM390

Après 5 administrations de ARM390, l'efficacité observée de l'agoniste est toujours la même, aucune tolérance analgésique n'a été développée, contrairement à ce qui aurait été attendu d'après la littérature (Pradhan et al., 2010). Les souris KO-GPRASP1 répondent de la même manière que les souris sauvages, sans potentialisation de l'effet. GPRASP1 ne semble pas médier une adaptation de la réponse à l'agoniste ARM390.

En concordance avec l'absence de tolérance, on constate que ARM390 ne génère pas de dégradation du récepteur après 5 administrations contrairement au SNC80. Cela a été vérifié par deux méthodes dans le cerveau, mais également par immunoprécipitation de DOR-eGFP dans la moëlle épinière.

Ces résultats seront discutés dans la discussion générale de la thèse.



**Figure 23** ARM390 n'entraîne pas de dégradation de DOR-eGFP après des stimulations répétées

La quantité de DOR-eGFP a été évaluée à la suite de son activation par 5 administrations d'ARM390 dans les membranes de cerveau (A) par test de liaison à l'équilibre de  $^3\text{H}$ -deltorphine-II à une concentration saturante de 4nM pour 100 $\mu\text{g}$  de protéines ( $n=5-6 \pm \text{SEM}$ ) et (B) par Western Blot ( $n=6 \pm \text{SEM}$ ) ainsi que (C) dans la moëlle épinière (exprimé en pourcent du ratio de WT-CFA-saline GFP/actine  $n=7-9 \pm \text{SEM}$ ).

## **IV. Partie 4 : Expériences complémentaires pour l'exploration du rôle de GPRASP1 dans le maintien de l'effet analgésique de SNC80 injecté de manière répétée : analyse de la quantité de certains neurotransmetteurs dans les extraits de GRD**

### **A. Dosage des neurotransmetteurs dans les GRD**

#### **1) Objectif**

Une hypothèse qui pourrait expliquer les réponses différentes à la stimulation de DOR en absence de GPRASP1 serait une différence dans les neurotransmetteurs synthétisés par les neurones périphériques. Pour étudier cela, nous avons réalisé des dosages par spectrométrie de masse des principaux neurotransmetteurs, en condition basale, inflammée et suite au traitement par l'agoniste SNC80, chez les animaux sauvages et KO-GPRASP1.

#### **2) Matériel et méthode**

La préparation des échantillons et leur analyse par spectrométrie de masse ont été réalisées par Yannick Goumon et Virginie Andry (INCI, UPR3212, CNRS, Strasbourg).

##### **a) Préparation des échantillons**

Les échantillons sont soniqués (deux cycles de 5s, amplitude 20% -100 watts) dans 150  $\mu$ L, centrifugés 30 min à 20 000 G et 4°C, puis les 150 $\mu$ L de surnageant sont mélangés à 50 $\mu$ L d'acétonitrile 100%, additionné de 400.26 pmol de D8-2AG (ref sc-480539; Santa Cruz, Heidelberg, Germany) et 100.15 pmol de D4-AEA (Tocris/Biotechne, Lille, France). Les surnageants sont ensuite prélevés en vue du dosage protéique et de l'analyse en spectrométrie de masse.

Pour le dosage des catécholamines, une dérivation est réalisée, à chaque échantillon, 10 $\mu$ L d'ISTD sont ajoutés à 40 $\mu$ L de surnageant, ainsi que 50 $\mu$ L de borate et 10 $\mu$ L d'AccQTAq.

Ce mélange est ensuite centrifugé et le surnageant est évaporé 10 min à 55 °C. Le culot précipité est resuspendu, 30% d'acétonitrile, 0,1% d'acide formique et 69,9% d'eau (V/V/V)

sont ajoutés et la réaction est mise sur agitation, avant d'être centrifugée 30 min à 20 000G 4°C. Le surnageant en est collecté pour procéder aux analyses de spectrométrie de masse.

Il est repris dans 20µL d'acide formique à 0,1M. puis 10 min au thermos mix à 4 ° C vitesse maxi puis centrifugé 20.000g 4°C 10 min.

### **b) Instruments et conditions analytiques de LC-MS/MS**

Les peptides obtenus sont chargés sur une colonne ZORBAX SB-C18 (150 x 1 mm, 3,5 µm, débit de 90 µl/min ; Agilent, Les Ulis, France) chauffée à 40°C. Ils sont séparés par chromatographie liquide (système HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Electron)), couplé à un spectromètre de masse Endura triple quadripôle (Thermo Electron). 5µL du mélange sont injectés dans une colonne Zorbax 1 mm (HPLC Agilent technologies) avant d'être identifiés par spectrométrie de masse. L'analyse a été réalisée grâce au logiciel Xcalibur v4.0 (RRID : SCR\_014593) a été utilisé pour contrôler le système (Thermo Electron) (Gabel et al., 2022).

### **3) Échantillons analysés**

Les tissus analysés sont des GRD d'animaux DOR-eGFP ± KO GPRASP1. Ils sont issus d'une expérience de CCI. Les animaux « salines » ont donc subi une opération chirurgicale et une neuropathie, tandis que les SNC80 ont en plus reçu 9 administrations quotidiennes de SNC80 à 10mg/kg.

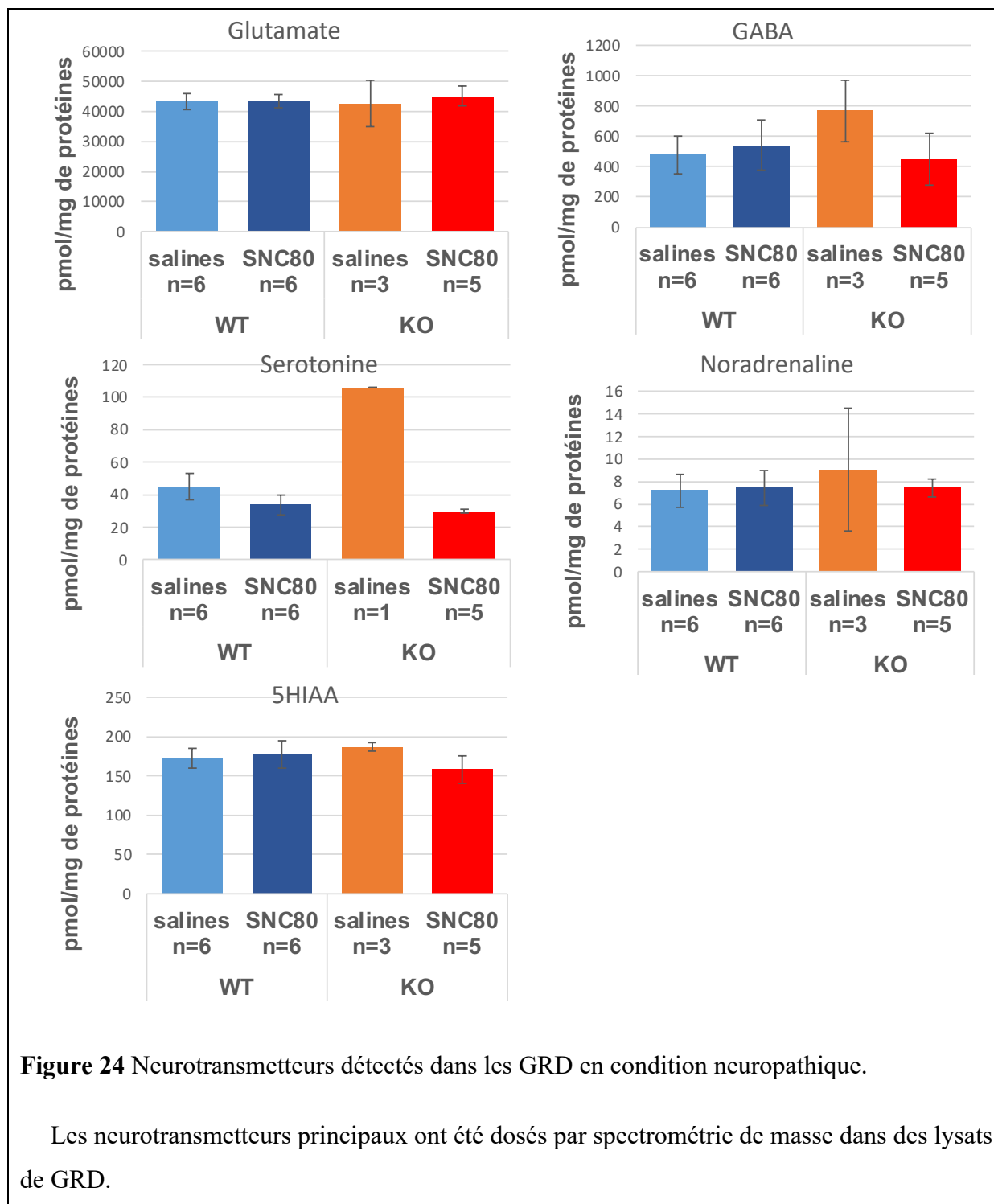
Les groupes contrôles sont des animaux DOR-eGFP n'ayant pas subi d'expérience de comportement, qu'ils soient compétents ou KO pour GPRASP1, de sorte à étudier l'effet de la neuropathie ainsi que du traitement sur la synthèse de neurotransmetteurs, en absence de GPRASP1 comparativement à des animaux compétents.

Les organes sont prélevés 24h après la dernière injection, sans lavage ni fixation, et congelés dans de la carboglace. Ils ont été conservés un an à -80°C avant analyse.

### **4) Résultats**

Les 5 neurotransmetteurs évalués sont le glutamate, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), la sérotonine, la noradrénaline et l'acide 5hydroxyindolacétique (5HIAA), métabolite de la sérotonine.





**Figure 24** Neurotransmetteurs détectés dans les GRD en condition neuropathique.

Les neurotransmetteurs principaux ont été dosés par spectrométrie de masse dans des lysats de GRD.

Aucune différence n'a été observée dans les 4 groupes comparés. Ni dans les neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA), ni le principal excitateur (glutamate), les catécholamines (noradrénaline) du neurone postganglionnaire, ni la sérotonine et ses métabolites. La détection de la sérotonine et du 5 La différence de réponse observée entre les animaux WT et KO GPRASP1 ne provient donc pas d'une variation de la synthèse de neurotransmetteurs par les nocicepteurs.

## **5) Conclusion**

L'absence de GPRASP1 n'entraîne pas de modifications majeures dans la synthèse de neurotransmetteurs dans les nocicepteurs, qu'ils soient excitateurs ou inhibiteurs, ni en condition basale, ni après inflammation ou situation de tolérance à un agoniste. Ce n'est pas ce mécanisme adaptatif qui sous-tend le développement de la tolérance analgésique et qui serait bloqué en absence de GPRASP1.

## **V. Partie 5 : Analyse de la résolution de l'hyperalgésie inflammatoire et de la résolution de l'allodynie neuropathique dans les souris WT comparée aux souris KO-GPRASP1**

### **A. Contexte**

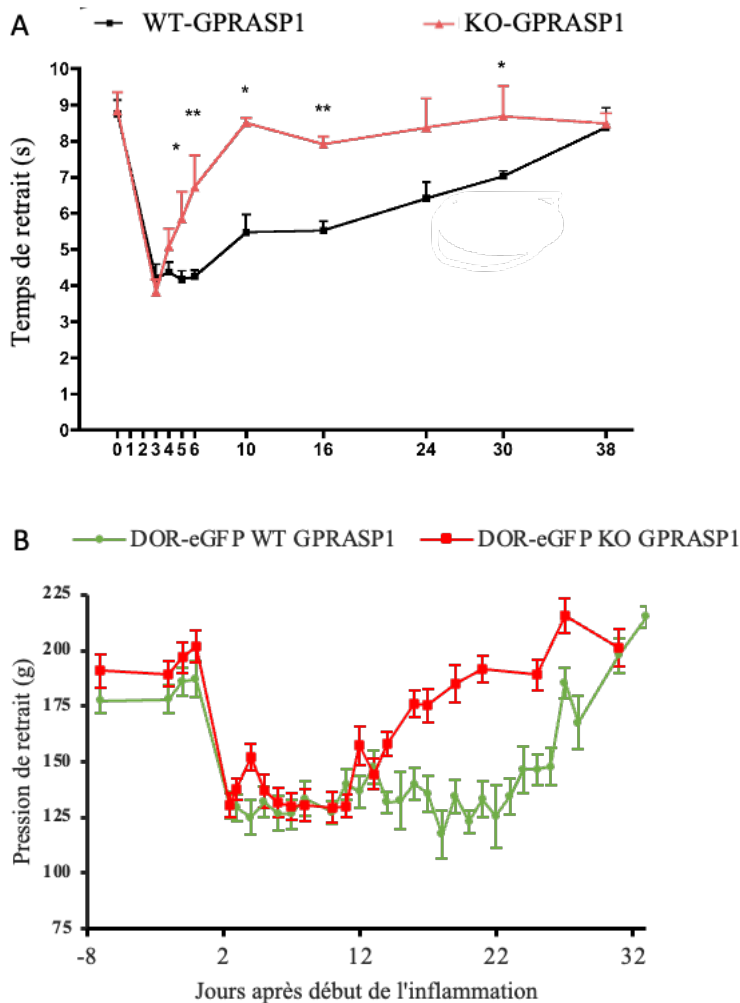
Lors de l'évaluation de l'effet des agonistes DOR sur le seuil de sensibilité à la douleur des animaux KO-GPRASP1 dans un modèle de douleur inflammatoire par CFA, après une hyperalgésie développée de façon équivalente entre les animaux sauvages et ceux déficients pour GPRASP1, il s'est installé une légère différence au cours des jours de traitement dans les groupes CFA-saline. Aussi, nous avons décidé de suivre la résolution de l'hyperalgésie dans les deux groupes saline, WT-GPRASP1 et KO-GPRASP1, pour évaluer la persistance de cette différence.

### **B. Suivi de la résolution de l'hyperalgésie chez des animaux KO-GPRASP1 comparé aux animaux WT-GPRASP1**

#### **1) Modèle de douleur inflammatoire**

La résolution a été évaluée par test d'immersion de la queue sur des animaux sauvages pour DOR, montrant une résolution de l'hyperalgésie en 10 jours après l'injection sous-cutanée de CFA pour les KO GPRASP1, au lieu de 38 jours pour les animaux sauvages (**Figure 25 A**).

Dans le cas où le récepteur DOR est greffé de la protéine GFP, la résolution de l'hyperalgésie est complète en environ 20 jours chez les animaux KO-GPRASP1, ce qui cette fois est environ 10 jours plus tôt que pour les animaux WT-GPRASP1 (**Figure 25 B**). La différence de durée de la résolution de l'inflammation entre les 2 génotypes de souris KO-GPRASP1 entre-elles pourrait être due soit à une différence entre DOR non fluorescent et DOR-eGFP, soit à une différence expérimentale d'injection du CFA entre les deux expérimentateurs différents.

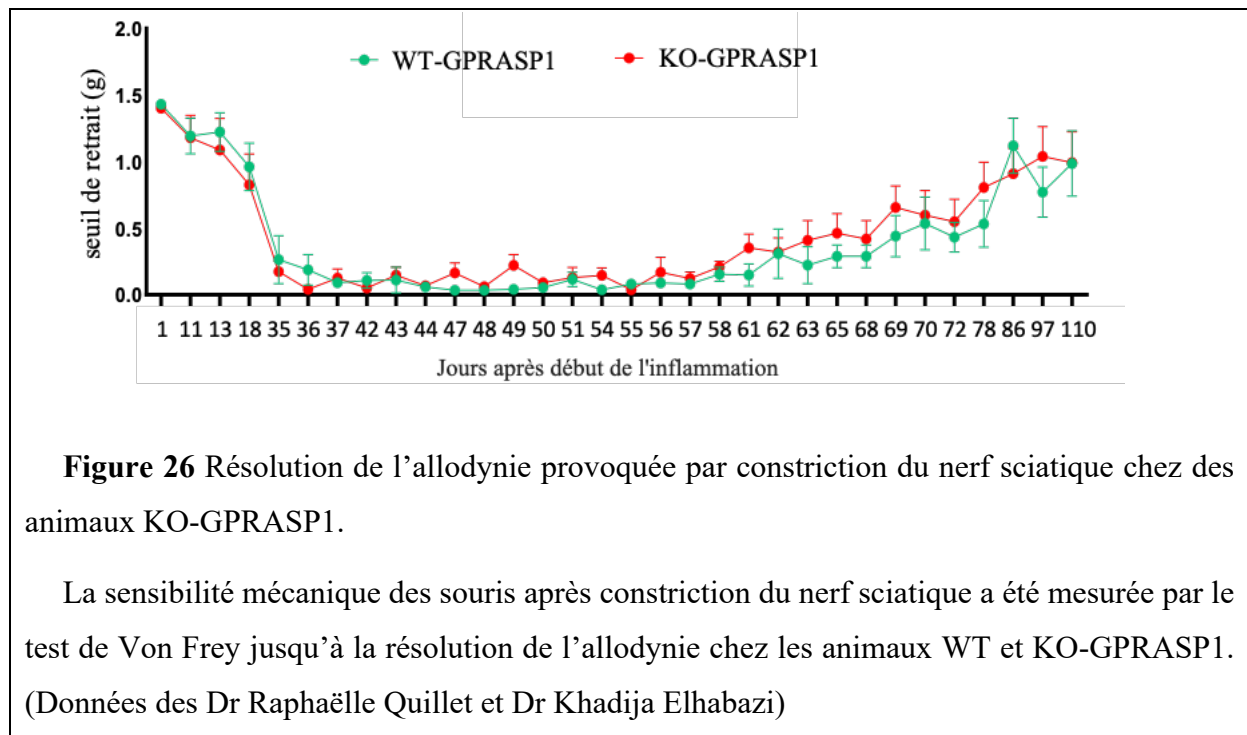


**Figure 25** Résolution de l’hyperalgésie inflammatoire chez les animaux KO-GPRASP1

(A) Suivi de la résolution de l’hyperalgésie induite par le CFA évaluée par test d’immersion de la queue pour les animaux KO GPRASP1 (Données du Dr Glenn-Marie LeCoz) (B) et par pince calibrée chez des animaux DOR-eGFP KO-GPRASP1. Il semble que GPRASP1 joue un rôle dans la résolution de l’hyperalgésie inflammatoire dans les modalités mécanique et thermique.

## 2) Modèle de douleur neuropathique

Pour explorer un peu plus le rôle inattendu de la protéine GPRASP1 dans la résolution de l’hyperalgésie en modèle inflammatoire, nous avons regardé la résolution de l’allodynie provoquée dans le deuxième modèle de douleur chronique utilisé, la neuropathie par constriction du nerf sciatique.



**Figure 26** Résolution de l'allodynie provoquée par constriction du nerf sciatique chez des animaux KO-GPRASP1.

La sensibilité mécanique des souris après constriction du nerf sciatique a été mesurée par le test de Von Frey jusqu'à la résolution de l'allodynie chez les animaux WT et KO-GPRASP1. (Données des Dr Raphaëlle Quillet et Dr Khadija Elhabazi)

Dans ce modèle de douleur neuropathique, l'allodynie se développe à la même vitesse et avec la même profondeur chez les animaux WT comme KO GPRASP1, avec un récepteur DOR sauvage. La résolution de l'allodynie a pris environ 110 jours, elle aussi identique dans les deux génotypes observés (**Figure 26**).

### C. Conclusions

Lors d'expériences en modèle de douleur chronique inflammatoire, il est apparu que l'absence de GPRASP1 accélérât la résolution de la douleur. Cet effet inattendu n'a pas été retrouvé dans le modèle de douleur neuropathique. On pourrait donc supposer que GPRASP1 a un rôle dans l'entretien de la douleur inflammatoire, peut être par le maintien de l'inflammation. Chez l'Homme, GPRASP1 est présent dans les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes CD8<sup>+</sup>. GPRASP1 est aussi connu comme interagissant avec le récepteur CXCR4 aux chimiokines (Morales-Hernandez et al., 2020) mais CXCR4 est plutôt impliquée dans l'installation de l'hyperalgésie inflammatoire plutôt que sa résolution (donnée du laboratoire non publiées).



# **Discussion**





## **I. GPRASP1 est nécessaire pour l'établissement de la tolérance analgésique à l'agoniste SNC80 de DOR**

Durant cette thèse, j'ai confirmé que le SNC80, agoniste synthétique de DOR, est responsable d'une analgésie dans un modèle murin qui est rapidement contrée par le développement d'une tolérance, que ce soit dans un modèle de douleur neuropathique (CCI) chez les mâles comme chez les femelles, ou dans un modèle de douleur chronique inflammatoire (CFA). Dès la deuxième administration de l'agoniste, qu'elle soit espacée de 4 ou 24h, son effet est diminué de moitié chez les souris sauvages. En revanche, avec une administration quotidienne, l'analgésie générée par le SNC80 est conservée aussi longtemps que nous l'avons testée, sans faiblissement, chez les souris KO-GPRASP1. Ce maintien de l'analgésie au SNC80 se confirme dans deux modèles de douleurs persistantes, en modalité mécanique et thermique, chez les mâles comme chez les femelles. GPRASP1 semble donc nécessaire au développement de la tolérance analgésique au SNC80.

Nous avons également évalué un agoniste décrit comme non-internalisant mais produisant une analgésie sujette à la tolérance en administration chronique, le ARM390 (Pradhan et al., 2010). Nous avons préféré employer la voie injectable et non orale, utilisée dans les études antérieures, pour nous assurer de la dose administrée en nous affranchissant de la biodisponibilité de la molécule. En effet, bien que cela ait été décrit lors de l'étude antérieure qui parlait de la tolérance ARM390 à long terme, nous n'avons pas observé d'effet indésirable du traitement chronique par ARM390 en i.p. Dans nos conditions expérimentales favorisant l'apparition rapide de la tolérance au SNC80, en condition d'hyperalgésie inflammatoire, aucune tolérance analgésique n'a semblé se développer lors d'administrations répétées d'ARM390, ni en modalité mécanique, ni en modalité thermique. Ces résultats sont en accord avec ceux de DiCello et collaborateurs (DiCello et al., 2020), qui met en évidence qu'ARM390 n'induit ni tolérance aiguë ni une tolérance chronique pour le contrôle de la motricité colique.

Nous n'avons ici pas étudié la formation d'hétéromères MOR-DOR, ni déterminé si GPRASP1 pourrait avoir un rôle dans la stabilisation de ce couple. Nous n'avons pas testé d'antagoniste sélectif de MOR dans notre modèle animal. Pourtant, la formation d'hétéromères entre le domaine transmembranaire 4 de DOR et le domaine transmembranaire 1 de MOR est bien connue (Erbs et al., 2015; Xie et al., 2009) et les résultats de l'équipe de Metcalf suggèrent que le SNC80 active les hétéromères DOR-MOR pour produire son analgésie (Metcalf et al.,

2012), cependant cette théorie n'est pas soutenue par les résultats plus récents (Derouiche et al., 2020).

## **II. La dégradation de DOR est indépendante de la présence de GPRASP1**

Diverses études biochimiques ont été réalisées à la suite de ces expériences, pour évaluer à quel niveau de la voie d'internalisation/dégradation/recyclage du récepteur GPRASP1 intervenait.

L'hypothèse principale de la tolérance analgésique de DOR est basée sur la dégradation rapide et massive du récepteur. Pour l'évaluer, nous avons eu recours à deux techniques indépendantes, la liaison de deltorphine-II radioactive ainsi que la détection du récepteur par un anticorps anti-GFP. Les deux méthodes utilisées ainsi que les trois organes évalués ont donné des résultats similaires. Que ce soit chez les souris sauvages ou déficientes pour l'expression de GPRASP1, au niveau du système nerveux central ou périphérique, après 5 administrations de SNC80, DOR est dégradé à plus de 50%, et ce même si l'analgésie observée est maintenue à un niveau équivalent dans les KO-GPRASP1. La dégradation du récepteur apparaît être dose-dépendante, la quantité de DOR persistante s'amenuisant quand on augmente la dose de SNC80. La tolérance analgésique est dissociée de la dégradation du récepteur. Pourtant, l'utilisation de l'antagoniste sélectif de DOR, le naltrindole, en réponse analgésique nous a confirmé que l'antihyperalgésie observée chez les KO-GPRASP1 est bien médiée par DOR, alors qu'il reste entre 20 et 50% du récepteur dans tout le système nerveux.

Après un traitement répété au ARM390, DOR n'est pas dégradé, ni dans le cerveau, ni dans la moëlle épinière, indiquant qu'il est possible d'obtenir une analgésie maximale et persistante sans activer la voie de la dégradation.

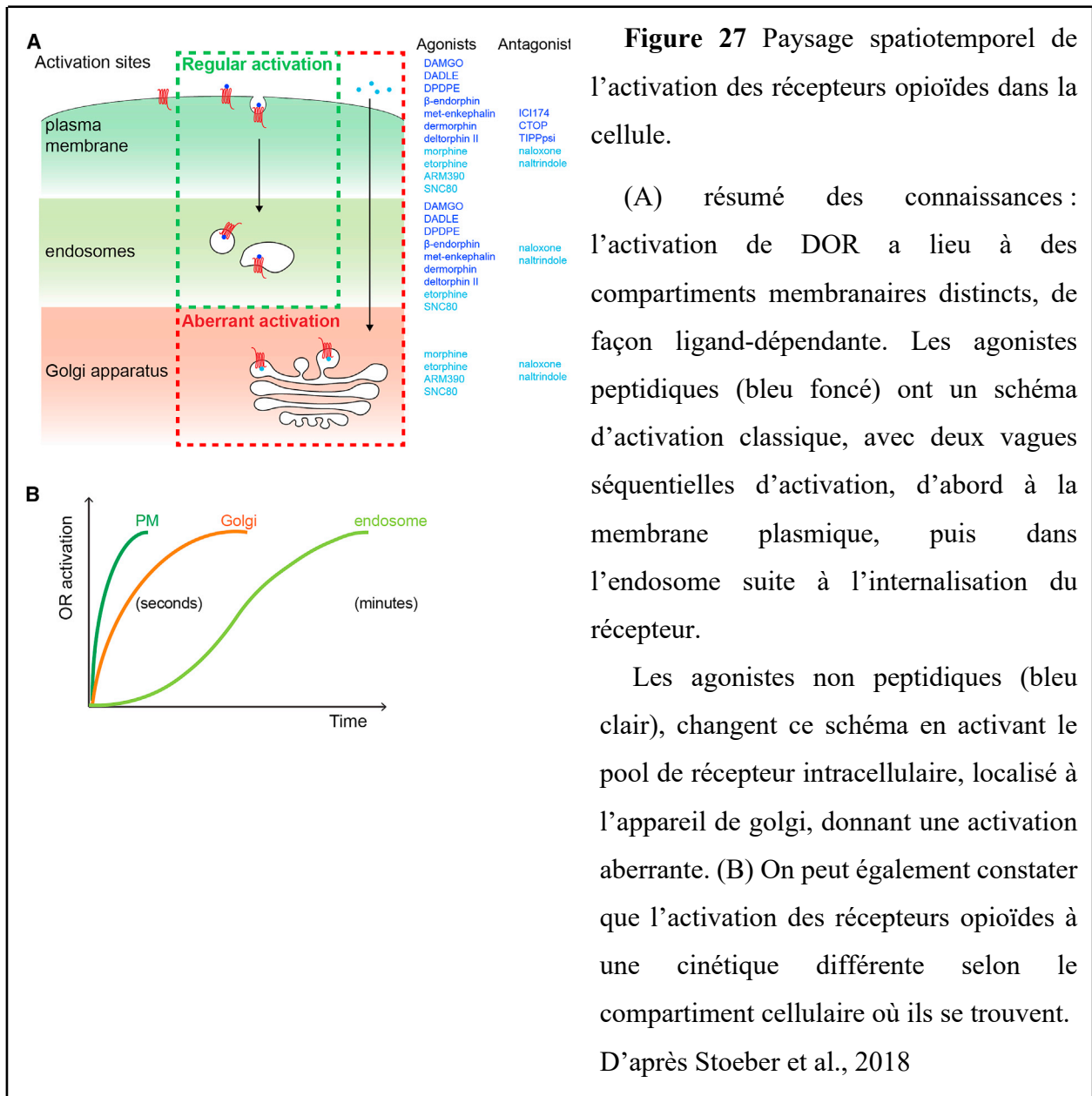
Des travaux de l'équipe, non présentés dans cette thèse, ont mis en évidence par la technique de BRET que le SNC80 et ARM390 n'ont pas la même cinétique d'internalisation et recyclage en modèle de cellules transfectées, bien que l'ARM390 produise également une internalisation du récepteur.

