



Effet d'un traitement à la morphine sur le protéome des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y

Jérémy Neasta

► To cite this version:

Jérémy Neasta. Effet d'un traitement à la morphine sur le protéome des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006. Français. NNT : . tel-00137683

HAL Id: tel-00137683

<https://theses.hal.science/tel-00137683>

Submitted on 21 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER-TOULOUSE III

Spécialité : **Biochimie**

Jérémie NEASTA

EFFET D'UN TRAITEMENT À LA MORPHINE SUR LE PROTÉOME DES CELLULES DE NEUROBLASTOME HUMAIN SH-SY5Y

Soutenue le 23 octobre 2006 devant le jury :

Dr Philippe Marin, Directeur de Recherche, CNRS Montpellier

Rapporteur

Dr Florence Noble, Directrice de Recherche, CNRS Paris

Rapporteur

Dr Stéphane Allouche, Maître de Conférences, université de Caen

Examineur

Dr Lionel Moulédous, Chargé de Recherche, CNRS Toulouse

Co-directeur de thèse

Pr Alain Milon, Professeur d'université Toulouse III

Président du jury

Dr Jean-Claude Meunier, Directeur de Recherche, CNRS Toulouse

Directeur de thèse

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS-UMR 5089

205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex

Ce travail a été effectué à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale dans l'équipe de Neuropharmacologie moléculaire dirigée par Jean-Claude Meunier à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli et permis de réaliser cette thèse.

Je remercie avant tout Lionel Moulédous pour sa disponibilité, son dévouement, son soutien et surtout pour tout ce qu'il m'a appris. Je pense aussi à Sandrine Uttenweiler sans laquelle tout ce travail n'aurait pu être mené à bien, merci également pour ta disponibilité, ton opiniâtreté, tes conseils et ta bonne humeur.

Je remercie Bernard Monsarrat et Alexandre Stella de la plate-forme protéomique de Toulouse qui ont participé à ce travail. Je n'oublie pas l'ensemble des membres de l'équipe de Bernard Monsarrat avec lesquels j'ai eu l'occasion de discuter à de multiples reprises durant les nombreuses heures passées devant l'ordinateur.

Je remercie tous les membres de l'équipe de Jean-Claude Meunier, Lionel, Maïthé, Jean-Luc, Brice ; les stagiaires ayant contribué à ce travail, Mariette, Karima et Delphine ; les autres stagiaires que j'ai croisées, Sophie et Elisa.

Je remercie mes compagnons de repas notamment Sylvain non pas pour ses blagues mais pour l'ensemble des discussions hautement scientifiques que nous avons eues au cours du déjeuner.

Je remercie Giusy, Fanny et Flavie, mes « drôles de dames » du vieux bâtiment, j'espère qu'on se recroisera...

Je remercie enfin mes proches : toute ma famille particulièrement mes parents et mon frangin ; Mimi adorée ; mes coloc' Benjamin, Benoît, Julien, Zazou ; mon demi coloc' Xavier, Stéphane et tous les autres...

Résumé

La morphine, le principe actif de l'opium, est connue pour ses propriétés antalgiques mais aussi pour ses propriétés toxicomanogènes. En France, la prise en charge des grandes douleurs fait toute sa place à la morphine. Elle demeure aujourd'hui le principal analgésique utilisé pour traiter des douleurs sévères d'origine cancéreuse par exemple. Malheureusement l'administration prolongée de morphine entraîne des effets secondaires importants tels que la tolérance et la dépendance. La connaissance des mécanismes conduisant à ces phénomènes constitue un enjeu majeur non seulement pour l'amélioration des thérapies actuelles, mais aussi dans le traitement de la toxicomanie, réel problème socio-économique dans le monde.

Afin de mieux comprendre les adaptations cellulaires induites suite à une prise chronique de morphine, son récepteur MOP a été surexprimé dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Dans cette lignée optimisée, nous avons montré que la puissance et l'efficacité de la morphine en termes d'inhibition aiguë de l'adénylyl cyclase (un effecteur de MOP), ainsi que de sa sensibilisation lors d'un traitement chronique sont significativement augmentées.

Une stratégie de type protéomique différentielle combinant les techniques d'électrophorèse mono / bidimensionnelle pour les analyses du protéome total et du phosphoprotéome a été entreprise afin de mettre en évidence les adaptations cellulaires suite au traitement morphinique. Ainsi, nous avons pu montrer, notamment, qu'un traitement chronique à la morphine entraîne la downrégulation des protéines de signalisation $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ et $G\gamma_2$. Plus particulièrement, la downrégulation des protéines $G\beta$ et $G\gamma_2$ est due à leur dégradation par le protéasome. De plus, nous avons montré qu'il existe une corrélation très étroite entre le niveau de dégradation de $G\beta$ et le niveau de sensibilisation de l'adénylyl cyclase, phénomène impliqué dans la dépendance à la morphine et dont le mécanisme est encore débattu. L'étude plus globale des modifications induites par la morphine sur le protéome total des cellules SH-SY5Y a permis d'identifier environ 50 protéines dont l'abondance est modulée par la drogue. Ces protéines sont impliquées dans des processus tels que l'organisation du cytosquelette, le trafic vésiculaire, la dégradation des protéines, la signalisation cellulaire ou encore la régulation de la transcription et de la traduction. Enfin, une étude différentielle du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y révélé par le colorant fluorescent Pro-Q Diamond a été initiée. Les premiers résultats montrent que cette approche permet de révéler spécifiquement un effet de la morphine sur une centaine de phosphoprotéines.

En conclusion, mes travaux ont non seulement permis de proposer un nouveau mécanisme moléculaire responsable de la sensibilisation de l'adénylyl cyclase mais surtout suggèrent pour la première fois que la voie ubiquitine-protéasome est impliquée dans les effets à long terme de la morphine ouvrant ainsi un nouveau champ dans l'investigation des mécanismes moléculaires de la dépendance aux opiacés.

Abréviations

2-DE	électrophorèse bidimensionnelle
2D-DIGE	differential in-gel electrophoresis
AC	adénylyl cyclase
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AGS	activator of G-protein signaling
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPc	adénosine 5' monophosphate cyclique
APS	persulfate d'ammonium
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine 5' triphosphate
BRET	transfert d'énergie de bioluminescence
CCK	cholécystokinine
CHO	chinese hamster ovary
CREB	cAMP responsive element binding protein
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂
CTX	toxine cholérique
Cy	cyanine
Da	daltons
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵]-enképhaline
DAG	1, 2-diacylglycérol
DAMGO	[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-enképhaline
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
DOP	delta opioïde
DRG	ganglions de la racine dorsale
DRM	detergent resistant membrane
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESI	electrospray
FRET	transfert d'énergie de fluorescence
FSK	forskoline
GABA	acide γ -amino butyrique
GAIP	G alpha interacting protein
GAP	GTPase activating protein
GDI	inhibiteurs de la dissociation du GDP
GDP	guanosine 5' diphosphate
GIP	GPCR interacting protein
GIRK	G protein-activated inward by rectifying K ⁺ channel
GPI	glycophosphatidylinositol
GPR	G-Protein Regulatory
GRK	G protein-coupled receptor kinase
GST	glutathione-S-transférase
GTP	guanosine 5' triphosphate
HEK	human embryonic kidney
IBMX	3-isobutyl-1-méthyl xanthine
ICAT	isotope coded affinity tags
IEF	isoélectrofocalisation
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IP3	inositol-1, 4, 5-triphosphate

IPG	gradient de pH immobilisé
kDa	kilodaltons
KOP	kappa opioïde
KRH	hepes buffered Krebs-Ringer saline
LC	chromatographie liquide
LTD	dépression à long terme
LTP	potentialisation à long terme
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
MAP kinases	mitogen-activated protein kinases
MES	2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid
MBS	MES buffered saline
MG115	Z-Leu-Leu-Norvalinal
MOP	mu opioïde
MS	spectrométrie de masse
MudPIT	multidimensional protein identification technology
MW	masse moléculaire
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NOP	nociceptine opioïde
NPFF	neuropeptide FF
Nor-BNI	nor-binaltorphimine
p	p-value
PAG	substance grise périaqueducule
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGi	noyau réticulaire paragigantocellulaire
Pi	point iosélectrique
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA	protéine kinase A
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PTX	toxine pertussique
Q	quadropole
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RGS	regulator of G protein signaling
RO 20-1724	4-(3-butoxy-4-methoxy-benzyl)-2-imidazolidinone
RVM	médulla rostroventrale
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	sodium dodécylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TBS	tris buffer saline
TEMED	N, N, N', N' tétraméthyléthylènediamine
Tris	tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TOF	temps de vol
UV	ultraviolets
VTA	aire tegmentale ventrale

Sommaire

. <i>Introduction</i>	12
I. La morphine : le plus vieux remède connu par l'Homme pour traiter la douleur	13
A. La morphine est le principal agent actif de l'opium	13
B. Premières utilisations de l'opium en tant que drogue et remède	14
C. La morphine aux XIX ^{ème} et XX ^{ème} siècles	15
II. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G	18
A. Les différentes familles de RCPG.....	19
B. Bases structurales de l'activation des RCPG	20
1- Liaison du ligand au récepteur à travers quelques exemples.....	20
2- Activation du récepteur : mouvement des hélices transmembranaires.	22
3- Couplage aux protéines G	23
C. Les protéines G	24
1- Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques.	24
2- Les différentes familles de protéines G.....	25
3- Modifications post-traductionnelles des protéines G et leurs implications fonctionnelles	26
a) Isoprénnylation et acylation	26
b) Phosphorylation	27
c) Ubiquitinylation	27
D. Effecteurs des protéines G hétérotrimériques	28
1- Adénylyl cyclase	28
a) Les différentes isoformes d'adénylyl cyclases.....	29
b) Régulation des adénylyl cyclases membranaires par les protéines G.....	29
c) Quelques mots sur la structure des adénylyl cyclases membranaires	30
2- Les autres effecteurs enzymatiques.....	30
3- Les effecteurs canaux ioniques	31
E. Vers un modèle complexe de la transduction du signal <i>via</i> les RCPG	31
1- Le concept de « réceptosome »	32
2- Les protéines accessoires à travers deux exemples.....	34
a) Les protéines RGS (Regulators of G-protein Signaling)	34
b) Les protéines AGS (Activators of G-protein Signaling).....	35
3- Oligomérisation des RCPG.....	36

a)	Mise en évidence de la dimérisation	36
b)	Mécanismes moléculaires de la dimérisation.....	37
c)	Régulation de la dimérisation des RCPG.....	37
d)	Implications pharmacologique et thérapeutique de l'hétérodimérisation des RCPG à travers l'exemple des récepteurs opioïdes mu, delta et kappa	38
4-	Compartimentation membranaire des voies de signalisation : les rafts	38
a)	Les rafts : une nouvelle architecture de la membrane plasmique	39
b)	Isolation des rafts par des techniques biochimiques	39
c)	Caractéristiques biochimiques des rafts	40
d)	Raft et signalisation des RCPG	41
F.	Les récepteurs opioïdes sont des RCPG	42
III.	Le système opioïde	43
A.	Pharmacologie des récepteurs opioïdes	43
1-	La découverte des récepteurs opioïdes : introduction historique.....	43
2-	Les ligands opioïdes.....	44
a)	Ligands peptidiques endogènes	44
b)	Ligands exogènes.....	45
B.	Clonage des récepteurs opioïdes	45
C.	Distribution des récepteurs opioïdes dans le système nerveux	46
1-	Récepteur MOP.....	47
2-	Récepteur DOP	47
3-	Récepteur KOP	47
4-	Récepteur NOP	47
D.	Effets d'un traitement aigu à la morphine.....	48
1-	L'analgésie	48
a)	Le circuit principal de la douleur	48
b)	L'analgésie induite par la morphine.....	49
2-	Effets cellulaires d'un traitement à la morphine	50
a)	Inhibition de l'adénylyl cyclase	50
b)	Régulation calcique.....	51
c)	Activation de la conductance potassique	52
d)	Activation de la voie des MAP Kinases.....	52
E.	La tolérance et la dépendance aux opiacés	53
F.	Mécanismes moléculaires et cellulaires de la tolérance aux opiacés.....	54
1-	Adaptations au niveau du récepteur	54

a)	Désensibilisation du récepteur : découplage du récepteur avec les protéines G.....	54
b)	Internalisation du récepteur.....	55
c)	Downrégulation des récepteurs.....	56
2-	Exemples d'effets compensatoires excitateurs	57
a)	Couplage du récepteur MOP avec la protéine Gs	57
b)	Sensibilisation de la voie de l'AMPC.....	57
3-	Implication des systèmes anti-opioïdes dans le phénomène de tolérance	58
G.	Circuits neuronaux impliqués dans la dépendance à la morphine	58
1-	La voie noradrénergique et la dépendance physique à la morphine	59
a)	Implication de la noradrénaline dans la dépendance physique à la morphine	59
b)	Le locus coeruleus joue un rôle majeur dans l'expression des signes somatiques du sevrage	60
c)	Les autres régions de contrôle potentiel du sevrage	61
2-	La voie dopaminergique mésocorticolimbique et l'addiction.....	61
a)	L'addiction est une forme pathologique de l'apprentissage et de la mémoire : implication du circuit de la récompense	61
b)	Effets d'un traitement aigu par une drogue sur le circuit dopaminergique mésocorticolimbique.....	63
c)	Effets d'un traitement chronique à la morphine.....	64
H.	Mécanismes moléculaires de la dépendance à la morphine.....	66
1-	Adaptations moléculaires à un traitement chronique par la morphine dans le <i>locus coeruleus</i>	66
a)	Rôle de la sensibilisation de la voie AMPc.....	66
b)	Rôle du facteur de transcription CREB.....	67
2-	Adaptations moléculaires à un traitement chronique par la morphine au niveau de la voie VTA-noyau accumbens.....	69
a)	Rôles de la sensibilisation de la voie de l'AMPC et du facteur de transcription CREB après un traitement chronique à la morphine	69
b)	Induction du facteur de transcription Δ FosB dans le noyau accumbens.....	71
3-	Plasticité synaptique et traitement chronique à la morphine.....	72
I.	Conclusion	73
IV.	Protéomique.....	75
A.	Complémentarité de la génomique et de la protéomique.....	75
B.	Stratégie générale d'une approche protéomique	76
1-	Préparation de l'échantillon	76

2-	Séparation du protéome	77
a)	L'électrophorèse bidimensionnelle	77
b)	La chromatographie	79
3-	Identification des protéines par spectrométrie de masse.....	80
a)	Cartographie peptidique (Peptide Mass Fingerprint, PMF) en MALDI-TOF	80
b)	Identification par séquençage peptidique en mode LC ESI-MS/MS	82
4-	Bioinformatique	83
a)	Les banques de données protéiques	83
b)	Interrogation des banques de données	84
C.	Protéomique différentielle.....	85
1-	Première approche : quantification au niveau du spectromètre de masse.....	85
a)	Marquage par le réactif ICAT	86
b)	Marquage SILAC	86
2-	Seconde approche : quantification après électrophorèse	87
a)	Révélation des protéines	87
b)	Analyse d'image	89
D.	Analyse du phosphoprotéome	92
1-	Enrichissement en phosphoprotéines	92
2-	Stratégies de détection des protéines phosphorylées après séparation par 2-DE.....	93
a)	Western-blot.....	93
b)	Marquage isotopique au ^{32}P (ou ^{33}P).....	94
c)	Coloration au Pro-Q diamond	94
V.	Objectifs de mon travail de thèse.....	95
A.	La protéomique pour l'étude des effets chroniques de la morphine	95
B.	Choix de la lignée cellulaire de neuroblastome humain SH-SY5Y	96
C.	Plan de mon travail	96
.	<i>Matériels et méthodes</i>	98
A.	Culture cellulaire et traitements	99
B.	Mesure de l'activité de l'adénylyl cyclase	99
C.	Préparation des fractions DRM.....	100
D.	Séparation du protéome des DRM par électrophorèse SDS-PAGE	101
E.	Révélation du protéome et du phosphoprotéome.....	101
1-	Coloration au bleu de coomassie colloïdal	101
2-	Coloration au Pro-Q Diamond	102
F.	Analyse d'image par le logiciel Quantity One.....	102

G. Western blot	102
H. Préparation des extraits cellulaires totaux pour l'électrophorèse bidimensionnelle	103
1- Solubilisation des protéines	103
2- Précipitation des protéines au méthanol / chloroforme.....	104
3- Réduction et alkylation des protéines.	104
I. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.....	104
1- Isoélectrofocalisation	104
2- Electrophorèse SDS-PAGE.....	105
J. Révélation du protéome total et du phosphoprotéome.....	105
1- Coloration au bleu de coomassie colloïdal	105
2- Coloration au Pro-Q diamond	105
K. Analyse d'image par le logiciel Image Master 2D Platinum.....	105
L. Identification des protéines par spectrométrie de masse.....	106
1- Excision et lavage des protéines d'intérêt.....	106
2- Réduction et alkylation de bandes 1D.....	106
3- Digestion trypsique	107
4- Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF	107
5- Extraction peptidique	107
6- Analyse par nanoLC-ESI-Q-TOF (nanoLiquid Chromatography-Electrospray- Quadrupole-Time of Flight).....	107
. Résultats et discussion.....	109
I. Analyse protéomique des adaptations moléculaires induites par la morphine dans les cellules SH-SY5Y.....	110
A. Protéome des DRM-rafts : « Long-term morphine treatment enhances protéasome- dependent degradation of G β in human neuroblastoma SH-SY5Y cells : correlation with onset of adenylate cyclase sensitization ».....	110
B. Suite de ces travaux.....	111
1- Dans les cellules SH-SY5Y : la protéine G γ ₂ est downrégulée après un traitement de 6h à la morphine	111
2- Chez la souris	111
a) Un traitement chronique à la morphine conduit à la downrégulation de G γ ₂ dans le noyau accumbens de souris.....	112
b) La lactacystine inhiberait la préférence de place conditionnée induite par la morphine chez la souris.....	112