### III. GPRASP1 semble impliqué dans le trafic membranaire de DOR

La dégradation de DOR requiert son internalisation. Si GPRASP1 permet de maintenir l'analgésie malgré une dégradation de 80% du récepteur cellulaire, il a été envisagé que le rôle de GPRASP1 soit d'empêcher le recyclage du récepteur, et qu'en son absence, le recyclage se fasse beaucoup plus vite et que la fraction de récepteurs restante soit majoritairement à la membrane plasmique. Pour cela, des expériences d'**immunohistochimie** ont été réalisées, de sorte à étudier la proportion de récepteurs à la membrane plasmique, quand la différence analgésique est établie entre les souris sauvages et celles KO-GPRASP1. Le prélèvement a été fait 24h après la dernière dose de SNC80, au moment où une nouvelle dose de SNC80 aurait été injectée si le protocole de comportement avait été prolongé. Il y a bien une différence de localisation de DOR à la membrane entre les deux génotypes : en condition d'hyperalgésie inflammatoire, la proportion de DOR-eGFP à la membrane plasmique par rapport à la fluorescence DOR-eGFP totale est significativement diminuée chez les animaux KO-GPRASP1 par rapports aux souris sauvages. En revanche, ni internalisation, ni augmentation du signal à la membrane plasmique n'ont pu être mises en évidence chez les KO-GPRASP1 après traitement répété au SNC80. Cela peut être dû à la faible sensibilité de la technique pour détecter DOR-eGFP, qui nécessite l'amplification du signal, et à la perte de 80% du récepteur. Dans la littérature, DOR est décrit comme trouvé à l'état basal sous forme majoritaire de récepteur de réserve, dans des vésicules intracellulaires et serait adressé à la membrane lors d'une stimulation (Gendron et al., 2019). Ce premier résultat devrait être validé par une autre technique, cependant GPRASP1 semble participer à l'adressage du récepteur à la membrane plasmique. La différence attendue étant après traitement, les animaux non inflammés n'ont pas été ajoutés en contrôle de ces expériences, nous empêchant pour l'instant d'affirmer que c'est lors de l'inflammation que DOR est adressé à la membrane plasmique et que l'absence de GPRASP1 limite ce mouvement. Il faudra donc approfondir l'étude de la **localisation subcellulaire** de DOR, dans un premier temps en réitérant ces expériences de quantification à la membrane plasmique, en incluant cette fois-ci des animaux **non inflammés**, pour pouvoir déterminer si on observe un adressage de DOR à la membrane plasmique et s'il est effectivement modulé par GPRASP1. Il semble pertinent de compléter ces observations pas l'analyse similaire de la répartition de DOR dans la **moëlle épinière** ainsi que dans les **GRD**. Il semble d'autant plus important d'étudier DOR en périphérie que certains agonistes peptidiques développant une tolérance analgésique, le DADLE et le DPDPE, ne passent pas la

barrière hémato encéphalique, leur efficacité est uniquement médiée par l'activation de DOR périphérique. La perte quasi-totale de l'effet analgésique des agonistes DOR dans les animaux KO-DOR dans les neurones Nav<sub>1.8</sub> des GRD renforce également l'importance d'étudier le comportement de DOR en périphérie (Ceredig et al., 2020; Nozaki et al., 2012; Spahn and Stein, 2017). Un suivi cinétique de l'internalisation lors d'une administration aiguë est également à envisager pour confirmer ou infirmer une différence de recyclage du récepteur.

Si la proportion de DOR intracellulaire est plus importante, le **compartiment** intracellulaire dans lequel il se trouve pourrait donner des indications sur la façon dont il maintient son activité. En effet, plusieurs études ont montré maintenant que DOR pouvait continuer d'avoir une signalisation depuis les compartiments intracellulaires, en particulier l'**endosome et l'appareil de Golgi** (Jimenez-Vargas et al., 2020; Radoux-Mergault et al., n.d.; Stoeber et al., 2018) (**Figure 27**). L'utilisation de marqueur des compartiments cellulaires comme le lysosome (LAMP1), l'endosome (EEA1) ou l'appareil de Golgi (GM130) apporterait également une information sur la localisation intracellulaire du récepteur lors de l'internalisation avec et sans GPRASP1. Il est également probable que le SNC80 soit capable de passer la membrane plasmique et d'activer des récepteurs intracellulaires (Stoeber et al., 2018). Auquel cas, si les récepteurs intracellulaires sont atteignables par l'agoniste, si les 20% suffisent à donner une analgésie maximale chez les KO-GPRASP1 alors que les WT ne répondent plus, bien que la phosphorylation soit identique, une autre forme de désensibilisation du récepteur pourrait avoir eu lieu. Elle sera étudiée par **activabilité du récepteur couplé à la protéine G $\alpha$ i** grâce à un anticorps anti-G $\alpha$ i -GTP, qui reconnaît spécifiquement la conformation active de la protéine G (G protein activation assay kit NB80301, New East Biosciences, Wuhan, China ; mise au point en cours) ou à l'aide du nanobody Nb33, qui reconnaît sélectivement les récepteurs DOR et MOR sous leur conformation activée. Celui-ci permettrait un suivi de l'activation du récepteur dans des neurones vivants (Stoeber et al., 2018).



Nous avons également pu exclure que la réponse différente chez les animaux KO-GPRASP1 provenait d'une différence de production de **neurotransmetteurs** au niveau périphérique.

#### IV. La désensibilisation de DOR n'empêche pas la réponse analgésique

La **phosphorylation** de DOR a été explorée *in vivo*. Tout d'abord, alors que jusqu'à maintenant les études de phosphorylation *in vivo* étaient faites à 15 ou 20 min post-administration du SNC80 (Mann et al., 2020; Pradhan et al., 2009), nous avons montré que les temps de phosphorylation maximale sont entre 30 min et 2h pour les deux sites, avec une

phosphorylation persistante de T361 ainsi que de S363 4h après l'injection du SNC80 i.p., un délai auquel l'effet analgésique est terminé. Cette phosphorylation du récepteur se fait selon une cinétique et avec une intensité similaire quel que soit le génotype des souris, GPRASP1 n'intervient pas dans cette étape de la réponse à l'agoniste. C'est à 4h que nous avons réalisé la deuxième administration de SNC80 dans le modèle de douleur inflammatoire, l'effet de la première injection est terminé et la deuxième entraîne un effet maximal du SNC80, DOR semble donc être redevenu activable, bien qu'il soit toujours massivement phosphorylé au niveau du cerveau total.

La spectrométrie de masse réalisée sur les co-immunoprécipitations de DOR-eGFP pourrait nous permettre d'étudier le nombre de phosphorylations présentes en C-ter de DOR suite à son activation et peut-être de différencier un autre résidu impacté par l'absence de GPRASP1.

La culture de neurones primaires de l'hippocampe ainsi que des ganglions rachidiens dorsaux, obtenus à partir des souris KO-GPRASP1, pourrait permettre de comparer la réponse du récepteur dans des types cellulaires différents. La cinétique de phosphorylation pourrait alors être suivie dans les neurones périphériques en s'affranchissant de la faible quantité de DOR présente physiologiquement dans ces structures.

L'une des hypothèses expliquant la tolérance analgésique en cours de développement est la superactivation de l'adénylate cyclase est développée par Ahmed Mansour et collaborateurs (Mansour et al., 2021). Lors d'expériences sur les voies activées par divers agonistes de DOR en cellules, Mansour et collaborateurs se sont aperçus que, lors d'une incubation de 8h avec les agonistes, l'AMPc produit par les HEK293 par stimulation directe de l'adénylate cyclase (via la forskoline) peut atteindre 150% de l'AMPc produit sans agoniste DOR. Ce serait un mécanisme compensatoire de l'inhibition prolongée par la protéine  $G\alpha_i$ , produisant un niveau d'AMPc supérieur au niveau basal (Mazei-Robison and Nestler, 2012). Grâce à des cultures de neurones primaires obtenues à partir d'animaux sauvages et KO-GPRASP1, il serait intéressant d'étudier l'activation d'AMPc après un traitement prolongé au SNC80, en absence de GPRASP1. On sait que GPRASP1 potentialise les augmentations de cAMP après activation de RCPG lié à  $G\alpha_s$  (Tschische et al., 2010)(nos résultats Abu-Helo et al. 2023, en préparation) et que GPRASP1 interagit avec *Gas in vitro*, il pourrait être acteur d'un mécanisme adaptatif similaire avec DOR.

## V. Co-immunoprécipitation de GPRASP1 avec DOR-eGFP

Pour la première fois, nous avons mis en évidence dans du tissu animal, grâce aux **co-immunoprécipitations** de DOR-eGFP cérébral, que **GPRASP1 fait bien partie d'un complexe protéique avec DOR**. Si cette interaction est spécifique et robuste, elle n'est pas augmentée lors de la préactivation ou de l'activation de DOR, elle aurait plutôt tendance à diminuer suite à son activation par le SNC80, du moins entre 0 et 4h après stimulation.

L'analyse de ces **interactômes** par spectrométrie de masse est une étape du projet en cours.

Plusieurs interactômes ont été élucidés, l'un en modèle cellulaire (HEK293) grâce à la technique de la peroxydase de l'acide ascorbique (APEX), où l'environnement protéique de DOR a pu être étudié suite à une activation 1, 3, 10 et 10min d'activation par l'agoniste DADLE (Lobingier et al., 2017), mais également sur des cerveaux de souris FLAG-DOR par l'équipe de Louis Gendron (Degrandmaison et al., 2020). Une co-immunoprécipitation de cerveau sur billes magnétiques greffées d'anticorps anti-FLAG a permis d'extraire DOR et les complexes protéiques avec lesquels DOR interagit en condition basale, les protéines retenues avec le récepteur ont ensuite été analysées par un tandem chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse. Les protéines au moins 2 fois plus enrichies dans les échantillons FLAG-DOR que dans le cerveau KO-DOR ont été considérées positives. De nombreuses protéines identifiées qui interagissent avec DOR sont impliquées dans l'endocytose et l'exocytose, participent à l'adressage intracellulaire du récepteur. Par la technique APEX, TOM1 et WWP2 ont été identifiées, elles ont toutes deux été impliquées dans la dégradation du récepteur (Lobingier et al., 2017). La majorité des protéines spécifiquement associées à DOR fait partie des systèmes de transport membranaire et de signalisation intracellulaire. En particulier, nous avons identifié Rab10 et VSP41 (Degrandmaison et al., 2020). Des sous-unités  $\alpha$  des protéines hétérotrimériques G,  $G\alpha_{o1}$ ,  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_z$  ont également été trouvées dans l'interactôme de DOR, mais pas  $G\alpha_i$ . *In vivo*, c'est la  $\beta$ -arrestine 1 (=arrestine 2), qui a été confirmée sélectivement associée à DOR (Degrandmaison et al., 2020).

Plusieurs protéines identifiées dans l'interactôme APEX sont confirmées dans cette co-immunoprécipitation *in vivo*, comme la protéine de transport Sec31A, la *Ras-related GTP-binding protein C*, des sous-unités catalytiques d'ATPase. Le récepteur cannabinoïde 1 a également été identifié comme interagissant du DOR (Degrandmaison et al., 2020).

**Tableau 16** Protéines interagissant avec DOR identifiées par LC-MS/MS chez les souris FLAG-DOR et validées par un autre résultat.

Gene symbol	Protein identity	N/2	Fold intensity KI/KO	Unique peptide	Coverage (%)	Method	References
Proteins appearing in both experiments with an intensity ratio of at least 1.5-fold							
ARF6	ADP ribosylation factor 6	2	2.3–2.0	2–4	18.3–33.1	CoIP	This study (Fig. 4E)
ITSN2	Intersectin-2	1	N/A	1	11.6	APEX-MS	Ref. 27
RABEP1	Rab GTPase-binding effector protein 1	1	N/A	1	6.6	CoIP	This study (Fig. 4F)
TFRC	Transferrin receptor protein 1	1	N/A	1	1.7	APEX-MS	Ref. 27
VPS41	Vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog	1	N/A	1	1.8	CoIP	This study (Fig. 4D)
ATP6V1A	V-type proton ATPase catalytic subunit A	1	1.5	28	57.1	APEX-MS	Ref. 27
ATP6V1E1	V-type proton ATPase catalytic subunit E1	1	1.8	5	35.4	APEX-MS	Ref. 27
NAPG	$\gamma$ -Soluble NSF attachment protein	1	1.8	9	35.9	APEX-MS	Ref. 27
RRAGC	Ras-related GTP-binding protein C	1	2.6	2	5.5	APEX-MS	Ref. 27
SCAMP3	Secretory carrier-associated membrane protein 3	1	2.4	2	13.0	APEX-MS	Ref. 27
SEC31A	Protein transport protein Sec31A	1	2.3	3	3.5	APEX-MS	Ref. 27

Liste des interactions entre FLAG-DOR immunoprécipité du cerveau de souris et identifiées par analyse LC-MS/MS et validée par co-immunoprécipitation ou identifiées par APEX (Lobingier et al., 2017). Extrait de (Degrandmaison et al., 2020).

Cependant, *in vivo*, les complexes protéiques de DOR n'ont été étudiées qu'à l'état basal. Comme GPRASP1 pourrait avoir le rôle d'une **protéine d'échafaudage**, qui formerait un complexe impliqué dans l'adressage intracellulaire de DOR (Kaeffer et al., 2021), nous pourrions donc supposer que sans un des éléments du complexe, il est déstabilisé et nous souhaitons comparer les interactions qui varient en absence de GPRASP1 pour identifier les autres protéines qui participent à son activité. Par ailleurs, si DOR est bien adressé à la membrane plasmique lors d'une préactivation, les complexes **protéiques** dans lesquels il se trouve pourraient varier dans un contexte inflammatoire, et puisque **GPRASP1 aurait un impact sur la localisation** à la membrane de DOR, l'interactome de DOR pourrait peut-être révéler des différences et des voies de signalisation et d'adressage impliquées. Des analyses préliminaires de spectrométrie de masse ont été réalisées au cours de la mise au point des co-immunoprécipitations de DOR-eGFP. Nous avons trouvé parmi les protéines interagissant spécifiquement avec DOR l'adénylate cyclase 5, inhibée par  $G\alpha_i$ , déjà décrite comme interagissant avec DOR (Kim et al., 2006; Olanas et al., 2012a), et une sous-unité du canal calcique de type L.

Dans un troisième temps, la tolérance du récepteur n'est pas la même en absence de GPRASP1, cela signifie que son activation entraîne **d'autres adaptations intracellulaires**, peut-être dans les protéines interagissant avec le récepteur.



## VI. Hypothèses complémentaires à explorer

### A. Étude des modulations de GPRASP1 et DOR par hybridation *in situ*

Nous n'avons jamais pu explorer la colocalisation de DOR avec GPRASP1, car notre anticorps anti-GPRASP reconnaît également GPRASP2 et ne donne pas de signal spécifique de GPRASP1 en immunohistochimie sur coupes de tissus ((Zeder-Lutz et al., 2023), voir en Annexe 1). La distribution du messager de DOR est connue, l'ARNm de GPRASP1 a été retrouvé dans toutes les zones du cerveau par séquençage d'ARN en cellule unique (Zeisel et al., 2015) et en hybridation *in situ* ("Brain tissue expression of GPRASP1 - Summary - The Human Protein Atlas") Allen experiment 67765726). Puisque nous avons obtenu une co-immunoprécipitation qui semble spécifique, nous pouvons supposer qu'il y a une expression dans les mêmes cellules, mais sans en avoir fait l'observation directe. Nous ignorons également si DOR est systématiquement exprimé avec GPRASP1 ou bien s'ils sont retrouvés uniquement partiellement co-exprimés, et quelle classe de neurones les expriment tous les deux. En absence d'anticorps spécifique, pour répondre à cette question il faudra réaliser des expériences **d'hybridation *in situ***, à l'aide de sondes fluorescentes multiplexées (RNAscope) qui ciblent l'ARNm des gènes par de multiples couples de sondes (Wang et al., 2012). GPRASP2 ayant une séquence très proche de GPRASP1, il faudra cibler les zones de séquence différente exclusivement. Cette méthode est également quantitative, bien que nous n'ayons pas observé de variation d'expression protéique de GPRASP1 lors des stimulations du récepteur, ni de DOR en absence de GPRASP1, nous pourrions confirmer le maintien de leur expression. Cela permet également de distinguer le type (NeuN pour les neurones, GFAP pour la glie...) et le sous-type cellulaire qui expriment nos cibles.

### B. Étude directe des voies de signalisation

Les voies de signalisations activées par DOR en aigu sont partiellement connues mais peu dans un contexte de traitement répété et avec un suivi cinétique. Une des hypothèses résultant de nos observations est que les voies de signalisation seraient différentes en présence et en absence de GPRASP1 (**Figure 28**). Pour les explorer, l'étude des phosphorylations générées par l'activation des MAPkinases, p38 par exemple ("p38 MAPK Signaling Pathway | Sino Biological," 2023), de mTOR, ou JNK est envisagée. En considérant que Mittal et collaborateurs voient une implication de la PKC et JNK dans la resensibilisation de MOR après

des agonistes faiblement internalisant (Mittal et al., 2013), il pourrait être instructif de regarder si en absence de GPRASP1, cette voie est activée suite à l'administration de SNC80.

La réponse des neurones pourrait être suivie par électrophysiologie, *ex vivo*, de sorte à détecter la vitesse de désensibilisation du récepteur chez les animaux sauvages et KO-GPRASP1.

### **C. Exploration des modifications de transcription provoquées par l'absence de GPRASP1**

Pour explorer les modifications de transcription générées par l'absence de GPRASP1 et la stimulation du récepteur, il serait intéressant de procéder à des analyses transcriptomiques, comme du RNAseq dans des zones enrichies en DOR (l'hippocampe ou les bulbes olfactifs) (Zeisel et al., 2015). Les voies de signalisation de DOR activées par le SNC80 en présence et en absence de GRPASP1 pourraient être évaluées par l'étude du kinome de DOR, avec la technique PAMgene (Hilhorst et al., 2009). Par ces méthodes, nous espérons par exemple mettre en évidence l'activation de signalisation anti-opioïde.

### **D. Hypothèses alternatives : incompétence de DOR dans les neurones périphériques**

L'hypothèse défendue par Allison Brackley et collaborateurs en 2017 implique la GRK2, la PKA et une protéine d'ancrage à la membrane plasmique, AKAP (A-anchoring Protein 79/150) (Brackley et al., 2017). La GRK2 a été montrée constitutivement liée à DOR et libérerait l'extrémité C-ter en cas de préactivation par une inflammation (Brackley et al., 2016). Dans ce contexte, dans des cultures de neurones de rat, la PKA semble phosphoryler la GRK2 après l'activation du récepteur, ce qui la maintient attachée à DOR et empêche la réponse intracellulaire lors de l'activation du récepteur. La PKA est ancrée à la membrane par AKAP, ce qui la retient à l'extrémité synaptique des neurones du cerveau, augmentant ses chances de phosphoryler GRK2 sur DOR. Ainsi, la présence du complexe AKAP-PKA à la membrane plasmique post synaptique favoriserait l'incompétence de DOR dans les neurones sensoriels périphériques. Cependant, la GRK2 n'a pas été retrouvée par spectrométrie de masse suite aux co-immunoprécipitations réalisées sur DOR-eGFP en condition basale ni par Degrandmaison et collaborateurs (Degrandmaison et al., 2020). Nous n'avons pas non plus observé la redondance d'autres protéines connues. Pourtant, nous trouvons spécifiquement GPRASP1 en Western Blot, il serait donc intéressant de vérifier également la présence d'autres protéines

décrites comme interagissant avec DOR dans nos co-immunoprécipitations grâce à des anticorps spécifiques de chacune d'elles.

## **E. Perspectives médicales**

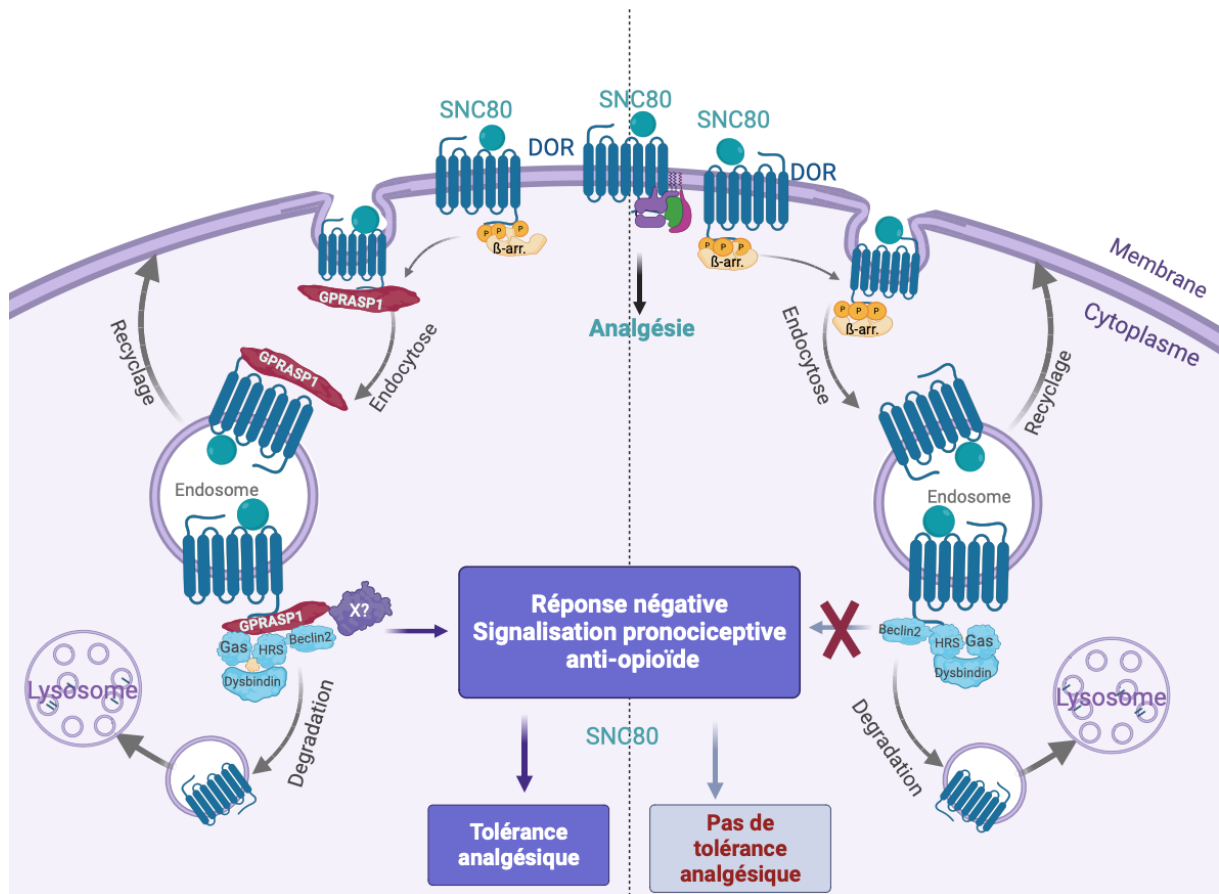
Ce projet de thèse a été financé avec l'un des objectifs de développer des molécules bloquant l'action de GPRASP1, pour limiter son impact dans le développement de la tolérance analgésique.

En effet, plusieurs molécules agonistes de DOR ont atteint les phases cliniques I et II du développement d'un médicament. L'ADL5859, un diméthylbenzamide, basé sur la structure du SNC80, montrerait en phase préclinique une réversion complète de l'hyperalgésie et une action antidépresseur, une durée d'action courte, aucun effet indésirable opiacé et une bonne tolérance jusqu'à 1g/kg. Cependant chez l'homme l'ADL5859 n'a montré aucun soulagement des patients dans les différents types de douleur évalués, mettant ainsi fin au développement de la molécule par Pfizer et Adolor (Cubist Pharmaceuticals LLC, 2015; Nozaki et al., 2012). Une seconde molécule a suivi le même cheminement, avec une amélioration de la biodisponibilité par voie orale : l'ADL5747. Le temps de  $\frac{1}{2}$  vie de 12h a été bien toléré en phase I sur sujets sains, Lors de la phase IIa, un effet intermédiaire a été observé dans les douleurs neuropathiques post herpétiques, mais non satisfaisant, il n'a pas permis de continuer l'exploitation de cette molécule (Cubist Pharmaceuticals LLC, 2015). L'AZD2327 a lui montré des effets antidépresseurs et anxiolytiques en modèle préclinique, mais pas suffisamment lors des essais cliniques pour atteindre la phase III (Richards et al., 2016). Pour beaucoup de ces essais, les résultats ne sont pas publics et ne nous permettent pas de savoir si, bien que l'objectif principal n'ait pas été atteint, des objectifs secondaires intéressants se seraient détachés des résultats. Une des pistes évoquées pour améliorer l'efficacité de traitement ciblant DOR, serait de faire des agonistes uniquement périphériques, agissant dans les zones lésées et non au niveau central, mais également de développer des modulateurs allostériques qui augmenteraient l'efficacité ou l'affinité des ligands de DOR sur le récepteur (Spahn and Stein, 2017). Des agonistes MOR-DOR biaisés ont ensuite été développés pour limiter les effets indésirables convulsivants, tel que le TRV250 qui est en étude de phase II dans le cadre du traitement de la migraine.

GPRASP1 est également associée à de nombreux RCPG, dont le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, ciblé dans le traitement de l'asthme. Il est possible que chez l'humain également, GPRASP1 soit responsable du développement de tolérance analgésique, ainsi empêcher son action pourrait permettre de potentialiser le traitement de l'asthme ou d'augmenter les chances de réussite d'un

traitement analgésique. Il faudra cependant s'assurer qu'un bloqueur de cette protéine n'a pas d'impact majeur sur le fonctionnement physiologique de ces récepteurs.





**Figure 28** Représentation schématique d'une hypothèse de l'implication de GPRASP1 dans la régulation de l'analgésie aux agonistes DOR.

L'hypothèse actuelle sur le rôle de GPRASP1 est qu'elle serait une protéine échafaudage, permettant de stabiliser un complexe protéique responsable de la désensibilisation, de l'adressage intracellulaire de DOR et de l'activation de voies anti-opioïdes, qui entraîne le développement de la tolérance analgésique. En absence de GPRASP1, ce complexe serait déstabilisé et la cascade de développement de la tolérance ne serait donc pas mise en place.  
Créé avec Biorender.com

# Conclusion

Durant cette thèse, j'ai pu mettre en évidence que GPRASP1 interagit *in vivo* avec le récepteur aux opioïdes delta et a un rôle important à jouer dans la tolérance analgésique aux agonistes DOR. Cette protéine cytoplasmique est nécessaire au développement de la tolérance analgésique suite à l'administration répétée de l'agoniste DOR SNC80, quel que soit le modèle de douleur inflammatoire étudié. Cependant, contrairement à l'hypothèse communément admise, le développement de cette tolérance n'est pas dû à la dégradation du récepteur. En effet, en absence de GPRASP1, la dégradation massive de DOR est maintenue au même niveau que chez les animaux sauvages, à tous les niveaux du système nerveux central. Pourtant, les 30% de récepteur persistants suffisent à maintenir un effet analgésique maximal de l'agoniste. La désensibilisation par phosphorylation n'est pas non plus modifiée en absence de GPRASP1. En revanche, elle semble avoir un impact sur la localisation subcellulaire de DOR. De nombreux complexes protéiques sont impliqués dans la régulation de la réponse et l'internalisation de DOR, comme les  $\beta$ -arrestines, GRK2, RGS4, HRS,  $G\alpha_s$  et il est probable que GRPASP1 soit une protéine servant d'échafaudage à ces interactions. Ainsi, en son absence, certaines voies de signalisation contrecarrant l'effet des opioïdes ne seraient pas activées et l'analgésie provoquée par l'activation du récepteur serait maintenue (**Figure 28**).





## Bibliographie

Abu-Helo, A., Simonin, F., 2010. Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs). *Pharmacol Ther* 126, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.03.004>

Abuse, W.H.O.D. of M.H. and S., Organization, W.H., 2009. Guidelines for the Psychosocially Assisted Pharmacological Treatment of Opioid Dependence. World Health Organization.

Aceto, M.D., May, E.L., Harris, L.S., Bowman, E.R., Cook, C.D., 2007. Pharmacological studies with a nonpeptidic, delta-opioid (–)-(1R,5R,9R)-5,9-dimethyl-2'-hydroxy-2-(6-hydroxyhexyl)-6,7-benzomorphan hydrochloride ((–)-NIH 11082). *European Journal of Pharmacology* 566, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.03.008>

Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E., Watson, S., 1998. Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug and Alcohol Dependence* 51, 127–140. [https://doi.org/10.1016/S0376-8716\(98\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(98)00071-4)

Alizadeh, Z., Fereidoni, M., Behnam-Rassouli, M., Hosseini, S., 2014. Role of C-fibers in pain and morphine induced analgesia/hyperalgesia in rats. *Iran J Neurol* 13, 19–27.

Allouche, S., Polastron, J., Hasbi, A., Homburger, V., Jauzac, P., 1999. Differential G-protein activation by alkaloid and peptide opioid agonists in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE. *Biochemical Journal* 342, 71–78. <https://doi.org/10.1042/bj3420071>

Alves, I.D., Cowell, S.M., Salamon, Z., Devanathan, S., Tollin, G., Hruba, V.J., 2004. Different Structural States of the Proteolipid Membrane Are Produced by Ligand Binding to the Human  $\delta$ -Opioid Receptor as Shown by Plasmon-Waveguide Resonance Spectroscopy. *Mol Pharmacol* 65, 1248–1257. <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1248>

\*Antalgiques non opiacés : Les points essentiels [WWW Document], n.d. URL <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antalgiques-non-opiaces-les-points-essentiels> (accessed 1.30.22).

Anti-inflammatoires non-stéroïdiens [WWW Document], n.d. URL <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anti-inflammatoires-non-steroidiens> (accessed 1.30.22).

Archer-Lahlou, E., Audet, N., Amraei, M.G., Huard, K., Paquin-Gobeil, M., Pineyro, G., 2009. Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *J Cell Mol Med* 13, 147–163. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00308.x>

Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., Amraei, M., Chabot-Doré, A.-J., Millecamps, M.,

Stone, L.S., Pineyro, G., 2012. Differential Association of Receptor-G $\beta\gamma$  Complexes with  $\beta$ -Arrestin2 Determines Recycling Bias and Potential for Tolerance of Delta Opioid Receptor Agonists. *J Neurosci* 32, 4827–4840. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012>

Ayoub, S.S., 2021. Paracetamol (acetaminophen): A familiar drug with an unexplained mechanism of action. *Temperature* 8, 351–371. <https://doi.org/10.1080/23328940.2021.1886392>

Aziz, I., Whitehead, W.E., Palsson, O.S., Törnblom, H., Simrén, M., 2020. An approach to the diagnosis and management of Rome IV functional disorders of chronic constipation. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 39–46. <https://doi.org/10.1080/17474124.2020.1708718>

Baamonde, A., Lastra, A., Juárez, L., García, V., Hidalgo, A., Menéndez, L., 2005. Effects of the local administration of selective  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 372, 213–219. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-0013-6>

Bagheri Tudashki, H., Haddad, Y., Charfi, I., Couture, R., Pineyro, G., 2020. Ligand-specific recycling profiles determine distinct potential for chronic analgesic tolerance of delta-opioid receptor (DOPr) agonists. *J Cell Mol Med* 24, 5718–5730. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15234>

Bahari, Z., Meftahi, G.H., 2019. Spinal  $\alpha_2$ -adrenoceptors and neuropathic pain modulation; therapeutic target. *Br J Pharmacol* 176, 2366–2381. <https://doi.org/10.1111/bph.14580>

Bambai, B., Kulmacz, R.J., 2000. Prostaglandin H synthase. Effects of peroxidase cosubstrates on cyclooxygenase velocity. *J Biol Chem* 275, 27608–27614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003982200>

Bao, L., Jin, S.-X., Zhang, C., Wang, L.-H., Xu, Z.-Z., Zhang, F.-X., Wang, L.-C., Ning, F.-S., Cai, H.-J., Guan, J.-S., Xiao, H.-S., Xu, Z.-Q.D., He, C., Hökfelt, T., Zhou, Z., Zhang, X., 2003. Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron* 37, 121–133. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01103-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01103-0)

Bardoni, R., Tawfik, V.L., Wang, D., François, A., Solorzano, C., Shuster, S.A., Choudhury, P., Betelli, C., Cassidy, C., Smith, K., de Nooij, J.C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., MacDermott, A.B., Scherrer, G., 2014. Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron* 81, 1312–1327. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.044>

Barn, D.R., Caulfield, W.L., Cottney, J., McGurk, K., Morphy, J.R., Rankovic, Z., Roberts, B., 2001. Parallel synthesis and biological activity of a new class of high affinity and selective  $\delta$ -opioid ligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9, 2609–2624.

[https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00017-7)

Bartlett, S.E., Enquist, J., Hopf, F.W., Lee, J.H., Gladher, F., Kharazia, V., Waldhoer, M., Mailliard, W.S., Armstrong, R., Bonci, A., Whistler, J.L., 2005. Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11521–11526. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502418102>

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>

Beaudry, H., Mercier-Blais, A.-A., Delaygue, C., Lavoie, C., Parent, J.-L., Neugebauer, W., Gendron, L., 2015. Regulation of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor functions: involvement of cyclin-dependent kinase 5. *Br J Pharmacol* 172, 2573–2587. <https://doi.org/10.1111/bph.13088>

Beaudry, H., Proteau-Gagné, A., Li, S., Dory, Y., Chavkin, C., Gendron, L., 2009. Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience* 161, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.053>

Befort, K., Mattéi, M.G., Roeckel, N., Kieffer, B., 1994. Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3-p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization. *Genomics* 20, 143–145. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1146>

Bennett, D.L., Clark, A.J., Huang, J., Waxman, S.G., Dib-Hajj, S.D., 2019. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiological Reviews* 99, 1079–1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2017>

Bertrand, X., 2006. Plan d'amélioration de la prise en charge de la douleur 2006 - 2010 ministre de la Santé et des Solidarités. *Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement* 7, 3. [https://doi.org/10.1016/S1624-5687\(06\)71118-0](https://doi.org/10.1016/S1624-5687(06)71118-0)

Bertran-Gonzalez, J., Laurent, V., Chieng, B.C., Christie, M.J., Balleine, B.W., 2013. Learning-related translocation of  $\delta$ -opioid receptors on ventral striatal cholinergic interneurons mediates choice between goal-directed actions. *J. Neurosci.* 33, 16060–16071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1927-13.2013>

Bianchi, E., Galeotti, N., Menicacci, C., Ghelardini, C., 2011. Contribution of G inhibitory protein alpha subunits in paradoxical hyperalgesia elicited by exceedingly low doses of morphine in mice. *Life Sciences* 89, 918–925. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.09.025>

Bie, B., Zhang, Z., Cai, Y.-Q., Zhu, W., Zhang, Y., Dai, J., Lowenstein, C.J., Weinman, E.J., Pan, Z.Z., 2010. Nerve Growth Factor-Regulated Emergence of Functional  $\delta$ -Opioid Receptors. *J. Neurosci.* 30, 5617–5628. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-09.2010>

Bilsky, E., Calderón, S., Wang, T., Bernstein, R., Davis, P., Hruby, V., McNutt, R.,

Rothman, R., Rice, K., Porreca, F., 1995. SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 273, 359–66.

Bilsky, E.J., Wang, T., Lai, J., Porreca, F., 1996. Selective blockade of peripheral delta opioid agonist induced antinociception by intrathecal administration of delta receptor antisense oligodeoxynucleotide. *Neurosci Lett* 220, 155–158. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(96\)13262-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(96)13262-6)

Blaine, A.T., van Rijn, R.M., 2023. Receptor expression and signaling properties in the brain, and structural ligand motifs that contribute to delta opioid receptor agonist-induced seizures. *Neuropharmacology* 232, 109526. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109526>

Boeuf, J., Trigo, J.M., Moreau, P.-H., Lecourtier, L., Vogel, E., Cassel, J.-C., Mathis, C., Klosien, P., Maldonado, R., Simonin, F., 2009. Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 30, 860–868. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06865.x>

Bornert, O., Møller, T.C., Boeuf, J., Candusso, M.-P., Wagner, R., Martinez, K.L., Simonin, F., 2013. Identification of a Novel Protein-Protein Interaction Motif Mediating Interaction of GPCR-Associated Sorting Proteins with G Protein-Coupled Receptors. *PLoS One* 8, e56336.

Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Rostaing, S., Lanteri-Minet, M., Collin, E., Grisart, J., Boureau, F., 2004. Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 108, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2003.12.024>

Bouhassira, D., Lanteri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., Touboul, C., 2008. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136, 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>

Bourdonnec, B.L., Windh, R.T., Ajello, C.W., Leister, L.K., Gu, M., Chu, G.-H., Tuthill, P.A., Barker, W.M., Koblish, M., Wiant, D.D., Graczyk, T.M., Belanger, S., Cassel, J.A., Feschenko, M.S., Brogdon, B.L., Smith, S.A., Christ, D.D., Derelanko, M.J., Kutz, S., Little, P.J., DeHaven, R.N., DeHaven-Hudkins, D.L., Dolle, R.E., 2008. Potent, Orally Bioavailable Delta Opioid Receptor Agonists for the Treatment of Pain: Discovery of N,N-Diethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide (ADL5859). *J. Med. Chem.* 51, 5893–5896. <https://doi.org/10.1021/jm8008986>

Brackley, A.D., Gomez, R., Akopian, A.N., Henry, M.A., Jeske, N.A., 2016. GRK2 constitutively governs peripheral delta opioid receptor activity. *Cell Reports* 16, 2686–2698. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.084>

Brackley, A.D., Jeske, N.A., 2022. Paroxetine increases  $\delta$  opioid responsiveness in sensory neurons. *eNeuro* 9, ENEURO.0063-22.2022. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0063-22.2022>

Brackley, A.D., Sarrami, S., Gomez, R., Guerrero, K.A., Jeske, N.A., 2017. Identification of a signaling cascade that maintains constitutive  $\delta$ -opioid receptor incompetence in peripheral sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry* 292, 8762–8772. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.776799>

Brain tissue expression of GPRASP1 - Summary - The Human Protein Atlas [WWW Document], n.d. URL <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198932-GPRASP1/brain> (accessed 7.26.23).

Brainin-Mattos, J., Smith, N.D., Malkmus, S., Rew, Y., Goodman, M., Taulane, J., Yaksh, T.L., 2006. Cancer-related bone pain is attenuated by a systemically available  $\delta$ -opioid receptor agonist. *PAIN®* 122, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.01.032>

Brandt, M.R., Furness, M.S., Mello, N.K., Rice, K.C., Negus, S.S., 2001. Antinociceptive effects of delta-opioid agonists in Rhesus monkeys: effects on chemically induced thermal hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 939–946.

Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., Gallacher, D., 2006. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10, 287–333. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.06.009>

Breivik, H., Eisenberg, E., O'Brien, T., 2013. The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. *BMC Public Health* 13, 1229. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1229>

Brown, C., Fezoui, M., Selig, W.M., Schwartz, C.E., Ellis, J.L., 2004. Antitussive activity of sigma-1 receptor agonists in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 141, 233–240. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705605>

Bruehl, S., Denton, J.S., Lonergan, D., Koran, M.E., Chont, M., Sobey, C., Fernando, S., Bush, W.S., Mishra, P., Thornton-Wells, T.A., 2013. Associations between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphisms and pain-related phenotypes. *Pain* 154, 2853–2859. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.08.026>

Buck, S.A., Torregrossa, M.M., Logan, R.W., Freyberg, Z., 2021. Roles of dopamine and glutamate co-release in the nucleus accumbens in mediating the actions of drugs of abuse. *FEBS J* 288, 1462–1474. <https://doi.org/10.1111/febs.15496>

Bzdega, T., Chin, H., Kim, H., Jung, H.H., Kozak, C.A., Klee, W.A., 1993. Regional

expression and chromosomal localization of the delta opiate receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9305–9309.

Cahill, C.M., McClellan, K.A., Morinville, A., Hoffert, C., Hubatsch, D., O'Donnell, D., Beaudet, A., 2001. Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: Evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *Journal of Comparative Neurology* 440, 65–84. <https://doi.org/10.1002/cne.1370>

Cahill, C.M., Morinville, A., Hoffert, C., O'Donnell, D., Beaudet, A., 2003. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* 101, 199–208. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00333-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00333-0)

Cahill, C.M., Walwyn, W., Taylor, A.M.W., Pradhan, A.A.A., Evans, C.J., 2016. Allostatic mechanisms of opioid tolerance beyond desensitization and downregulation. *Trends in Pharmacological Sciences* 37, 963–976. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.08.002>

Calvino, B., 2019. *Physiologie moléculaire de la douleur*, Doin. ed.

Cann, C., Curran, J., Milner, T., Ho, B., 2002. Unwanted effects of morphine-6-glucuronide and morphine. *Anaesthesia* 57, 1200–1203. [https://doi.org/10.1046/j.1365-2044.2002.02624\\_2.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2044.2002.02624_2.x)

Cao, C.Q., Hong, Y., Dray, A., Perkins, M., 2001. Spinal delta-opioid receptors mediate suppression of systemic SNC80 on excitability of the flexor reflex in normal and inflamed rat. *Eur J Pharmacol* 418, 79–87. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)00934-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)00934-7)

Cathenaut, L., Leonardon, B., Kuster, R., Inquimbert, P., Schlichter, R., Hugel, S., 2022. Inhibitory interneurons with differential plasticities at their connections tune excitatory–inhibitory balance in the spinal nociceptive system. *PAIN* 163, e675–e688. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002460>

Ceredig, R.A., Pierre, F., Doridot, S., Alduntzin, U., Hener, P., Salvat, E., Yalcin, I., Gaveriaux-Ruff, C., Barrot, M., Massotte, D., 2020. Peripheral Delta Opioid Receptors Mediate Formoterol Anti-allodynic Effect in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 324. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00324>

Charfi, I., Abdallah, K., Gendron, L., Pineyro, G., 2018. Delta opioid receptors recycle to the membrane after sorting to the degradation path. *Cell Mol Life Sci* 75, 2257–2271. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2732-5>

Charfi, I., Nagi, K., Mnie-Filali, O., Thibault, D., Balboni, G., Schiller, P.W., Trudeau, L.-E., Pineyro, G., 2014. Ligand- and cell-dependent determinants of internalization and cAMP

modulation by delta opioid receptor (DOR) agonists. *Cell Mol Life Sci* 71, 1529–1546. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1461-7>

Chen, K.Y., Chen, L., Mao, J., 2014. Buprenorphine-naloxone therapy in pain management. *Anesthesiology* 120, 1262–1274. <https://doi.org/10.1097/ALN.000000000000170>

Christie, M.J., 2008. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 154, 384–396. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.100>

Chu Sin Chung, P., Boehrer, A., Stephan, A., Matifas, A., Scherrer, G., Darcq, E., Befort, K., Kieffer, B.L., 2015a. Delta opioid receptors expressed in forebrain GABAergic neurons are responsible for SNC80-induced seizures. *Behav Brain Res* 278, 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.029>

Chu Sin Chung, P., Keyworth, H.L., Martin-Garcia, E., Charbogne, P., Darcq, E., Bailey, A., Filliol, D., Matifas, A., Scherrer, G., Ouagazzal, A.-M., Gaveriaux-Ruff, C., Befort, K., Maldonado, R., Kitchen, I., Kieffer, B.L., 2015b. A novel anxiogenic role for the delta opioid receptor expressed in GABAergic forebrain neurons. *Biol Psychiatry* 77, 404–415. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.033>

CIM-11 pour les statistiques de mortalité et de morbidité [WWW Document], n.d. URL <https://icd.who.int/browse11/l-m/fr#/http://id.who.int/icd/entity/1581976053> (accessed 6.27.23).

Claff, T., Yu, J., Blais, V., Patel, N., Martin, C., Wu, L., Han, G.W., Holleran, B.J., Van der Poorten, O., White, K.L., Hanson, M.A., Sarret, P., Gendron, L., Cherezov, V., Katritch, V., Ballet, S., Liu, Z.-J., Müller, C.E., Stevens, R.C., 2019. Elucidating the active  $\delta$ -opioid receptor crystal structure with peptide and small-molecule agonists. *Sci. Adv.* 5, eaax9115. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax9115>

Codd, E.E., Baker, J., Brandt, M.R., Bryant, S., Cai, C., Carson, J.R., Chevalier, K.M., Colburn, R.W., Coogan, T.P., Dax, S.L., DeCorte, B., Kemmerer, M., LeGrand, E.K., Lenhard, J.M., Leone, A.M., Lin, L., Mabus, J.R., McDonnell, M.E., McMillian, M.K., McNally, J.J., Stone, D.J., Jr, Wang, C.Y., Zhang, S.-P., Flores, C.M., 2010. Diabetogenic Effect of a Series of Tricyclic Delta Opioid Agonists Structurally Related to Cyproheptadine. *Toxicological Sciences* 117, 493–504. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq200>

Codéine : substance active à effet thérapeutique [WWW Document], 2013. . VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/codeine-1039.html> (accessed 5.5.22).

Commons, K.G., 2003. Translocation of presynaptic delta opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray after swim stress. *Journal of Comparative Neurology* 464,

197–207. <https://doi.org/10.1002/cne.10788>

Compton, P., Charuvastra, V.C., Ling, W., 2001. Pain intolerance in opioid-maintained former opiate addicts: effect of long-acting maintenance agent. *Drug and Alcohol Dependence* 63, 139–146. [https://doi.org/10.1016/S0376-8716\(00\)00200-3](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(00)00200-3)

Conibear, A.E., Asghar, J., Hill, R., Henderson, G., Borbely, E., Tekus, V., Helyes, Z., Palandri, J., Bailey, C., Starke, I., von Mentzer, B., Kendall, D., Kelly, E., 2020. A novel  $\delta$  protein-biased agonist at the  $\delta$  opioid receptor with analgesic efficacy in models of chronic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 372, 224–236. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.258640>

Connor, M., Bagley, E.E., Chieng, B.C., Christie, M.J., 2015.  $\beta$ -Arrestin-2 knockout prevents development of cellular  $\mu$ -opioid receptor tolerance but does not affect opioid-withdrawal-related adaptations in single PAG neurons. *Br J Pharmacol* 172, 492–500. <https://doi.org/10.1111/bph.12673>

Corder, G., Castro, D.C., Bruchas, M.R., Scherrer, G., 2018. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu Rev Neurosci* 41, 453–473. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061522>

Crilly, S.E., Ko, W., Weinberg, Z.Y., Puthenveedu, M.A., 2021. Conformational specificity of opioid receptors is determined by subcellular location irrespective of agonist. *eLife* 10, e67478. <https://doi.org/10.7554/eLife.67478>

Cubist Pharmaceuticals LLC, 2015. A Phase 2a, Randomized, Double-blind, Placebo- and Active-controlled, Parallel-group, Multicenter Study Evaluating the Analgesic Efficacy and Safety of ADL5859 and ADL5747 in Subjects With Moderate to Severe Pain Due to Osteoarthritis of the Knee (Clinical trial registration No. NCT00979953). [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

Cvejic, S., Trapaidze, N., Cyr, C., Devi, L.A., 1996. Thr353, located within the coo-terminal tail of the  $\delta$  opiate receptor, is involved in receptor down-regulation. *Journal of Biological Chemistry* 271, 4073–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.8.4073>

Dahlhamer, J., Lucas, J., Zelaya, C., Nahin, R., Mackey, S., DeBar, L., Kerns, R., Von Korff, M., Porter, L., Helmick, C., 2018. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 67, 1001–1006. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>

Dang, V.C., Chieng, B., Azriel, Y., Christie, M.J., 2011. Cellular Morphine Tolerance Produced by  $\beta$ Arrestin-2-Dependent Impairment of  $\mu$ -Opioid Receptor Resensitization. *J Neurosci* 31, 7122–7130. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5999-10.2011>

Décaillot, F.M., Rozenfeld, R., Gupta, A., Devi, L.A., 2008. Cell surface targeting of mu-



delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16045–16050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804106105>

Degrandmaison, J., Abdallah, K., Blais, V., Génier, S., Lalumière, M.-P., Bergeron, F., Cahill, C.M., Boulter, J., Lavoie, C.L., Parent, J.-L., Gendron, L., 2020. In vivo mapping of a GPCR interactome using knockin mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 13105–13116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917906117>

Derouiche, L., Pierre, F., Doridot, S., Ory, S., Massotte, D., 2020. Heteromerization of Endogenous Mu and Delta Opioid Receptors Induces Ligand-Selective Co-Targeting to Lysosomes. *Molecules* 25, 4493. <https://doi.org/10.3390/molecules25194493>

Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M.A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V., Lecca, D., 2004. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology, Frontiers in Addiction Research: Celebrating the 30th Anniversary of the National Institute on Drug Abuse.* 47, 227–241. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.032>

DiCello, J.J., Carbone, S.E., Saito, A., Rajasekhar, P., Ceredig, R.A., Pham, V., Valant, C., Christopoulos, A., Veldhuis, N.A., Canals, M., Massotte, D., Poole, D.P., 2020. Mu and delta opioid receptors are coexpressed and functionally interact in the enteric nervous system of the mouse colon. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 9, 465–483. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.11.006>

DICODIN L.P. 60 mg, comprimé à libération prolongée -Résumé des caractéristiques du produit - Base de données publique des médicaments [WWW Document], 2022. . [medicament.gouv.fr](https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr). URL <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=67482372&typedoc=R> (accessed 5.6.22).

Dietis, N., Rowbotham, D.J., Lambert, D.G., 2011. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? *British Journal of Anaesthesia* 107, 8–18. <https://doi.org/10.1093/bja/aer115>

Dortch-Carnes, J., Potter, D.E., 2003. Delta-opioid agonist-stimulated inositol phosphate formation in isolated, rabbit iris-ciliary bodies: role of Gi/o proteins and Gβγ-subunits. *Experimental Eye Research* 77, 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.006>

Drieu la Rochelle, A., Guillemyn, K., Dumitrascuta, M., Martin, C., Utard, V., Quillet, R., Schneider, S., Daubeuf, F., Willemsse, T., Mampuy, P., Maes, B.U.W., Frossard, N., Bihel, F., Spetea, M., Simonin, F., Ballet, S., 2018. A bifunctional-biased mu-opioid agonist–neuropeptide FF receptor antagonist as analgesic with improved acute and chronic side effects.

PAIN 159, 1705. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001262>

Dripps, I.J., Wang, Q., Neubig, R.R., Rice, K.C., Traynor, J.R., Jutkiewicz, E.M., 2017. The role of regulator of G protein signaling 4 in delta-opioid receptor-mediated behaviors. *Psychopharmacology* 234, 29–39. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4432-5>

Dubois, D., Gendron, L., 2010. Delta opioid receptor-mediated analgesia is not altered in preprotachykinin A knockout mice. *Eur J Neurosci* 32, 1921–1929. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07466.x>

Elhabazi, K., Ayachi, S., Ilien, B., Simonin, F., 2014. Assessment of morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance in mice using thermal and mechanical nociceptive modalities. *JoVE* e51264. <https://doi.org/10.3791/51264>

Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Kessler, P., Hentsch, D., Vonesch, J.-L., Matifas, A., Kieffer, B.L., Massotte, D., 2012. Distribution of delta opioid receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 221, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.023>

Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J.-L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M.-C., Koutsourakis, M., Vasseur, L., Veinante, P., Kieffer, B.L., Massotte, D., 2015. A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct* 220, 677–702. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0717-9>

Farmer, A.D., Drewes, A.M., Chiarioni, G., De Giorgio, R., O'Brien, T., Morlion, B., Tack, J., 2019. Pathophysiology and management of opioid-induced constipation: European expert consensus statement. *United European Gastroenterol J* 7, 7–20. <https://doi.org/10.1177/2050640618818305>

Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W.D., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R., Kieffer, B.L., 2000. Mice deficient for  $\delta$ - and  $\mu$ -opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* 25, 195–200. <https://doi.org/10.1038/76061>

Fishbain, D.A., Rosomoff, H.L., Rosomoff, R.S., 1992. Drug abuse, dependence, and addiction in chronic pain patients. *Clin J Pain* 8, 77–85. <https://doi.org/10.1097/00002508-199206000-00003>

Fraser, G.L., Gaudreau, G.A., Clarke, P.B., Ménard, D.P., Perkins, M.N., 2000. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br J Pharmacol* 129, 1668–1672. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703248>

Fréquence médicale [WWW Document], 2021. . frequencemedicale.com. URL <https://www.frequencemedicale.com/index.php?op=article&action=video&type=2&id=2414&fmnl=cb2c2041d9763d84d7d655e81178f444&ReverseCode=NWNMbStkUHpPVkdTY29aMHFCT3RWVkiTdUxKd1lyT0daREJKZG1MZ2YrVT0~~equal~~&specialite=generaliste> (accessed 9.19.21).

Gabel, F., Hovhannisyann, V., Andry, V., Goumon, Y., 2022. Central metabolism as a potential origin of sex differences in morphine antinociception but not in the induction of antinociceptive tolerance in mice. *British Journal of Pharmacology Online* ahead of print. <https://doi.org/10.1111/bph.15792>

Gallantine, E.L., Meert, T.F., 2005. A Comparison of the Antinociceptive and Adverse Effects of the  $\mu$ -Opioid Agonist Morphine and the  $\delta$ -Opioid Agonist SNC80. *Basic clin. Pharmacol. Toxicol.* 97, 39–51. [https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto\\_97107.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_97107.x)

Gao, C.-J., Niu, L., Ren, P.-C., Wang, W., Zhu, C., Li, Y.-Q., Chai, W., Sun, X.-D., 2012. Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system. *Neuroscience* 202, 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.060>

Garzón, J., García-España, A., Sánchez-Blázquez, P., 1997. Opioids binding mu and delta receptors exhibit diverse efficacy in the activation of Gi2 and G(x/z) transducer proteins in mouse periaqueductal gray matter. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 549–557.

Gavériaux-Ruff, C., Karchewski, L.A., Hever, X., Matifas, A., Kieffer, B.L., 2008. Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur J Neurosci* 27, 2558–2567. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06223.x>

Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2011. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol* 22, 405–414. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32834a1f2c>

Gaveriaux-Ruff, C., Nozaki, C., Nadal, X., Hever, X.C., Weibel, R., Matifas, A., Reiss, D., Filliol, D., Nassar, M.A., Wood, J.N., Maldonado, R., Kieffer, B.L., 2011. Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* 152, 1238–1248. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.031>

Gendron, L., Cahill, C.M., von Zastrow, M., Schiller, P.W., Pineyro, G., 2016. Molecular Pharmacology of  $\delta$ -Opioid Receptors. *Pharmacol Rev* 68, 631–700. <https://doi.org/10.1124/pr.114.008979>

Gendron, L., Lucido, A.L., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, J.-P., Stroh, T., Beaudet,

A., 2006. Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 26, 953–962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3598-05.2006>

Gendron, L., Nagi, K., Zeghal, M., Giguère, P.M., Pineyro, G., 2019. Molecular aspects of delta opioid receptors. *Vitam Horm* 111, 49–90. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.06.001>

Gendron, L., Pintar, J.E., Chavkin, C., 2007. Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* 150, 807–817. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.060>

Génier, S., Degrandmaison, J., Moreau, P., Labrecque, P., Hébert, T.E., Parent, J.-L., 2016. Regulation of GPCR expression through an interaction with CCT7, a subunit of the CCT/TRiC complex. *MBoC* 27, 3800–3812. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-04-0224>

Georgoussi, Z., Leontiadis, L., Mazarakou, G., Merkouris, M., Hyde, K., Hamm, H., 2006. Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the mu- and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling. *Cell Signal* 18, 771–782. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.07.003>

Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L., 1979. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6666–6670.

Gong, L., Gao, F., Li, J., Li, J., Yu, X., Ma, X., Zheng, W., Cui, S., Liu, K., Zhang, M., Kunze, W., Liu, C.Y., 2015. Oxytocin-induced membrane hyperpolarization in pain-sensitive dorsal root ganglia neurons mediated by Ca(2+)/nNOS/NO/KATP pathway. *Neuroscience* 289, 417–428. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.058>

Graham, G.G., Davies, M.J., Day, R.O., Mohamudally, A., Scott, K.F., 2013. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacol* 21, 201–232. <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0172-x>

Granier, S., Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2012. Structure of the  $\delta$ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485, 400–404. <https://doi.org/10.1038/nature11111>

Gris, P., Gauthier, J., Cheng, P., Gibson, D.G., Gris, D., Laur, O., Pierson, J., Wentworth, S., Nackley, A.G., Maixner, W., Diatchenko, L., 2010. A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. *Mol Pain* 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-33>

Gupta, A., Gomes, I., Wardman, J., Devi, L.A., 2014. Opioid receptor function is regulated

by post-endocytic peptide processing. *J Biol Chem* 289, 19613–19626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.537704>

Hackler, L., Zadina, J.E., Ge, L.-J., Kastin, A.J., 1997. Isolation of Relatively Large Amounts of Endomorphin-1 and Endomorphin-2 From Human Brain Cortex. *Peptides* 18, 1635–1639. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(97\)00259-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00259-3)

Hampton, S.B., Cavalier, J., Langford, R., 2015. The influence of race and gender on pain management: a systematic literature review. *Pain Manag Nurs* 16, 968–977. <https://doi.org/10.1016/j.pmn.2015.06.009>

Harrison, L.M., Kastin, A.J., Zadina, J.E., 1998. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides* 19, 1603–1630. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00126-0)

Hassett, A.L., Aquino, J.K., Ilgen, M.A., 2014. The risk of suicide mortality in chronic pain patients. *Curr Pain Headache Rep* 18, 436. <https://doi.org/10.1007/s11916-014-0436-1>

Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., Gloriam, D.E., 2017. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>

Hayhurst, C.J., Durieux, M.E., 2016. Differential Opioid Tolerance and Opioid-induced Hyperalgesia: A Clinical Reality. *Anesthesiology* 124, 483–488. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000963>

He, C., Wei, Y., Sun, K., Li, B., Dong, X., Zou, Z., Liu, Y., Kinch, L.N., Khan, S., Sinha, S., Xavier, R.J., Grishin, N.V., Xiao, G., Eskelinen, E.-L., Scherer, P.E., Whistler, J.L., Levine, B., 2013. Beclin 2 Functions in Autophagy, Degradation of G Protein-Coupled Receptors, and Metabolism. *Cell* 154, 1085–1099. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.035>

Henry, Anastasia G., White, I.J., Marsh, M., von Zastrow, M., Hislop, J.N., 2011. The Role of Ubiquitination in Lysosomal Trafficking of  $\delta$ -Opioid Receptors. *Traffic* 12, 170–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01145.x>

Henry, Anastasia G., White, I.J., Marsh, M., von Zastrow, M., Hislop, J.N., 2011. The role of ubiquitination in lysosomal trafficking of  $\delta$ -opioid receptors. *Traffic* 12, 170–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01145.x>

Hervera, A., Leáñez, S., Negrete, R., Pol, O., 2009. The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 380, 345–352. <https://doi.org/10.1007/s00210-009-0436-6>

Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y., 2010. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Res* 90, 291–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>

Hilger, D., Masureel, M., Kobilka, B.K., 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* 25, 4–12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>

Hilhorst, R., Houkes, L., van den Berg, A., Ruijtenbeek, R., 2009. Peptide microarrays for detailed, high-throughput substrate identification, kinetic characterization, and inhibition studies on protein kinase A. *Anal Biochem* 387, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.022>

Hill, S.J., 2006. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol* 147, S27–S37. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706455>

Hislop, J.N., von Zastrow, M., 2011. Role of Ubiquitination in Endocytic Trafficking of G-Protein-Coupled Receptors. *Traffic* 12, 137–148. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01121.x>

Holdridge, S.V., Armstrong, S.A., Taylor, A.M., Cahill, C.M., 2007. Behavioural and Morphological Evidence for the Involvement of Glial Cell Activation in Delta Opioid Receptor Function: Implications for the Development of Opioid Tolerance. *Mol Pain* 3, 1744-8069-3–7. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-7>

Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R., 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258, 577–579. <https://doi.org/10.1038/258577a0>

Hurley, R.W., Hammond, D.L., 2000. The analgesic effects of supraspinal  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *J. Neurosci.* 20, 1249–1259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-03-01249.2000>

IASP Announces Revised Definition of Pain, 2020. . International Association for the Study of Pain (IASP). URL <https://www.iasp-pain.org/publications/iasp-news/iasp-announces-revised-definition-of-pain/> (accessed 10.6.21).

Je sais comment ma douleur chronique peut être évaluée [WWW Document], n.d. . PÔLE DE CANCÉROLOGIE POLYCLINIQUE DU PARC - CENTRE MAURICE TUBIANA. URL <http://cancer-parc-tubiana.docvitae.fr/46/post/2020/08/je-sais-comment-ma-douleur-chronique-peut-etre-evaluee.html> (accessed 7.17.23).