C. Protéome total de la cellule : « Effect of long-term exposure of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to morphine : a whole cell proteomic analysis »	113
II. Analyse protéomique des adaptations moléculaires induites par un traitement à la morphine sur le phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y	114
A. Introduction.....	114
B. Analyse du phosphoprotéome de la fraction DRM des cellules SH-SY5Y.....	115
1- Mise au point de la révélation du phosphoprotéome des DRM.....	115
a) Caractérisation des DRM.....	115
b) Révélation du phosphoprotéome des DRM	116
c) Spécificité de coloration.....	116
d) Proportion relative entre phosphoprotéome et protéome.....	117
2- Analyse différentielle du phosphoprotéome des DRM.....	117
a) Première expérience : traitement chronique à la morphine.....	118
b) Deuxième expérience : traitement aigu à la morphine.....	118
c) Troisième expérience : traitement à la forskoline.....	119
C. Analyse globale du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y	120
1- Mise au point de la révélation du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y	120
a) Conditions expérimentales pour la séparation des phosphoprotéines par 2-DE.....	120
b) Comparaison du phosphoprotéome et du protéome total.....	121
2- Analyse différentielle du phosphoprotéome après un traitement à la morphine.....	122
a) Conditions opératoires	122
b) Première expérience : traitement chronique de 24h à 1 μ M de morphine	123
c) Deuxième expérience : traitement chronique à la morphine puis sevrage.....	123
d) Troisième expérience : traitement aigu de 5 min à 1 μ M de morphine	124
3- Discussion	125
a) Interprétation du sens de variation de l'intensité des spots après un traitement	125
b) Validation de la stratégie de protéomique différentielle mise en œuvre.....	125
c) Fonction des protéines identifiées.....	127
d) Comparaison des résultats avec ceux issus de l'analyse du protéome total.....	129
4- Conclusion	130
. Conclusion et perspectives.....	131
A. Conclusion	132
1- Analyse différentielle du protéome après coloration au bleu de coomassie colloïdal.....	132
2- Analyse du phosphoprotéome par coloration au Pro-Q Diamond	133
B. Perspectives.....	134

1- <i>In cellulo</i>	134
2- <i>In vivo</i>	135
a) Rôle du protéasome dans les comportements associés à la dépendance à la morphine.....	135
b) Rôle du protéasome dans les adaptations moléculaires à la morphine	135
. <i>Références bibliographiques</i>	137

. *Introduction*



Figure 1 : Fleur du pavot à opium. Le pavot à opium fait partie de la famille des papavéracées comme le coquelicot.



Figure 2 : Capsules du pavot à opium. Les capsules sont les fruits du pavot.



Figure 3 : L'opium exsude de la capsule. Après quelques heures à l'air, l'opium brut s'oxyde.



Figure 4. Le papyrus d'Ebers. Le plus ancien traité médical connu. Il décrit des maladies, leurs diagnostics et leurs traitements.

I. La morphine : le plus vieux remède connu par l'Homme pour traiter la douleur

La morphine est notamment connue pour ses propriétés analgésiques mais également pour d'autres effets tels que la suppression de la toux, la sédation, l'euphorie, l'effet antidiarrhéique mais aussi pour ses effets indésirables comme la dépression respiratoire, les vomissements, le myosis et surtout ses propriétés toxicomanogènes (Magistretti, 1992). L'utilisation de la morphine à des fins euphorisantes et pharmacologiques remonte à la plus lointaine Antiquité puisqu'elle est le principe actif de l'opium, constituant ainsi le plus vieux remède connu par l'Homme pour lutter contre la douleur.

A. La morphine est le principal agent actif de l'opium

La morphine n'est synthétisée que par une seule famille de plantes, les papavéracées. Les papavéracées du genre *Papaver*, appelées plus communément pavots, regroupent plusieurs espèces dont fait partie le coquelicot (*Papaver rhoeas*). Les pavots sont des plantes mesurant de quelques dizaines de centimètres jusqu'à plus d'un mètre, possédant quatre pétales dont la couleur peut aller du blanc au rouge en passant par le rose et le violet selon la variété et l'espèce (voir figure 1). La graine de pavot, quant à elle, est de petite taille, de couleur foncée et peut être utilisée en cuisine pour recouvrir certains pains ou encore pour obtenir une pâte utilisée notamment dans la gastronomie hongroise. Plusieurs espèces de papavéracées contiennent un pourcentage non négligeable de morphine mais c'est le pavot à opium ou *Papaver somniferum album* qui en présente la plus forte concentration dans son latex. L'opium qui étymologiquement vient du grec « opos » signifiant « jus » est en effet le suc exsudé par le fruit du pavot appelé capsule (voir figure 2) (Brownstein, 1993). L'opium n'est en fait produit et disponible que seulement quelques jours durant la vie de la plante, lors de la maturation de la capsule, environ une semaine après la tombée des pétales. Traditionnellement, le procédé de récolte de l'opium brut débute en fin de journée par des incisions superficielles de la capsule avec un petit outil tranchant. Durant la nuit, un suc blanc suinte des scarifications (voir figure 3) puis va s'oxyder à l'air et se solidifier pour devenir une pâte rouge – brunâtre soigneusement récupérée sous forme de petites boules pour former l'opium brut (Ray and Ksir, 2002). La récolte dure quelques jours jusqu'à épuisement du fruit, chaque plant de pavot pouvant donner environ un gramme d'opium brut. Après traitements, cette substance devient l'opium contenant plus de vingt alcaloïdes différents dont le plus abondant est la morphine avec une

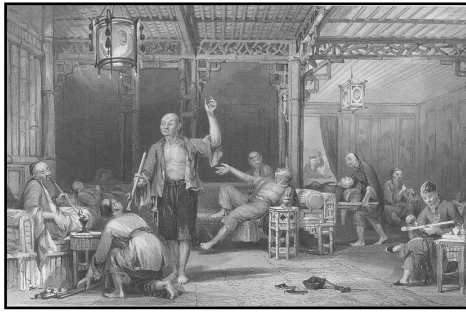


Figure 5 : Une représentation du plaisir de fumer de l'opium en Chine.

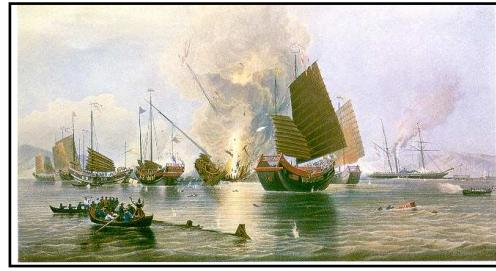


Figure 6 : Une représentation de la première guerre de l'opium.

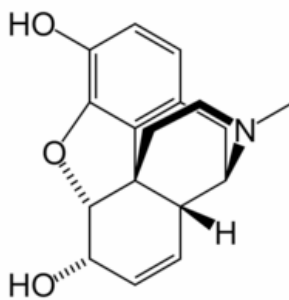


Figure 7 : Structure moléculaire de la morphine. Elle fut révélée par le chimiste britannique Robinson en 1925.

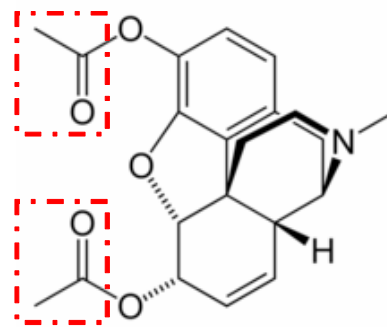


Figure 8 : Structure moléculaire de la diacétylmorphine ou héroïne.



Figure 9 : Bouteille d'héroïne commercialisée par la firme Bayer au XIX^{ème} siècle.

teneur de 8 à 20 % (Gilman et Goodman, 1985). Ainsi le principal agent actif de l'opium est la morphine.

Grâce à ses facultés d'adaptation, le pavot à opium peut être cultivé sur une large partie du globe. Sa culture en Australie, Inde, France et Turquie est destinée à l'industrie pharmaceutique mais aussi à la production de graines. Cependant depuis la chute des Talibans, la culture du pavot à opium, nécessitant peu d'eau et de soins, est devenue pour les agriculteurs Afghans un investissement rentable destinée à la production d'opium inondant le marché illégal dans le monde.

B. Premières utilisations de l'opium en tant que drogue et remède

Le pavot à opium a probablement pour origine un pays chaud et sec du Moyen Orient (Ray et Ksir, 2002). Son utilisation remonte à des milliers d'années (McCurdy et Scully, 2005). Des inscriptions sur des tablettes datant de plus de 6000 ans mentionnent que les sumériens, vivant dans ce qui est aujourd'hui l'Iraq, cultivaient le pavot qu'ils appelaient « plante de joie » pour en récupérer l'opium. Ainsi, dans un premier temps, l'opium était probablement consommé en tant qu'euphorisant lors de rites religieux par exemple (Brownstein, 1993). A l'époque des Pharaons, le papyrus d'Ebers (voir figure 4), 1500 ans avant Jésus Christ, mentionne probablement la première utilisation de l'opium à usage médical pour « empêcher les pleurs excessifs des enfants » (Ray et Ksir, 2002). Les grecs connaissaient aussi l'usage de l'opium. Il apparaît dans l'Odyssée d'Homère (1000 ans avant Jésus Christ) en tant que Népenthes versée dans le vin par Hélène, fille de Zeus, permettant ainsi « l'oubli des maux ». Hippocrate, père de la médecine, utilise le « jus de pavot » pour traiter l'hystérie. Galien, un des derniers grands médecins grecs, mentionne les bienfaits de l'opium pour soigner les morsures de serpents, les maux de tête, les vertiges, l'épilepsie et les coliques mais raconte aussi la vente libre de gâteaux et bonbons à l'opium dans les rues.

Plus tard, dans le monde arabe, les drogues telles que le hashish et l'opium se développent en raison de l'interdiction de l'alcool par le Coran. Pendant la période florissante du monde arabe, le médecin arabe Biruni écrit vers l'an 1000 après Jésus Christ dans un livre de pharmacologie ce qui ressemble à une première description de la dépendance à l'opium (Ray et Ksir, 2002). L'expansion du monde arabe d'un point de vue scientifique, culturel et commerçant entraîne la diffusion du pavot à opium en Extrême - Orient. Ainsi, des écrits du VIII^{ème} siècle témoignent de la présence de culture du pavot en Chine. Pendant longtemps la consommation d'opium en Chine fut modérée et plutôt réservée à l'élite. Puis avec l'arrivée du tabac en Chine, le plaisir de fumer s'est fortement développé si bien que la consommation d'opium par voie aérienne a supplanté sa consommation par voie orale. Ce phénomène a été accentué par l'interdiction temporaire de fumer du tabac en 1644 par l'empereur. Ainsi en Chine au XVIII^{ème} siècle, fumer de l'opium était

largement démocratisé probablement puisque cette voie d'administration résultait en un effet rapide et accru de la drogue (voir figure 5). S'en suivit alors une consommation excessive d'opium par les chinois poussant leur empereur à en prohiber l'usage récréatif. Cette interdiction conduira en partie, au XIX^{ème} siècle, aux deux guerres de l'opium motivées par des conflits commerciaux entre l'occident et la Chine (voir figure 6). C'est aussi au XIX^{ème} siècle que le principe actif de l'opium fut découvert.

C. La morphine aux XIX^{ème} et XX^{ème} siècles

Même si l'opium constitue l'un des plus vieux remèdes utilisés par l'homme, son principe actif, la morphine, ne fut isolé qu'en 1806 par le pharmacien allemand Friedrich Wilhelm Sertürner qui le baptisa ainsi en référence à Morphée dieu grec des rêves. Mais ce n'est qu'un siècle plus tard, en 1925, que la structure de la morphine sera révélée par le chimiste britannique Robinson (voir figure 7). Puis à partir de 1952, il fut possible de produire chimiquement la morphine même si sa synthèse n'est encore actuellement pas en mesure de concurrencer la morphine extractive sur le plan de coût de production.

L'isolement en 1806 de la morphine, analgésique sans équivalent à l'époque et dix fois plus puissant que l'opium, va rencontrer en 1850 l'invention de la seringue hypodermique par le médecin lyonnais Charles Pravaz conduisant ainsi à l'explosion de son utilisation médicale. Pour la première fois, le principe actif d'une plante est injecté par voie intraveineuse. Ce mode d'administration plus direct, rapide et efficace que par voie orale facilitera son utilisation massive sur les champs de batailles des guerres de Sécession aux USA (1861-1865) ou encore Franco-allemande en 1870. De nombreux combattants reviendront avec la « maladie du soldat », en d'autres termes : dépendants à la drogue (Ray et Ksir, 2002).

En 1874, le chimiste Alder Wright greffe deux groupes acétyles à la morphine pour synthétiser la diacétylmorphine (voir figure 8). Cette nouvelle molécule sera reprise puis commercialisée à partir de 1898 par la firme Bayer pour soigner de nombreuses pathologies telles que l'asthme ou la toux des tuberculeux pour lesquels aucun traitement n'existe (voir figure 9). Cette molécule trois fois plus efficace que la morphine en raison de ses deux groupes acétyles augmentant sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique sera baptisée héroïne de l'allemand « heroisch » signifiant « héroïque » puisqu'on la croyait plus efficace tout en étant moins dangereuse que la morphine.

Au XX^{ème} siècle apparaissent aux USA les premières réglementations concernant les drogues. En 1914, alors que la dépendance aux opiacés et à ses dérivés touche environ 200 000 américains (Ray et Ksir, 2002), l'« Harrison Narcotics act » régule et taxe l'importation, la

production, la commercialisation des opiacés et de la cocaïne aux USA. En 1915, la Court Suprême des Etats-Unis statue que la possession de drogue non prescrite par un médecin est un crime. Plusieurs lois suivront durcissant non seulement les conditions de délivrance des opiacés mais aussi les peines à l'encontre des trafiquants pour faire face à l'augmentation du marché illégal. En 1961, la « convention unique sur les stupéfiants » remplaçant plusieurs conventions internationales est ratifiée par l'ONU. Son objectif est de limiter la production et le commerce de substances interdites en établissant une liste de ces substances, qualifiées de stupéfiants. En 1974 naît aux USA le « National Institute of Drug Abuse » pour soutenir la recherche contre les addictions, les reconnaissant ainsi comme de véritables maladies contre lesquelles des moyens financiers doivent être mis en place (Nestler, 2004).

En dépit de ces dispositions, la toxicomanie demeure aujourd'hui un réel problème socio-économique et de santé publique. En effet, elle est la cause de nombreux crimes et délits perpétrés pour inonder et dominer le marché illégal de la drogue mais aussi pour assouvir le besoin impérieux de drogue des toxicomanes. Qui plus est, la toxicomanie est un vecteur de transmission d'infections graves telles que les hépatites B et C ou le HIV. Selon Jersey Vetulani (Vetulani, 2001), l'ensemble des dommages liés à la toxicomanie coûte par année 300 dollars à chaque contribuable américain. Plus généralement et pour donner quelques chiffres, l'Organisation Mondiale de la Santé estime à deux milliards le nombre de consommateurs d'alcool, 1,3 milliards le nombre de fumeurs et 185 millions le nombre de consommateurs de drogues illicites. En 2001, la consommation de ces drogues a contribué à 12 % des décès répertoriés dans le monde (Goldman et al., 2005).

En marge de ces ravages, la prise en charge des grandes douleurs fait toute sa place à la morphine. C'est le cas notamment en France où en 1998, Bernard Kouchner a mis en place un plan de lutte contre la douleur afin que celle-ci ne soit plus une « fatalité ». La morphine, en raison de son efficacité, reste donc aujourd'hui le principal analgésique utilisé pour traiter des douleurs sévères aiguës ou chroniques d'origine cancéreuse par exemple. Malheureusement l'administration prolongée de morphine peut entraîner des effets secondaires lourds, notamment la tolérance ou accoutumance et la pharmacodépendance. La tolérance se traduit par une diminution progressive de l'effet antinociceptif de la morphine nécessitant pour le malade d'augmenter les doses afin d'obtenir le même bénéfice thérapeutique. La pharmacodépendance, quant à elle, se traduit par l'envie irrésistible de se procurer de la morphine (dépendance psychique) et par l'apparition du syndrome de sevrage (dépendance physique) au moment de l'arrêt de l'effet de la morphine, entre deux prises par exemple.

Aujourd'hui, la prise de morphine dans un cadre thérapeutique, selon des règles de prescription bien maîtrisées, permet seulement de réduire les risques d'apparition de tolérance et de dépendance. En effet, des usages abusifs peuvent malgré tout subvenir chez des patients traités par

des opiacés pour soulager des douleurs chroniques (Jage, 2005). Chez les malades atteints de cancer, l'augmentation de la dose administrée résulte, dans la plupart des cas, de l'augmentation de l'intensité douloureuse due à l'évolution de la maladie ou de l'angoisse du malade laissé seul face à la douleur avant une nouvelle prise (Jage, 2005; Magistretti, 1992). Malgré tout, chaque type de douleur et son évolution sont très variables d'un patient à l'autre et il reste difficile d'établir des règles de prescription générales. Par ailleurs, l'utilisation de morphine ou de son dérivé l'héroïne, sur un organisme sain c'est à dire non mobilisé par la douleur, transforme fréquemment le consommateur en toxicomane. Ainsi, la connaissance des mécanismes conduisant aux phénomènes de tolérance et de dépendance aux opiacés constitue un enjeu majeur, non seulement pour l'amélioration des thérapies actuelles afin de développer des analgésiques aussi efficaces que la morphine et dépourvus d'effets secondaires mais également dans le traitement de la toxicomanie. Cette recherche s'inscrit aussi de façon plus générale dans la lutte contre l'ensemble des addictions comme celles liées au tabac et à l'alcool qui, depuis avril 2006, rentre dans le cadre de la deuxième phase du plan français de lutte contre le cancer.