Jimenez-Vargas, N.N., Gong, J., Wisdom, M.J., Jensen, D.D., Latorre, R., Hegron, A., Teng, S., DiCello, J.J., Rajasekhar, P., Veldhuis, N.A., Carbone, S.E., Yu, Y., Lopez-Lopez, C.,

Jaramillo-Polanco, J., Canals, M., Reed, D.E., Lomax, A.E., Schmidt, B.L., Leong, K.W., Vanner, S.J., Halls, M.L., Bunnett, N.W., Poole, D.P., 2020. Endosomal signaling of delta opioid receptors is an endogenous mechanism and therapeutic target for relief from inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 15281–15292. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000500117>

Jones, P., Griffin, A.M., Gawell, L., Lavoie, R., Delorme, D., Roberts, E., Brown, W., Walpole, C., Xiao, W., Boulet, J., Labarre, M., Coupal, M., Butterworth, J., St-Onge, S., Hodzic, L., Salois, D., 2009. N,N-Diethyl-4-[(3-hydroxyphenyl)(piperidin-4-yl)amino] benzamide derivatives: The development of diaryl amino piperidines as potent  $\delta$  opioid receptor agonists with in vivo anti-nociceptive activity in rodent models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 5994–5998. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.072>

Joseph, E.K., Levine, J.D., 2010. Mu and Delta Opioid Receptors on Nociceptors Attenuate Mechanical Hyperalgesia in Rat. *Neuroscience* 171, 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.035>

Joshi, W., Reuben, S.S., Kilaru, P.R., Sklar, J., Maciolek, H., 2000. Postoperative analgesia for outpatient arthroscopic knee surgery with intraarticular clonidine and/or morphine. *Anesth Analg* 90, 1102–1106. <https://doi.org/10.1097/00000539-200005000-00018>

Jullié, D., Benitez, C., Knight, T.A., Simic, M.S., von Zastrow, M., 2022. Endocytic trafficking determines cellular tolerance of presynaptic opioid signaling. *Elife* 11, e81298. <https://doi.org/10.7554/eLife.81298>

Jutkiewicz, Emily M., Kaminsky, S.T., Rice, K.C., Traynor, J.R., Woods, J.H., 2005. Differential behavioral tolerance to the delta-opioid agonist SNC80 ([(+)-4-( $\alpha$ R)- $\alpha$ -[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl]-3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide) in Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 414–422. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.088831>

Jutkiewicz, E. M., Rice, K.C., Traynor, J.R., Woods, J.H., 2005. Separation of the convulsions and antidepressant-like effects produced by the delta-opioid agonist SNC80 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 182, 588–596. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0138-9>

Jutkiewicz, E.M., Torregrossa, M.M., Sobczyk-Kojiro, K., Mosberg, H.I., Folk, J.E., Rice, K.C., Watson, S.J., Woods, J.H., 2006. Behavioral and neurobiological effects of the enkephalinase inhibitor RB101 relative to its antidepressant effects. *Eur J Pharmacol* 531, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.002>

Kabli, N., Cahill, C.M., 2007. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in

neuropathic pain. *Pain* 127, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.08.003>

Kadam, U.T., Thomas, E., Croft, P.R., 2005. Is chronic widespread pain a predictor of all-cause morbidity? A 3 year prospective population based study in family practice. *J Rheumatol* 32, 1341–1348.

Kaeffer, J., Zeder-Lutz, G., Simonin, F., Lecat, S., 2021. GPRASP/ARMCX protein family: potential involvement in health and diseases revealed by their novel interacting partners. *Curr Top Med Chem* 21, 227–254. <https://doi.org/10.2174/1568026620666201202102448>

Kamei, J., Kawai, K., Mizusuna, A., Saitoh, A., Morita, K., Narita, M., Tseng, L.F., Nagase, H., 1997. Supraspinal delta 1-opioid receptor-mediated antinociceptive properties of (-)-TAN-67 in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 322, 27–30. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)00085-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)00085-x)

Katon, W., Lin, E., Von Korff, M., Russo, J., Lipscomb, P., Bush, T., 1991. Somatization: a spectrum of severity. *Am J Psychiatry* 148, 34–40. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.7.A34>

Kaufman, D.L., Xia, Y.-R., Keith, D.E., Newman, D., Evans, C.J., Lusk, A.J., 1994. Localization of the  $\delta$ -opioid receptor gene to mouse chromosome 4 by linkage analysis. *Genomics* 19, 405–406. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1087>

Kawaraguchi, Y., Kawaguchi, M., Takahashi, M., Horiuchi, T., Sakamoto, T., Furuya, H., 2004. Delta-opioid agonist SNC80 can attenuate the development of dynorphin A-induced tactile allodynia in rats. *Anesthesiology* 101, 546–549. <https://doi.org/10.1097/00000542-200408000-00040>

Kelly, E., Conibear, A., Henderson, G., 2023. Biased Agonism: Lessons from Studies of Opioid Receptor Agonists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 63, 491–515. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-052120-091058>

Khavandgar, S., Homayoun, H., Dehpour, A.R., 2002. The role of nitric oxide in the proconvulsant effect of delta-opioid agonist SNC80 in mice. *Neurosci Lett* 329, 237–239. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00417-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00417-2)

Kieffer, B.L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., Hirth, C.G., 1992. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12048–12052. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12048>

Kim, K.-S., Lee, Ko-Woon, Lee, Kang-Woo, Im, J.-Y., Yoo, J.Y., Kim, S.-W., Lee, J.-K., Nestler, E.J., Han, P.-L., 2006. Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3908–3913. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508812103>



Kohno, T., Kumamoto, E., Higashi, H., Shimoji, K., Yoshimura, M., 1999. Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol* 518, 803–813. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0803p.x>

König, M., Zimmer, A.M., Steiner, H., Holmes, P.V., Crawley, J.N., Brownstein, M.J., Zimmer, A., 1996. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature* 383, 535–538. <https://doi.org/10.1038/383535a0>

Kosek, E., Cohen, M., Baron, R., Gebhart, G.F., Mico, J.-A., Rice, A.S.C., Rief, W., Sluka, A.K., 2016. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain* 157, 1382–1386. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000507>

Kotlinska, J.H., Gibula-Bruzda, E., Pachuta, A., Kunce, D., Witkowska, E., Chung, N.N., Schiller, P.W., Izdebski, J., 2010. Influence of new deltorphin analogues on reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in rats. *Behav Pharmacol* 21, 638–648. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32833e7e97>

Kreil, G., Barra, D., Simmaco, M., Erspamer, V., Falconieri Erspamer, G., Negri, L., Severini, C., Corsi, R., Melchiorri, P., 1989. Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for  $\delta$  opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 162, 123–128. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90611-0](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90611-0)

Kremer, M., Yalcin, I., Goumon, Y., Wurtz, X., Nexon, L., Daniel, D., Megat, S., Ceredig, R.A., Ernst, C., Turecki, G., Chavant, V., Thérout, J.-F., Lacaud, A., Joganah, L.-E., Lelievre, V., Massotte, D., Lutz, P.-E., Gilsbach, R., Salvat, E., Barrot, M., 2018. A dual noradrenergic mechanism for the relief of neuropathic allodynia by the antidepressant drugs duloxetine and amitriptyline. *J Neurosci* 38, 9934–9954. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1004-18.2018>

Kristensen, K., Christensen, C.B., Christrup, L.L., 1995. The  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ , delta, kappa opioid receptor binding profiles of methadone stereoisomers and morphine. *Life Sci* 56, PL45-50. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00426-s](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00426-s)

Lackman, J.J., Markkanen, P.M.H., Hogue, M., Bouvier, M., Petäjä-Repo, U.E., 2014. N-Glycan-dependent and -independent Quality Control of Human  $\delta$  Opioid Receptor N-terminal Variants. *J Biol Chem* 289, 17830–17842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.566273>

Lagerström, M.C., Schiöth, H.B., 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7, 339–357. <https://doi.org/10.1038/nrd2518>

Larousse, É., 2023. Définitions : douleur, douleurs - Dictionnaire de français Larousse [WWW Document]. URL <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/douleur/26637>

(accessed 6.23.23).

Laugwitz, K.L., Offermanns, S., Spicher, K., Schultz, G., 1993.  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuron* 10, 233–242. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90314-h](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90314-h)

Law, S.F., Reisine, T., 1997. Changes in the Association of G Protein Subunits with the Cloned Mouse Delta Opioid Receptor on Agonist Stimulation 281.

Le Merrer, J., Rezai, X., Scherrer, G., Becker, J.A.J., Kieffer, B.L., 2013. Impaired hippocampus-dependent and facilitated striatum-dependent behaviors in mice lacking the  $\delta$  opioid receptor. *Neuropsychopharmacology* 38, 1050–1059. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.1>

Lee, M., Silverman, S., Hansen, H., Patel, V., Manchikanti, L., 2011. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician* 14, 145–161.

Letellier, B., Kremer, M., Becker, L.J., Andry, V., Goumon, Y., Leboulleux, Q., Hener, P., Inquimbert, P., Couqueberg, N., Waltisperger, E., Yalcin, I., Mouthon, F., Droguerre, M., Charvériat, M., Barrot, M., 2021. Action of mefloquine/amitriptyline THN101 combination on neuropathic mechanical hypersensitivity in mice. *Pain* 162, 2841–2853. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002276>

Lim, S.-N., Han, H.-S., Lee, K.-H., Lee, S.-C., Kim, J., Yun, J., Park, S., Park, M., Choe, Y., Ryoo, H.-M., Lee, K., Cho, D., Zang, D.Y., Choi, J., 2015. A Satisfaction Survey on Cancer Pain Management Using a Self-Reporting Pain Assessment Tool. *Journal of Palliative Medicine* 18, 225–231. <https://doi.org/10.1089/jpm.2014.0021>

Ling, N., Burgus, R., Guillemin, R., 1976. Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3942–3946. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3942>

Listos, J., Łupina, M., Talarek, S., Mazur, A., Orzelska-Górka, J., Kotlińska, J., 2019. The mechanisms involved in morphine addiction: an overview. *Int J Mol Sci* 20, 4302. <https://doi.org/10.3390/ijms20174302>

Liu, X.-Y., Liu, Z.-C., Sun, Y.-G., Ross, M., Kim, S., Tsai, F.-F., Li, Q.-F., Jeffrey, J., Kim, J.-Y., Loh, H.H., Chen, Z.-F., 2011. Unidirectional Cross-activation of GRPR by MOR1D Uncouples Itch and Analgesia Induced by Opioids. *Cell* 147, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.043>

Lobingier, B.T., Hüttenhain, R., Eichel, K., Miller, K.B., Ting, A.Y., von Zastrow, M.,

Krogan, N.J., 2017. An approach to spatiotemporally resolve protein interaction networks in living cells. *Cell* 169, 350–360.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.022>

Lutz, P.-E., Kieffer, B.L., 2013. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci* 36, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.002>

Ma, J., Zhang, Y., Kalyuzhny, A.E., Pan, Z.Z., 2006. Emergence of functional delta-opioid receptors induced by long-term treatment with morphine. *Mol Pharmacol* 69, 1137–1145. <https://doi.org/10.1124/mol.105.019109>

Magni, G., Rigatti-Luchini, S., Fracca, F., Merskey, H., 1998. Suicidality in chronic abdominal pain: an analysis of the Hispanic Health and Nutrition Examination Survey (HHANES). *Pain* 76, 137–144. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(98\)00035-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(98)00035-9)

Manfra, O., Van Craenenbroeck, K., Skieterska, K., Frimurer, T., Schwartz, T.W., Levy, F.O., Andressen, K.W., 2015. Downregulation of 5-HT<sub>7</sub> Serotonin Receptors by the Atypical Antipsychotics Clozapine and Olanzapine. Role of Motifs in the C-Terminal Domain and Interaction with GASP-1. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 1206–1218. <https://doi.org/10.1021/cn500339p>

Mann, A., Liebetrau, S., Klima, M., Dasgupta, P., Massotte, D., Schulz, S., 2020. Agonist-induced phosphorylation bar code and differential post-activation signaling of the delta opioid receptor revealed by phosphosite-specific antibodies. *Sci Rep* 10, 8585. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65589-7>

Mansour, A., Hoversten, M.T., Taylor, L.P., Watson, S.J., Akil, H., 1995. The cloned  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res* 89–98. [https://doi.org/10.1016/0286-8999\(95\)00928-j](https://doi.org/10.1016/0286-8999(95)00928-j)

Mansour, A., Nagi, K., Dallaire, P., Lukasheva, V., Le Guill, C., Bouvier, M., Pineyro, G., 2021. Comprehensive Signaling Profiles Reveal Unsuspected Functional Selectivity of  $\delta$ -Opioid Receptor Agonists and Allow the Identification of Ligands with the Greatest Potential for Inducing Cyclase Superactivation. *ACS Pharmacol Transl Sci* 4, 1483–1498. <https://doi.org/10.1021/acscptsci.1c00019>

Martini, L., Thompson, D., Kharazia, V., Whistler, J.L., 2010. Differential Regulation of Behavioral Tolerance to WIN55,212-2 by GASP1. *Neuropsychopharmacol* 35, 1363–1373. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.6>

Martyn, J.A.J., Mao, J., Bittner, E.A., 2019. Opioid tolerance in critical illness. *N Engl J Med* 380, 365–378. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1800222>

Matthes, H.W.D., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort,

K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P., Kieffer, B.L., 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the  $\mu$ -opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819–823. <https://doi.org/10.1038/383819a0>

Mattson, C.L., Tanz, L.J., Quinn, K., Kariisa, M., Patel, P., Davis, N.L., 2021. Trends and geographic patterns in drug and synthetic opioid overdose deaths — United States, 2013–2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 70, 202–207. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7006a4>

Mauermann, E., Filitz, J., Dolder, P., Rentsch, K.M., Bandschapp, O., Ruppen, W., 2016. Does fentanyl lead to opioid-induced hyperalgesia in healthy volunteers?: A double-blind, randomized, crossover trial. *Anesthesiology* 124, 453–463. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000976>

Mazei-Robison, M.S., Nestler, E.J., 2012. Opiate-Induced Molecular and Cellular Plasticity of Ventral Tegmental Area and Locus Coeruleus Catecholamine Neurons. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a012070–a012070. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012070>

McLaughlin, P.J., 2013. Chapter 219 - Proenkephalin-Derived Peptides, in: Kastin, A.J. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 1602–1609. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00219-0>

Mellman, I., Fuchs, R., Helenius, A., 1986. Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways. *Annu Rev Biochem* 55, 663–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.003311>

Mennicken, F., Zhang, J., Hoffert, C., Ahmad, S., Beaudet, A., O'Donnell, D., 2003. Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J of Comp Neuro* 465, 349–360. <https://doi.org/10.1002/cne.10839>

Mercadante, S., Bruera, E., 2016. Opioid switching in cancer pain: From the beginning to nowadays. *Crit Rev Oncol/Hematol* 99, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.011>

Merkouris, M., Dragatsis, I., Megaritis, G., Konidakis, G., Zioudrou, C., Milligan, G., Georgoussi, Z., 1996. Identification of the critical domains of the delta-opioid receptor involved in G protein coupling using site-specific synthetic peptides. *Mol Pharmacol* 50, 985–993.

Metcalf, M.D., Yekkirala, A.S., Powers, M.D., Kitto, K.F., Fairbanks, C.A., Wilcox, G.L., Portoghese, P.S., 2012. The  $\delta$  Opioid Receptor Agonist SNC80 Selectively Activates Heteromeric  $\mu$ - $\delta$  Opioid Receptors. *ACS Chem Neurosci* 3, 505–509. <https://doi.org/10.1021/cn3000394>

Mika, J., Przewłocki, R., Przewłocka, B., 2001. The role of  $\delta$ -opioid receptor subtypes in

neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology* 415, 31–37. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)00814-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00814-7)

Milne, B., Jhamandas, K., Sutak, M., Grenier, P., Cahill, C.M., 2013. Stereo-selective inhibition of spinal morphine tolerance and hyperalgesia by an ultra-low dose of the alpha-2-adrenoceptor antagonist efaroxan. *Eur J Pharmacol* 702, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.022>

Mittal, N., Roberts, K., Pal, K., Bentolila, L.A., Fultz, E., Minasyan, A., Cahill, C., Pradhan, A., Conner, D., DeFea, K., Evans, C., Walwyn, W., 2013. Select g-protein-coupled receptors modulate agonist-induced signaling via a ROCK, LIMK, and  $\beta$ -arrestin 1 pathway. *Cell Rep* 5, 1010–1021. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.015>

Mittal, N., Tan, M., Egbuta, O., Desai, N., Crawford, C., Xie, C.-W., Evans, C., Walwyn, W., 2012. Evidence that Behavioral Phenotypes of Morphine in  $\beta$ -arr2<sup>-/-</sup> Mice Are Due to the Unmasking of JNK Signaling. *Neuropsychopharmacol* 37, 1953–1962. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.42>

Mobarec, J.C., Filizola, M., 2008. Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors. *Expert Opin Drug Discov* 3, 343–355. <https://doi.org/10.1517/17460441.3.3.343>

Moon, H.-E., Cavalli, A., Bahia, D.S., Hoffmann, M., Massotte, D., Milligan, G., 2001. The human  $\delta$  opioid receptor activates  $G_{i1\alpha}$  more efficiently than  $G_{o1\alpha}$ . *Journal of Neurochemistry* 76, 1805–1813. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00196.x>

Moore, C.A.C., Milano, S.K., Benovic, J.L., 2007. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 451–482. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712>

Morales-Hernandez, A., Benaksas, C., Chabot, A., Caprio, C., Ferdous, M., Zhao, X., Kang, G., McKinney Freeman, S.L., 2020. GPRASP proteins are critical negative regulators of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 135, 1111–1123. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003435>

Morinville, A., Cahill, C.M., Esdaile, M.J., Aibak, H., Collier, B., Kieffer, B.L., Beaudet, A., 2003. Regulation of  $\delta$ -Opioid Receptor Trafficking via  $\mu$ -Opioid Receptor Stimulation: Evidence from  $\mu$ -Opioid Receptor Knock-Out Mice. *J. Neurosci.* 23, 4888–4898. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-04888.2003>

Morinville, A., Cahill, C.M., Kieffer, B., Collier, B., Beaudet, A., 2004. Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic

inflammatory pain. *Pain* 109, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.01.011>

Mosberg, H.I., Hurst, R., Hruby, V.J., Gee, K., Yamamura, H.I., Galligan, J.J., Burks, T.F., 1983. Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 5871–5874.

Nagi, K., Pineyro, G., 2014. Kir3 channel signaling complexes: focus on opioid receptor signaling. *Front Cell Neurosci* 8, 186. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00186>

Naloxone [WWW Document], 2017. . sfmu.org. URL <https://www.sfm.org/toxin/ANTIDOTE/NALOXONE.HTM> (accessed 4.24.22).

National Institute on Drug Abuse, 2021. Opioid Overdose Crisis [WWW Document]. National Institute on Drug Abuse. URL <https://nida.nih.gov/drug-topics/opioids/opioid-overdose-crisis> (accessed 5.6.22).

Nicholas, M., Vlaeyen, J.W.S., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Giamberardino, M.A., Goebel, A., Korwisi, B., Perrot, S., Svensson, P., Wang, S.-J., Treede, R.-D., 2019. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain* 160, 28–37. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001390>

Noda, M., Teranishi, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Notake, M., Nakanishi, S., Numa, S., 1982. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature* 297, 431–434. <https://doi.org/10.1038/297431a0>

Nozaki, C., Le Bourdonnec, B., Reiss, D., Windh, R.T., Little, P.J., Dolle, R.E., Kieffer, B.L., Gavériaux-Ruff, C., 2012.  $\delta$ -Opioid Mechanisms for ADL5747 and ADL5859 Effects in Mice: Analgesia, Locomotion, and Receptor Internalization. *J Pharmacol Exp Ther* 342, 799–807. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.188987>

Obara, I., Parkitna, J.R., Korostynski, M., Makuch, W., Kaminska, D., Przewlocka, B., Przewlocki, R., 2009. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain* 141, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.12.006>

Offermanns, S., Schultz, G., Rosenthal, W., 1991. Evidence for opioid receptor-mediated activation of the G-proteins, Go and Gi2, in membranes of neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells. *Journal of Biological Chemistry* 266, 3365–3368. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)67799-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)67799-9)

Ohsawa, M., Nagase, H., Kamei, J., 1998. Role of Intracellular Calcium in Modification of Mu and Delta Opioid Receptor-Mediated Antinociception by Diabetes in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 780–787.

Okura, T., Varga, E.V., Hosohata, Y., Navratilova, E., Cowell, S.M., Rice, K., Nagase, H., Hruby, V.J., Roeske, W.R., Yamamura, H.I., 2003. Agonist-specific down-regulation of the human  $\delta$ -opioid receptor. *Eur J Pharmacol* 459, 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02823-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02823-6)

Olianas, M.C., Dedoni, S., Onali, P., 2012a. The atypical antidepressant mianserin exhibits agonist activity at  $\kappa$ -opioid receptors. *Br J Pharmacol* 167, 1329–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02078.x>

Olianas, M.C., Dedoni, S., Onali, P., 2012b. Coincidence Signaling of Dopamine D1-Like and M1 Muscarinic Receptors in the Regulation of Cyclic AMP Formation and CREB Phosphorylation in Mouse Prefrontal Cortex. *Neurosignals* 21, 61–74. <https://doi.org/10.1159/000335208>

Onofrio, B.M., Yaksh, T.L., 1983. Intrathecal delta-receptor ligand produces analgesia in man. *Lancet* 1, 1386–1387. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)92170-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(83)92170-0)

Opr1 (opioid receptor, delta 1) | Gene Report | BioGPS [WWW Document], n.d. URL <http://biogps.org/#goto=genereport&id=18386> (accessed 7.20.23).

Otis, V., Sarret, P., Gendron, L., 2011. Spinal activation of delta opioid receptors alleviates cancer-related bone pain. *Neuroscience* 183, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.052>

Overland, A.C., Kitto, K.F., Chabot-Doré, A.-J., Rothwell, P.E., Fairbanks, C.A., Stone, L.S., Wilcox, G.L., 2009. Protein kinase C mediates the synergistic interaction between agonists acting at alpha2-adrenergic and delta-opioid receptors in spinal cord. *J Neurosci* 29, 13264–13273. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1907-09.2009>

p38 MAPK Signaling Pathway | Sino Biological [WWW Document], n.d. URL <https://www.sinobiological.com/pathways/p38-mapk-signaling-pathway> (accessed 7.27.23).

Pacheco, D.F., Reis, G.M.L., Francischi, J.N., Castro, M.S.A., Perez, A.C., Duarte, I.D.G., 2005.  $\delta$ -Opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via  $\delta$ 1 and  $\delta$ 2 receptors and activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sciences* 78, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.032>

Patwardhan, A.M., Diogenes, A., Berg, K.A., Fehrenbacher, J.C., Clarke, W.P., Akopian, A.N., Hargreaves, K.M., 2006. PAR-2 agonists activate trigeminal nociceptors and induce functional competence in the delta opioid receptor. *Pain* 125, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.05.007>

Peckys, D., Landwehrmeyer, G.B., 1999. Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor

messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. *Neuroscience* 88, 1093–1135. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00251-6)

Pei, G., Kieffer, B.L., Lefkowitz, R.J., Freedman, N.J., 1995. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol Pharmacol* 48, 173–177.

Pellissier, L.P., Pujol, C., Becker, J.A., Merrer, J.L., 2018. Delta Opioid Receptors: Learning and Motivation. Editions Springer, p. 227. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_89](https://doi.org/10.1007/164_2016_89)

Pert, C.B., Snyder, S.H., 1973. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011–1014. <https://doi.org/10.1126/science.179.4077.1011>

Petrillo, P., Angelici, O., Bingham, S., Ficalora, G., Garnier, M., Zaratini, P.F., Petrone, G., Pozzi, O., Sbacchi, M., Stean, T.O., Upton, N., Dondio, G.M., Scheideler, M.A., 2003. Evidence for a Selective Role of the  $\delta$ -Opioid Agonist [8R-(4bS\*,8 $\alpha$ ,8 $\beta$ ,12b $\beta$ )]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]isoquinoline Hydrochloride (SB-235863) in Blocking Hyperalgesia Associated with Inflammatory and Neuropathic Pain Responses. *J Pharmacol Exp Ther* 307, 1079–1089. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.055590>

Pettinger, L., Gigout, S., Linley, J.E., Gamper, N., 2013. Bradykinin Controls Pool Size of Sensory Neurons Expressing Functional  $\delta$ -Opioid Receptors. *J Neurosci* 33, 10762–10771. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0123-13.2013>

Piñeyro, G., Archer-Lahlou, E., 2007. Ligand-specific receptor states: Implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cellular Signalling* 19, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.05.026>

Pirzgalska, R.M., Seixas, E., Seidman, J.S., Link, V.M., Sánchez, N.M., Mahú, I., Mendes, R., Gres, V., Kubasova, N., Morris, I., Arús, B.A., Larabee, C.M., Vasques, M., Tortosa, F., Sousa, A.L., Anandan, S., Tranfield, E., Hahn, M.K., Iannacone, M., Spann, N.J., Glass, C.K., Domingos, A.I., 2017. Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. *Nat Med* 23, 1309–1318. <https://doi.org/10.1038/nm.4422>

Portoghese, P.S., Sultana, M., Takemori, A.E., 1988. Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide  $\delta$  opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 146, 185–186. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90502-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90502-X)

Pradhan, A.A., Befort, K., Nozaki, C., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2011. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*



32, 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.06.008>

Pradhan, A.A., Perroy, J., Walwyn, W.M., Smith, M.L., Vicente-Sanchez, A., Segura, L., Bana, A., Kieffer, B.L., Evans, C.J., 2016. Agonist-specific recruitment of arrestin isoforms differentially modify delta opioid receptor function. *J. Neurosci.* 36, 3541–3551. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4124-15.2016>

Pradhan, A.A., Smith, M.L., Kieffer, B.L., Evans, C.J., 2012. Ligand-directed signalling within the opioid receptor family: Ligand-directed signalling at opioid receptors. *British Journal of Pharmacology* 167, 960–969. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02075.x>

Pradhan, A.A., Smith, M.L., Zyuzin, J., Charles, A., 2014.  $\delta$ -Opioid receptor agonists inhibit migraine-related hyperalgesia, aversive state and cortical spreading depression in mice:  $\delta$ -Opioid receptor agonists to treat migraine. *Br J Pharmacol* 171, 2375–2384. <https://doi.org/10.1111/bph.12591>

Pradhan, A.A.A., Becker, J.A.J., Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Massotte, D., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2009. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS One* 4, e5425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005425>

Pradhan, A.A.A., Siau, C., Constantin, A., Clarke, P.B.S., 2006. Chronic morphine administration results in tolerance to delta opioid receptor-mediated antinociception. *Neuroscience* 141, 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.021>

Pradhan, A.A.A., Walwyn, W., Nozaki, C., Filliol, D., Erbs, E., Matifas, A., Evans, C., Kieffer, B.L., 2010. Ligand-Directed Trafficking of the  $\delta$ -Opioid Receptor *In Vivo* : Two Paths Toward Analgesic Tolerance. *J. Neurosci.* 30, 16459–16468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3748-10.2010>

Prather, P.L., McGinn, T.M., Erickson, L.J., Evans, C.J., Loh, H.H., Law, P.Y., 1994. Ability of delta-opioid receptors to interact with multiple G-proteins is independent of receptor density. *Journal of Biological Chemistry* 269, 21293–21302. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31962-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31962-2)

Prather, P.L., Song, L., Piros, E.T., Law, P.Y., Hales, T.G., 2000.  $\delta$ -Opioid Receptors Are More Efficiently Coupled to Adenylyl Cyclase Than to L-Type  $Ca^{2+}$  Channels in Transfected Rat Pituitary Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 552–562.

Qiu, Y., Loh, H.H., Law, P.-Y., 2007. Phosphorylation of the  $\delta$ -opioid receptor regulates its  $\beta$ -arrestins selectivity and subsequent receptor internalization and adenylyl cyclase desensitization \*. *J Biol Chem* 282, 22315–22323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611258200>

Queneau, P., Serrie, A., Trèves, R., Bontoux, D., 2018. Chronic pain in France. Recommendations of the French Academy of Medicine for better pain management of the patients. *Académie Nationale de Médecine* 202, 1355–1370.

Quillet, R., Ayachi, S., Bihel, F., Elhabazi, K., Ilien, B., Simonin, F., 2016. RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol. Ther.* 160, 84–132. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.005>

Radoux-Mergault, A., Oberhauser, L., Aureli, S., Gervasio, F.L., Stoeber, M., n.d. Subcellular location defines GPCR signal transduction. *Sci Adv* 9, eadf6059. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf6059>

Rajagopal, S., Shenoy, S.K., 2018. GPCR desensitization: acute and prolonged phases. *Cell Signal* 41, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.024>

Ramasubbu, C., Gupta, A., 2011. Pharmacological treatment of opioid-induced hyperalgesia: a review of the evidence. *J Pain & Pall Care* 25, 219–230. <https://doi.org/10.3109/15360288.2011.589490>

Raynor, K., Kong, H., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G.I., Reisine, T., 1994. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45, 330–334.

Recommandations Douleur de l'adulte [WWW Document], 2023. . VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/douleur-de-l-adulte-1775.html> (accessed 8.5.21).

Reiss, D., Maurin, H., Audouard, E., Martínez-Navarro, M., Xue, Y., Herault, Y., Maldonado, R., Cabañero, D., Gaveriaux-Ruff, C., 2021. Delta opioid receptor in astrocytes contributes to neuropathic cold pain and analgesic tolerance in female mice. *Front Cell Neurosci* 15, 745178. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.745178>

Richard-Lalonde, M., Nagi, K., Audet, N., Sleno, R., Amraei, M., Hogue, M., Balboni, G., Schiller, P.W., Bouvier, M., Hébert, T.E., Pineyro, G., 2013. Conformational Dynamics of Kir3.1/Kir3.2 Channel Activation Via  $\delta$ -Opioid Receptors. *Mol Pharmacol* 83, 416–428. <https://doi.org/10.1124/mol.112.081950>

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., Maciag, C., Li, S., Cross, A., Smith, M.A., Zarate, C.A., 2016. A randomized, placebo-controlled pilot trial of the delta opioid receptor agonist AZD2327 in anxious depression. *Psychopharmacology (Berl)* 233,

1119–1130. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4195-4>

Roeckel, L.-A., Le Coz, G.-M., Gavériaux-Ruff, C., Simonin, F., 2016. Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience* 338, 160–182. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.029>

Rosciglione, S., Theriault, C., Boily, M.-O., Paquette, M., Lavoie, C., 2014. Gas regulates the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Nat Commun* 5, 1–11.

Roszbach, M.J., 1880. Ueber die Gewöhnung an Gifte. *Pflüger, Arch.* 21, 213–225. <https://doi.org/10.1007/BF01637005>

Saloman, J.L., Niu, K.Y., Ro, J.Y., 2011. Activation of peripheral delta-opioid receptors leads to anti-hyperalgesic responses in the masseter muscle of male and female rats. *Neuroscience* 190, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.062>

Salvareza, S.B., Deborde, S., Schreiner, R., Campagne, F., Kessels, M.M., Qualmann, B., Caceres, A., Kreitzer, G., Rodriguez-Boulan, E., 2009. Lim kinase 1 and cofilin regulate actin filament population required for dynamin-dependent apical carrier fission from the trans-golgi network. *MBoC* 20, 438–451. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0891>

Salz, T., Lavery, J.A., Lipitz-Snyderman, A.N., Boudreau, D.M., Moryl, N., Gillespie, E.F., Korenstein, D., 2019. Trends in opioid use among older survivors of colorectal, lung, and breast cancers. *J Clin Oncol* 37, 1001–1011. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00938>

Sánchez-Blázquez, P., García-España, A., Garzón, J., 1995. In vivo injection of antisense oligodeoxynucleotides to G alpha subunits and supraspinal analgesia evoked by mu and delta opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 275, 1590–1596.

Sánchez-Blázquez, P., Garzón, J., 1998. Delta Opioid Receptor Subtypes Activate Inositol-Signaling Pathways in the Production of Antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 285, 820–827.

Sanna, M.D., Mello, T., Ghelardini, C., Galeotti, N., 2015. Inhibition of spinal ERK1/2–c-JUN signaling pathway counteracts the development of low doses morphine-induced hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology* 764, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.022>

Sauriyal, D.S., Jaggi, A.S., Singh, N., 2011. Extending pharmacological spectrum of opioids beyond analgesia: Multifunctional aspects in different pathophysiological states. *Neuropeptides* 45, 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.12.004>

Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y.-Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L., Basbaum, A.I., 2009. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137, 1148–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.019>

Scherrer, G., Tryoen-Tóth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, Y.Q., Basbaum, A.I., Dierich, A., Vonesh, J.-L., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2006. Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9691–9696. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603359103>

Schmauss, C., Emrich, H.M., 1985. Dopamine and the action of opiates: A reevaluation of the dopamine hypothesis of schizophrenia with special consideration of the role of endogenous opioids in the pathogenesis of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 20, 1211–1231. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(85\)90179-9](https://doi.org/10.1016/0006-3223(85)90179-9)

Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J.J.-M., Matifas, A., Kieffer, B.L., 2004. Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J. Neurochem.* 89, 766–775.

Spahn, V., Stein, C., 2017. Targeting delta opioid receptors for pain treatment: drugs in phase I and II clinical development. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 26, 155–160. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1275562>

Standifer, K.M., Rossi, G.C., Pasternak, G.W., 1996. Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits. *Mol Pharmacol* 50, 293–298.

Stein, C., Millan, M.J., Shippenberg, T.S., Peter, K., Herz, A., 1989. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 248, 1269–1275.

Stein, E.A., Hiller, J.M., Simon, E.J., 1992. Effects of stress on opioid receptor binding in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51, 683–690. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90307-N](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90307-N)

St-Louis, É., Degrandmaison, J., Grastilleur, S., Génier, S., Blais, V., Lavoie, C., Parent, J.-L., Gendron, L., 2017. Involvement of the coatamer protein complex I in the intracellular traffic of the delta opioid receptor. *Mol Cell Neurosci* 79, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.12.005>

Stoeber, M., Jullié, D., Lobingier, B.T., Laeremans, T., Steyaert, J., Schiller, P.W., Manglik, A., von Zastrow, M., 2018. A genetically encoded biosensor reveals location bias of opioid drug action. *Neuron* 98, 963-976.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.021>

Stratton, J.A., Holmes, A., Rosin, N.L., Sinha, S., Vohra, M., Burma, N.E., Trang, T., Midha, R., Biernaskie, J., 2018. Macrophages regulate schwann cell maturation after nerve injury. *Cell Reports* 24, 2561-2572.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.004>

Su, D., Wang, M., Ye, C., Fang, J., Duan, Y., Zhang, Z., Hua, Q., Shi, C., Zhang, L., Zhang, R., Xie, X., 2017. One-step generation of mice carrying a conditional allele together with an HA-tag insertion for the delta opioid receptor. *Sci Rep* 7, 44476. <https://doi.org/10.1038/srep44476>

Swierkosz, T.A., Jordan, L., McBride, M., McGough, K., Devlin, J., Botting, R.M., 2002. Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. *Med Sci Monit* 8, BR496–BR503.

Taira, T., 2008. Chronic intrathecal drug administration for the control of intractable pain. *Brain Nerve* 60, 509–517.

Tejedor-Real, P., Micó, J.A., Smadja, C., Maldonado, R., Roques, B.P., Gibert-Rahola, J., 1998. Involvement of  $\delta$ -opioid receptors in the effects induced by endogenous enkephalins on learned helplessness model. *European Journal of Pharmacology* 354, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00423-3)

Thompson, D., Martini, L., Whistler, J.L., 2010a. Altered ratio of D1 and D2 dopamine receptors in mouse striatum is associated with behavioral sensitization to cocaine. *PLoS One* 5, e11038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011038>

Thompson, D., Martini, L., Whistler, J.L., 2010b. Altered Ratio of D1 and D2 Dopamine Receptors in Mouse Striatum Is Associated with Behavioral Sensitization to Cocaine. *PLoS One* 5, e11038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011038>

Thompson, P.I., Joel, S.P., John, L., Wedzicha, J.A., Maclean, M., Slevin, M.L., 1995. Respiratory depression following morphine and morphine-6-glucuronide in normal subjects. *Br J Clin Pharmacol* 40, 145–152.

Tissue Cell Type - OPRD1 - The Human Protein Atlas [WWW Document], 2023. . [Proteinatlas.org. URL https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116329-OPRD1/tissue+cell+type](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116329-OPRD1/tissue+cell+type) (accessed 7.19.23).

Tramadol - an overview | ScienceDirect Topics [WWW Document], n.d. URL <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/tramadol> (accessed 5.6.22).

Trapaidze, N., Keith, D.E., Cvejic, S., Evans, C.J., Devi, L.A., 1996. Sequestration of the  $\delta$  Opioid Receptor. *J Biol Chem* 271, 29279–29285.

Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H., 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, S133-153.

Tschische, P., Moser, E., Thompson, D., Vischer, H.F., Parzmair, G.P., Pommer, V., Platzer,

W., Schwarzbraun, T., Schaidler, H., Smit, M.J., Martini, L., Whistler, J.L., Waldhoer, M., 2010. The G-protein Coupled Receptor Associated Sorting Protein GASP-1 Regulates the Signalling and Trafficking of the Viral Chemokine Receptor US28. *Traffic* 11, 660–674. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01045.x>

Tuusa, J.T., Leskelä, T.T., Petäjä-Repo, U.E., 2010. Human  $\delta$  opioid receptor biogenesis is regulated via interactions with SERCA2b and calnexin. *The FEBS Journal* 277, 2815–2829. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07699.x>

Ujčíková, H., Brejchová, J., Vošahlíková, M., Kagan, D., Dlouhá, K., Sýkora, J., Merta, L., Drastichová, Z., Novotný, J., Ostašov, P., Roubalová, L., Parenti, M., Hof, M., Svoboda, P., 2014. Opioid-receptor (OR) signaling cascades in rat cerebral cortex and model cell lines: the role of plasma membrane structure. *Physiol Res* 63, S165-176. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932638>

van Rijn, R.M., Brissett, D.I., Whistler, J.L., 2012. Emergence of Functional Spinal Delta Opioid Receptors After Chronic Ethanol Exposure. *Biological Psychiatry, Addiction: Risk and Recovery* 71, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.015>

van Rijn, R.M., DeFriel, J.N., Whistler, J.L., 2013. Pharmacological traits of delta opioid receptors: pitfalls or opportunities? *Psychopharmacology (Berl)* 228, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3129-2>

Varga, E.V., Rubenzik, M.K., Stropova, D., Sugiyama, M., Grife, V., Hruby, V.J., Rice, K.C., Roeske, W.R., Yamamura, H.I., 2003. Converging protein kinase pathways mediate adenylyl cyclase superactivation upon chronic delta-opioid agonist treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 109–115. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.049643>

Veinante, P., Yalcin, I., Barrot, M., 2013. The amygdala between sensation and affect: a role in pain. *J Mol Psychiatry* 1, 9. <https://doi.org/10.1186/2049-9256-1-9>

Vicente-Sanchez, A., Dripps, I.J., Tipton, A.F., Akbari, H., Akbari, A., Jutkiewicz, E.M., Pradhan, A.A., 2018. Tolerance to high-internalizing  $\delta$  opioid receptor agonist is critically mediated by arrestin 2. *BJP* 175, 3050–3059. <https://doi.org/10.1111/bph.14353>

Vicente-Sanchez, A., Segura, L., Pradhan, A.A., 2016. The delta opioid receptor tool box. *Neuroscience* 338, 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.028>

Walwyn, W., Maidment, N.T., Sanders, M., Evans, C.J., Kieffer, B.L., Hales, T.G., 2005. Induction of  $\delta$  Opioid Receptor Function by Up-Regulation of Membrane Receptors in Mouse Primary Afferent Neurons. *Mol Pharmacol* 68, 1688–1698. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014829>

Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., Luo, Y., 2012. RNAscope. *The Journal of Molecular Diagnostics* 14, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>

Wang, Q., Liu-Chen, L.-Y., Traynor, J.R., 2009. Differential Modulation of  $\mu$ - and  $\delta$ -Opioid Receptor Agonists by Endogenous RGS4 Protein in SH-SY5Y Cells. *J Biol Chem* 284, 18357–18367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.015453>

Wang, S.-C., Chen, Y.-C., Lee, C.-H., Cheng, C.-M., 2019. Opioid addiction, genetic susceptibility, and medical treatments: a review. *Int J Mol Sci* 20, 4294. <https://doi.org/10.3390/ijms20174294>

Wang, Y., Zhuang, Y., DiBerto, J.F., Zhou, X.E., Schmitz, G.P., Yuan, Q., Jain, M.K., Liu, W., Melcher, K., Jiang, Y., Roth, B.L., Xu, H.E., 2023. Structures of the entire human opioid receptor family. *Cell* 186, 413–427.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.026>

Wei, Z.-Y., Brown, W., Takasaki, B., Plobeck, N., Delorme, D., Zhou, F., Yang, H., Jones, P., Gawell, L., Gagnon, H., Schmidt, R., Yue, S.-Y., Walpole, C., Payza, K., St-Onge, S., Labarre, M., Godbout, C., Jakob, A., Butterworth, J., Kamassah, A., Morin, P.-E., Projean, D., Ducharme, J., Roberts, E., 2000. N,N-Diethyl-4-(phenylpiperidin-4-ylidenemethyl)benzamide: A Novel, Exceptionally Selective, Potent  $\delta$  Opioid Receptor Agonist with Oral Bioavailability and Its Analogues. *J. Med. Chem.* 43, 3895–3905. <https://doi.org/10.1021/jm000229p>

Weibel, R., Reiss, D., Karchewski, L., Gardon, O., Matifas, A., Filliol, D., Becker, J.A.J., Wood, J.N., Kieffer, B.L., 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, e74706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074706>

Whistler, J.L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S.R., von Zastrow, M., 2002. Modulation of Postendocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors. *Science* 297, 615–620. <https://doi.org/10.1126/science.1073308>

Williams, T.J., Torres-Reveron, A., Chapeau, J.D., Milner, T.A., 2011. Hormonal regulation of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 95, 206–220. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.01.002>

Xie, W.-Y., He, Y., Yang, Y.-R., Li, Y.-F., Kang, K., Xing, B.-M., Wang, Y., 2009. Disruption of Cdk5-Associated Phosphorylation of Residue Threonine-161 of the  $\delta$ -Opioid Receptor: Impaired Receptor Function and Attenuated Morphine Antinociceptive Tolerance. *J.*

Neurosci. 29, 3551–3564. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0415-09.2009>

Yam, M.F., Loh, Y.C., Tan, C.S., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., Basir, R., 2018. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int J Mol Sci* 19, 2164. <https://doi.org/10.3390/ijms19082164>

Yang, L., Seifert, A., Wu, D., Wang, X., Rankovic, V., Schröder, H., Brandenburg, L.O., Höllt, V., Koch, T., 2010. Role of phospholipase D2/phosphatidic acid signal transduction in micro- and delta-opioid receptor endocytosis. *Mol Pharmacol* 78, 105–113. <https://doi.org/10.1124/mol.109.063107>

Zeder-Lutz, G., Bornert, O., Fellmann-Clauss, R., Knittel-Obrecht, A., Tranchant, T., Bouteben, S., Kaeffer, J., Quillet, R., Villa, P., Wagner, R., Lecat, S., Simonin, F., 2023. Characterization of anti-GASP motif antibodies that inhibit the interaction between GPRASP1 and G protein-coupled receptors. *Anal Biochem* 665, 115062. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115062>

Zeisel, A., Muñoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., Rolny, C., Castelo-Branco, G., Hjerling-Leffler, J., Linnarsson, S., 2015. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* 347, 1138–1142. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1934>

Zelaya, C.E., Dahlhamer, J.M., Lucas, J.W., Connor, E.M., 2020. Chronic Pain and High-impact Chronic Pain Among U.S. Adults, 2019. *NCHS Data Brief* 1–8.

Zheng, Y.-J., Wang, X.-R., Chen, H.-Z., Wu, X.-J., Zhao, Y.-H., Su, D.-S., 2012. Protective Effects of the Delta Opioid Peptide [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]enkephalin in an Ex Vivo Model of Ischemia/Reperfusion in Brain Slices. *Neuro Ther* 18, 762–766. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2012.00360.x>

Zhou, L., Zhang, Q., Stein, C., Schäfer, M., 1998. Contribution of Opioid Receptors on Primary Afferent Versus Sympathetic Neurons to Peripheral Opioid Analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 1000–1006.

Zhu, Y., King, M.A., Schuller, A.G.P., Nitsche, J.F., Reidl, M., Elde, R.P., Unterwald, E., Pasternak, G.W., Pintar, J.E., 1999. Retention of Supraspinal Delta-like Analgesia and Loss of Morphine Tolerance in. *Neuron* 24, 243–252.

Zhuang, Y., Wang, Y., He, B., He, X., Zhou, X.E., Guo, S., Rao, Q., Yang, J., Liu, J., Zhou, Q., Wang, X., Liu, M., Liu, W., Jiang, X., Yang, D., Jiang, H., Shen, J., Melcher, K., Chen, H., Jiang, Y., Cheng, X., Wang, M.-W., Xie, X., Xu, H.E., 2022. Molecular recognition of morphine and fentanyl by the human  $\mu$ -opioid receptor. *Cell* 185, 4361-4375.e19.



<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.041>

Zhuo, M., Gebhart, G.F., 1990. Characterization of descending inhibition and facilitation from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Pain* 42, 337–350. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)91147-B](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)91147-B)



# Annexe



## **I. Annexe 1**

L'annexe 1 est un article publié dans le journal *Analytical Biochemistry* en janvier 2023, décrivant la création et la caractérisation de l'anticorps purifié ciblant sélectivement GPRASP1 et GPRASP2 par l'équipe RCPG, douleur et inflammation. J'ai participé à ces travaux pour la caractérisation de l'anticorps en immunohistochimie et immunofluorescence. J'ai prélevé les cerveaux de souris WT et KO-GPRASP1 fixés au paraformaldéhyde et réalisé leur coupe au cryostat ainsi que participé aux tests d'immunohistochimie sur tissus. J'ai également réalisé des coupes de culots cellulaires congelés en vue d'un marquage par anticorps sur lames. La présence de GPRASP2 dans les mêmes tissus donnant un signal fort chez les KO-GPRASP1, les résultats n'ont pas été concluants et ne sont pas illustrés dans l'article.





## Characterization of anti-GASP motif antibodies that inhibit the interaction between GPRASP1 and G protein-coupled receptors

Gabrielle Zeder-Lutz<sup>a</sup>, Olivier Bornert<sup>a</sup>, Rosine Fellmann-Clauss<sup>a</sup>, Adeline Knittel-Obrecht<sup>b</sup>, Thibaud Tranchant<sup>a</sup>, Sarah Bouteben<sup>a,c</sup>, Juliette Kaeffer<sup>a</sup>, Raphaëlle Quillet<sup>a</sup>, Pascal Villa<sup>b</sup>, Renaud Wagner<sup>a,c</sup>, Sandra Lecat<sup>a,1</sup>, Frédéric Simonin<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Biotechnology and Cell Signaling, UMR7242 CNRS, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

<sup>b</sup> Plateforme de Chimie Biologique intégrative de Strasbourg, UAR3286, CNRS, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

<sup>c</sup> Biotechnology and Cell Signaling, IMPReSs facility for Integral Membrane Proteins Research and Services, UMR7242 CNRS, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Intrinsically disordered regions  
PPI  
GASP motif  
GPRASP1 antibodies  
SPR  
AlphaScreen assay

### ABSTRACT

G protein-coupled receptor associated sorting protein 1 (GPRASP1) belongs to a family of 10 proteins that display sequence homologies in their C-terminal region. Several members including GPRASP1 also display a short repeated sequence called the GASP motif that is critically involved in protein-protein interactions with G protein-coupled receptors (GPCRs). Here, we characterized anti-GASP motif antibodies and investigated their potential inhibitory functions. We first showed that our in-house anti-GPRASP1 rabbit polyclonal serum contains anti-GASP motif antibodies and purified them by affinity chromatography. We further showed that these antibodies can detect GPRASP1 and GPRASP2 in Western blot, immunoprecipitation and immunofluorescence experiments while a mutant of GPRASP2, in which the most conserved hydrophobic core of the GASP motifs is mutated, was no more detected. Further characterization of anti-GASP motif antibodies by ELISA and Surface Plasmon Resonance assays suggests that GASP motifs function as multivalent epitopes. Finally, we set-up an Amplified Luminescent Proximity Homogeneous AlphaScreen® assay to detect the interaction between purified ADRB2 receptor and the central domain of GPRASP1 and showed that anti-GASP motif antibodies efficiently inhibit this interaction. Altogether, our results suggest that anti-GASP motif antibodies could represent a valuable tool to neutralize the interaction of GPRASP1 and GPRASP2 with different GPCRs.

### 1. Introduction

The GPRASP/ARMCX protein family, mainly present in mammals, is composed of ten members, nine of which are encoded in tandem on the X chromosome. They share homologies in their carboxyl-terminal domains that contain armadillo-like repeats and can be subdivided according to whether they possess or not GASP motif repeats (subfamily 1 and 2, respectively; [1–4]). GPRASP1 and GPRASP2 (GPCR-associated sorting proteins) are the best functionally characterized proteins of subfamily 1 and have been implicated in membrane trafficking of G protein-coupled receptors (GPCRs; [3,5–7]). However, the molecular functions of GPRASP1 and GPRASP2 remain to be precisely characterized and knowledge about their intracellular localization and regulation is missing.

In previous studies, we have identified and characterized the GASP motif as a consensus sequence of twenty-one residues, the fifteen most conserved residues being formed by a hydrophobic kernel tetrapeptide - serine-tryptophan-phenylalanine-tryptophan (SWFW) - surrounded by acidic amino acids [3]. The GASP motif repeats are located in the central part of the proteins, which is considered an intrinsically disordered region, and are unique to the GPRASP/ARMCX subfamily 1 of all proteins in the Swissprot database [3,4]. In Human, GASP motifs are found in tandems, 22 times in GPRASP1, 7 times in GPRASP2, 2.5 times in GPRASP3, 11 times in ARM CX4 and 1.5 times in ARM CX5 [3]. We have shown previously that GASP motifs are necessary for GPRASP1 or GPRASP2 to interact directly with several GPCRs [2]. We have observed that in vitro translated full-length GPRASP1 could be pulled-down by the purified GST-tagged C-tail of GPCRs including delta-opioid,

\* Corresponding author. Biotechnology and Cell Signaling, UMR7242 CNRS, University of Strasbourg, 300 Boulevard Sébastien Brant, 67412, Illkirch, France.

E-mail address: [simonin@unistra.fr](mailto:simonin@unistra.fr) (F. Simonin).

<sup>1</sup> Co-last authors.

muscarinic M1 and beta-adrenergic ADRB1 receptors. Moreover, the central domain of GPRASP1 on its own could be pulled-down to the same extent by these receptor C-tails. Since this central domain contains 19 GASP motifs, this motif may play a major role in mediating these interactions. In cells, exogenously expressed full-length muscarinic M1 receptor, beta-adrenergic ADRB1 or ADRB2 receptors and calcitonin-like CALCR, could all co-immunoprecipitate the full-length GPRASP1 as well as the central domain of GPRASP1 expressed on its own. Using Surface Plasmon Resonance (SPR) measurements, we have shown that the purified central domain of GPRASP1 could interact *in vitro* with purified full-length ADRB2 or cannabinoid type 2 CNR2 receptors with an apparent affinity of 10–100 nM [2]. Interestingly, GST-pull-down experiments or SPR measurements allowed us to show that the interaction between these receptors and full-length GPRASP1 or the central domain of GPRASP1 (respectively) is completely abolished by a small peptide encoding one of the GASP motifs of GPRASP2 used as a competitor [2]. Finally, GPRASP2 can be pulled-down by purified GST-tagged C-tail of several GPCRs while a mutant of GPRASP2 in which the consensus kernel SWFW of GASP motifs was substituted by four alanine residues is no longer pulled-down [2]. These results indicate that GASP motifs mediate protein/protein interactions in particular with GPCRs.

We have previously generated and validated in GPRASP1 knock-out

mice a rabbit polyclonal serum directed against GPRASP1 [8]. To generate antibodies, one approach consists in producing a short peptide of 10–20 amino acids that is predicted to represent an immunogenic region of the targeted protein. A drawback of this approach is that many anti-peptide antibodies can react with the peptide but fail to recognize the cognate protein. Another approach is to produce the target protein as the immunogen for inoculation into animals, which, as a general rule, produces antibodies that can recognize the native protein and often display interfering function. We employed this latter to generate rabbit polyclonal anti-GPRASP1 antibodies directed against the last 470 residues of the GPRASP1. This region of GPRASP1 corresponds to the sequence initially isolated as a prey from a two-hybrid screen using the C-tail of delta-opioid receptor as a bait [4]. To raise antibodies, we produced and purified from *E Coli* GST fused to GPRASP<sub>924-1395</sub> and injected it to two rabbits. Within this immunogenic sequence, the majority codes for the most conserved C-ter domain of the GPRASP/ARMCX protein family with armadillo-like repeats but it extends on its N-terminus to include three GASP motifs repeated in tandem. We have previously observed that the resulting polyclonal serum could label the central domain of GPRASP1 [2] suggesting that it might contain anti-GASP motif antibodies. In the present study, we have purified from this serum and further characterized subpopulations of antibodies that specifically recognize GASP motifs. Using these anti-GASP motif

**Table 1**

Information on the different constructs used in this study.

Name of the fusion protein	GPRASP/ ARM CX domain or protein	GPRASP/ ARM CX residues	Vector	Nter-tag or Nter-protein	Goal	Assays	Name of the antibodies subpopulations	References
MBP-o.Ag	Original Antigen	924–1395	pMalC2	Maltose Binding protein	Production, purification in <i>E. coli</i>	Affinity columns for antibodies purification, ELISA	Affinity purified anti-o.Ag	This publication
MBP-GPRASP1-Ct	GPRASP1-Ct	1147–1395	pMalC2x	Hexa-Histidine			Affinity purified anti-GPRASP1-Ct	
MBP-GPRASP1-M	GPRASP1-M	380–1073	pMalC2x				Affinity purified anti-GPRASP1-M	
6xHis-GASP peptide	GASP motif	800–889	pET28b				Affinity purified anti-GASP-peptide	
GST-GPRASP1	GPRASP1	1–1395	pGEX-4T3	Glutathione S transferase	Production, purification in <i>E. coli</i>	SPR	Anti-GST-o.Ag serum	This publication [4]
GST-o.Ag	Original Antigen	924–1395	pGEX-4T3			Rabbit immunization		
GST-GPRASP2-C	GPRASP2-C	367–838	pGEX-4T3			SPR		This publication
GST-GPRASP1-M	GPRASP1-M	380–1073	pGEX-4T3			SPR, AlphaScreen		[2]
GPRASP1	GPRASP1	1–1395	pcDNA3		Overexpression in mammalian cells	Western Blot (WB)		[4]
GPRASP2	GPRASP2	1–838	pcDNA3					[2]
GPRASP2-DM	GPRASP2-DM	1–838	pcDNA3					[2]
GPRASP3	GPRASP3	1–547	pcDNA3.1					[2]
ARMCX5	ARMCX5	1–558	pcDNA3.1					[2]
GLuc2-GPRASP1	GPRASP1	1–1395	pSPICA-N2	Cter of Gaussia Luciferase	Overexpression in mammalian cells	Western Blot (WB)		Lecat et al. In preparation
GLuc2-GPRASP2	GPRASP2	1–838	pSPICA-N2					
GLuc2-GPRASP2-DM	GPRASP2-DM	1–838	pSPICA-N2					
GLuc2-GPRASP3	GPRASP3	1–547	pSPICA-N2					
GLuc2-ARMCX5	ARMCX5	1–558	pSPICA-N2					
EYFP-GPRASP1	GPRASP1	1–1395	pcDNA3.1	EYFP	Overexpression in mammalian cells	Immunofluorescence		This publication
EYFP-GPRASP2	GPRASP2	1–838	pcDNA3.1					



antibodies, we have set-up and validated a miniaturized assay suitable for the identification of compounds that inhibit the ADRB2 receptor/GPRASP1 interaction.

## 2. Experimental section

### 2.1. Cloning of GPRASP/ARMCX coding sequences into mammalian and bacterial expression vectors

All the constructs that were used in this study are summarized in Table 1. The cDNAs encoding the full-length proteins GPRASP1, GPRASP2, GPRASP2-DM, GPRASP3 and ARM CX5 cloned into the pcDNA3 or pcDNA3.1 eukaryotic expression vectors were described elsewhere [2,4]. For the expression of the EYFP-GPRASP1 and EYFP-GPRASP2 fusion proteins, the sequence encoding the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP, Clontech) was fused 5' upstream to each of these cDNA and inserted into the pcDNA3.1/Hygromycin (+) vector. For the expression of each GPRASP/ARM CX proteins fused at the C-ter of the *Gaussia princeps* luciferase GLuc2 fragment according to Ref. [9], PCR fragments were cloned into pDONOR223 (GPRASP1 and GPRASP2) or pDONOR207 (GPRASP3 and ARM CX5) following the Gateway cloning scheme and then subcloned by LR recombination into pSPICA-N2 vector (derived from the pCiNeo mammalian expression vector). The cDNAs encoding the different domains of GPRASP1 or GPRASP2 in fusion at their N-terminus with different proteins or tags were cloned into different vectors for *E. coli* expression: pGEX-4T3 vectors for bacterial expression of GST (glutathione S-transferase)-fused to sequences encoding full-length GPRASP1, the original antigen (o.Ag) encompassing residues 924 to 1395 of GPRASP1 and GPRASP2-C encompassing residues 367 to 838 of GPRASP2. The Middle domain of GPRASP1, GPRASP1-M, encoding residues 380 to 1073 was also cloned into pGEX-4T3 [2,4]. pMALC2x vector was used for bacterial expression of the MBP (maltose binding protein) fused GPRASP1 protein domains: the o.Ag, the GPRASP1-Ct encompassing residues 1147 to 1395 and the GPRASP1-M. pET28b vector was used for bacterial expression of the GASP peptide encoding residues 800 to 889 of GPRASP1 fused to a hexa-Histidine-tag (6xHis). All constructs were verified by DNA sequencing.

### 2.2. Expression and purification of GPRASP1 fusion proteins (Table 1)

GST-GPRASP1 full-length protein was expressed and purified as previously described [2]. To express the 6xHis-GASP peptide and the recombinant MBP proteins, vectors were introduced into competent *E. coli* Rosetta 2 DE3 strain (NOVAGEN 71400) and expression was induced using 0.5 mM isopropylthiogalactoside (IPTG) for 18 h at 22 °C (MBP-GPRASP1-M) or 1 mM IPTG for 2,5 h at 37 °C (6xHis-GASP peptide; MBP-o.Ag, MBP-GPRASP1-Ct). Bacteria were then pelleted, suspended in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5; 200 mM NaCl; 1 mM DTT with cOmplete protease inhibitors cocktail (ROCHE)), lysed using the microfluidizer M110-EH-30 or a sonicator (40 W). Finally, the lysates were cleared by centrifugation (10,000 g, 15 min, 4 °C). The MBP alone and MBP-fused GPRASP1 domains were purified on an AKTA Purifier instrument (GE Healthcare) using an MBP-Trap 1 ml column (Cytiva Europe GmbH) according to the manufacturer instructions. Proteins were eluted with lysis buffer supplemented with 10 mM maltose. The fractions corresponding to the protein of interest were pooled and concentrated using Vivaspin6 centrifugal concentrator with a 50 kDa cut-off (Sartorius) and dialyzed to exchange the buffer for PBS or for the coupling buffer (0.2 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3; 0.5 M NaCl) when used to prepare columns for anti-GST-o.Ag serum affinity purification. All fusion proteins with purified GPRASP1 domains were quantified using the BCA assay (Pierce), analyzed by SDS-PAGE and stored at -20 °C.