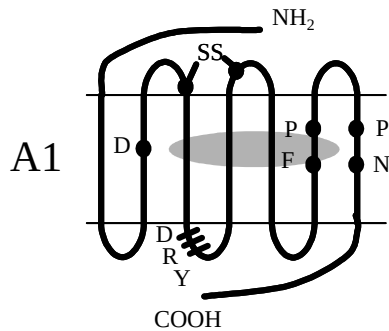
II. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G

La survie d'une espèce tient, en particulier, dans sa capacité d'adaptation à son environnement. Un organisme, qu'il soit pluri ou unicellulaire n'existe pas de façon isolée mais dans un milieu inconstant dont les fluctuations doivent être perçues puis intégrées afin de pouvoir y répondre de manière efficace et adéquate. Ainsi, une cellule doit être capable de communiquer avec son environnement ou encore avec d'autres cellules pour, par exemple, agir en synergie au sein d'un organe. Dans ce contexte, un récepteur membranaire peut être défini comme une protéine capable de percevoir un signal extracellulaire et de catalyser sa transmission à l'intérieur de la cellule. Le faible signal original est fortement amplifié par ce phénomène de transduction. Parmi ces récepteurs membranaires, ceux à sept domaines transmembranaires sont les plus nombreux, ils constitueraient à eux seuls 1 à 3% du génome des vertébrés constituant ainsi une des plus grandes familles de protéines (Bockaert et al., 2002). Ils assurent la transduction de messages de la communication cellulaire (hormones, neurotransmetteurs, facteurs de croissance...) ou sensoriels (lumière, odeurs et goûts). Au cours du temps, ces récepteurs ont su s'adapter pour reconnaître des messages de nature et structure très variées tels que des peptides, lipides, photons, ions (Bockaert et Pin, 1998). Malgré cette diversité, cette grande famille de protéines est connue pour transmettre le message extracellulaire vers l'intérieur *via* une protéine G de transduction du signal. Ainsi, ces récepteurs sont-ils appelés Récepteurs Couplés aux Protéines G ou RCPG même s'il n'a pas été montré pour la majorité d'entre eux qu'ils étaient capables d'interagir avec une protéine G (Schioth et Fredriksson, 2005). Rodbell, un pionnier dans la recherche du mécanisme d'activation de l'adénylyl cyclase (AC) par des hormones, décrivait ainsi un modèle de « ménage à trois » avant même la découverte des protéines G. Selon lui, le récepteur était une sorte de discriminateur du message, l'AC son amplificateur à l'intérieur de la cellule et enfin le transducteur qui s'avèrera être plus tard les protéines G réalisait le lien entre les deux (Bockaert et al., 2002).

La connaissance du mode de fonctionnement des RCPG est capitale, notamment dans le domaine pharmaceutique, puisque l'on estime que 60 % de tous les médicaments utilisés actuellement ont pour cible un protagoniste de la voie de transduction *via* les RCPG. Il existe deux raisons principales à cela : d'une part le nombre important des membres de cette famille et d'autre part la grande variété de processus physiologiques que ces récepteurs régulent (Bockaert et Pin, 1998). Enfin, il est à noter que des mutations affectant les RCPG sont impliquées dans plusieurs maladies génétiques (Bockaert et al., 2002).

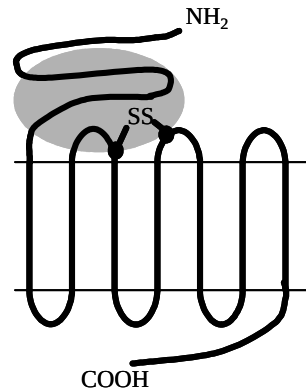
La morphine et plus généralement les opiacés ont pour cible cellulaire des récepteurs appartenant à la grande famille des RCPG. Il convient donc avant de présenter le système opioïde

Famille 1

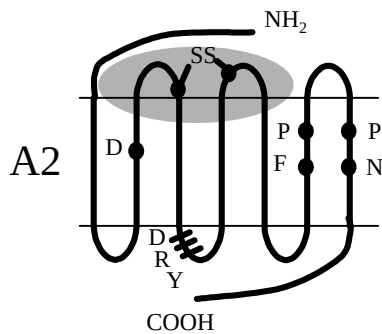


Rétinal, odeurs, catécholamines, adénosine, ATP, opiacés/enképhalines...

Famille 2

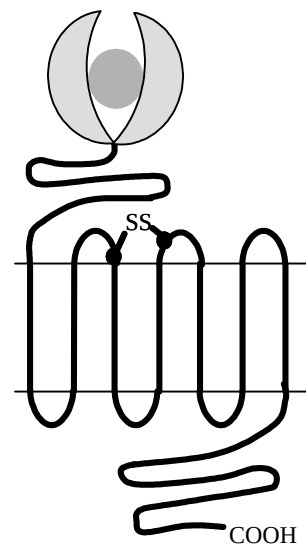


Calcitonine, α -latrotoxine, sécrétine, PTH, VIP, PACAP, CRF...

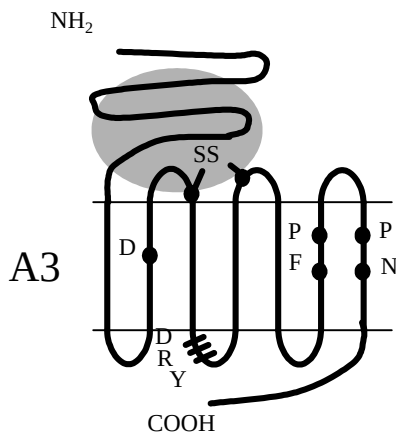


Peptides, cytokines, IL8, formyl Met-Leu-Phe, PAF-acéter, thrombine...

Famille 3



Glutamate (métabotropique), Ca^{++} , GABA_B ...



Hormones glycoprotéiques (LH, TSH, FSH)

Figure 10: Les trois familles classiques de RCPG. Les acides aminés très conservés sont représentés. La zone d'interaction avec le ligand est grisée. D'après Bockaert et Pin, 1999. IL8 (interleukine 8), LH (luteinizing hormone) TSH (thyroid stimulating hormone), FSH (follicle stimulating hormone), PTH (parathyroid hormone), VIP (vasoactive intestinal peptide), PACAP (pituitary adenyl cyclase activating peptide).

de décrire dans un premier temps comment un RCPG est capable de percevoir un signal puis de le transmettre. Je m'appuierai d'abord, sur une revue de Joël Bockaert *et al* détaillant le mode de fonctionnement d'un RCPG (Bockaert et al., 2002).

A. Les différentes familles de RCPG

L'ensemble des RCPG présente des caractéristiques structurales communes. Ils possèdent tous un cœur hydrophobe comprenant sept hélices transmembranaires de 25 à 35 acides aminés. Ces sept hélices sont reliées entre elles par trois boucles intracellulaires et trois extracellulaires. La plupart des RCPG possède aussi deux résidus cystéine très conservés dans les boucles extracellulaires 1 et 2 formant un pont disulfure conduisant à une contrainte au sein du récepteur (voir figure 10). Au contraire, les parties N terminale extracellulaire, C terminale intracellulaire et les boucles intracellulaires sont très variables suggérant qu'elles assurent la spécificité de la reconnaissance du message et de la réponse qui s'en suit (Bockaert et Pin, 1999).

Plusieurs études se sont attachées à classer les RCPG en différentes familles aboutissant à des résultats variés. Une comparaison des séquences en acides aminés des RCPG provenant de plusieurs espèces a révélé l'existence de six familles selon Bockaert et Pin (Bockaert et Pin, 1999) pour être plus tard étendue à huit familles (Bockaert et al., 2002). Fredriksson *et al* (Fredriksson et al., 2003) ont, quant à eux, plus récemment réalisé une analyse phylogénétique de la majorité des RCPG du génome humain pour aboutir à une autre classification comprenant cinq familles. En 2005, l'Union Internationale de Pharmacologie a publié une nomenclature des RCPG qui considère leur pharmacologie, leur structure prédictive, la physiologie et les pathologies dans lesquelles ils sont impliqués (Foord et al., 2005). L'objet de cette introduction n'étant pas de réaliser une description précise des différentes familles de RCPG, j'utiliserai la classification donnée par Joël Bockaert et Jean-Philippe Pin (voir figure 10), basée sur l'analyse des séquences en acides aminés, et comprenant six groupes (Bockaert et Pin, 1999).

La famille 1 correspond à celle de la rhodopsine dont la structure cristalline complète résolue en 2000 est la seule connue à ce jour pour un RCPG (Palczewski et al., 2000). Cette famille peut être caractérisée d'un point de vue de la séquence en acides aminés par trois signatures cruciales pour le couplage et l'activation des protéines G. D'abord, un résidu aspartate dans la deuxième hélice transmembranaire, ensuite un triplet D/ERY situé dans la deuxième boucle intracellulaire et enfin des résidus basiques (lysine ou arginine) dans la troisième boucle intracellulaire (Bockaert et al., 2002). Cette première famille est la plus nombreuse et peut être subdivisée en trois sous-groupes en fonction de la taille et du lieu du site de liaison des ligands : A1) les récepteurs aux petits ligands comme le rétinal, les molécules odorantes ou les petits

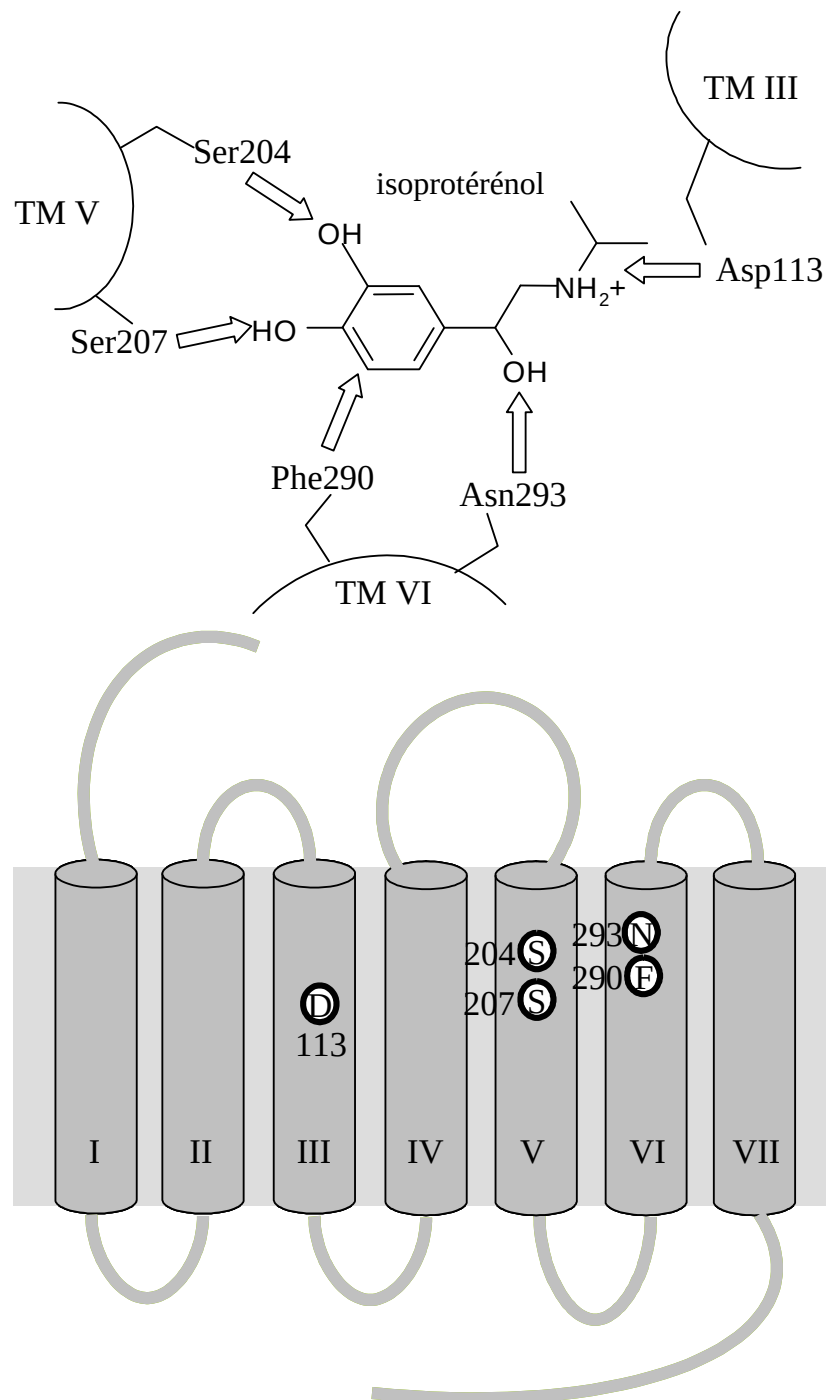


Figure 11 : Site de liaison des catécholamines sur le récepteur β_2 -adrénergique. L'adrénaline et l'isoprotérénol possèdent trois zones d'interactions communes réparties entre les hélices transmembranaires (TM) 3, 5 et 6.

peptides, ce sous-groupe comprend notamment les récepteurs opioïdes, A2) les récepteurs aux peptides dont le site de liaison se situe sur la face externe du récepteur et A3) les récepteurs aux hormones glycoprotéiques.

La famille 2 lie des hormones peptidiques relativement grosses comme le glucagon ou la sécrétine. Leur liaison implique majoritairement l'extrémité N-terminale relativement longue (une centaine d'acides aminés).

La famille 3 comprend les récepteurs métabotropiques du glutamate, des récepteurs sensibles au calcium ou encore les récepteurs GABA_B (acide γ -amino butyrique). Les sites de liaisons de ces récepteurs se situent au niveau du long domaine N-terminal possédant une structure à deux lobes pouvant s'ouvrir et se fermer pour accueillir le ligand.

Les dernières familles 4, 5 et 6 sont moins connues. Les récepteurs de la famille 4 sont sensibles à certaines phéromones. La famille 5 comprend des récepteurs connus pour contrôler le développement embryonnaire, la prolifération et la détermination cellulaire. Enfin la dernière famille est constituée de récepteurs à l'AMPC caractérisés uniquement chez *Dyctiostelium discoideum* et impliqués dans la chimio attraction.

La comparaison des séquences en acides aminés de récepteurs appartenant à deux familles distinctes ne révèle aucune similarité suggérant que ces récepteurs ont convergé vers une structure commune, efficace pour transduire un message extracellulaire à l'intérieur de la cellule (Bockaert et al., 2002).

B. Bases structurales de l'activation des RCPG

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les RCPG forment une grande famille hétéroclite en termes de séquence en acides aminés, structure et domaine de liaison du ligand. Cette hétérogénéité est particulièrement bien illustrée au sein même de la famille 1 des RCPG puisque trois grands sites de liaison du ligand peuvent être discriminés : liaison au coeur des hélices transmembranaires, liaison à la fois au niveau des boucles extracellulaires et du domaine transmembranaire et enfin liaison principalement avec la partie N-terminale extracellulaire. Malgré cette diversité, quelques mécanismes communs d'activation des RCPG peuvent être dégagés. Je m'appuierai notamment sur des exemples précis provenant d'études structurales de la famille 1, la plus étudiée.

1- Liaison du ligand au récepteur à travers quelques exemples

L'identification des régions et résidus impliqués dans l'interaction ligand / récepteur et dans la sélectivité des RCPG envers leurs ligands a été notamment réalisée par des techniques classiques

d'ingénierie des protéines (construction de chimères, mutagénèse dirigée) et par marquage par photoaffinité combinée à la modélisation moléculaire (Gether, 2000; Minami et al., 1995; Mouldous et al., 2000).

De façon générale, la liaison d'un ligand sur son récepteur implique un réseau complexe d'interactions impliquant de nombreuses liaisons de type hydrogène, ionique ou hydrophobe. Ainsi, le récepteur β_2 -adrénergique possède un certain nombre d'acides aminés bien conservés et répartis entre les hélices 3, 5, 6 et 7 du domaine transmembranaire pour former une poche de liaison où vient se nicher le ligand. L'adrénaline et l'isoprotérénol, deux agonistes du récepteur β_2 -adrénergique partagent 3 zones d'interactions communes (voir figure 11) : i) une liaison ionique entre la fonction amine chargée et l'aspartate 113 de l'hélice 3 ii) deux liaisons hydrogène entre les hydroxyls du cycle aromatique du ligand et les sérines 204 / 207 de l'hélice 5 iii) une interaction hydrophobe entre les noyaux aromatiques des ligands et la phénylalanine 290 de l'hélice 6 (Gether, 2000). D'autres résidus situés également dans cette poche de liaison sont, quant à eux, plus spécifiques d'un ligand. D'ailleurs, de subtiles différences chimiques et / ou structurales entre deux ligands peuvent être à l'origine de nouvelles interactions ou d'encombrements stériques pouvant changer drastiquement leur affinité envers leur récepteur. Ainsi, même s'il est parfois possible de définir un certain nombre d'interactions communes entre un récepteur et différents ligands, il existe autant de réseaux d'interactions que de couples ligand / récepteur. Cela est particulièrement bien illustré par les récepteurs aux peptides (comme les récepteurs opioïdes) qui sont capables de lier des peptides endogènes mais aussi toute une série de petites molécules naturelles ou synthétiques de structures très diverses.

La complexité des bases moléculaires de la reconnaissance d'un ligand par son RCPG s'accroît encore plus avec l'étude du rôle des domaines du récepteur qui ne sont pas directement impliqués dans l'interaction entre les deux protagonistes. La famille des récepteurs opioïdes permet d'illustrer cette complexité. Le rôle des domaines extracellulaires des récepteurs opioïdes dans la reconnaissance de leurs ligands a principalement été étudié par construction de chimères de récepteurs. Le DAMGO ([D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-enképhaline) est un ligand peptidique sélectif envers le récepteur opioïde de type mu (MOP). Alors que la délétion de la partie N-terminale de MOP n'affecte en rien la liaison du DAMGO, son remplacement par celle du récepteur delta (DOP) diminue par un facteur 10 l'affinité du DAMGO pour le chimère MOP / DOP (Wang et al., 1995). La construction de toute une combinaison de chimères de récepteurs opioïdes suggère que le DAMGO distingue respectivement les récepteurs MOP de DOP et MOP de KOP (récepteur kappa opioïde) grâce à la première boucle extracellulaire dans le premier cas et la troisième boucle extracellulaire dans le second (Minami et al., 1995; Onogi et al., 1995). Ces résultats pointent clairement du doigt le rôle critique des domaines extracellulaires dans la sélectivité du ligand. Selon

Metzger et Ferguson les boucles extracellulaires n'interagissent pas forcément spécifiquement avec les ligands mais joueraient plutôt un rôle de filtre permettant d'en exclure certains (Metzger et Ferguson, 1995).

2- Activation du récepteur : mouvement des hélices transmembranaires.

Une fois que le ligand interagit avec le récepteur, cette information doit être en quelque sorte transmise par le récepteur afin que le signal se propage. Même s'il est difficile de proposer un mécanisme général d'activation du récepteur en raison de la diversité de la famille des RCPG, il apparaît que le mouvement des hélices transmembranaires induit par la liaison de l'agoniste joue un rôle capital (voir figure 12) (Bockaert et Pin, 1999). On peut dès lors se demander quels sont les mécanismes mis en jeu conduisant à ces mouvements. La publication de la structure à haute résolution de la rhodopsine de bovin sous sa forme inactive montre que sa région transmembranaire est stabilisée par de nombreuses liaisons hydrogène, hydrophobe et ionique mettant en jeu des acides aminés bien conservés. Ces nombreuses interactions moléculaires maintiennent la rhodopsine sous un état particulièrement contraint (Palczewski et al., 2000). L'absorption d'un photon par le 11-cis-retinal, le ligand lié constitutivement de façon covalente à la rhodopsine, va entraîner son isomérisation en trans-rétinal. Cette photoactivation s'accompagne d'un changement de structure du ligand qui va se propager à la rhodopsine. Un élément clé, commun aux autres RCPG de la famille 1, implique la protonation de l'aspartate ou glutamate du motif D/ERY. Deux modèles ont été proposés pour souligner le rôle central joué par l'arginine dans l'activation des RCPG. Dans le premier, l'arginine est maintenue dans l'état inactif du récepteur notamment par une liaison ionique avec un aspartate de la deuxième hélice. La protonation de l'aspartate ou glutamate casserait cette interaction libérant ainsi l'arginine qui établirait de nouvelles liaisons pour stabiliser la forme active du récepteur. Selon le second modèle, l'arginine est, cette fois, stabilisée dans l'état inactif du récepteur par une liaison ionique avec l'aspartate ou glutamate adjacent. Leur protonation entraînerait la libération de l'arginine qui établirait une interaction avec l'aspartate de la deuxième hélice stabilisant, cette fois-ci, la forme active du récepteur (Bockaert et al., 2002). La structure de la rhodopsine est en faveur de la seconde hypothèse qui montre que sous la forme inactive du récepteur, un pont salin existe entre le groupement carboxylate du glutamate 134 et le guanidium de l'arginine 135 de la séquence ERY (voir figure 13) (Palczewski et al., 2000). Ainsi la simple mutation d'un acide aminé impliqué dans l'activation peut libérer un RCPG de sa contrainte, le rendant par conséquent constitutivement actif (Bockaert et al., 2002).

Quoi qu'il en soit, de façon générale, à des interactions moléculaires stabilisant la forme inactive d'un RCPG vont se substituer de nouvelles interactions après liaison du ligand libérant le

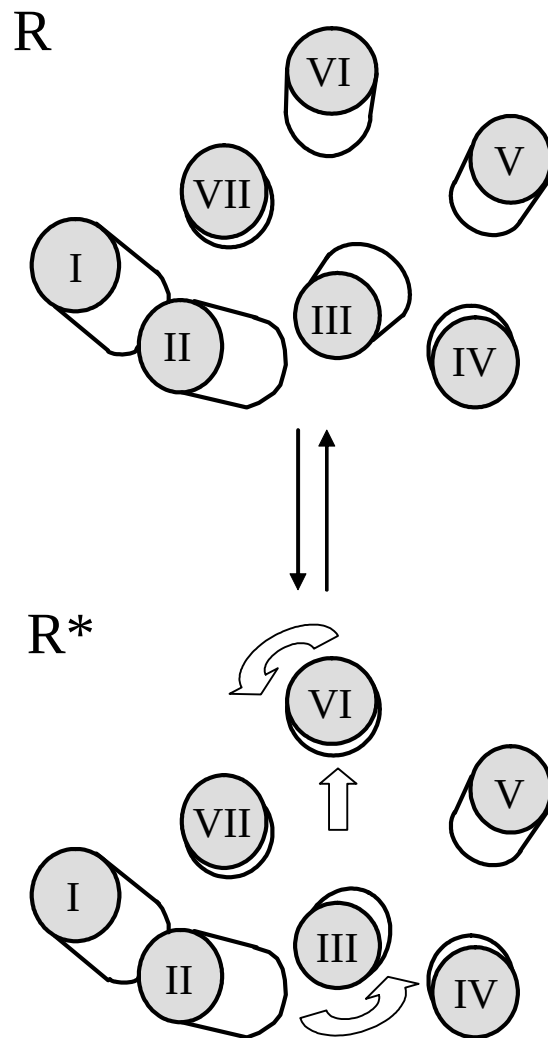


Figure 12 : Mouvement des hélices accompagnant l'activation des RCPG de la famille de la rhodopsine. L'activation du récepteur provoque le mouvement des hélices transmembranaires 3 et 6. D'après Gether, 2000. R (récepteur inactif), R* (récepteur actif).

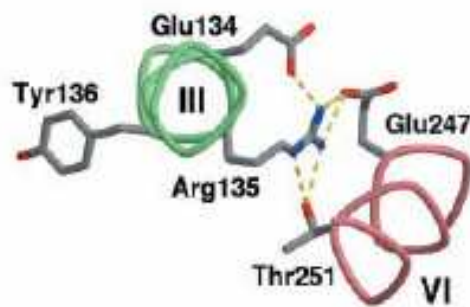


Figure 13 : Interactions mises en jeu au niveau du motif ERY de la rhodopsine à l'état inactif. Le motif ERY se situe sur la deuxième boucle intracellulaire de la rhodopsine à l'extrémité cytoplasmique de l'hélice transmembranaire 3. Un pont salin lie le glutamate 134 à l'arginine 135 à l'état inactif. D'après Palczewski *et al*, 2000.

récepteur de sa contrainte et conduisant au mouvement des hélices transmembranaires. Des techniques spectroscopiques comme le marquage de spin de résidus cystéines ou la mesure de l'absorbance UV du tryptophane témoignent de tels mouvements (Gether, 2000). L'utilisation de la structure de la rhodopsine comme modèle pour l'étude des relations structure / fonction d'autres RCPG montre que l'écartement des hélices transmembranaires 3 et 6 est un dénominateur commun à l'activation des RCPG de la première famille (voir figure 12) (Karnik et al., 2003, Gether, 2000). Pour les RCPG de la famille 1 reconnaissant les glycoprotéines au niveau de leur domaine extracellulaire N-terminal, la question de l'activation du corps central du récepteur se pose. Il semblerait cependant, que le mécanisme d'activation se base sur un principe similaire, à savoir que le domaine de liaison extracellulaire serait capable de contraindre le corps central et que la liaison de l'agoniste libèrerait le récepteur de ces contraintes (Bockaert et al., 2002). Dans tous les cas, la réorientation des hélices transmembranaires permettrait de libérer l'espace ou encore de démasquer des domaines nécessaires aux contacts avec les protéines G. D'ailleurs, les mouvements d'hélices sont répercutés au niveau des boucles intracellulaires essentielles dans l'activation des protéines G.

3- Couplage aux protéines G

Dans la plupart des cas, une fois activé, le RCPG n'est couplé qu'à un nombre limité de protéines G. De nombreuses études utilisant, entre autres, des hybrides de récepteurs couplés à des protéines G distinctes ont tenté d'éclaircir les zones d'interaction RCPG / protéines G et les bases moléculaires de la spécificité du couplage (Gether, 2000; Wess, 1997). L'idée générale qui s'en dégage est que si les trois boucles internes et la partie C-terminale du récepteur sont nécessaires à un couplage maximal avec les protéines G, ce sont les boucles intracellulaires 2 et 3 qui jouent le premier rôle (Bockaert et Pin, 1998). Ce résultat apparaît somme toute logique puisqu'elles sont connectées aux hélices 3 et 6 qui subissent les changements conformationnels les plus importants lors de l'activation du récepteur. Plus précisément, la boucle intracellulaire 2 serait plutôt responsable de l'activation de la protéine G tandis que la boucle intracellulaire 3 serait, quant à elle, impliquée dans la spécificité de couplage (Gether, 2000). Ainsi le récepteur m3 muscarinique, normalement couplé à la protéine Gq devient couplé à Gi si lui est substitué sur la boucle intracellulaire 3 quatre résidus appartenant au récepteur m2 muscarinique qui, lui, est couplé à Gi (Bockaert et Pin, 1998). En plus de la séquence en acides aminés du récepteur, des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, palmitoylation) affectant ce dernier sont aussi capables de modifier la spécificité du couplage (Wess, 1998). Malgré tout, cette spécificité ne dépend pas seulement du récepteur mais aussi de l'hétérotrimère de la protéine G. Par exemple, une protéine

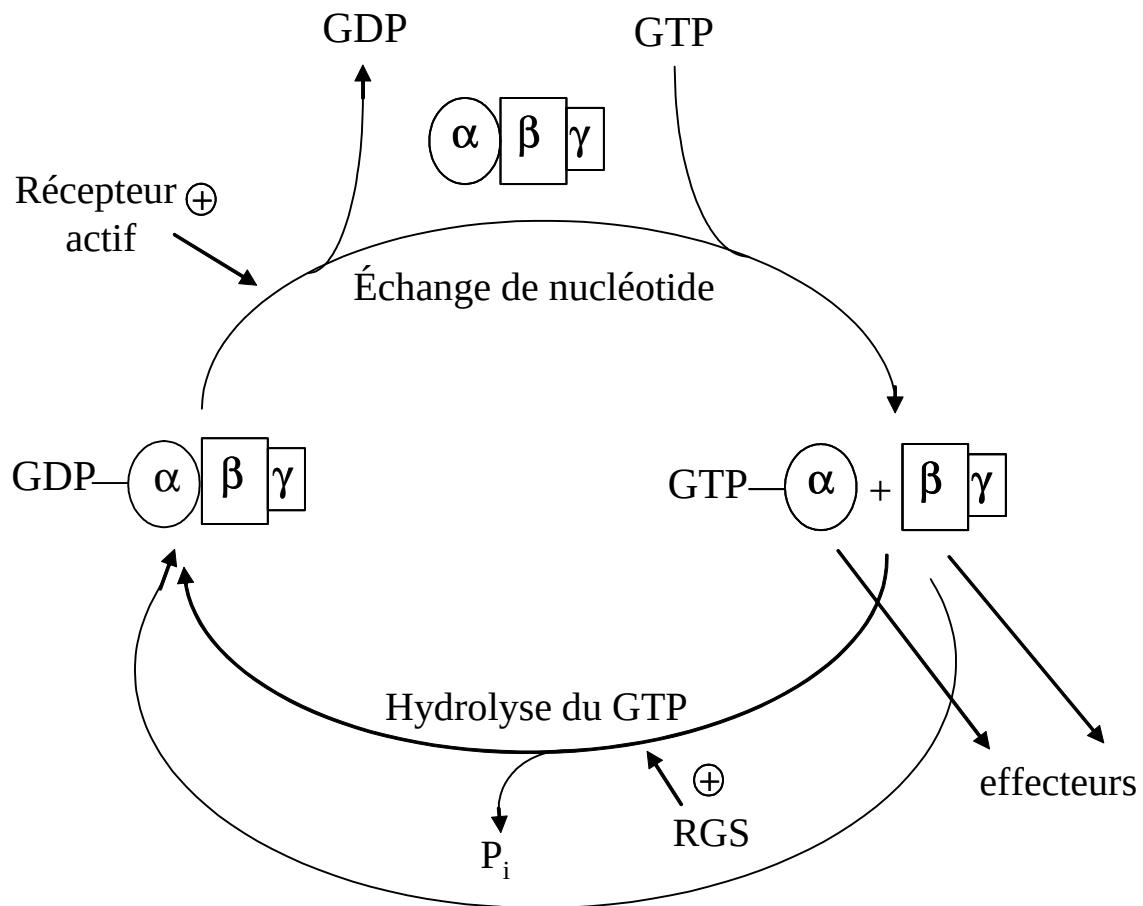


Figure 14: Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques. Après stimulation par l'agoniste, le RCPG stimule l'échange GDP-GTP sur la sous-unité α . L'activité GTPasique de la sous-unité α , stimulée par RGS (Regulators of G protein Signaling), permet le retour à l'état trimérique inactif.

$G\alpha_q$ chimère dans laquelle ont été remplacés seulement quatre ou cinq résidus C-terminaux par leur équivalent en $G\alpha_i$ sera activée par le récepteur m2 muscarinique normalement non couplé à $G\alpha_q$. Même si ces études montrent l'importance de certains résidus très précis pour la spécificité de couplage, il n'existe en général pas de séquence consensus entre différents récepteurs pourtant couplés à la même protéine G. Ainsi, il est possible que la spécificité de couplage soit régie par des motifs structuraux (Bockaert et al., 2002) ou que d'autres protéines participent à cette spécificité.

Une fois la protéine G reconnue, le mécanisme par lequel le signal d'activation du récepteur lui est transmis reste encore relativement flou. Il semble que l'écartement des hélices transmembranaires 3 et 6 permettrait l'insertion de l'extrémité C-terminale de la protéine $G\alpha$ sans interaction directe avec le site de liaison au GDP. Cependant, les nouvelles interactions imposées déclencheraient des réarrangements structuraux transmis au site de fixation du nucléotide provoquant la baisse d'affinité du GDP au profit du GTP (Bockaert et Pin, 1998; Gether, 2000).

C. Les protéines G

Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, les RCPG ne possèdent pas d'activité enzymatique propre mais sont en quelque sorte des « senseurs » de signaux extracellulaires dont le message est transmis à l'intérieur de la cellule grâce à leur capacité à catalyser l'échange GDP / GTP au niveau de la protéine G. Malgré la grande diversité des RCPG et les milliers de molécules avec lesquelles ils sont capables d'interagir, il existe un nombre relativement restreint de protéines G. Après avoir décrit brièvement le cycle d'activation des protéines G, ce chapitre présentera les grandes familles de protéines G en se focalisant uniquement sur les protéines G hétérotrimériques.

1- Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques.

Les protéines G hétérotrimériques couplées aux récepteurs à sept hélices transmembranaires sont constituées d'une sous-unité $G\alpha$ et d'un dimère $G\beta\gamma$ indissociable *in cellulo*, fixés à la membrane par des lipides. La sous-unité $G\alpha$ possède un site de liaison et d'hydrolyse du GTP (voir figure 14). La protéine G ne peut exister sous forme de trimère que si $G\alpha$ est liée au GDP. Lors de la liaison d'un agoniste, le RCPG et la protéine G vont s'associer et le récepteur va agir en tant que facteur d'échange de GDP. Cette association va conduire, comme nous l'avons vu, à un changement de structure de $G\alpha$ conduisant à l'expulsion du GDP et son remplacement par le GTP. La liaison du GTP entraîne à son tour un réarrangement structural résultant en la dissociation de $G\alpha$ avec $G\beta\gamma$. Les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, libérées, vont pouvoir interagir avec leurs effecteurs respectifs.

Tableau 1 : Diversité et fonctions des différentes sous-unités de protéines G hétérotrimériques. Seuls certains effecteurs des protéines G sont indiqués. Certaines sous-unités peuvent être ADP ribosylées par la toxine pertussique (PTX) ou cholérique (CTX). D'après Milligan et Kostenis, 2006 et Bockaert et Pin, 1998. β ARKinases (β -adrenergic receptor kinase), PI₃-kinases (phosphoinositides 3-kinases), Ras-GRF (protéine d'échange GDP/GTP de la petite protéine G Ras), RhoGEF (protéine facteur d'échange GDP/GTP de la protéine Rho).