### 2.3. Affinity purification of antibodies sub-populations from serum against GST-o.Ag protein

Different purified MBP-fused GPRASP1 domains were immobilized onto affinity columns in order to purify antigen-specific antibodies from the serum with polyclonal rabbit antibodies directed against the GST-o.Ag fusion protein [4]. The purified MBP-fused GPRASP1 domains were cross-linked via amine groups onto the pre-packed NHS-activated Sepharose™ columns (HiTrap NHS-activated HP; Cytiva Europe GmbH) according to the instructions from the manufacturer and equilibrated in PBS before their further use. To purify antibodies, total IgGs fraction was first prepared from 1 to 2 ml of serum diluted 2-fold with binding buffer (PBS) using a HiTrap Protein A HP 1 ml column (Cytiva Europe GmbH). The IgGs were eluted with 200 mM citric acid, pH 2.5 (elution buffer) into neutralizing buffer (1 M Tris-HCl, pH 8) and dialyzed against PBS before their adsorption by recirculation onto MBP-GPRASP1 domain-affinity columns. After incubation for 4 h–12 h at 4 °C, each affinity column was washed with 10 ml PBS. Antibodies were eluted with 0.5 ml elution buffer into 1.5 ml tubes pre-loaded with 0.05 ml neutralizing buffer.

### 2.4. Cell culture and transfection

Cells were grown at 37 °C in a water-saturated atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> incubator. HEK293 cells lines [10] were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) with 4.5 g/L glucose, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco), penicillin and streptomycin (100 U/ml and 100 µg/ml) antibiotics. For transient transfection, cells were seeded at 5 to 6.10<sup>5</sup> cells/well in 6-wells culture plates. 24 h after seeding (80% confluency) DNA transfection was started by adding 4 µg of plasmid DNA and 9 µg of PEI max reagent (24765-1, Polysciences; Europe). Cell lysates were prepared 24 h later in ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% (v/v) NP40; 0.25% (w/v) Na-deoxycholate) supplemented with EDTA-free anti-protease and protein concentrations were determined (BCA assay kit, Pierce). Chinese hamster ovary (CHO) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with HAMF12 (DMEM/HAMF12 1:1, Gibco) containing 5% (v/v) fetal calf serum (Gibco), penicillin and streptomycin antibiotics (100 U/ml and 100 µg/ml, respectively) and 2 mM L-glutamine. CHO cells stably expressing either EYFP-GPRASP1 or EYFP-GPRASP2 after lipofectamine 2000 transfection were established with the help of FACS sorting and propagated in appropriate selection media supplemented with 0.4 mg/ml Hygromycin. Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were grown in RPMI medium, 4 mM L-glutamine, and 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco), penicillin and streptomycin antibiotics (100 U/ml and 100 µg/ml, respectively).

### 2.5. Generation of GPRASP2-KO HEK293 cell line by CRISPR/Cas9 technology

HEK293 cells were genome edited using clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9) system. To ensure the high specificity to the target sites, three different selective GPRASP2 guided-RNAs (gRNA 1, 2 and 3) were tested using web-based algorithms (<https://www.dna20.com/eCommerce/cas9/input>) and verified on NCBI blast. The gRNAs were also controlled for genome-wide off-target analysis using CCTop, (<http://crispr.cos.uni-heidelberg> [11]). gRNA 1, 2 and 3 had the following sequences: gRNA1, 5'-CACCGCTGGGGAAGAGGTTATCGC; gRNA2, 5'-CACCGTTAGGACCCAGGCAACTAC and gRNA3, 5'-CACCGGAGACCAAGTCTGTGCCTG. Each gRNA was subcloned into pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene plasmid # 48138, gift from Feng Zhang). Forty-eight hours after cell transfection with 166.7 ng plasmid/cm<sup>2</sup> using the calcium phosphate technique [12], GFP positive cells were sorted by flow cytometry (FACS Aria, Becton Dickinson) and were

allowed to grow prior to GPRASP2 expression analysis by Western blotting using anti-GST-o.Ag serum. The promising polyclonal cell populations in term of large decrease of GPRASP2 expression were diluted in order to collect clones after 3 weeks of growth in T10 plates. GPRASP2-KO HEK293 clones could be obtained with the three gRNAs. GPRASP2-KO HEK293 clone N<sup>2</sup> generated using gRNA2 was further used in this study.

## 2.6. Mouse brain total homogenates preparation

Brain tissue samples of WT and GPRASP1 deficient mice [8] were homogenized with an UltraTurrax device (IKA) followed by several dounce passages (IMLAB) in a final volume of 20 ml/g of tissue of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 250 mM Sucrose, and the homogenate was centrifuged for 10 min at 500 g at 4 °C. The supernatant was then collected and protein concentrations were determined by BCA assay kit (Pierce).

## 2.7. Immunoprecipitation experiments

CHO cells stably expressing N-terminally EYFP-tagged GPRASP1 or GPRASP2 grown in petri dishes were washed twice with PBS and lysed in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 mM KCl, 0.3% (v/v) Triton X-100 and cComplete protease inhibitors (Roche) for 1 h at 4 °C under agitation. 250 µg of proteins from the cleared lysates were incubated with 1.5 µg (20 nM) of the indicated affinity-purified anti-GPRASP1 population overnight at 4 °C, followed by an incubation with 50 µl of protein A MAG-Sepharose (GE Healthcare) for an additional 3 h at 4 °C. Beads were then washed three times in ice-cold lysis buffer.

## 2.8. SDS-PAGE and immunoblotting

HEK293 cells lysates, brain homogenates or immuno-precipitates were mixed in Laemmli buffer and incubated at 100 °C for 5 min. Proteins were separated by electrophoresis on SDS 8% polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (IMMOBILON P, Merck). After 1 h incubation with blocking buffer (3% (w/v) BSA in PBS + 0.04% (v/v) Tween-20 (PBST)) at room temperature (RT), membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. Membranes were washed 3 times with PBST (5 min/each) and incubated for 1 h at RT with Goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1:50000) (Jackson ImmunoResearch). Blots were washed five times (5 min each) with PBST, prior to imaging. Blots were developed using enhanced chemiluminescence (West Pico Plus, PIERCE) and the Amersham Imager 680 system (Cytiva Europe GmbH). Antibodies used were rabbit anti-Gaussia luciferase (NEB, E8023S) [9] and anti-GFP-HRP (Ab6663 Goat polyclonal to GFP, Abcam).

## 2.9. ELISA and SPR measurements

For the ELISA assays, microtiter wells (Nunc MaxiSorp™ ThermoFisher Scientific) were coated either with purified MBP-o.Ag (1 nM), MBP-GPRASP1-M (1 nM) or MBP-GPRASP1-Ct (10 nM) in PBS overnight at 4 °C. After a saturation step (3% (w/v) BSA in PBST) of 1 h at RT, the indicated purified polyclonal antibodies subpopulation was diluted in PBST and incubated at RT for 2 h. After three washes with PBST, antigen-antibodies complexes were revealed with addition of HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch). After several washes with PBST and addition of 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) in Citrate-Phosphate buffer 0.1 M pH 5, the optical density was measured at 450 nm in an ELISA reader.

The SPR measurements were achieved with a Biacore 2000 SPR instrument (GE Healthcare) equipped with a Sensor Chip CM5 (GE Healthcare) at 25 °C with HBS-EP (GE Healthcare) as the running buffer. The SPR signal (in 'resonance units'; RU) was monitored in real time and

shown as sensorgrams (RU vs time plots). According to Ref. [13], an SPR signal of 1000 RU corresponds to 1 ng/mm<sup>2</sup> of immobilized protein. Affinity-purified polyclonal anti-GST antibodies (GE Healthcare) were covalently immobilized in 4 flow cells using Amine Coupling Kit (GE Healthcare) according to the instructions from the manufacturer. Recombinant GST alone or indicated GST-fused GPRASP1 or GPRASP2 domains were captured and the GST surface was used as reference. Two concentrations of the indicated affinity-purified anti-GPRASP1 antibodies subpopulations were passed over GST (reference cell, 854 RU ~28,5 fmol/mm<sup>2</sup>); GST-GPRASP1 full-length (700 RU ~4.1 fmol/mm<sup>2</sup>) GST-GPRASP1-M (1160 RU ~10.5 4.1 fmol/mm<sup>2</sup>) and GST-GPRASP2-C (1393 RU ~18.6 fmol/mm<sup>2</sup>). Signals were corrected for signals from the reference flow cell and were normalized relative to target density as RU/fmol.mm<sup>2</sup>.

## 2.10. Immunofluorescence microscopy

About 5 to 6.10<sup>5</sup> cells were seeded on fibronectin-coated 18 mm glass coverslip in 6 wells plates. After 24 h (80% confluency), cells were transfected with the corresponding expression vectors using Lipofectamine2000, according to the manufacturer instructions. For the analysis by immunofluorescence microscopy, cells were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Euromedex) in PBS for 10 min and permeabilized with PBS + 0.1% (v/v) Triton X100 for 10 min. After a blocking step (3% (w/v) BSA in PBS, 60 min) fixed cells were incubated with the indicated affinity-purified anti-GPRASP antibodies subpopulations diluted in PBS over night at 4 °C. The bound antibodies were detected with Alexa Fluor 594 labelled-goat anti-rabbit immunoglobulins incubated during 60 min (Molecular probes). Nuclei were stained with 4',6'-diamino-2-phenyl-indole (DAPI 1 µg/ml, 5 min). After several washes with PBS, the coverslips were mounted with Mowiol (CALBIOCHEM) and imaged with a microscope (DM5500 Leica) equipped with a 63X objective. The signal was recorded with a DFC350FX R2 camera (Leica). Confocal microscopy was performed with DMI 4000 (Leica). All microscopy images were processed using the Fiji/Image J software. The YFP detection in immunofluorescence experiments with the CHO cells stabilized for EYFP-GPRASP1 or EYFP-GPRASP2 expression was performed with a mouse monoclonal anti-GFP antibody (Life technologies A11120, 0.5 µg/ml, overnight at 4 °C) and YFP-mab complexes were revealed with an Alexa Fluor488 labelled-goat anti-mouse immunoglobulins 4 µg/ml, overnight at 4 °C (Molecular probes).

## 2.11. AlphaScreen experiments

Cross-titration of His-tagged ADRB2 receptor (2000-125 nM) against GST-GPRASP1-M (250-62.5 nM) was performed in 384 well plates (Optiplate, Perkin-Elmer, USA). Resulting combinations were mixed and incubated for 60 min at 25 °C. Glutathione Donor Beads (Perkin-Elmer) and Nickel Chelate Acceptor Beads (AlphaScreen Histidine Detection Kit; Perkin-Elmer) were then added to a final concentration of 20 µg/ml, incubated for 60 min and plates were then read using an EnVision Plate Reader (Perkin-Elmer). For the antibody competition assay, solubilized and purified His-tagged ADRB2 receptor (described in Ref. [2] and purified GST-GPRASP1-M were diluted in PBS at pH 7.0, 0.1% (w/v) BSA, and 0.1% (v/v) Tween20. The ADRB2 receptor (125 nM) was incubated with the GST-GPRASP1-M (62.5 nM) preincubated for 60 min at RT in presence of purified antibodies (concentration range of 0-800 nM) in 384-well plates (Optiplate, Perkin-Elmer). Glutathione Donor Beads Perkin-Elmer) and Nickel Chelate Acceptor Beads (AlphaScreen Histidine Detection Kit, Perkin-Elmer) were then added to a final concentration of 20 µg/ml. After 60 min, Alpha Counts were read using an EnVision Plate Reader (Perkin-Elmer). Quadruplicates were performed in each experiment. Positive (ADRB2 receptor 125 nM/GST-GPRASP1-M 62.5 nM) and negative controls (only ADRB2 receptor 125 nM) were performed in 8 wells each. The Z' value was

calculated according to the following formula [14]:  $Z' = 1 - [(3SD \text{ of sample} + 3SD \text{ of control}) / (\text{mean of sample} - \text{mean of control})]$ . Data were analyzed in GraphPad Prism (version 4.0c), using nonlinear regression analysis for curve fitting.

### 3. Results

#### 3.1. Identification of antibodies targeting the GASP motif

As an initial step, we analyzed the binding properties of the immune serum from a rabbit immunized against purified glutathione S-transferase fused to residues 924–1395 of GPRASP1 (previously described in Ref. [4]). This carboxyl-terminal part (470 last residues) of GPRASP1, named in this study the original Antigen (o.Ag), contains the last three GASP motifs of GPRASP1 upstream to the entire C-ter domain that displays sequence homologies with the other members of the GPRASP/ARMCX protein family (Fig. 1). We therefore analyzed potential cross reactivity of this serum with the closest homologues of GPRASP1 (GPRASP2, GPRASP3 and ARMCX5) in Western blot experiments. In addition, we used the GPRASP2-DM mutant protein [2] in which the full consensus hydrophobic core SWFW present in two out of seven GASP motifs were substituted by four Alanine residues. Lysates of HEK293 cells overexpressing either GPRASP1, GPRASP2, GPRASP2-DM, GPRASP3 or ARMCX5 as fusion proteins with the Gaussia Luciferase C-ter domain (GLuc2, Table 1) were analyzed by immunoblotting analysis with the serum containing anti-GST-o.Ag antibodies. While analysis with anti-GLuc antibodies confirmed the overexpression of all fusion proteins (Fig. 2 left panel), only overexpressed GLuc2-GPRASP1 and GLuc2-GPRASP2 were detected by anti-GST-o.Ag antibodies from the serum (Fig. 2 right panel). The absence of detection of the mutant GPRASP2-DM, with mutated GASP motifs, as well as GPRASP3 and ARMCX5 suggests that the serum contains mainly antibody populations that detect GASP motifs present in GPRASP1 and GPRASP2. These results corroborate our previous observation showing that these anti-GST-o.Ag antibodies were able to detect the GPRASP1-Middle protein (i.e. the central part of GPRASP1 encompassing residues 380 to 1073; Fig. 2) that contains 19 GASP motifs [2].

#### 3.2. Characterization of affinity-purified antibodies subpopulations targeting GASP motifs by ELISA and Surface Plasmon Resonance (SPR)

To further characterize the recognition specificity of GPRASP1 polyclonal antibodies, we next decided to purify by affinity subpopulations of antibodies from the serum against GST-o.Ag. To this purpose, the IgG fraction from the immune rabbit serum was first isolated by conventional Protein G chromatography and the subpopulations of antibodies were then affinity-purified on sepharose-beads bound to MBP-o.Ag that contains the original GPRASP1 immunoreactive sequence, MBP-GPRASP1-Ct that contains no GASP motifs.

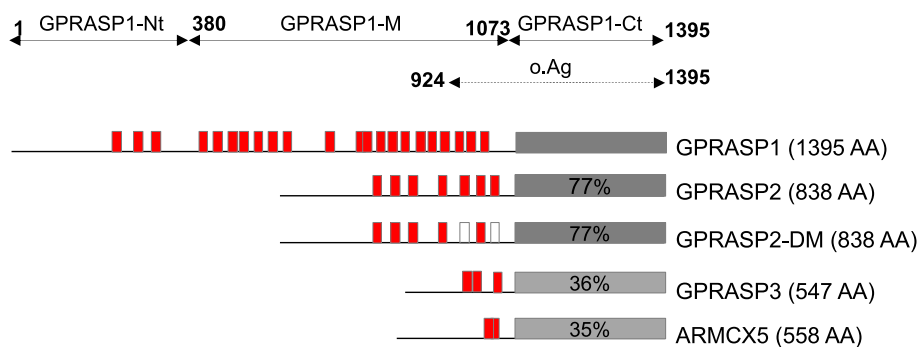


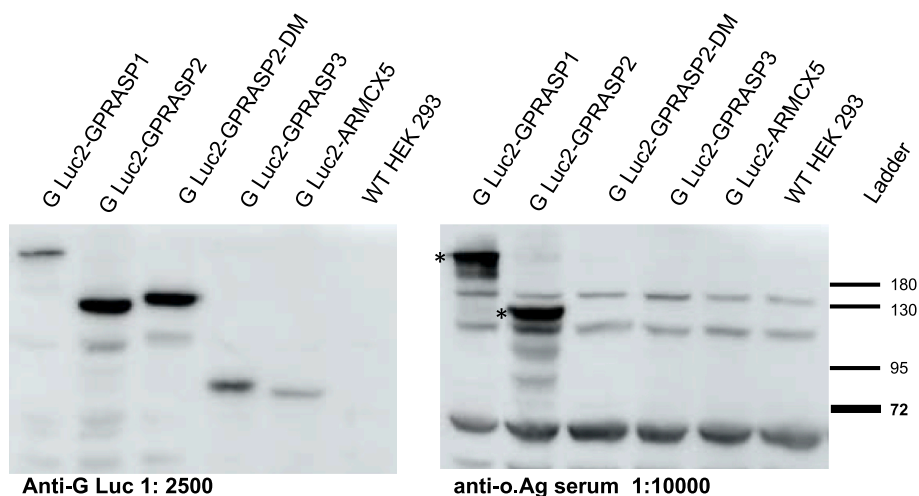
Fig. 1. Schematic representation of four members of the GPRASP/ARMCX protein subfamily 1.

Grey boxes represent the conserved carboxyl-terminal domain of around 250 amino acids. The percent of identical amino acids shared with GPRASP1 is indicated within each box. Red boxes represent GASP motifs that correspond to the consensus sequence of 21 amino acids (GSEEEAIGSWFWAEIEASME). Locations of GASP motifs are represented as a result of sequences analysis with the MEME SUITE web application 5.1.1 [3,15]. The GPRASP2-DM double mutant protein [2] is presented with the two GASP motifs (white boxes) out of seven in which SWFW kernels were substituted by AAAA residues. Polyclonal rabbit antibodies were raised against residues 924–1395 of GPRASP1 named the original GPRASP1 Antigen (o.

Ag). The limits of the GPRASP1 amino-terminal (GPRASP1-Nt), central domain (GPRASP1-M) and carboxyl-terminal domains (GPRASP1-Ct) are indicated.

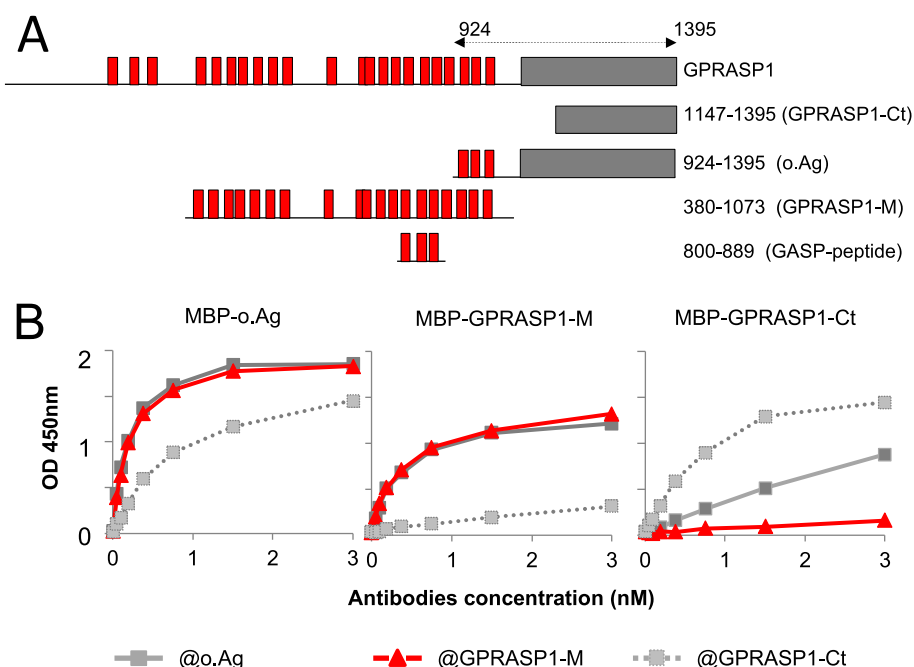
MBP-GPRASP1-M that contains 19 out of the 22 GASP motifs but not the conserved GPRASP1 C-terminal domain and overlaps by approximately 150 amino acids with the o.Ag immunogen, including its 3 N-terminal GASP motifs. The 6xHis-GASP peptide encompasses only 3 GASP motifs (residues 800 to 889 of GPRASP1) that represent 70% of the amino acid sequence. Although these motifs are absent from the 3 GASP motifs present in o. Ag they display the highest homology to the GASP motif consensus sequence (Fig. 3A). The three different GPRASP1 domains were produced and purified from *E. Coli* as MBP-fusion proteins while the GASP peptide was produced and purified from *E. Coli* as a 6xHis-fusion protein. The purified GPRASP1 domains were examined for purity by SDS-PAGE (Supplementary Fig. S1) before coupling to Sepharose beads. The different GPRASP1 domains coupled to Sepharose beads were then used for affinity purification of the different subpopulations of antibodies from the polyclonal serum against GST-o.Ag. The final purified sub-populations of antibodies were assayed for protein concentration and examined for purity by Coomassie stained SDS-PAGE (Supplementary Fig. S2). Approximately 0.25 mg of antibodies were purified per milliliter of serum. The subpopulation of antibodies affinity-purified from the MBP-o.Ag column was designated as “affinity-purified anti-o.Ag” (@ o.Ag) and represents antibodies against the entire immunogen except GST. The subpopulation of antibodies affinity-purified from the MBP-GPRASP1-M column was designated as “affinity-purified anti-GPRASP1-M” (@ GPRASP1-M). It represents antibodies against the central domain of GPRASP1 encoding 19 GASP motifs and corresponded to approximately 50% of the total affinity-purified anti-o. Ag antibodies. The subpopulation of antibodies affinity-purified from the MBP-GPRASP1-Ct column was designated as “affinity-purified anti-GPRASP1-Ct” (@ GPRASP1-Ct). It represents antibodies against the C-terminal sequence of GPRASP1 with no GASP motif and corresponded to approximately 30% of the total affinity-purified anti-o.Ag antibodies. The subpopulation of antibodies affinity-purified on the 6xHis-GASP peptide column represented around 30% of the total affinity purified anti-o.Ag antibodies and was designated as “affinity-purified anti-GASP peptide” (@ GASP peptide).

The binding abilities of affinity-purified antibodies sub-populations were subsequently assessed by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). We immobilized either MBP-o.Ag, MBP-GPRASP1-M or MBP-GPRASP1-Ct and incubated affinity-purified anti-GPRASP1 subpopulations of antibodies (o.Ag, GPRASP1-M and GPRASP1-Ct) at increasing concentrations (Seric antibodies showed no binding to MBP, Supplementary Fig. S3A). As shown in Fig. 3B, the binding curves confirmed the interaction of affinity-purified o.Ag antibodies with all three antigens (dark grey curves) and all three purified antibodies populations bind to the original antigen encoded in MBP-o.Ag (Fig. 3B, left panel). As expected, the affinity-purified anti-GPRASP1-M antibodies did not bind to MBP-GPRASP1-Ct and, conversely, the affinity-purified anti-GPRASP1-Ct antibodies did not bind to the MBP-GPRASP1-M antigen (Fig. 3B middle and right panels, respectively).



**Fig. 2.** Identification of antibodies targeting GASP motifs.

Western Blot analysis of lysates of HEK293 cells overexpressing either GPRASP1, GPRASP2, GPRASP2-DM, GPRASP3 or ARMCX5 as fusion proteins with the C-ter of the *Gaussia princeps* luciferase GLuc2 fragment. The membranes were probed with anti-Gaussia luciferase antibodies (Anti-G Luc, left panel) or with the serum from rabbit inoculated with the original GST-GPRASP1 antigen (anti-o.Ag, right panel). Equivalent amounts of proteins (40 µg) were analyzed for each sample. The anti-o.Ag serum detected over-expressed GLuc2-GPRASP1 and GLuc2-GPRASP2 (protein bands tagged with asterisks) and reacted with at least 3 other proteins present in transfected and non-transfected HEK 293 cells extracts.



**Fig. 3.** Two domains of GPRASP1 are recognized by antibodies from the serum raised against GST-o.Ag.

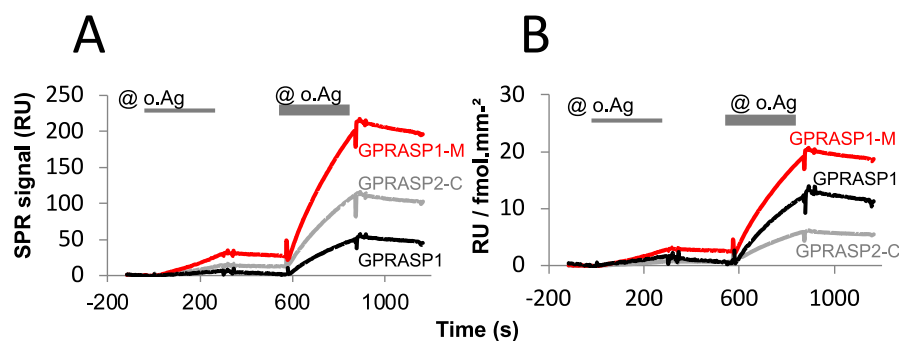
**A.** Scheme of GPRASP1 domains used for affinity purification of the seric antibodies raised against the original antigen fused to GST (GST-o.Ag). The antigens were all expressed as MBP-fusion proteins except for the GASP peptide that was fused to a 6xHis-tag.

**B.** Reactivity of each purified antibodies subpopulation in ELISA. Plates were coated with a fixed concentration of purified antigens, MBP-o.Ag (1 nM, left panel), MBP-GPRASP1-M (1 nM, middle panel) or MBP-GPRASP1-Ct (10 nM, right panel), and incubated with different concentrations of affinity-purified anti-o.Ag (@ o.Ag, dark grey squares), affinity purified anti-GPRASP1-M (@ GPRASP1-M, red triangles) and affinity-purified anti-GPRASP1-Ct (@ GPRASP1-Ct, light grey squares). The optical density values (OD450nm) indicate the relative IgGs binding (for antibodies concentration ranging from 0.05 to 3 nM) to the coated antigens from a representative experiment (n = 2).

These data fully confirmed the specificities of all three antibodies. Importantly, the affinity purified anti-GASP peptide antibodies showed similar binding reactivity than the affinity-purified anti-GPRASP1-M antibodies with the 6xHis-GASP peptide antigen in ELISA (Supplementary Figs. S4B and S4C), indicating that these two antibodies subpopulations almost exclusively detect GASP motifs. This is not surprising since the GPRASP1-M domain, apart from the 19 GASP motifs shares less than 13% of its amino acid sequence (87/693) with the original GPRASP1 antigen (o.Ag).

Since in ELISAs the target antigens are adsorbed to hydrophobic solid surface which can lead to protein denaturation [16], we next assessed whether the affinity-purified o.Ag antibodies could bind to GST-GPRASP1, GST-GPRASP1-M and GST-GPRASP2-C fusion proteins captured through anti-GST antibodies in a hydrophilic matrix by Surface Plasmon Resonance (SPR) in order to quantitatively compare their binding capacities to the three different antigens. GPRASP2 is the closest GPRASP1 paralogue [4] and GPRASP2-C displays 85% sequence identity over the full sequence of the original antigen (471 aa), including 3 GASP motifs that display the highest sequence homology with the 3

GASP motifs present in the o.Ag. It should therefore have conserved the immunogenic epitopes that are present in the o.Ag. Purified GST-fusion GPRASP1 full-length, GPRASP2-C and GPRASP1-M domains were immobilized on a sensor surface and the binding of two successive concentrations of affinity-purified anti-o.Ag antibodies to captured GST-fusions were compared. A GST-surface was used as the reference surface showing no binding since antibodies were affinity-purified on MBP-o.Ag columns (Supplementary Fig. S4) and the raw binding profiles (Fig. 4A) were normalized with respect to the molecular weight of each antigen by expressing the SPR antibodies responses in RU/fmol.mm<sup>-2</sup> (Fig. 4B). Full-length GST-GPRASP1, GST-GPRASP2-C and GST-GPRASP1-M domains could significantly bind to o.Ag antibodies. Once normalized (Fig. 4B), higher signals were observed for full-length GST-GPRASP1 and GST-GPRASP1-M as compared to GST-GPRASP2-C. This result suggests that GASP motifs may function as repeated epitopes allowing the binding of a higher number of antibodies on GST-GPRASP1 and GST-GPRASP1-M, which contains 22 and 19 GASP motifs, respectively, as compared to GST-GPRASP2-C that contains only 3 GASP motifs.