	Sous-unité	Sous-type	Toxine	Effecteurs	Effet
Gα	α _s	α _{s(s),(L),(XL)} + α _{olf}	CTX	Adénylyl cyclase Src tyrosine kinase	+ +
	α _i / o	α _{t1} , α _{t2}	CTX, PTX	cGMP-phosphodiesterase	+
		α _{gust}		?	
		α _{i1} ,α _{i2} ,α _{i3}	PTX	Adénylyl cyclase Canaux Ca ⁺⁺ Canaux K ⁺	- - +
		α _{o1} ,α _{o2}			
		α _z			
	α _q / α ₁₁	α _q , α ₁₁ , α ₁₄ , α ₁₅ , α ₁₆	-	Phospholipases C Canaux K ⁺ (α _q)	+ +
	α _{12/13}	α ₁₂ , α ₁₃	-	Echangeur Na ⁺ /H ⁺ Phospholipase Cε / D Protéine Phosphatase 5 RhoGEF	+ + + +
Gβγ	β ₁₋₅		-	Phospholipase A ₂ Phospholipase Cβ Adénylyl cyclase GIRK Canaux Ca ⁺⁺ (N, P/Q, R) βARKinases Src kinases c-jun N-terminal kinase PI ₃ -kinases Ras-GRF RhoGEF	+ + +/- + - + + + + + +
	γ ₁₋₁₂				

L'hydrolyse du GTP en GDP permet, par la suite, de reconstituer le trimère bouclant, ainsi, le cycle d'activation (Milligan et Kostenis, 2006). Même si $G\alpha$ possède une activité GTPasique intrinsèque, l'hydrolyse du GTP est finement contrôlée par les protéines RGS (Regulators of G protein Signaling) capables d'interagir avec plusieurs types de protéines $G\alpha$.

Ce mécanisme général de transduction du signal, à travers l'association des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ pour former un trimère, suggère qu'il existe au sein d'une cellule un ratio bien précis entre $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Dans le cas contraire, on pourrait penser que la présence d'un excès de $G\alpha$ par rapport à $G\beta\gamma$ ou l'inverse puisse résulter en l'activation non spécifique d'effecteurs cellulaires. C'est ainsi qu'il a été montré par surexpression de tout un panel de protéines $G\alpha$ ou $G\beta$ (Lee et al., 2003) ou par leur extinction *via* une approche utilisant des ARN interférence (Krumins et Gilman, 2006) que les quantités de ces sous-unités étaient finement coordonnées.

En 2003, le modèle classique d'activation des protéines G a été mis en question par des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ fusionnées à des protéines fluorescentes. De façon inattendue, les auteurs montrent que l'activation du récepteur β_2 -adrénergique par la noradrénaline provoque une augmentation de FRET indiquant que les sondes fluorescentes se rapprochent (Bunemann et al., 2003). Même si ce résultat n'est pas forcément en contradiction avec une séparation du trimère, les auteurs suggèrent que l'activation des protéines G résulterait, au moins dans certains cas, d'un réarrangement conformationnel entre $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ plutôt que d'une dissociation (Bunemann et al., 2003; Klein et al., 2000). Il est aussi possible que les deux mécanismes d'activation existent et que selon le ligand ou le couple RCPG / protéine G (Frank et al., 2005), l'un ou l'autre des mécanismes soit mis en jeu.

2- Les différentes familles de protéines G.

Selon Milligan et Kostenis, alors que plus de 800 gènes codent pour des RCPG, les protéines G humaines dérivent, quant à elles, de seulement 35 gènes : 16 codant pour les sous-unités α , 5 pour β et 14 pour γ (Milligan et Kostenis, 2006).

Les sous-unités $G\alpha$ peuvent être classées en quatre familles en fonction de la similarité de leurs séquences (Bockaert et al., 2002) : i) $G\alpha_s$, ii) $G\alpha_i/o$ iii) $G\alpha_q/11$ et iv) $G\alpha_{12/13}$ (voir tableau 1). Ces protéines diffèrent autant par leur spectre d'expression tissulaire que par leur spectre d'activité envers leurs effecteurs. Notons par exemple que les protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_o$ sont capables d'inhiber l'activité de l'adénylyl cyclase (AC) tandis que $G\alpha_s$ la stimule.

On pensait traditionnellement que le dimère $G\beta\gamma$ était un simple partenaire de $G\alpha$ nécessaire à son ancrage membranaire et à la terminaison du signal. Cependant, il apparaît aujourd'hui que le dimère

G $\beta\gamma$ est capable de moduler l'activité d'une gamme d'effecteurs aussi variée que celle régulée par G α . Il existe au moins cinq sous-unités G β et douze G γ . La structure cristalline du dimère G $\beta_1\gamma_1$ a montré que les deux protéines interagissent sur toute la longueur de la sous-unité G γ (Sondek et al., 1996).

La formation de l'hétérotrimère $\alpha\beta\gamma$ n'est pas régie par le hasard mais est probablement contrôlée par des mécanismes qui nous échappent encore. Par ailleurs, un récepteur ne reconnaît que certaines combinaisons d'hétérotrimères $\alpha\beta\gamma$ (Robishaw et Berlot, 2004). Ainsi, à l'heure actuelle les diverses combinaisons possibles d'hétérotrimères $\alpha\beta\gamma$ couplées à un récepteur particulier, la spécificité de répartition tissulaire des hétérotrimères et enfin l'importance de ces combinaisons particulières dans le mécanisme de transduction du signal restent en partie inconnues.

3- Modifications post-traductionnelles des protéines G et leurs implications fonctionnelles

a) Isoprénylation et acylation

Malgré l'hydrophobicité du dimère G $\beta\gamma$, il s'avère que la thio-isoprénylation en C-terminal de la sous-unité G γ est nécessaire non seulement pour son ancrage au niveau de la membrane plasmique mais aussi pour la régulation de ses effecteurs (Milligan et Kostenis, 2006).

Les protéines G α , quant à elles, sont relativement hydrophiles. Cependant, leur présence au niveau de la membrane plasmique est nécessaire pour leur permettre d'interagir avec un RCPG. Pour ce faire, les sous-unités G α sont acylées permettant, par conséquent, leur ancrage à la membrane. On distingue deux types d'acylation pour G α : i) une N-myristoylation au niveau du résidu glycine N-terminal des protéines de type G α_i/o ii) une thio-palmitoylation pour l'ensemble des sous-unités G α au niveau d'une cystéine en N-terminal (Milligan et Kostenis, 2006). D'un point de vue fonctionnel la palmitoylation est particulièrement importante puisque, contrairement à la myristoylation, il s'agit d'une modification réversible. Ainsi, l'état de palmitoylation d'une sous-unité G α peut être modulé par la liaison d'un agoniste sur son récepteur (Chen et Manning, 2000; Wedegaertner et Bourne, 1994). Cela peut avoir pour conséquence le renforcement et / ou la diminution du pouvoir catalytique de G α envers son effecteur (Kleuss et Krause, 2003) ou encore la translocation de la sous-unité G α pour aller réguler un effecteur vers un autre compartiment cellulaire (Chen et Manning, 2001). D'ailleurs, plusieurs études suggèrent que les acylations sont déterminantes pour cibler les protéines G α vers des microdomaines membranaires appelés rafts dont l'importance dans la signalisation sera évoquée au paragraphe II-E-4 (page 38) (Moffett et al., 2000; Zacharias et al., 2002).

b) Phosphorylation

Les protéines de la famille G α i/o furent les premières sous-unités dont la phosphorylation a été démontrée. Depuis, il a été montré que d'autres protéines G, appartenant aux sous-unités α , β et γ sont elles aussi des substrats phosphorylables. D'un point de vue fonctionnel, la phosphorylation des sous-unités de protéine G est capable d'augmenter ou de diminuer leur affinité envers leurs partenaires tels que les effecteurs cellulaires ou les protéines RGS (Milligan et Kostenis, 2006). On comprend dès lors l'implication des phosphorylations des protéines G dans le mécanisme de transduction du signal. Pour illustrer cela par un exemple prenons le cas de la phosphorylation de G β suite à un traitement chronique par la morphine. Les travaux de Chakrabarti et Gintzler ont montré que cette phosphorylation de G β diminuait son association avec la protéine GRK2/3 (G protein-coupled Receptor Kinase) augmentant, selon eux, la durée du signal et la rendant plus libre pour interagir avec ses effecteurs (Chakrabarti et al., 2001). Pour l'un d'eux, l'AC2, ils ont par la suite montré que son activité était potentialisée par une protéine G β phosphorylée (Chakrabarti et Gintzler, 2003) certainement *via* une interaction entre l'AC2 et G β favorisée suite à la phosphorylation de cette dernière (Chakrabarti et al., 2005b).

c) Ubiquitinylation

L'ubiquitine est un peptide d'environ 70 acides aminés qui est lié de façon covalente à une lysine de la protéine cible suite à trois réactions successives dont la dernière est catalysée par une Enzyme 3 Ubiquitine Ligase. La poly-ubiquitinylation d'une protéine peut, selon la lysine ciblée, entraîner sa dégradation par le protéasome ou encore être le signal pour activer un facteur de transcription ou pour réparer l'ADN (Nandi et al., 2006). La mono-ubiquitinylation, quant à elle, peut jouer un rôle dans la localisation sub-cellulaire ou l'activité d'une protéine (DiAntonio et Hicke, 2004).

A l'heure actuelle, on ne connaît qu'un nombre restreint de sous-unités de protéines G capables d'être ubiquitinylées. L'ubiquitinylation la mieux caractérisée est probablement celle de Gpa1, l'équivalent de G α chez la levure, dont la lysine liée à l'ubiquitine a été identifiée par spectrométrie de masse (Marotti et al., 2002). Chez les mammifères, l'ubiquitinylation des sous-unités G γ ₂ et G γ de la transducine a été montrée de façon claire *in vitro* (Hamilton et al., 2003; Obin et al., 2002), celle des sous-unités G α _o (Busconi et al., 2000) et G α _{i2} (Ogasawara et al., 2004) sont, quant à elles, plus élusives. Dans tous les cas décrits, le devenir de la sous-unité G poly-ubiquitinylée est sa dégradation par la voie du protéasome (Hamilton et al., 2003; Obin et al., 2002; Wang et al., 2005d). Dès lors, le problème qui se pose est de comprendre la conséquence

Tableau 2 : Régulation des adénylyl cyclases par les protéines G et le calcium. Les adénylyl cyclases (AC) 1 à 9 sont stimulées par G α s. Les AC1 à 8 sont aussi toutes stimulées par la forskoline. L'AC soluble a été initialement caractérisée dans les testicules mais est aussi exprimée dans des cellules somatiques (Bundey *et al*, 2004), elle est stimulée par le bicarbonate. L'inhibition de l'AC8 par G $\beta\gamma$ a été mise en évidence récemment (Steiner D *et al*, 2006). D'après Sunahara et Taussig, 2000. (+) activation, (-) inhibition, Ca²⁺/CaM (calmoduline activée par le calcium).

Famille	Isoforme	Distribution tissulaire	Régulation par les protéines G	Effet du calcium
1	AC1	Cerveau, médullo surrénale	G α s (+) G α o (-) G $\beta\gamma$ (-)	Ca ²⁺ /CaM (+)
	AC3	Cerveau, épithélium olfactif	G α s (+)	Ca ²⁺ /CaM (+)
	AC8	Cerveau, poumons, testicules, utérus, cœur	G α s (+) G $\beta\gamma$ (-)	Ca ²⁺ /CaM (+)
2	AC2	Cerveau, muscle squelettique, poumons, cœur	G α s (+) G $\beta\gamma$ (+)	
	AC4	Cerveau, cœur, reins, foie, poumons, utérus	G α s (+) G $\beta\gamma$ (+)	
	AC7	Ubiquitaire	G α s (+) G $\beta\gamma$ (+)	
3	AC5	Cœur, cerveau, reins, foie, poumons, utérus	G α s (+) G α i (-) G $\beta\gamma$ (-)	Ca ²⁺ (-)
	AC6	Ubiquitaire	G α s (+) G α i (-) G $\beta\gamma$ (-)	Ca ²⁺ (-)
4	AC9	Cerveau, muscle squelettique, poumons, cœur	G α s (+)	
5	AC soluble	Testicules et autres tissus somatiques	Non régulée par les protéines G	

fonctionnelle de la dégradation des protéines G par le protéasome. Ainsi, sans montrer directement leur ubiquitinylation, il a été prouvé que la dégradation des protéines G par le protéasome était non seulement impliquée dans la régulation de leur taux intracellulaire (Johansson et al., 2005; Lee et al., 2003) mais aussi dans des cascades de signalisation chez *Saccharomyces cerevisiae* (Madura et Varshavsky, 1994) et chez les mammifères (Botion et al., 2001). Par conséquent, à l'instar des acylations et phosphorylations, l'ubiquitinylation des protéines G apparaîtrait comme une modification post-traductionnelle pouvant réguler la signalisation suite à la dégradation par le protéasome des protéines ainsi modifiées.

En conclusion, il s'avère que les modifications post-traductionnelles sont des processus dynamiques et réversibles affectant les protéines G au cours de leur cycle d'activation. Elles conduisent, comme nous l'avons vu, à un degré supérieur de complexité dans la compréhension des mécanismes de la transduction du signal par les protéines G hétérotrimériques.

D. Effecteurs des protéines G hétérotrimériques

Une fois activées, les protéines G hétérotrimériques sont capables de moduler l'activité d'un grand nombre d'effecteurs, rendant compte des nombreux processus physiologiques dans lesquels les RCPG interviennent. Les effecteurs modulés par les protéines G sont soit des enzymes soit des canaux ioniques. Je m'attarderai sur l'adénylyl cyclase (AC), le premier effecteur connu pour être régulé suite à l'activation d'un RCPG.

1- Adénylyl cyclase

Il est connu depuis les années 50 que certaines hormones comme le glucagon sont capables d'activer l'AC pour produire de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), un second messenger cellulaire, à partir d'ATP (adénosine triphosphate) intracellulaire. On pensait alors qu'une unique protéine était capable de reconnaître l'hormone puis de produire de l'AMPc. Dans les années 70, Rodbell et Birnbaumer ont montré que l'activation de l'AC passait par une protéine G (Bockaert et al., 2002) décrivant un modèle relativement simple à trois composantes. Depuis, la signalisation *via* l'AC s'est particulièrement complexifiée puisque qu'il apparaît que cette enzyme est capable d'intégrer et d'interpréter différents signaux provenant de différentes voies de signalisation (Patel et al., 2001).

a) Les différentes isoformes d'adénylyl cyclases

A l'heure actuelle, on connaît chez les mammifères neuf gènes codant pour des isoformes membranaires de l'AC et un gène pour une isoforme soluble (voir tableau 2). Ces dix isoformes de l'AC peuvent être classées en cinq familles en fonction des similitudes entre leurs séquences en acides aminés et leurs profils de régulation : i) la première famille regroupe les AC1, 3 et 8, régulées par le calcium *via* la calmoduline ii) les AC2, 4 et 7 stimulées par l'interaction avec G $\beta\gamma$ iii) les AC5 et 6 inhibées par le calcium et les G α_i iv) AC9 qui est l'isoforme membranaire la plus divergente v) l'AC soluble, l'isoforme la plus divergente de toute et qui n'est pas régulée par les protéines G mais par le calcium et le bicarbonate (Sunahara et Taussig, 2002).

La distribution tissulaire des isoformes de l'AC déterminée selon la présence de leur ARNm est résumée au tableau 2. Il est à noter que même si les isoformes membranaires de l'AC sont distribuées spécifiquement dans différentes régions du cerveau, elles sont toutes exprimées dans ce tissu, les AC1 et 3 semblant être les plus spécifiques de cet organe (Sunahara et Taussig, 2002). Les autres isoformes, quant à elles, sont exprimées de façon plus large. Alors que jusqu'à récemment on pensait que l'AC soluble n'était exprimée que dans les testicules (Patel et al., 2001; Sunahara et Taussig, 2002), elle est aussi retrouvée dans des cellules somatiques où elle serait la source de pools locaux d'AMPc (Bundey et Insel, 2004). Globalement, la large distribution des AC suggère qu'au sein d'une même cellule existent différentes isoformes d'AC n'appartenant pas à la même famille. Dès lors, apparaissent la multiplicité et la complexité de la voie de signalisation de l'AMPc du fait de l'existence de nombreuses isoformes d'AC régulées différemment mais pouvant coexister au sein d'une même cellule.

b) Régulation des adénylyl cyclases membranaires par les protéines G

Les propriétés régulatrices des AC ont été étudiées principalement *in vitro* et sont résumées tableau 2. Toutes les AC membranaires sont stimulées par l'interaction avec les protéines G α_s . La forme active de G α_s liée au GTP est dix fois plus efficace que la forme liée au GDP pour activer les AC. La forskoline (FSK), un diterpène extrait de la plante *Coleus Forskohlii* est capable de stimuler l'ensemble des AC à l'exception de l'isoforme 9 (Patel et al., 2001; Sunahara et Taussig, 2002). Il s'agit, quasiment, des seules propriétés régulatrices communes puisque même au sein d'une famille, il existe une hétérogénéité de régulation vis-à-vis des protéines G.

Les protéines G α_i/o sont capables d'inhiber les AC mais de façon plus sélective que G α_s n'est capable de les activer. Les sous-unités G α_i/o et G α_s ne sont pas en compétition directe pour

moduler l'activité des AC puisque leurs sites d'interaction avec l'AC sont situés à l'opposé l'un de l'autre (Sunahara et Taussig, 2002).

Le dimère $G\beta\gamma$ est, lui aussi, capable de moduler l'activité des AC. La régulation des AC par $G\beta\gamma$ est plus complexe qu'avec $G\alpha_{i/o}$ et $G\alpha_s$ puisque $G\beta\gamma$ est capable, par exemple, de stimuler les AC2, 4 et 7 et d'inhiber les AC1 et 8. D'ailleurs, $G\beta\gamma$ est le plus puissant inhibiteur des AC1 et 8 ce qui est particulièrement important dans le cerveau puisque ces deux isoformes y sont fortement exprimées. Ainsi, alors qu'il y a quelques années le rôle régulateur de $G\beta\gamma$ était sous-estimé, il apparaît depuis que $G\beta\gamma$ est un puissant modulateur des AC (Sunahara et Taussig, 2002).

c) Quelques mots sur la structure des adénylyl cyclases membranaires

Les AC sont des protéines dont la masse avoisine 130 kDa, composées de deux domaines chacun constitué par six hélices transmembranaires et une grande boucle cytosolique. Les deux boucles cytosoliques portent les régions catalytique et régulatrice de l'enzyme (voir figure 15). Leur expression sans les domaines membranaires résulte en une AC tronquée possédant la même activité que l'AC native, tout aussi sensible à ses régulateurs comme la forskoline ou les protéines $G\alpha$ (Sunahara et Taussig, 2002).