**Fig. 4.** Comparison of SPR sensorgrams of anti-o.Ag antibodies binding to captured GPRASP antigens surfaces.

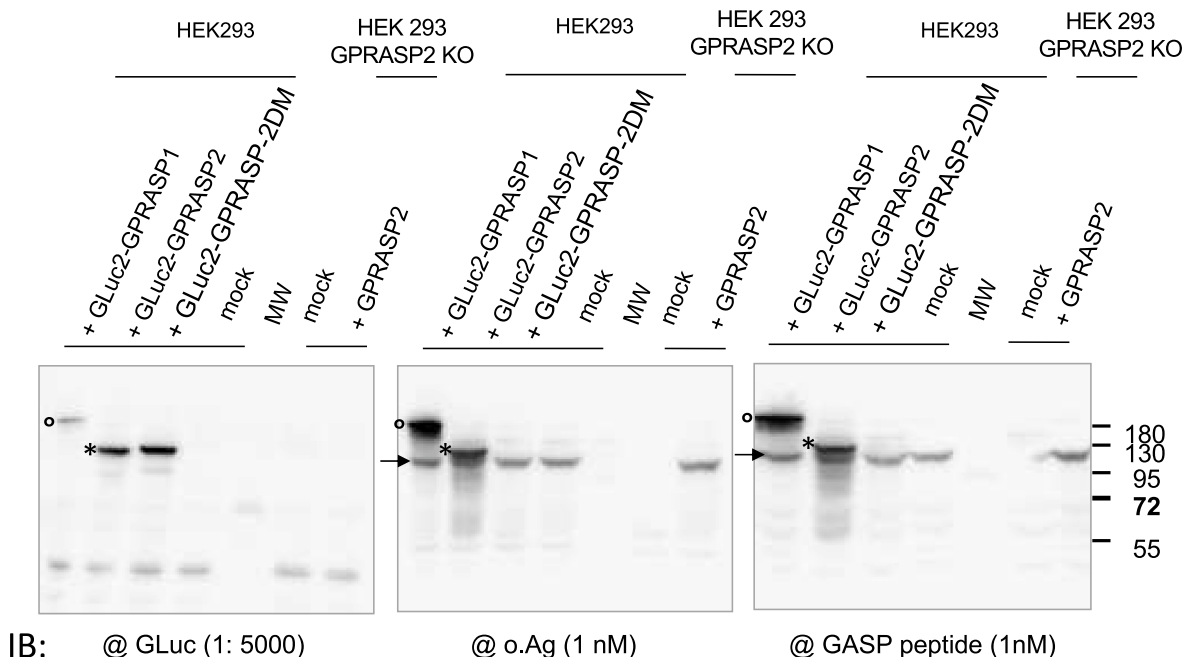
SPR experiments showing the binding of purified anti-o.Ag antibodies (@ o. Ag) to either captured GST-full-length GPRASP1 (700 RU  $\sim$ 4.1 fmol/mm<sup>2</sup>; bold black line), GST-GPRASP1-M (1160 RU  $\sim$ 10.5 fmol/mm<sup>2</sup>; red line) or GST-GPRASP2-C (1393 RU  $\sim$ 18.6 fmol/mm<sup>2</sup>; grey line). Two concentrations of purified anti-o.Ag antibodies were tested sequentially in one experiment ( $\sim$ 10 and 100  $\mu$ g/ml). SPR signals in relative unit were corrected for signals from the reference flow cell with GST alone (854 RU  $\sim$ 28,5 fmol/mm<sup>2</sup>; (A) then signals were normalized relative to target density as RU/fmol.mm<sup>2</sup> (B).

### 3.3. Validation of subpopulations of affinity-purified antibodies targeting GASP motifs by Western blot, immunoprecipitation and immunofluorescence

To evaluate the specificity of affinity-purified anti-o.Ag and anti-GASP-peptide antibodies subpopulations, we further performed immunoblotting of extracts from HEK293 cells overexpressing GLuc2-tagged GPRASP1, GPRASP2 and GPRASP2-DM. Since HEK293 cells display endogenous expression of GPRASP2 but no expression of GPRASP1, we also analyzed cell extracts from CRISPR/Cas9 generated GPRASP2 knock-out HEK293 cells in which a construct expressing full length GPRASP2 was transfected or not (Fig. 4). As shown for the anti-o.Ag serum (Fig. 2), purified anti-o.Ag and anti-GASP peptide antibodies detected overexpressed GLuc2-GPRASP1 and GLuc2-GPRASP2 but not GLuc2-GPRASP2-DM (Fig. 5). The anti-o.Ag serum (Fig. 2), the purified anti-o.Ag and anti-GASP peptide antibodies (Fig. 5) recognized a band with an apparent molecular weight of  $\sim$ 130 kDa in all HEK293 cell extracts. This band was absent in GPRASP2-KO HEK293 cell extracts but was present in cell extracts from GPRASP2-KO HEK293 transfected with the construct expressing full length GPRASP2, thus demonstrating that

GPRASP2 is endogenously expressed in HEK293 cells and detected by the anti-GPRASP1 antibodies.

Results presented above indicates that both the 6xHis-GASP peptide and GPRASP1-M domain allowed to affinity-purify GASP motif specific antibodies. However, columns packed with the 6xHis-GASP peptide led to a lower antibody recovery than the ones packed with GPRASP1-M as compared to columns packed with the original antigen (30 and 50%, respectively). Moreover, we observed by ELISA that the flow-through of the 6xHis-GASP peptide column still contained antibodies that bind to GPRASP1-M, which was not the case when GPRASP1-M columns were used (data not shown). As these data indicated that GPRASP1-M was more efficient to purify anti-GASP motif antibodies we decided to further characterize anti-GPRASP1-M antibodies and to restrict the use of anti-GASP-peptide antibodies only in some critical experiments. We next evaluated whether overexpressed EYFP-GPRASP1 and YFP-GPRASP2 from CHO cell extracts could be immunoprecipitated with either affinity-purified anti-o.Ag or anti-GPRASP1-M antibodies and revealed in Western blot experiments with anti-GFP-HRP antibodies. It is noteworthy that we observed in previous experiments that CHO cells do not express endogenous GPRASP1 and GPRASP2 (not shown). As

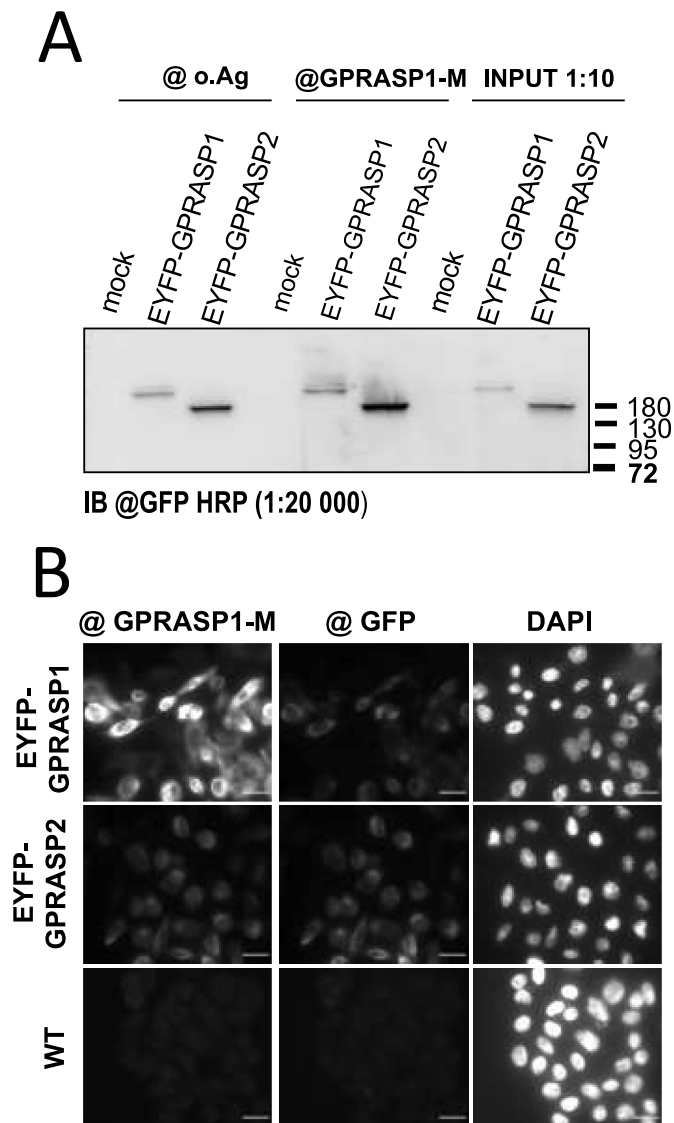


**Fig. 5.** The purified anti-GASP motif antibodies detect GPRASP1 and GPRASP2 but not overexpressed GLuc2-GPRASP2-DM in Western blot.

For each blot, lysates from HEK293 cells (4 left lanes) overexpressing a GLuc2 fusion protein with either GPRASP1, GPRASP2 or GPRASP2-DM, and lysates from GPRASP2-KO HEK293 cells (2 right lanes) overexpressing or not GPRASP2 were analyzed with the anti-Gaussia luciferase antibodies (@ GLuc; left) and the purified antibodies populations against o.Ag (@ o.Ag; middle) or the GASP peptide (@ GASP peptide; right) for immunoblotting (IB). The two anti-GPRASP1 antibodies recognized a  $\sim$ 195 kDa protein corresponding to GLuc2-GPRASP1 (labelled with  $\circ$ ) and a  $\sim$ 130 kDa protein corresponding to GLuc2-GPRASP2 (labelled with \*) as well as GPRASP2 ( $\sim$ 120 kDa) which is endogenously expressed in HEK293 cells (arrow). MW (molecular weight ladder).

shown in Fig. 6A, both antibodies efficiently immunoprecipitated full length GPRASP1 and GPRASP2 fused to YFP while no signal was observed in mock transfected CHO cells. We then performed immunofluorescence experiments with the same CHO cells overexpressing EYFP-GPRASP1 or YFP-GPRASP2 and anti-GPRASP1-M antibodies. As shown in Fig. 6B, anti-GPRASP1-M antibodies could detect a specific signal (left panels) overlapping with the YFP signal (middle panels) that was absent in WT CHO cells (lower panels), indicating that these antibodies specifically recognized GPRASP1 and GPRASP2 in a cellular context.

We further wanted to investigate whether affinity purified anti-o.Ag and anti-GPRASP1-M antibodies were able to selectively detect



**Fig. 6.** Purified anti-GASP motif antibodies detect GPRASP1 and GPRASP2 in immunoprecipitation and immunofluorescence studies.

**A.** Immunoblot of immunoprecipitates from CHO cells extracts stably expressing EYFP-GPRASP1 or EYFP-GPRASP2. Equivalent amounts of protein extracts (250  $\mu$ g) were immunoprecipitated with affinity-purified anti-GPRASP1 antibodies populations 3  $\mu$ g/mL for anti-o.Ag (@ o.Ag; left) and 0.45  $\mu$ g/mL for anti-GPRASP1-M (@ GPRASP1-M; middle) and were separated by SDS-PAGE. EYFP-GPRASP1 or EYFP-GPRASP2 were revealed with an anti-GFP antibody (IB: @ GFP-HRP; 1: 20000).

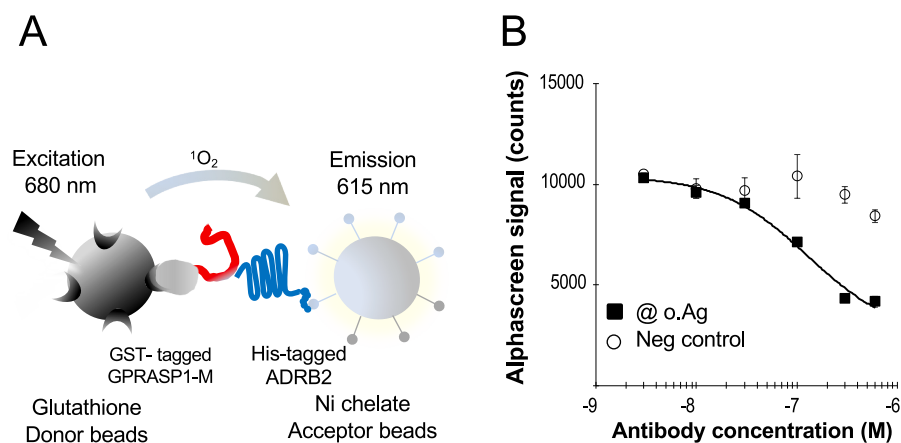
**B.** Epifluorescence images of PFA-fixed CHO cells stably expressing EYFP-GPRASP1 or EYFP-GPRASP2 stained with affinity-purified antibodies against GPRASP1-M (@ GPRASP1-M, 1.5  $\mu$ g/mL, left panel) or anti-GFP (@GFP, 0.5  $\mu$ g/mL, middle panel) and with DAPI (right panel) Scale bar: 20  $\mu$ m.

endogenous GPRASP1 and GPRASP2 expressed either in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [6] or in mouse brain [4]. We therefore performed immunoblot experiments with SH-SY5Y cells and mouse brain extracts with both affinity-purified anti-o.Ag and anti-GPRASP1-M (Supplementary Fig. S5). In Western blot experiments, both antibodies revealed two bands at the expected size of GPRASP1 (~195 KDa) and GPRASP2 (~120 KDa) in SH-SY5Y extracts and almost no background (Supplementary Fig. S5). In brain extracts, anti-o.Ag and anti-GPRASP1-M antibodies revealed two major bands in Western blot experiments corresponding to the expected size of GPRASP1 and GPRASP2 (Supplementary Fig. S5). As expected, the upper band corresponding to GPRASP1 was absent in brain extracts of GPRASP1-KO mice [8] and the highest signal/noise ratio was observed with the anti-GPRASP1-M population of antibodies.

We also performed immunofluorescence assays with the same SH-SY5Y cells showing that anti-o.Ag and anti-GPRASP1-M antibodies mostly stained the cytoplasm (Supplementary Fig. S6A, left upper and middle panels) and this signal was completely absent in the negative control with normal rabbit IgGs (Supplementary Fig. S6A; left lower panels). Moreover, control immunofluorescence experiments with GPRASP2-KO HEK-293 cells, which do not show endogenous expression of GPRASP1, displayed only a low background signal (Supplementary Fig. S6A right panels). Finally, we used HEK-293 cells stably expressing the GloSensor™ (HEK-293-Glo [17]), which display endogenous expression of both GPRASP1 and GPRASP2, to generate double KO for those two proteins and compared them to the same cells in which GPRASP1 was transiently reexpressed. Immunoblot and immunofluorescence experiments performed with those cell lines and anti-GPRASP1-M antibodies showed a high signal/noise ratio (Supplementary Figs. S6B and S6C, respectively). Together, these observations indicate that anti-GPRASP1-M antibodies can detect endogenous levels of GPRASP1 and GPRASP2.

#### 3.4. Affinity-purified antibodies targeting GASP motifs inhibit ADRB2/GPRASP1-M interaction in a miniaturized AlphaScreen assay

In a previous study we have shown that the GASP motifs are essential for the interaction with C-tail of different GPCRs including  $\beta$ -adrenergic receptors ADRB1 and ADRB2, DOR, cannabinoid receptor type 2 CNR2 and muscarinic M1R [2]. Moreover, we have shown by SPR that the purified central domain of GPRASP1 (GST-GPRASP1-M) interacts with purified full-length solubilized ADRB2 (His-ADRB2) with an apparent affinity of 10–100 nM. On the basis of these data, we therefore decided to assess whether affinity purified anti-GPRASP1 antibodies could inhibit the interaction between purified ADRB2 and the central domain of GPRASP1. To this end, we setup a miniaturized assay based on the AlphaScreen technology that allows to use low amounts of purified material and provide sensitive and reproducible quantitative measurements. This bead-based, non-radioactive Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (AlphaScreen Assay) is adapted to test the capacities of the affinity-purified antibodies to compete for GST-GPRASP1-M binding with purified His-ADRB2 in a 384-well format. This no wash assay consists in the use of two types of nano-beads: the Glutathione donor beads loaded with a photosensitizer and the Nickel-chelate acceptor beads containing a chromophore. The proximity between beads, due to the interaction of the two proteins, is detected through the excitation of the donor bead with a laser at 680 nm, which leads to the production of a singlet oxygen, and the concomitant chemiluminescence in the acceptor bead upon exposure to singlet oxygen leading to the emission of light at 520–620 nm (Fig. 7A). In a first step, the assay was adjusted with positive and negative controls of the interaction in order to obtain an optimal signal to noise ratio. The GST-GPRASP1-M and the His-ADRB2 concentrations were notably optimized using a cross titration experiment, using three concentrations for GST-GPRASP1-M (62.5 nM, 125 nM and 250 nM) and concentrations ranging from 125 to 2000 nM for His-ADRB2 (Supplementary Fig. S7A).



(normal rabbit IgGs; Neg control;  $n = 3$ ).

We then tested a larger range of ADRB2 concentrations (7.8 nM, 15.6 nM, 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM and 2000 nM) with a fixed GST-GPRASP1-M concentration of 62.5 nM (Supplementary Fig. S7B). A bell-shape response to His-ADRB2 increasing concentrations was observed with a maximum signal at 125 nM. This so-called “hook” effect frequently occurs in AlphaScreen assays since the excess of receptor inhibits the contact between the donor and acceptor beads. We then tested the signal consistency of a positive control with a GST-His-tagged (10 and 30 nM) containing the two tags fused together with the donor and acceptor beads (Supplementary Fig. S7C). A negative control was obtained with the same GST-His-tagged fusion protein to which either imidazole (200 nM) or glutathione (10 nM) was added. Another negative control in the assay was His-ADRB2 (125 nM) in the absence of GST-GPRASP1-M (Supplementary Fig. S7D). Based on these experiments, the quality of the assay was measured by a statistical parameter  $Z'$  which takes into account the mean and standard deviation values for the positive and negative controls [14]. The calculated  $Z'$  and signal-to-background (S/B) corresponding to these control measurements were  $Z' > 0.72$  with  $S/B > 58$ , confirming the robustness of the assay. Based on these controls, we chose the following conditions for further investigations: 62.5 nM GST-GPRASP1-M and 125 nM of His-ADRB2. We calculated the  $Z'$  and S/B for the ADRB2 receptor - GPRASP1-M interaction assay. Background signal was gauged either in the absence of GST-GPRASP1-M or with imidazole (200 nM) or glutathione (10 nM). The calculated  $Z'$  and S/B scores for these measurements were 0.6 and 8 (respectively) indicating satisfactory assay performance. Finally, Adenosine A2A receptor that poorly interacts with GPRASP1 in GST-pull down assay (not shown), produced no significant signal in this assay (Supplementary Fig. S7E). In the conditions described above, increasing concentrations of affinity-purified anti-o.Ag antibodies, pre-incubated 1 h with GST-GPRASP1-M were able to compete for GST-GPRASP1-M binding to the His-ADRB2 with an IC50 of  $116 \pm 14$  nM ( $n = 3$ ) (Fig. 7B). The purified anti-GASP-peptide antibodies showed similar inhibiting capacity (Supplementary Fig. S8). These data show the potency of anti-GASP antibodies to inhibit the protein/protein interaction function of GASP motifs.

#### 4. Discussion

In the present study, we have characterized an anti-GPRASP1 serum obtained from a rabbit inoculated with a purified recombinant protein encoding the last 470 residues of human GPRASP1 fused to GST. This original antigen (o.Ag) includes 3 out of the 22 GASP motifs repeated in tandem in GPRASP1 and also the entire C-ter armadillo-like repeats domain of around 250 residues. We now show that around 50% of the

**Fig. 7.** Purified anti-GPRASP1 antibodies inhibit ADRB2/GPRASP1-M interaction in a miniaturized AlphaScreen assay.

**A.** Scheme of the AlphaScreen interaction assay between His-tagged ADRB2 and GST-GPRASP1-M. If the donor and acceptor beads are in close proximity due to interaction between the two proteins, excitation of the donor beads at 680 nm results in the emission of light at 615 nm by acceptor beads. Glutathione-coated donor beads (for binding to GST-GPRASP1-M) and nickel chelate acceptor beads (for binding to His-tagged ADRB2 receptor) were used in this assay.

**B.** Competitive binding assay. The disruption of the association between ADRB2 and GPRASP1-M was evaluated by pre-incubation of the GST-GPRASP1-M with increasing amount of affinity-purified antibodies populations. The anti-o.Ag (@ o.Ag) inhibited the interaction between ADRB2 and GPRASP1-M proteins with an IC50 of  $116 \pm 14$  nM whereas no competition was observed for the negative control

antibodies from this serum target GASP motifs instead of targeting the larger conserved C-ter domain. This indicates that GASP motifs, which represent novel repeats unique to the GPRASP/ARMCX protein subfamily 1, display a good immunogenicity. Our previous data indicate that they may play a role in their protein-protein interactions (PPI) [2, 3]. In the present study, we describe the development of an AlphaScreen assay that allow to detect the interaction between purified ADRB2 and the central domain of GPRASP1 that contains most of the GASP motifs. In this assay, we show that purified antibodies that target GASP motifs efficiently block this interaction indicating that targeting GASP motifs could represent an interesting approach to inhibit the interaction between GPRASP1 and GPCRs.

Regarding the immunogenicity of the GASP motifs, we have proposed that the consensus sequence is GSEEEAIIGSWFWAEEEASMSE [3]. Intriguingly the central hydrophobic tetrapeptide SWFW is not considered to be immunogenic according to the Immune Epitope Database (IEDB) or the analysis resource Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 programs. Instead, it is the surrounding glutamate acidic residues on both sides of the SWFW sequence that score high for immunogenicity. Nevertheless, the SWFW sequences contribute to the detection of the protein target by the antibodies since GPRASP2-DM, in which the full consensus SWFW presents in two out of seven GASP motifs are substituted by alanine-tetrapeptides was detected neither by affinity-purified anti-o.Ag nor by affinity-purified anti-GASP motif antibodies using Western blot analysis. Our data also indicate that the antibodies purified and characterized in this study do not recognize all GASP motifs present in the different members of GPRASP subfamily 1 probably due to sequence variability of these different motifs. Indeed, the remaining five GASP motifs in human GPRASP2 contain the tetrapeptides MGSW, SSFW, FSFW, SWVL and SAYW as hydrophobic cores and not the complete consensus SWFW sequence [3]. In addition, GPRASP3 and ARMCX5, that contain GASP motifs, are detected neither by affinity-purified anti-o.Ag antibodies nor by affinity-purified anti-GASP motif antibodies using Western blot analysis. In ARMCX5, the two GASP motifs contain each the conserved SWFW sequences but the glutamate acidic residues in between are shared by the two tandem motifs: the 21 residues-long consensus sequences overlap. This is the reason why we have proposed that there are 1.5 GASP motifs in ARMCX5 instead of two [3]. Following this reasoning, GPRASP3 contains 2.5 GASP motifs: in Human, their central tetrapeptides are AWFW, SWFW and NWFW, respectively. The only GASP motif with the fully conserved “SWFW” sequence is encoded in one of the two overlapping GASP motifs. It is probable as well that our antibodies bind tandem epitopes in a multivalent manner increasing their avidity and detect a unique GASP motif with low affinity. Our analysis by SPR also suggested

that GASP motifs form repeated epitopes. Taken together, our data indicate that antibodies targeting GASP motifs need both the SWFW sequence together with acidic glutamate on both sides of the hydrophobic core to detect the antigen explaining why our antibodies detect neither GPRASP2-DM, GPRASP3 nor ARMCX5. ARMCX4, that also belongs to the GPRASP/ARMCX subfamily 1, was not included in our study since this large protein (2290 residues) displays very divergent GASP motifs [3]. As we have not tested ARMCX4 protein, we cannot completely rule out that our antibodies do not cross react with this protein. As was demonstrated for gene transcription (see Ref. [18]), one can speculate that avidity might participate in the regulation of the protein-protein interactions mediated by GASP motifs particularly for GPRASP1 and GPRASP2 that contains 22 and 7 GASP motifs, respectively. In the future, the role of avidity will have to be explored both in vitro and in cellular context.

In our present study, we set-up a quantitative miniaturized assay using the AlphaScreen method based on the interaction between the purified central domain of GPRASP1 and the purified G protein-coupled receptor ADRB2. Pre-incubation of the GPRASP1 central domain (62.5 nM) with increasing concentrations of affinity-purified anti-GASP motif antibodies could inhibit the interaction between this domain and the ADRB2 receptor (125 nM) with an IC<sub>50</sub> of 115–145 nM. Although it was not possible to set-up this assay with the full length GPRASP1 due to difficulties to produce and purify this large protein (1395 aa) from bacteria, our results confirm that GASP motifs are necessary for mediating the interaction between the central domain of GPRASP1 and the entire receptor and that targeting these motifs with purified antibodies could allow the efficient neutralization of ADRB2-GPRASP1 interaction. They further suggest that the AlphaScreen assay described in this report might be useful for further screening of small molecule inhibitors of the interaction between GPRASP1 and the ADRB2 receptor. As GPRASP1 has been shown to be involved in adaptations associated with repeated stimulation of GPCRs like sensitization [8,19] or tolerance [20] that are often considered as adverse side effects, antibodies or small molecules that block GPRASP1 interaction with different GPCRs could represent an efficient way to limit adaptations associated with their chronic activation.

## 5. Conclusion

In this work we affinity-purified and characterized by Western blotting, immunofluorescence and SPR, anti-GPRASP1 polyclonal antibodies targeting a short repeated sequence called the GASP motif. We further set up a miniaturized AlphaScreen assay that allow to detect quantitatively the interaction between purified central domain of GPRASP1 and ADRB2. In the future, this assay will be useful to identify small molecules that block the interaction of GPRASP1 with GPCRs. In this AlphaScreen assay anti-GASP motif antibodies efficiently compete for the interaction between GPRASP1 central domain and ADRB2. Although this work makes the proof of concept that targeting GASP motifs with antibodies could represent an efficient way to block the interaction of GPRASP1 with GPCRs, the development of mono-specific tools such as monoclonal antibodies or nanobodies targeting a specific GASP motif to compete for the interaction of GPRASP1 with GPCRs will probably represent a more promising strategy both in terms of specificity and unlimited availability.

## Author contributions

Gabrielle Zeder-Lutz: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing.

Olivier Bornert: Methodology, Investigation.

Rosine Fellmann-Clauss: Methodology, Investigation.

Adeline Knittel-Obrecht: Methodology, Investigation.

Thibaud Tranchant: Methodology, Investigation.

Sarah Bouteben: Methodology, Investigation.

Juliette Kaeffer: Methodology, Investigation.

Raphaëlle Quillet: Methodology, Investigation.

Pascal Villa: Supervision.

Renaud Wagner: Supervision.

Sandra Lecat: Supervision, Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing.

Frédéric Simonin: Supervision, Writing - review & editing.

## Declarations of interest

None.

## Fundings

This research was funded by the CNRS, Region Grand-Est, LABEX Medalis (ANR-10- LABX-0034, Programme d'investissement d'avenir), graduate school of pain EURIDOL of the University of Strasbourg (ANR-17-EURE-0022, Programme d'investissement d'avenir), IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002) and by the SFRI-STRAT'US project (ANR-20-SFRI-0012) under the framework of the French Program "Investments for the Future" given to the Strasbourg Drug Institute (IMS), as part of the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) 2021–2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm.

## Data availability

No data was used for the research described in the article.

## Acknowledgments

We thank Dr. Jeremy Garwood for critical reading of the manuscript. We thank warmly all the actual and former members of the GPCRs pain and inflammation team as well as those from the IMPRESS platform for all the interdisciplinary scientific exchanges on the GPRASP projects. We are grateful to Marc Vigneron for helpful comments in CRISPR/Cas9 experimental design.

## Appendix A. Supplementary data

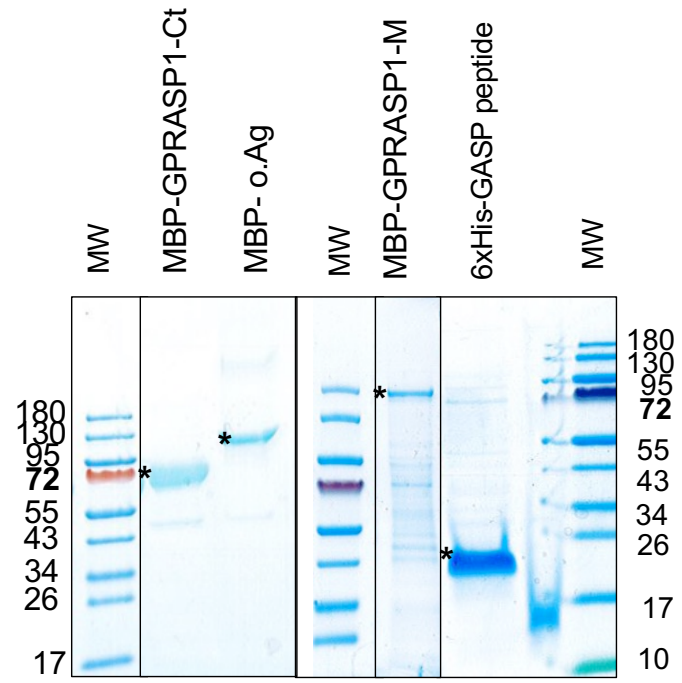
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115062>.