Le site actif des AC se partage entre les deux domaines cytosoliques dont les structures cristallines ont été résolues (Tesmer et al., 1997; Zhang et al., 1997). De ce fait, toute altération de la conformation de ces deux domaines modifiera la structure du site actif et ainsi l'activité de l'enzyme. La forskoline se lie aux AC dans une poche hydrophobe située à l'interface des deux domaines cytosoliques. La liaison de la forskoline permet donc en quelque sorte de coller les deux domaines dans une orientation propice à la liaison du substrat dans le site actif. Il est à noter que les acides aminés de la poche hydrophobe sont conservés au sein des AC1 à 8 alors que de subtiles substitutions chez l'isoforme 9 l'empêchent d'être stimulée par la forskoline (Hurley, 1999). De façon similaire à la forskoline, $G\alpha_s$ interagit avec les AC au niveau des deux domaines cytosoliques à la fois permettant de les orienter vers une conformation active de l'enzyme (Sunahara et Taussig, 2002). Au contraire, l'interaction des AC avec les protéines $G\alpha_{i/o}$ modifierait la structure du site actif de telle sorte que la liaison du substrat ne soit plus possible.

2- Les autres effecteurs enzymatiques

Outre l'adénylyl cyclase, d'autres classes d'enzymes ont été identifiées comme cibles des protéines G (voir tableau 1). Seules certaines d'entre elles sont énoncées :

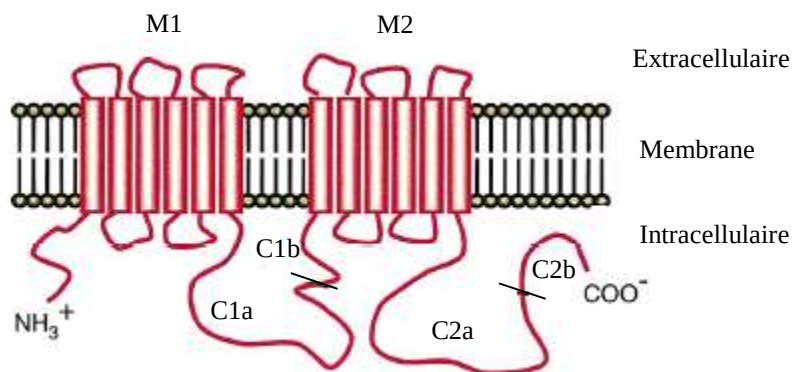


Figure 15: Structure schématique des adénylyl cyclases membranaires. Les adénylyl cyclases sont composées de deux domaines chacun constitué par six hélices transmembranaires (M1 et M2) et une grande boucle cytosolique (C1 et C2). L'expression des domaines C1a et C2a joints par un linker reconstitue l'activité de l'AC stimulée par la forskoline et la protéine $G_{\alpha s}$ couplée au GTP. D'après Patel *et al*, 2001.

Les phospholipases C β , activées par les sous-unités $G\alpha_q$ et par plusieurs dimères $G\beta\gamma$ (Clapham et Neer, 1997), entraînent la libération d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et de 1,2-diacylglycérol (DAG) à partir du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2). L'IP3 stimule la libération de calcium intracellulaire alors que le DAG active plusieurs isoformes de protéines kinases C (PKC) (Landry et al., 2006).

La GMPc-phosphodiesterase, responsable de la transformation du GMPc en GMP, est activée par la sous-unité $G\alpha_t$ des cellules en cônes et bâtonnets de la rétine exposée à la lumière (Seno et al., 2001).

Les isoformes de phosphatidylinositol 3-kinases de type γ sont activées par interaction directe avec les dimères $G\beta\gamma$. Elles produisent du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate à partir de PIP2 (Landry et al., 2006).

Enfin, il est à noter que la stimulation des RCPG conduit aussi l'activation de la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Proteins) de façon indirecte par l'intermédiaire des PKC, PKA ou encore des petites protéines G (Qi et Elion, 2005). D'ailleurs, les protéines $G\beta\gamma$, $G\alpha_{12/13}$ sont capables de stimuler les facteurs d'échange du GDP nécessaires à l'activation des petites protéines G (Landry et al., 2006).

3- Les effecteurs canaux ioniques

Les protéines G peuvent moduler les conductances membranaires en potassium, sodium, chlore et protons (Clapham, 1994; Schneider et al., 1997). Seuls certains exemples sont mentionnés (voir aussi tableau 1) :

Les sous-unités $G\beta\gamma$ activent notamment les canaux potassiques de type GIRK (G protein Inwardly Rectifying K^+ channel). Cinq canaux de ce type ont été clonés et retrouvés dans le cœur, cerveau ou pancréas (Landry et al., 2006). Leur activation conduit à une hyperpolarisation des cellules par sortie de potassium.

Les sous-unités $G\beta\gamma$ inhibent les canaux calciques de type N, P/Q et R. (Milligan et Kostenis, 2006). Les échangeurs ioniques sodium / proton sont les cibles des sous-unités $G\alpha_{12/13}$ (Bockaert et Pin, 1998).

E. Vers un modèle complexe de la transduction du signal via les RCPG

La spécificité, la sélectivité et l'efficacité avec lesquelles sont transmis les signaux cellulaires ne peuvent être expliquées par un modèle simple à trois composantes faisant intervenir uniquement un RCPG, une protéine G et un effecteur distribués au hasard au sein de la membrane

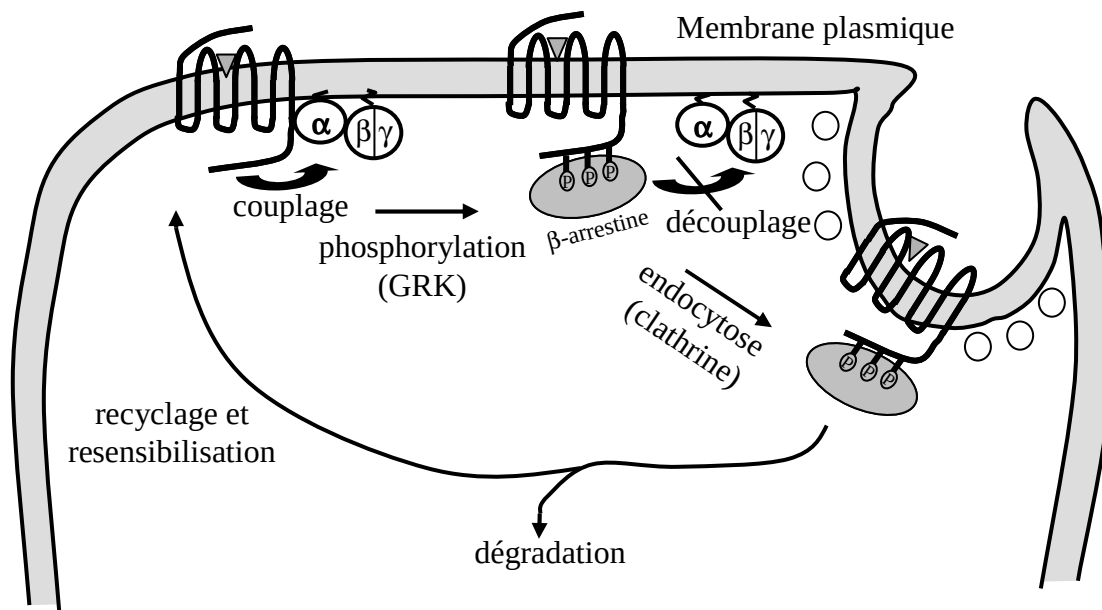


Figure 16 : Mécanisme d'internalisation d'un RCPG par la voie dépendante de l'arrestine. La phosphorylation et l'interaction avec la β -arrestine induisent la désensibilisation. L'endocytose et la dégradation participent à la « downrégulation » du RCPG mais aussi à son recyclage et à sa resensibilisation. (GRK, G protein-coupled receptor kinase).

plasmique. La question est de savoir comment la cellule est capable d'intégrer et de transmettre spécifiquement l'ensemble des signaux qu'elle reçoit à tout instant puis de formuler une réponse coordonnée sans interférence. L'une des explications qui émerge depuis quelques années est qu'il existe une compartimentation spatiale et fonctionnelle des voies de signalisation au sein de la membrane plasmique incluant des unités multiprotéiques organisées autour d'un ou plusieurs RCPG (Bockaert et al., 2004; Bockaert et al., 2003; Ostrom et Insel, 2004).

1- Le concept de « réceptosome »

L'idée selon laquelle un RCPG interagit uniquement avec une protéine G pour transmettre un signal spécifique est désormais révolue. Il apparaît, depuis quelques années maintenant, que les RCPG interagissent de façon directe ou indirecte avec un nombre important de protéines possédant, elles même, de multiples sites d'interactions avec d'autres protéines. De ce fait, il existe en quelque sorte autour d'un RCPG tout un réseau complexe de protéines formant une plateforme fonctionnelle de signalisation qualifiée de « réceptosome » (Bockaert et al., 2004). A donc émergé l'idée selon laquelle chaque RCPG établit tout autour de lui des connexions qui lui sont propres. En conséquence, mieux appréhender l'organisation de ce réseau est probablement l'une des clés permettant de comprendre les bases moléculaires de la spécificité de signalisation d'un RCPG.

Les approches de double hybride et de type protéomique (Becamel et al., 2002) notamment ont permis de décortiquer petit à petit ce réseau interactionnel. On dénombre, aujourd'hui, plus de cinquante protéines GIP (GPCR interacting protein) (Bockaert et al., 2003). Les GIP peuvent être des protéines membranaires telles que d'autres RCPG ou des canaux ioniques ou encore des protéines solubles du cytosquelette ou des facteurs de transcription. Elles interviennent dans le trafic cellulaire des récepteurs, dans leur adressage vers des compartiments sub-cellulaires ou encore directement dans les mécanismes de signalisation (Bockaert et al., 2004). A travers quelques exemples ayant fait l'objet de revues par Bockaert *et al* (Bockaert et al., 2004; Bockaert et al., 2003), j'essaierai de souligner comment les GIP participent activement à la spécificité du signal.

Les arrestines font partie des premières GIP ayant été caractérisées. Elles constituent une famille de protéines solubles participant au phénomène de désensibilisation. Elles interagissent avec de nombreux RCPG phosphorylés notamment par les GRK et participent au découplage récepteur / protéine G diminuant ainsi l'efficacité de la transmission du signal à l'intérieur de la cellule (voir figure 16). Elles permettent aussi l'internalisation du récepteur dans des vésicules d'endocytose de type puits de clathrine. Le récepteur internalisé va alors pouvoir être recyclé et resensibilisé à la membrane ou être dégradé. Cette dégradation fait partie du phénomène de downrégulation, caractérisé par une diminution du nombre de RCPG membranaires après une exposition prolongée à

un agoniste. Les arrestines sont par ailleurs impliquées dans l'activation de la voie des MAP Kinases en jouant un rôle de protéines adaptatrices entre des membres de cette voie et les RCPG (Bockaert et al., 2004).

De nombreux RCPG expriment en leur extrémité C-terminale un motif de liaison PDZ reconnaissant un domaine PDZ existant chez plusieurs familles de protéines. Parmi ces protéines, je mentionnerai la protéine NHERF (pour Na⁺ / H⁺ Exchangeur Regulatory Factor) qui fournit un exemple explicite montrant l'implication des GIP dans la spécificité du signal. NHERF est capable d'interagir avec le récepteur aux hormones parathyroïdes de type 1 (PTH1) et de l'« orienter » vers l'activation ou non de différents effecteurs. Plus précisément dans les cellules polarisées tubulaires proximales rénales, au sein de membranes où est présent NHERF, le récepteur PTH1 sera orienté vers l'activation de la Phospholipase C (PLC) et non vers celle de l'adénylyl cyclase tandis que si NHERF est absent l'inverse se produira (Bockaert et al., 2004; Bockaert et al., 2003). Dès lors, en fonction du tissu ou au sein d'une même cellule, le même récepteur peut activer différentes voies de signalisation selon la présence ou non d'une GIP dans son environnement.

Enfin, je citerai l'interaction existant entre la partie C-terminale du récepteur GABA_B et le facteur de transcription CREB2 (cAMP Responsive Element Binding 2). L'activation du récepteur GABA_B induit la translocation de CREB2 vers le noyau pour induire la transcription de gènes cibles (Bockaert et al., 2003). Ainsi, il est possible que la proximité constitutive entre le récepteur et les GIP qui pour certains sont des effecteurs des RCPG permet, en plus d'accroître la spécificité, d'augmenter l'efficacité / rapidité de la transmission du signal.

Les trois exemples de GIP que je viens d'évoquer interagissent avec la queue C-terminale des RCPG. En effet, sur la cinquantaine de GIP identifiées, une quarantaine a été identifiée comme se liant sur cette partie C-terminale. A cela, deux raisons peuvent être proposées. La première d'ordre biologique veut que la séquence la moins conservée des RCPG, même entre deux sous-types de récepteurs, soit la partie C-terminale. Ainsi le fait que différents GIP lient les récepteurs en C-terminal peut rendre compte de la spécificité du signal pour chaque sous-type de RCPG. La seconde raison, d'ordre méthodologique, veut que les approches employées pour identifier de nouvelles GIP sont plus performantes avec la partie C-terminale du fait de sa solubilité et de sa plus faible structuration (Bockaert et al., 2004; Bockaert et al., 2003).

En raison de leur implication dans la spécificité de la transduction du signal, les GIP se révèlent comme des cibles thérapeutiques particulièrement prometteuses (Bockaert et al., 2004; Bockaert et al., 2003). Il serait envisageable par exemple de cibler uniquement un sous-type de récepteur, ou encore un récepteur mais seulement dans un type de tissu réduisant ainsi les effets indésirables.

Dans le prochain chapitre j'évoquerai, plus en détails, deux familles de protéines accessoires impliquées elles aussi dans la transduction du signal mais identifiées d'abord comme interagissant avec les protéines G.

2- Les protéines accessoires à travers deux exemples

Les protéines accessoires peuvent être définies comme l'ensemble des protéines autres que les RCPG, les protéines G ou les effecteurs classiques capables de réguler la force, l'efficacité et la spécificité d'un signal transféré par une protéine G (Sato et al., 2006). Dans ce chapitre, j'aborderai deux exemples de protéines accessoires : les RGS et AGS.

a) Les protéines RGS (Regulators of G-protein Signaling)

La première brèche dans le modèle à trois décrit originellement par Rodbell provient probablement de la découverte des protéines RGS capables de réguler négativement le signal reçu par un RCPG. Cette atténuation du signal a notamment été mise en évidence en montrant l'effet inhibiteur de la surexpression des RGS sur les voies de signalisation (De Vries et al., 2000). Chez les mammifères, il existe une trentaine de protéines RGS dont la distribution varie en fonction des tissus même si la plupart est exprimée dans le cerveau (De Vries et al., 2000). Elles se caractérisent par une activité GTPasique et la présence d'un domaine RGS de liaison aux protéines de type $G\alpha_{i/o}$ et $G\alpha_q$ (Bockaert et al., 2002; De Vries et al., 2000) alors qu'une seule RGS interagirait avec la sous-unité $G\alpha_s$ (Zheng et al., 2001). Les protéines RGS sont de tailles très variables, pourvues souvent de plusieurs domaines fonctionnels suggérant pour elles de multiples fonctions et interactions.

Le signal induit par un stimulus doit être finement régulé non seulement dans l'espace mais aussi dans le temps. Cette régulation de la durée du signal peut se faire au niveau des protéines G en modulant le temps de demi-vie de leur forme activée. Comme indiqué dans le paragraphe II-C-1 (page 24), la terminaison du signal transduit par les protéines G nécessite l'hydrolyse du GTP en GDP par l'activité GTPasique de la sous-unité $G\alpha$. Cependant *in vitro*, cette activité GTPasique intrinsèque paraît trop faible pour rendre compte de la rapidité de la terminaison du signal *in vivo* (Bockaert et al., 2002). C'est dans ce contexte qu'interviennent les protéines RGS qui raccourcissent la durée d'un signal induit par la stimulation d'un RCPG en inactivant la protéine G grâce à leur activité GTPasique. Ainsi, les RGS sont des GTPase Activating Protein (GAP), famille déjà connue pour intervenir dans l'inactivation des petites protéines G. L'activité GAP des RGS permet non seulement d'inactiver directement la sous-unité $G\alpha$ mais aussi indirectement le dimère

Tableau 3 : Propriétés des protéines AGS. Il est à noter que AGS1 est capable d'interagir avec G α o de même que le motif GPR des AGS de la deuxième famille. D'après Blumer *et al*, 2005. AGS (Activator of G-protein Signaling), GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor), GPR (G-Protein Regulatory), ND (Non Déterminé), +/- interaction ou non chez la levure.

Famille	AGS	Sélectivité envers certaines protéines G α				Autres propriétés
		Gi2	Gi3	Gs	G16	
Famille 1 (GEF)	AGS 1	+	+	-	-	
	AGS3	+	+	-	-	4 motifs GPR
Famille 2 (GDI)	AGS4	+	+	-	-	3 motifs GPR
	AGS5	ND	+	ND	ND	3 motifs GRP
	AGS6	ND	+	ND	ND	1 motif GPR
Famille 3	AGS2	+	+	+	+	lie G $\beta\gamma$
	AGS7	+	+	+	+	lie G $\beta\gamma$
	AGS8	+	+	+	+	lie G $\beta\gamma$

Gβγ par la reformation de l'hétérotrimère Gαβγ inactif. Cependant, la propriété inhibitrice des protéines RGS ne se limite pas à leur activité GAP puisqu'en interagissant avec la sous-unité Gα, elles la séquestrent, l'empêchant de lier ses effecteurs pour les moduler ou encore l'empêchant de se coupler à nouveau avec le récepteur (De Vries et al., 2000). C'est ainsi que Garzon *et al* (Garzon et al., 2005) ont récemment montré dans le cadre du système opioïde que l'activation du récepteur à la morphine s'accompagnait rapidement de la rétention de plusieurs sous-unités Gα par RGS9-2, phénomène qu'ils corrélaient à la désensibilisation du récepteur.

A l'heure actuelle, les RGS ne sont plus uniquement vues comme des protéines atténuant le signal des protéines G *via* leur activité GAP. Par exemple, les travaux de Fisher *et al* (Fischer et al., 2003) suggèrent que la protéine RGS-GAIP (pour G Alpha Interacting Protein) est capable d'adresser la sous-unité Gα_{i3} vers une E3 ubiquitine ligase proposant ainsi un rôle d'adaptateur pour cette RGS. Plus généralement, les RGS sont aussi capables d'interagir avec des RCPG ou des effecteurs. Les RGS12 et 14 possèdent aussi deux domaines d'interaction avec les protéines Gα. Par ces interactions multiples les RGS pourraient participer à l'échafaudage d'unités multiprotéiques de signalisation (Abramow-Newerly et al., 2006).

b) Les protéines AGS (Activators of G-protein Signaling)

De même que les RGS, les protéines AGS peuvent moduler le cycle d'activation des protéines G en interagissant directement avec celles-ci. Plus précisément, les AGS ont été identifiées en tant que protéines activant les protéines G indépendamment d'un RCPG. Il existe huit AGS capables de reconnaître spécifiquement certaines sous-unités de protéines G. Ces huit AGS sont classées en trois familles en fonction de leur mécanisme d'activation des protéines G (voir tableau 3) (Blumer et al., 2005).

In vitro, AGS1 augmente la liaison du GTP sur des protéines Gα_{i/o} purifiées (Blumer et al., 2005). Ainsi, à l'instar des RCPG, AGS1 est un facteur d'échange du GDP provoquant l'activation des protéines G de façon dépendante du GTP (Sato et al., 2006). Au contraire, les AGS2 à 8 activent les protéines G sans promouvoir l'échange GDP / GTP sur la sous-unité Gα. Les AGS3 à 6 lient préférentiellement Gα tandis que les AGS2, 7 et 8 lient plutôt Gβγ (Blumer et al., 2005).

Les AGS de la famille 2 possèdent un ou plusieurs domaines GPR (G-Protein Regulatory) responsables de la liaison spécifique avec une sous-unité de type Gα_i couplée au GDP (Blumer et al., 2005). Le motif GPR des AGS est capable de déclencher activement la dissociation du trimère Gαβγ (Ghosh et al., 2003) mais aussi de stabiliser la sous-unité Gα_i-GDP empêchant la réassociation du trimère (Peterson et al., 2000). Ainsi, les AGS de la famille 2 sont des inhibiteurs de la dissociation du GDP (ou GDI). La faculté de certaines AGS de se comporter en tant que GDI

introduit de nouveaux concepts quant au cycle d'activation des protéines G. De façon non exhaustive, citons d'abord le fait que la dissociation du trimère $G\alpha\beta\gamma$ par les AGS puis la stabilisation de $G\alpha$ i-GDP peut entraîner spécifiquement une activation des effecteurs modulés par $G\beta\gamma$ (Blumer et al., 2005). Ensuite, l'inhibition de la reconstitution du trimère peut potentialiser la signalisation dépendante de $G\beta\gamma$ en fonction de la demi-vie du complexe AGS- $G\alpha$ i-GDP (Lanier, 2004). Enfin, de la même façon que les RGS, il est possible d'imaginer que la séquestration et / la stabilisation des sous-unités $G\alpha$ i-GDP empêche le couplage du trimère $G\alpha\beta\gamma$ avec son récepteur (Natochin et al., 2000; Peterson et al., 2000).

A souligner, un autre point commun entre certaines RGS et les AGS3, 4 et 5 de la famille 2 provient de la présence dans leurs séquences de plusieurs domaines d'interaction avec des protéines. Plus précisément, les AGS3, 4 et 5 possèdent plusieurs motifs GPR chacun capable d'interagir avec une sous-unité $G\alpha$ i. On peut dès lors suggérer pour les AGS une fonction de protéine d'échafaudage participant à l'assemblage de complexes supramoléculaires de protéines G impliqués, par exemple, dans la formation de multimères de RCPG (Lanier, 2004).

3- Oligomérisation des RCPG

Jusqu'à présent les RCPG n'ont seulement été évoqués qu'en tant qu'entités monomériques. Seulement, depuis une dizaine d'années de nombreuses études ont révélé la présence de RCPG sous formes dimérique et oligomérique non seulement dans des systèmes d'expression hétérologues mais également *in vivo* (Kroeger et al., 2003). Plus particulièrement, l'existence d'hétérodimères / oligomères, c'est à dire l'association entre deux ou plusieurs RCPG différents, a suscité un engouement du fait que de telles entités peuvent posséder des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles originales. La possibilité d'interaction entre des récepteurs appartenant même à des familles distinctes révèle un nouveau niveau de diversité fonctionnelle jusqu'à récemment insoupçonné, chaque combinaison pouvant correspondre à une nouvelle cible pharmacologique. Dans les paragraphes qui suivent, je n'évoquerai que la dimérisation des RCPG.

a) Mise en évidence de la dimérisation

L'existence de RCPG sous forme dimérique a été montrée par des techniques biochimiques englobant la co-immunoprécipitation, le cross-linking ou encore le western-blot mais aussi par des techniques biophysiques : FRET ou BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) (Hansen et Sheikh, 2004). La majorité de ces travaux ayant été réalisée dans des systèmes d'expression hétérologue, il a été dans un premier temps suggéré que la dimérisation était un artefact généré par

la surexpression des récepteurs. Puis dans un second temps, la dimérisation a été mise à jour dans des systèmes exprimant les RCPG à des taux physiologiques et pour des récepteurs exprimés de façon endogène (Kroeger et al., 2003). Les dimères de rhodopsine ont par exemple été observés directement par microscopie à force atomique (Fotiadis et al., 2003). Aujourd'hui, la preuve étant faite que de nombreux récepteurs existent sous forme dimérique incite à penser qu'il s'agit d'une caractéristique commune à l'ensemble de la famille des RCPG (Kroeger et al., 2003).

b) Mécanismes moléculaires de la dimérisation

Il existe plusieurs modèles décrivant les bases moléculaires de la dimérisation des RCPG. On peut cependant citer trois types d'interactions. D'abord des ponts disulfures reliant les domaines extracellulaires de deux monomères. C'est le cas pour la plupart des RCPG de la famille 3 qui n'existent que sous forme dimérique (Hlavackova et al., 2005). Ensuite, des interactions intracellulaires notamment au niveau de la queue C-terminale des RCPG qui est entre autres impliquée dans l'homodimérisation du récepteur delta opioïde (Cvejic et Devi, 1997). Enfin, des interactions au niveau des hélices transmembranaires sont impliquées dans l'homodimérisation de la rhodopsine. Il est très probable que chaque dimère ait trouvé sa propre solution pour se constituer en utilisant, par exemple, une combinaison de ces trois types d'interactions (Kroeger et al., 2003). Comme indiqué précédemment, il est aussi envisageable que la dimérisation des RCPG se réalise par l'intermédiaire de protéines G solidarisées par une protéine accessoire telle qu'une AGS (Lanier, 2004). En accord avec cette idée, Law *et al* ont montré que l'hétérodimérisation des récepteurs opioïdes MOP et DOP nécessite l'interaction récepteur / protéine G (Law et al., 2005).

c) Régulation de la dimérisation des RCPG

Alors que certains RCPG comme la rhodopsine ou les récepteurs métabotropiques du glutamate sont des dimères constitutifs (Hlavackova et al., 2005; Terrillon et Bouvier, 2004), la formation ou dissociation de certains autres semble être modulée par le ligand (Kroeger et al., 2003). Les résultats de ces travaux sont cependant souvent difficiles à interpréter puisque la liaison d'un ligand peut induire seulement un changement conformationnel des RCPG se traduisant par une modulation de l'accessibilité d'un antigène par un anticorps lors d'une immunoprécipitation ou par une variation du transfert de fluorescence / bioluminescence (Kroeger et al., 2003; Terrillon et Bouvier, 2004). Aussi, il existe des résultats contradictoires concernant les effets des ligands sur la dimérisation en fonction de l'approche expérimentale entreprise (Hansen et Sheikh, 2004; Kroeger et al., 2003). Ainsi, selon Hansel *et al*, tous les RCPG existent sous forme homodimérique de façon constitutive probablement dès leur synthèse au niveau du réticulum endoplasmique alors que la

formation et la dissociation des dimères induites par les ligands ne sont qu'artefacts d'expérimentation (Hansen et Sheikh, 2004).

d) Implications pharmacologique et thérapeutique de l'hétérodimérisation des RCPG à travers l'exemple des récepteurs opioïdes mu, delta et kappa

L'observation que le knock-out d'un récepteur opioïde spécifique chez une souris entraînait l'altération du fonctionnement des récepteurs subsistants a fortement conduit à penser que les récepteurs opioïdes étaient capables de former des hétérodimères ayant des propriétés pharmacologiques spécifiques (Kroeger et al., 2003).

Il a été montré que les récepteurs opioïdes MOP, DOP et KOP sont capables d'hétérodimériser pour former les dimères MOP / DOP (Gomes et al., 2000), MOP / KOP (Wang et al., 2005a) et DOP / KOP (Jordan et Devi, 1999). Ces nouvelles entités sont pourvues de profils pharmacologiques distincts des récepteurs exprimés seuls (Kroeger et al., 2003). Pour illustrer ces propos, je citerai les travaux Waldhoer *et al* montrant que l'agoniste 6'-guanidinonaltrindole active spécifiquement les hétérodimères DOP / KOP et est un analgésique uniquement s'il est administré dans la moelle épinière (Waldhoer et al., 2005). Cette étude suggère, ainsi, que les hétérodimères de récepteurs opioïdes existent *in vivo* spécifiquement dans certains tissus. Encore plus intéressant d'un point de vue thérapeutique, il a été montré que le design de ligands bivalents ciblant des hétérodimères permet d'obtenir de nouveaux analgésiques aussi puissants que la morphine n'induisant ni tolérance ni dépendance (Daniels et al., 2005). D'autres travaux montrent, quant à eux, qu'il existe une coopération entre les récepteurs MOP et DOP d'un hétérodimère résultant en une potentialisation non seulement des voies de signalisation (Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2000) mais aussi de l'effet analgésique (Gomes et al., 2004) permettant d'entrevoir des traitements combinant plusieurs ligands.

L'ensemble de ces travaux souligne le potentiel thérapeutique énorme qu'ont les ligands ciblant les dimères de RCPG. La découverte de ces derniers permet d'envisager de nouvelles stratégies de traitements à partir de ligands déjà utilisés et le développement de molécules inédites présentant de nouvelles propriétés pharmacologiques et dépourvues d'effets secondaires.

4- Compartimentation membranaire des voies de signalisation : les rafts

Dans les chapitres précédents, nous venons de voir à travers quelques exemples que des plateformes de signalisation, constituées par tout un réseau de protéines interagissant les unes avec les autres de façon dynamique, convertissent un stimulus en une réponse physiologique adaptée. Jusqu'à présent, nous n'avons pas tenu compte du fait que de nombreux protagonistes de la

transduction du signal sont intimement associés à la membrane plasmique. La complexité et la variété de lipides composant la membrane plasmique suggèrent que son rôle ne se limite pas simplement à une frontière entre milieux externe et interne (Munro, 2003). En accord avec cette idée, il a été montré que la composition lipidique de cette membrane peut influencer l'activité des RCPG (Baenziger et al., 2000; Lagane et al., 2000). Plus largement, la question est donc de savoir si la membrane plasmique possède un rôle actif dans la transmission du signal. Dans les années 90, un premier élément de réponse a été apporté avec la proposition que la membrane plasmique était en partie composée de microdomaines enrichis en sphingolipides et en cholestérol impliqués dans le transport de protéines membranaires (Brown et Rose, 1992).

a) Les rafts : une nouvelle architecture de la membrane plasmique

Depuis près de trente ans, on considérait la membrane plasmique comme une mosaïque fluide et homogène à l'intérieur de laquelle les protéines se comportaient comme des icebergs flottant librement dans un océan de lipides (Singer et Nicolson, 1972). En réalité, ces dix dernières années, de nombreux travaux ont montré que la membrane plasmique ainsi que d'autres membranes intracellulaires possèdent une organisation complexe incluant des microdomaines protéo-lipidiques fonctionnels appelés rafts ou radeaux lipidiques (Pike, 2003; Pike, 2004).

La capacité de ces régions membranaires à former des microdomaines viendrait de leur composition lipidique distincte du reste de la membrane plasmique. En effet, les rafts seraient des régions enrichies notamment en cholestérol et sphingolipides composés d'acides gras à haut degré de saturation. Ces différences de propriétés physico-chimiques conduiraient à une séparation de phases entre des rafts plutôt rigides et le reste de la membrane plasmique plus fluide (Pike, 2003).

Cette nouvelle architecture membranaire des cellules a remis en cause la vision que l'on avait de la membrane plasmique notamment d'un point de vue fonctionnel. Même si elle prête encore à débat (Douglass et Vale, 2005; Lin et Shaw, 2005; Munro, 2003), l'implication des rafts dans la signalisation (Pike, 2003), le transport de protéines (Dessy et al., 2000) ou encore l'entrée de pathogènes dans la cellule (Rosenberger et al., 2000) a été relayée par plusieurs travaux.

b) Isolation des rafts par des techniques biochimiques

En raison de leurs propriétés physico-chimiques différentes du reste de la membrane plasmique, les rafts ont été traditionnellement caractérisés par leur insolubilité et leur faible densité à basse température dans 1 % du détergent Triton X-100 (Brown et Rose, 1992). Cette propriété permet d'isoler du reste de la membrane plasmique par ultracentrifugation à l'équilibre sur gradient de densité une fraction DRM (pour Detergent Resistant Membrane) qui flotte à l'interface des

gradients 5 % et 30 % de sucrose. Malgré l'absence de consensus (Munro, 2003), cette fraction DRM est très généralement assimilée aux rafts.

Depuis, d'autres méthodes de préparations avec ou sans détergent (Macdonald et Pike, 2005) ou utilisant de plus faibles pourcentages en Triton X-100 ont été mises en œuvre pour isoler les rafts. Cependant la composition protéo-lipidique de la fraction purifiée varie selon le procédé choisi. Cela suggère soit qu'il existe différentes populations de rafts (Pike, 2004) soit que les fractions purifiées ne sont pas représentatives des microdomaines existant au sein de la membrane plasmique (Munro, 2003).

c) Caractéristiques biochimiques des rafts

i) *Composition lipidique des rafts*

Comme indiqué précédemment, les rafts sont traditionnellement connus pour être enrichis en cholestérol et sphingolipides. Cependant, la composition lipidique des rafts dépend de la façon dont ils ont été isolés biochimiquement. Par exemple, leur préparation à l'aide de détergents semble extraire plus sélectivement des lipides caractéristiques du feuillet externe de la membrane plasmique que sont le cholestérol et les sphingolipides (Munro, 2003; Pike, 2003). Malgré tout, comme le montre une récente étude de type lipidomique réalisée sur des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), même si la composition lipidique des rafts est sensible à leur mode de préparation, dans tous les cas le cholestérol et les sphingolipides y sont enrichis (Pike et al., 2005).

ii) *Composition protéique*

Plusieurs études de type protéomique se sont attachées à déterminer la nature des protéines retrouvées dans les rafts après leur isolation biochimique (Foster et al., 2003; Li et al., 2003; von Haller et al., 2001). Même si la composition protéique varie en fonction du type cellulaire, les rafts sont notamment enrichis en protéines à ancrage GPI (pour GlycosylPhosphatidoInositol), en protéines du cytosquelette et de signalisation, particulièrement les protéines G. Des protéines telles que la phosphatase alcaline (protéine à ancre GPI) ou la flotilline sont couramment utilisées en tant que marqueurs caractéristiques des rafts (Butour et al., 2004; Eckert et al., 2003). Les cavéolines, quant à elles, sont propres aux cavéoles qui sont des invaginations de la membrane plasmique considérées comme une sous-famille de rafts (Pike, 2003).