## References

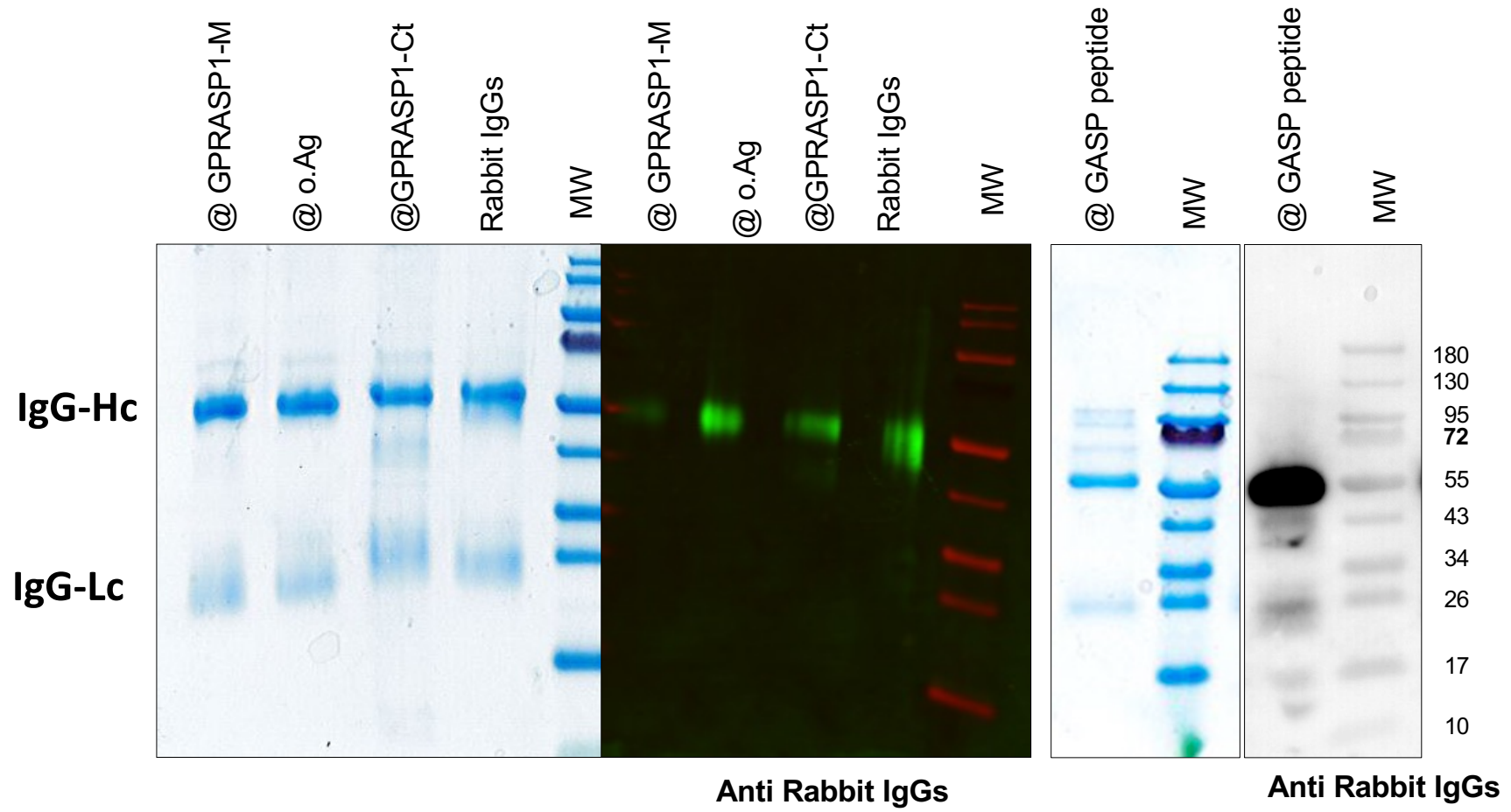
- [1] A. Abu-Helo, F. Simonin, Identification and biological significance of G protein-coupled receptor Associated Sorting Proteins (GASP), *Pharmacol. Therapeut.* 126 (2010) 244–250.
- [2] O. Bornert, T.C. Moller, J. Boeuf, M.P. Candusso, R. Wagner, K.L. Martinez, F. Simonin, Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors, *PLoS One* 8 (2013), e56336.
- [3] J. Kaeffer, G. Zeder-Lutz, F. Simonin, S. Lecat, GPRASP/ARMCX protein family: potential involvement in health and diseases revealed by their novel interacting partners, *Curr. Top. Med. Chem. (Sharjah, United Arab Emirates)* 21 (2021) 227–254.
- [4] F. Simonin, P. Karcher, J.J. Boeuf, A. Matifas, B.L. Kieffer, Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins, *J. Neurochem.* 89 (2004) 766–775.
- [5] B. Jung, D. Padula, I. Burtscher, C. Landerer, D. Lutter, F. Theis, A.C. Messias, A. Geerlof, M. Sattler, E. Kremmer, et al., Pitchfork and Gprasp2 target smoothed to the primary Cilium for Hedgehog pathway activation, *PLoS One* 11 (2016), e0149477.
- [6] A. Morales-Hernandez, C. Benaksas, A. Chabot, C. Caprio, M. Ferdous, X. Zhao, G. Kang, S. MCKinney-Freeman, GPRASP proteins are critical negative regulators of hematopoietic stem cell transplantation, *Blood* 135 (2020) 1111–1123.
- [7] J.L. Whistler, J. Enquist, A. Marley, J. Fong, F. Gladher, P. Tsuruda, S.R. Murray, M. Von Zastrow, Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors, *Science (New York, NY)* 297 (2002) 615–620.
- [8] J. Boeuf, J.M. Trigo, P.H. Moreau, L. Lecourtier, E. Vogel, J.C. Cassel, C. Mathis, P. Klosen, R. Maldonado, F. Simonin, Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1-deficient mice, *Eur. J. Neurosci.* 30 (2009) 860–868.



- [9] J. Poirson, E. Biquand, M.L. Straub, P. Cassonnet, Y. Nomine, L. Jones, S. van der Werf, G. Trave, K. Zanier, Y. Jacob, et al., Mapping the interactome of HPV E6 and E7 oncoproteins with the ubiquitin-proteasome system, *FEBS J.* 284 (2017) 3171–3201.
- [10] J.Y. Vollmer, P. Alix, A. Chollet, K. Takeda, J.L. Galzi, Subcellular compartmentalization of activation and desensitization of responses mediated by NK2 neurokinin receptors, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37915–37922.
- [11] M. Stemmer, T. Thumberger, M. Del Sol Keyer, J. Wittbrodt, J.L. Mateo, CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool, *PLoS One* 10 (2015), e0124633.
- [12] R.E. Kingston, C.A. Chen, H. Okayama, Calcium phosphate transfection, in: *Current Protocols in Cell Biology*, 2003.
- [13] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, quantitative-determination of surface concentration of proteins with surface-plasmon resonance using radiolabeled proteins, *J. Colloid Interface Sci.* 143 (1991) 513–526.
- [14] J.H. Zhang, T.D.Y. Chung, K.R.A. Oldenburg, A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *J. Biomol. Screen* 4 (1999) 67–73.
- [15] T.L. Bailey, M. Boden, F.A. Buske, M. Frith, C.E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W. W. Li, W.S. Noble, MEME SUITE: tools for motif discovery and searching, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) W202–W208.
- [16] J.E. Butler, Enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Immunoassay* 21 (2000) 165–209.
- [17] R. Quillet, S. Schneider, V. Utard, A. Drieu la Rochelle, K. Elhabazi, J. B. Henningsen, P. Gizzi, M. Schmitt, V. Kugler, V. Simonneaux, B. Ilien, F. Simonin, F. Bihel, Identification of an N-acylated-DArg-Leu-NH<sub>2</sub> Dipeptide as a highly selective neuropeptide FF1 receptor antagonist that potently prevents opioid-induced Hyperalgesia, *J. Med. Chem.* 64 (2021) 7555–7564.
- [18] S. Erlendsson, K. Teilum, Binding revisited-avidity in cellular function and signaling, *Front. Mol. Biosci.* 7 (2021), 615565.
- [19] D. Thompson, L. Martini, J.L. Whistler, Altered ratio of D1 and D2 dopamine receptors in mouse striatum is associated with behavioral sensitization to cocaine, *PLoS One* 5 (2010), e11038.
- [20] A. Tappe-Theodor, N. Agarwal, I. Katona, T. Rubino, L. Martini, J. Swiercz, K. Mackie, H. Monyer, D. Parolaro, J. Whistler, et al., A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids, *J. Neurosci.* 27 (2007) 4165–4177.

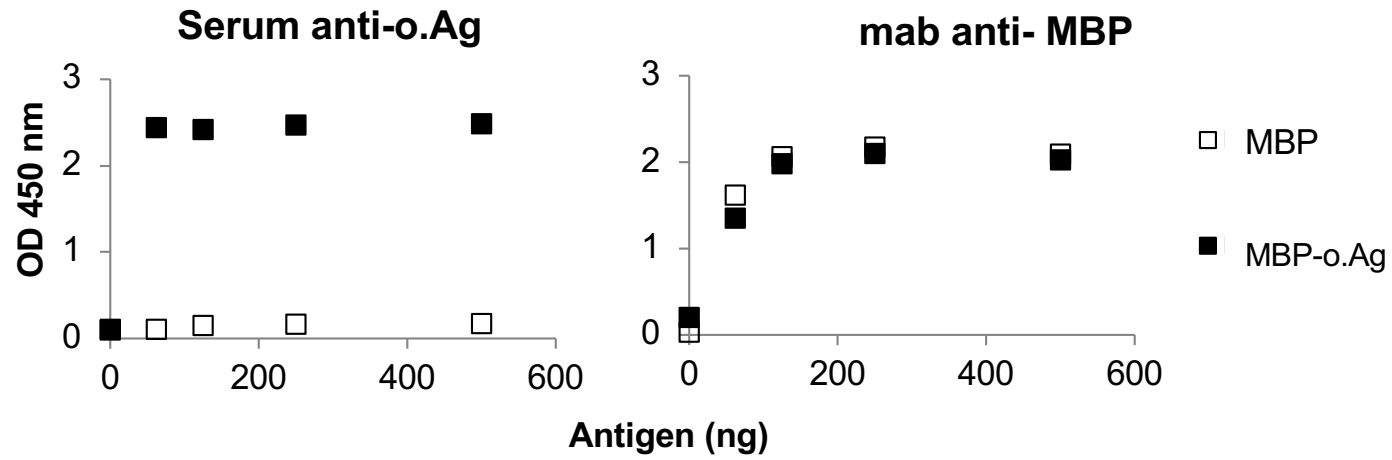


**Figure S1**

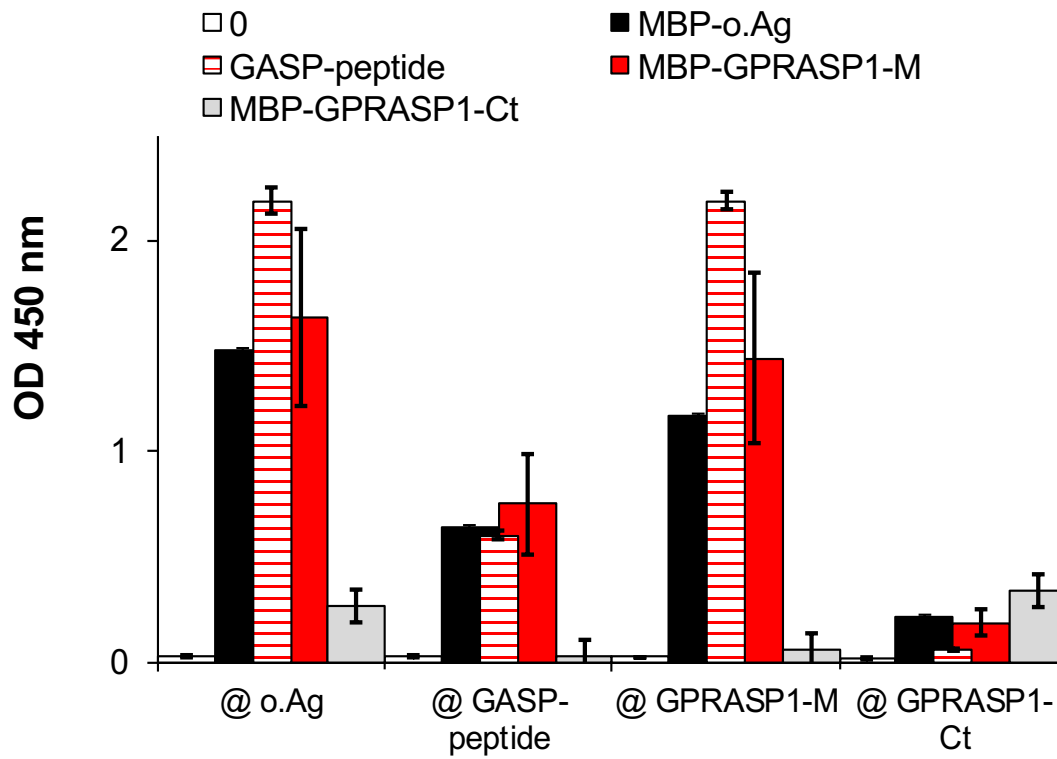


**Figure S2**

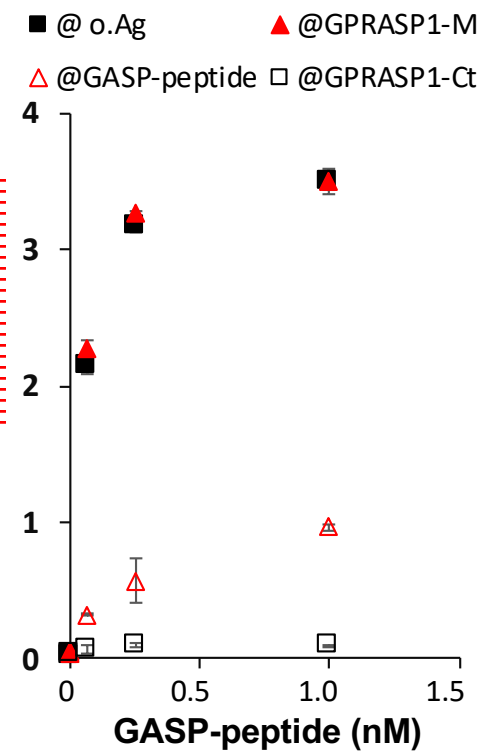
**A**



**B**



**C**



**Figure S3**

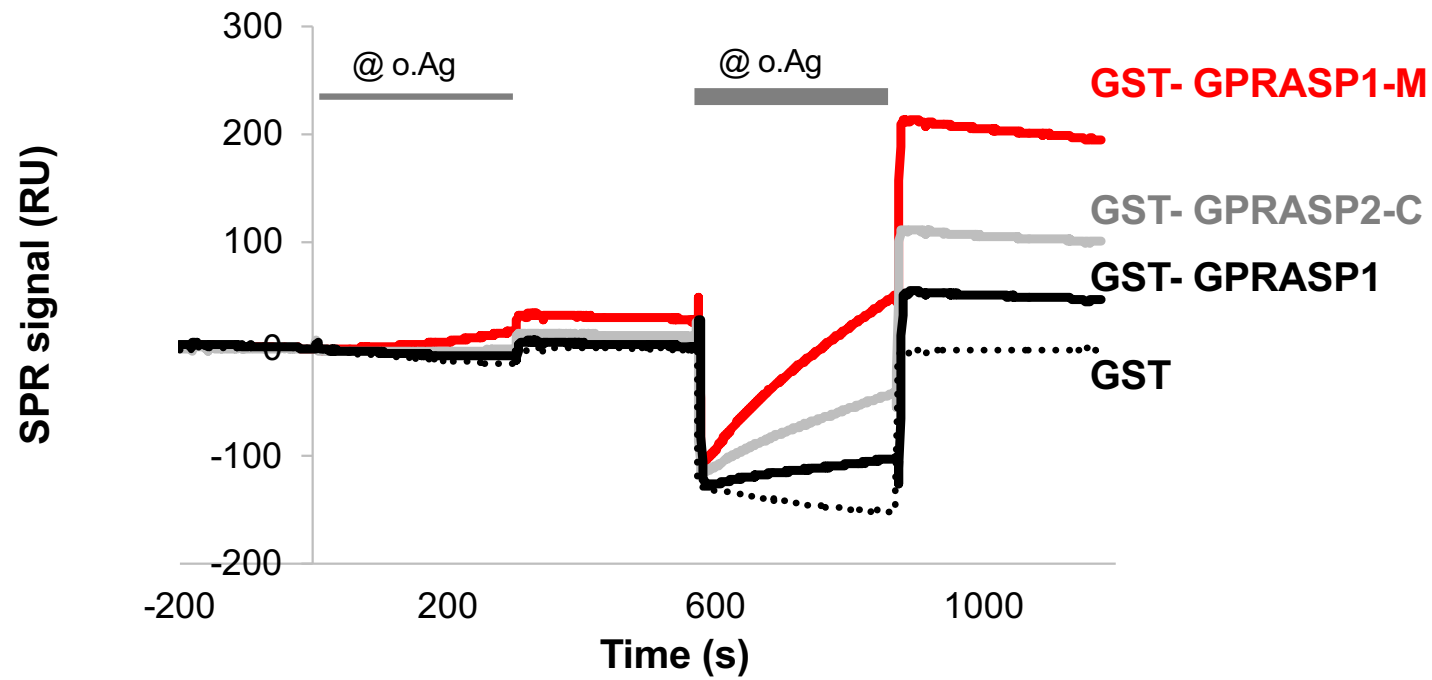


Figure S4

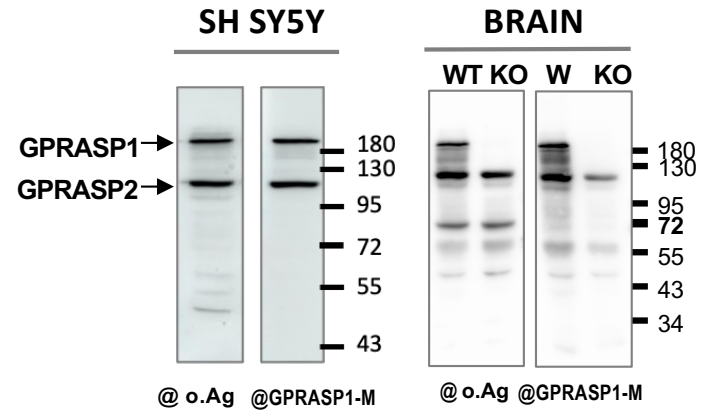


Figure S5

A

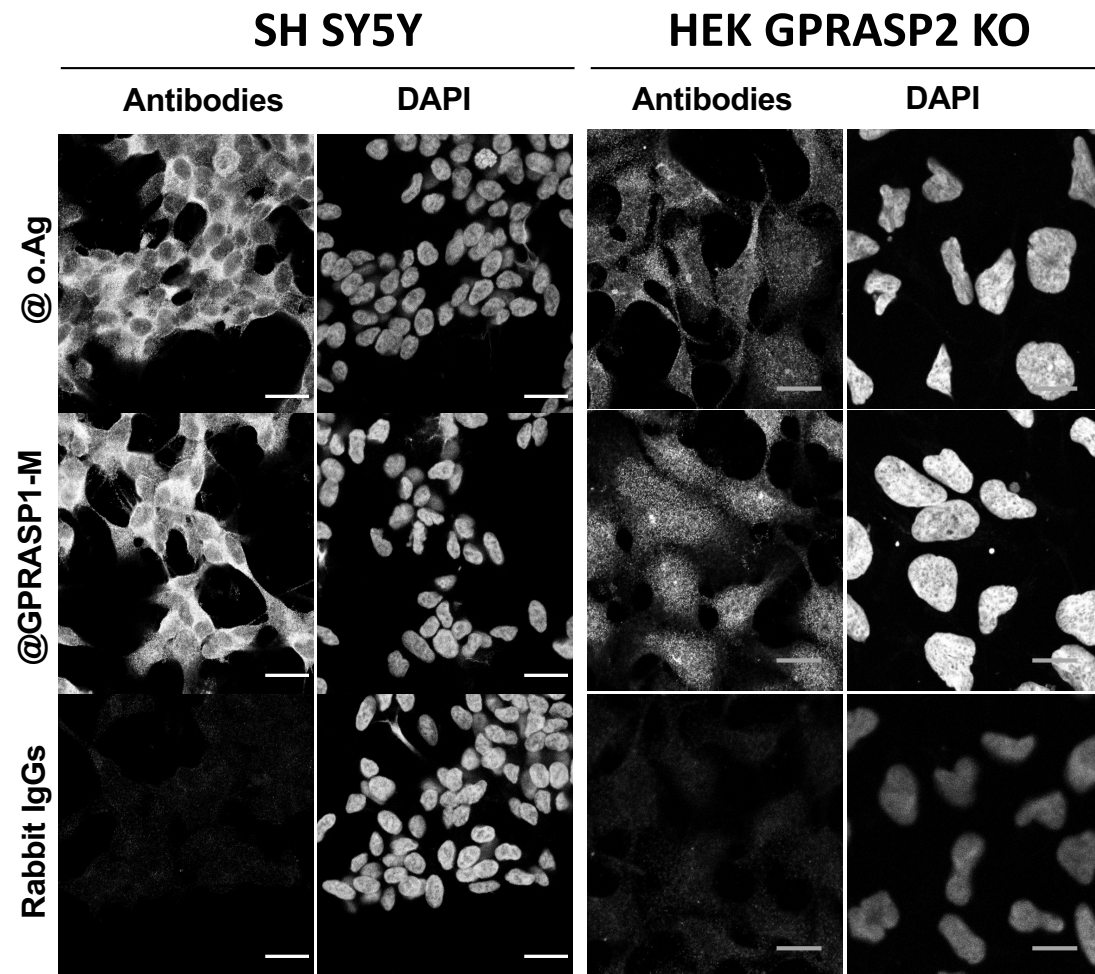


Figure S6 A

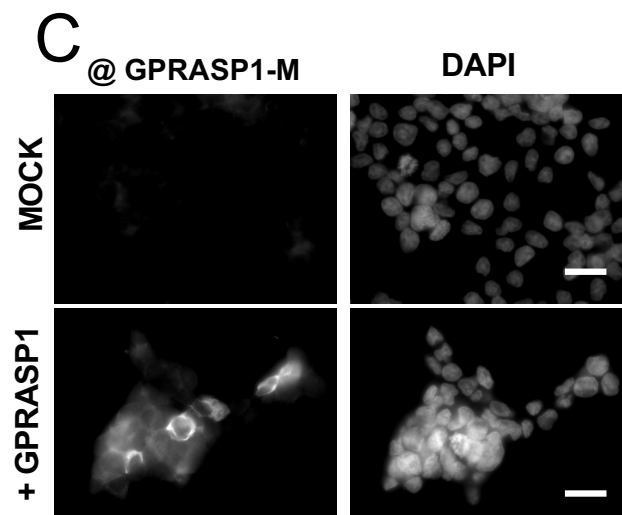
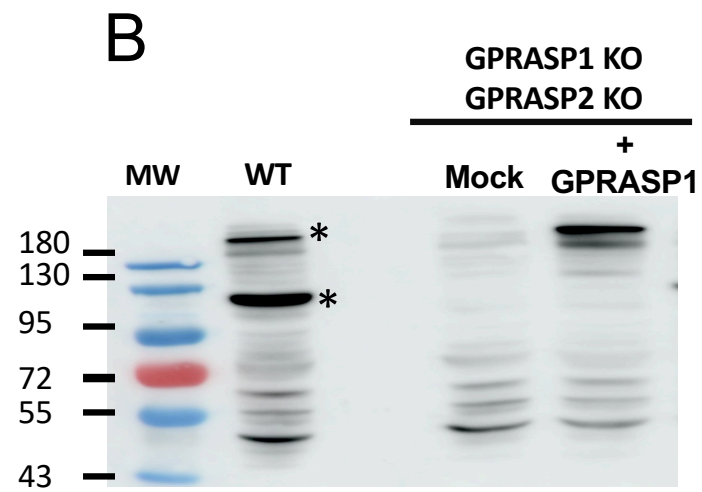
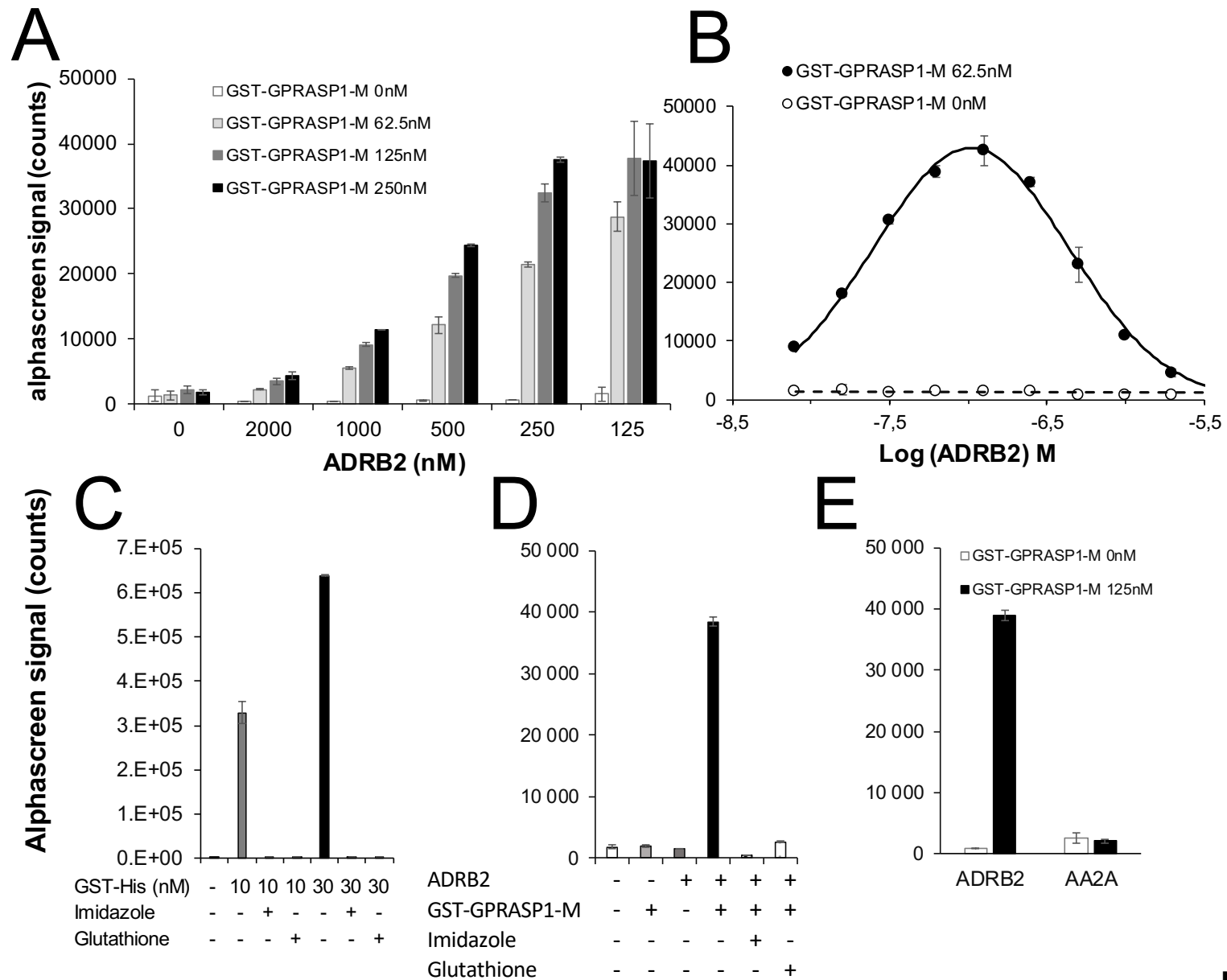


Figure S6B and S6C





**Figure S7**

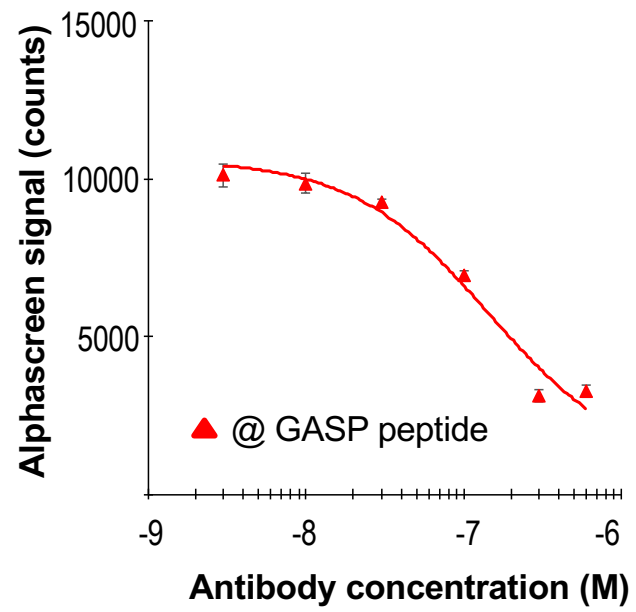


Figure S8



## Implication de GPRASP1 dans le développement de la tolérance analgésique aux agonistes du récepteur opioïde delta

**Résumé** : La douleur chronique est un problème de santé publique majeur mais hormis les dérivés de la morphine, peu d'analgésiques sont disponibles. Le récepteur aux opioïdes delta est une cible intéressante pour faire évoluer l'arsenal thérapeutique. Son activation entraîne une analgésie et des effets indésirables modérés, mais l'administration répétée de l'agoniste SNC80 induit le développement d'une tolérance analgésique qui serait due à la dégradation du récepteur. GPRASP1 est un partenaire d'interaction cytoplasmique de DOR qui aurait un rôle dans l'adressage de DOR vers la dégradation par le lysosome après activation. Le but de ce travail était d'évaluer le rôle de GPRASP1 dans le développement de la tolérance analgésique aux agonistes de DOR ainsi que dans sa dégradation. J'ai ainsi pu montrer que le blocage génétique de GPRASP1 prévient complètement le développement de la tolérance analgésique au SNC80 dans différents modèles de douleur mais n'a aucun impact sur la dégradation de DOR, remettant ainsi en cause le rôle précédemment décrit de cette protéine.

**Mots-clés** : Douleur chronique – Récepteur delta-opioïde – Tolérance analgésique - GPRASP1

## Implication of GPRASP1 in the development of analgesic tolerance to delta opioid receptor agonists

**Abstract** : Chronic pain is a major public health problem, but except morphine derivatives, few analgesics are available. The delta opioid receptor is an interesting target for advancing the therapeutic arsenal. Its activation leads to analgesia and moderate side effects, but repeated administration of SNC80 agonist induces the development of analgesic tolerance, thought to be due to receptor degradation. GPRASP1 is a cytoplasmic interacting partner of DOR that has been proposed to play a role in addressing DOR for degradation by the lysosome after activation. The aim of this work was to assess the role of GPRASP1 in the development of analgesic tolerance to DOR agonists, as well as in its degradation. In this work, I showed that genetic blockade of GPRASP1 completely prevents the development of analgesic tolerance to SNC80 in different pain models, but has no impact on DOR degradation, thus calling into question the previously described role of this protein.

**Keywords** : chronic pain – delta-opioid receptor - analgesic tolerance - GPRASP1