Les premières étapes de la transduction d'un signal se déroulant au niveau de la membrane plasmique et l'enrichissement des rafts en protéines de signalisation suggèrent un rôle fonctionnel

de ces microdomaines dans la transmission du signal. J'essaierai d'illustrer ces propos à travers les signaux reçus par les RCPG.

d) Raft et signalisation des RCPG

L'équipe de Paul Insel s'est intéressée au rôle des rafts dans la signalisation dépendante des récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques couplés positivement à l'AC (Ostrom et al., 2004; Ostrom et al., 2001). Lors de leur activation par un agoniste, tandis que le récepteur $\beta 1$ adrénergique reste confiné dans les rafts, le récepteur $\beta 2$ adrénergique est, quant à lui, délocalisé hors des rafts. Suite à la surexpression de l'AC6 qui se localise alors préférentiellement dans les rafts, la stimulation du récepteur $\beta 1$ adrénergique induit une plus forte activation de l'AC6 par rapport à la stimulation du récepteur $\beta 2$ adrénergique qui, sortant des rafts, se découple en partie de son effecteur (Ostrom et al., 2001). Ainsi, dans le cas du récepteur $\beta 1$ adrénergique les rafts peuvent être considérés comme des plateformes de signalisation permettant de «colocaliser» l'ensemble des protagonistes indispensables à la transduction du signal. Cette dernière se ferait alors plus efficacement grâce à la proximité spatiale des « acteurs » protéiques facilitant leurs interactions pour transmettre le signal (Pike, 2003). Par ailleurs, il apparaît aussi que les rafts permettraient d'augmenter la spécificité du signal puisque dans le cas présent, la voie activée par le récepteur $\beta 1$ adrénergique est privilégiée.

L'activation de la rhodopsine par la lumière, quant à elle, n'induit pas de modification de sa localisation membranaire. Cependant, la lumière entraîne une translocation drastique vers les rafts de la transducine, de la protéine RGS9-1 et de la GMPc phosphodiesterase (PDE) un effecteur impliqué dans la phototransduction (Nair et al., 2002; Seno et al., 2001). L'importance fonctionnelle de ces translocations n'est pas encore bien définie mais selon Seno *et al* les premières étapes de la transmission du signal visuel pourraient avoir lieu au sein des rafts. Dès lors, il est possible de proposer que dans certains cas la séparation spatiale des différents protagonistes de la transduction du signal empêche l'activation non spécifique de la voie de signalisation en l'absence de ligand (Pike, 2003).

Enfin, la translocation de certains RCPG vers les rafts suite à leur activation pourrait entraîner leur séquestration puis éventuellement leur internalisation et donc être la première étape dans le processus de désensibilisation. C'est ce qui semble être le cas pour le récepteur muscarinique à l'acétylcholine (Dessy et al., 2000).

De façon générale, ces précédents exemples montrent qu'il n'existe pas de modèle commun définissant le rôle des rafts dans la transduction du signal. Encore une fois il est possible que chaque cellule, chaque voie de signalisation ait sa propre stratégie de compartimentation afin de transmettre

le signal le plus efficacement et fidèlement possible. Enfin, même s'il n'existe toujours pas de consensus concernant l'implication des rafts dans les mécanismes de transduction du signal, il est communément admis qu'il existe au sein de la membrane plasmique une architecture dynamique des voies de signalisation (Munro, 2003).

En conclusion, la spécificité, l'intégrité, la force d'un signal reçu par un RCPG ou un autre type de récepteur sont assurées par le profil d'expression et la stoechiométrie dans une cellule des différents protagonistes de la transduction du signal (récepteurs, transducteurs, effecteurs, protéines accessoires) mais aussi par la structuration et la ségrégation des voies de signalisation en plusieurs unités distinctes (Sato et al., 2006).

F. Les récepteurs opioïdes sont des RCPG

Les récepteurs opioïdes sont activés à la fois par des ligands endogènes peptidiques tels que les endorphines et par des ligands exogènes comme la morphine. Ces derniers sont connus pour être non seulement de puissants analgésiques mais aussi des substances particulièrement addictives (Waldhoer et al., 2004). De part ces propriétés, l'une des questions fondamentales qui est posée dans le domaine de la biologie des addictions est de savoir pourquoi des substances exogènes comme la morphine ou l'héroïne ont une forte propension à induire les phénomènes de tolérance et la dépendance chez leurs usagers. Une première étape dans la compréhension des mécanismes de tolérance et de dépendance a été franchie avec le clonage de ces récepteurs opioïdes dans les années 90 (Chen et al., 1993; Evans et al., 1992; Yasuda et al., 1993). Il a été ainsi montré que ces récepteurs font partie de la grande famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G et plus précisément de la famille de la rhodopsine. Dès lors, un torrent d'informations sur leurs propriétés pharmacologiques, sur leur structure, sur les voies de signalisation activées par ces récepteurs est devenu disponible. Dans la deuxième partie de l'introduction, je présenterai plus en détails le système opioïde.

III. Le système opioïde

La morphine et plus généralement les opioïdes exercent leurs effets pharmacologiques sur le système nerveux central et périphérique par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques : les récepteurs opioïdes. Ces récepteurs ont été caractérisés dans les années 70 en fonction de leur spectre de sélectivité pharmacologique pour un répertoire de ligands. Depuis, quatre récepteurs opioïdes ont été clonés : les récepteurs MOP (pour *mu*), DOP (pour *delta*), KOP (pour *kappa*) et NOP (pour *nociceptine*) (Waldhoer et al., 2004). Dans ce chapitre je présenterai d'abord brièvement les propriétés pharmacologiques de cette famille de récepteurs puis certains effets aigus des opioïdes *in vivo* et au niveau cellulaire. Enfin, je m'attarderai plus longuement sur les effets chroniques des opioïdes plus particulièrement sur les bases moléculaires et cellulaires de la dépendance à la morphine.

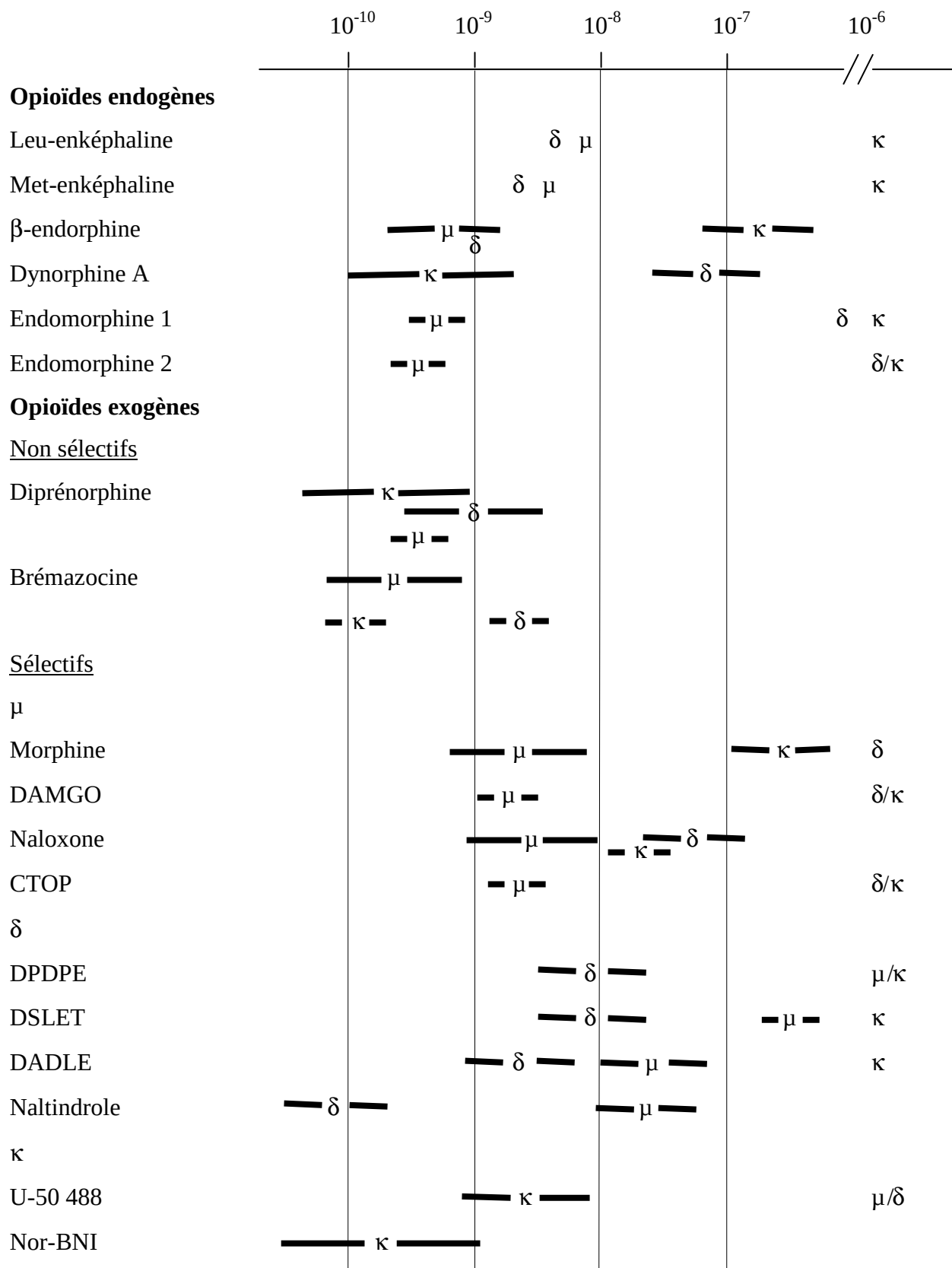
A. Pharmacologie des récepteurs opioïdes

1- La découverte des récepteurs opioïdes : introduction historique

Les premières observations suggérant l'existence de plusieurs récepteurs opioïdes datent des années 60. A cette époque deux équipes ont montré qu'un prétraitement chez des souris par la nalorphine, le premier antagoniste opioïde connu, était capable d'inhiber les effets analgésiques induits uniquement par certains opioïdes (Cox et Weinstock, 1964; Veatch et al., 1964). En 1973, les groupes de Pert et Snyder (Pert et Snyder, 1973), Simon (Simon et al., 1973), et Terenius (Terenius, 1973) ont montré pour la première fois, par des expériences de liaison spécifique de ligands opioïdes radiomarqués de haute affinité, l'existence de récepteurs opioïdes dans le cerveau. Dans la même année, il a été montré que les récepteurs identifiés ne possédaient pas la même distribution dans le cerveau suggérant une nouvelle fois l'existence de plusieurs récepteurs opioïdes (Brownstein, 1993). Enfin en 1976, les travaux de Martin *et al* (Martin et al., 1976) ont clairement mis en évidence cette multiplicité en montrant que le syndrome de sevrage chez des chiens rendus dépendants à différents groupes d'opioïdes était supprimé par la prise d'un agoniste du même groupe. A cette époque, l'existence de trois récepteurs opioïdes a été proposée en fonction de leur spécificité de ligands : le récepteur *mu* pour morphine, *kappa* pour ketocyclazocine et *sigma* pour N-allylnormetazocine.

La présence dans des tissus animaux de récepteurs stéréospécifiques à des molécules d'origine végétale telles que les opiacés, a amené Hans Kosterlitz à penser que les récepteurs opioïdes avaient des ligands endogènes. En 1975, son équipe a de ce fait isolé à partir d'extraits de

Tableau 4 : Affinités de quelques ligands opioïdes pour les récepteurs μ (MOP), δ (DOP) et κ (KOP).



cerveau de porc les deux premiers ligands endogènes, deux pentapeptides, la Met-enképhaline et la Leu-enképhaline (enképhaline venant du grec « dans la tête ») (Hughes et al., 1975). C'est alors qu'un autre récepteur opioïde, ayant une plus forte affinité pour la Leu-enképhaline que pour la morphine et moins sensible à l'effet de la naloxone a été caractérisé pour la première fois dans le canal déférent de la souris et baptisé ainsi récepteur *delta* (Hughes et al., 1975). Ainsi à la fin des années 70, les études pharmacologiques avaient donc identifié quatre types de récepteurs opioïdes potentiels : *mu*, *delta*, *kappa* et *sigma*. Aujourd'hui, alors que le récepteur *sigma* n'est plus considéré comme un récepteur opioïde, un dernier récepteur opioïde atypique, NOP, a été découvert en 1994 par homologie de séquence avec les autres récepteurs (Mollereau et al., 1994).

Concernant l'hypothèse originale de Kosterlitz ayant contribué à la recherche de ligands opioïdes endogènes, il est intéressant de noter que depuis plus de vingt ans la présence de morphine dans des tissus mammifères a été mise à jour (Pasternak, 1988). Or récemment, il a été établi que des cellules humaines en culture sont capables de produire de la morphine (Poeaknapo et al., 2004). A l'heure actuelle, le rôle éventuel de cette morphine endogène n'est pas défini.

2- Les ligands opioïdes

a) Ligands peptidiques endogènes

Depuis la découverte des deux premiers ligands endogènes des récepteurs opioïdes en 1975, plus d'une vingtaine de peptides endogènes aux propriétés opioïdergiques sont aujourd'hui connus (Brownstein, 1993). La plupart des peptides endogènes sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs codés par différents gènes : i) la **proenképhaline** dont sont notamment dérivés les Met-enképhalines et la Leu-enképhaline ii) la **prodynorphine** dont sont notamment dérivés les dynorphines A, la dynorphine B iii) la **proopiomélanocortine** dont sont notamment dérivés les β -endorphines iv) la **pronociceptine** dont dérive la nociceptine (Nestler et al., 2001b). Ces précurseurs sont maturés par des endopeptidases (proprotéines convertases 1 et 2) et des exopeptidases (aminopeptidases et carboxypeptidases) pour générer les plus petits fragments biologiquement actifs précédemment évoqués. Bien que synthétisés à partir de différents précurseurs, l'ensemble de ces peptides endogènes possède un motif commun en N-terminal Tyr/Phe-Gly-Gly-Phe nécessaire à leur reconnaissance par les récepteurs opioïdes (Law et al., 1999).

Plus récemment, d'autres peptides endogènes, les **endomorphines** consistant en de plus petits peptides (quatre acides aminés) particulièrement affins pour le récepteur MOP ont été isolés mais aucun précurseur n'a été identifié pour eux (Waldhoer et al., 2004).

	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	149																																																																																						
hNOP	L	K	V	T	I	V	G	L	A	V	C	V	G	L	L	G	N	C	L	V	M	V	I	L	R	H	T	K	M	K	T	A	T	N	I	I	F	N	L	A	L	A	D	T	L	V	L	L	T	L	P	F	Q	G	T	D	I	L	L	G	F	W	P	F	G	N	A	L	C	K	T	V	I	A	I	D	Y	N	M	F	T	S	T	F	T	L	T	A	M	S	V	D	R	Y			
hKOP	I	P	V	I	T	A	V	S	V	V	F	V	V	G	L	V	G	N	S	L	M	F	V	I	I	R	Y	T	K	M	K	T	A	T	N	I	I	F	N	L	A	L	A	D	A	L	V	T	T	T	M	P	F	Q	S	T	V	Y	L	M	N	S	W	P	F	G	D	V	L	C	K	I	V	I	S	I	D	Y	N	M	F	T	S	I	F	T	L	T	M	M	S	V	D	R	Y		
hMOP	T	A	I	T	A	L	S	I	V	C	V	V	G	L	F	G	N	F	L	V	M	V	I	V	R	T	K	M	K	T	A	T	N	I	I	F	N	L	A	D	A	L	A	T	S	T	L	P	F	Q	S	V	N	L	M	G	T	W	P	F	G	T	I	L	C	K	I	V	I	S	I	D	Y	N	M	F	T	S	I	F	T	L	T	C	T	M	S	V	D	R	Y						
hDOP	L	A	I	A	I	T	A	L	S	A	V	C	A	V	G	L	L	G	N	V	L	M	F	G	I	V	R	T	K	M	K	T	A	T	N	I	I	F	N	L	A	D	A	L	A	T	S	T	L	P	F	Q	S	A	K	Y	L	M	E	T	W	P	F	G	E	L	L	C	K	A	V	L	S	I	D	Y	N	M	F	T	S	I	F	T	L	T	M	M	S	V	D	R	Y				
	>=====TM1=====<.i1.>=====TM2=====<.....e1.....>=====TM3=====																																																																																																
	150	160	170	180	190	196A	200	205A	210	220	230	240	246																																																																																				
hNOP	V	A	I	C	H	P	I	R	A	L	D	V	R	T	S	S	K	A	Q	A	V	N	V	A	I	W	A	L	S	V	V	G	V	P	A	I	M	G	S	A	Q	V	E	D	E	-	E	I	E	C	L	V	E	I	P	-	T	P	Q	D	Y	W	G	P	V	F	A	I	C	I	F	L	F	S	F	I	V	P	V	L	V	I	S	V	C	Y	S	L	M	I	R	R	L	G	V	R	
hKOP	I	A	V	C	H	P	V	K	A	L	D	F	R	T	P	L	K	A	K	I	I	N	I	C	I	W	L	S	S	S	V	G	I	S	A	I	V	L	G	G	T	K	V	R	E	D	V	D	V	I	E	C	S	L	Q	F	P	D	D	D	Y	S	W	D	L	F	M	K	I	C	V	F	I	F	A	F	V	I	P	V	L	I	I	V	C	Y	T	L	M	I	L	R	L	K	S	V	R
hMOP	I	A	V	C	H	P	V	K	A	L	D	F	R	T	P	R	N	A	K	I	I	N	C	N	I	L	S	S	A	I	G	L	P	V	M	F	M	A	T	T	K	Y	R	Q	G	-	S	I	D	C	T	L	T	F	S	-	H	P	T	W	Y	W	E	N	L	V	K	I	C	V	F	I	F	A	F	I	M	P	V	L	I	I	T	V	C	Y	G	L	M	I	L	R	L	K	S	V	R
hDOP	I	A	V	C	H	P	V	K	A	L	D	F	R	T	P	A	K	A	K	I	N	I	C	I	W	V	L	S	A	G	V	G	V	P	I	M	V	M	A	V	T	R	P	R	D	G	-	A	V	V	C	M	L	Q	F	P	-	S	P	S	W	Y	W	D	T	V	T	K	I	C	V	F	L	F	A	F	V	P	I	L	I	T	V	C	Y	G	L	M	L	R	L	R	S	V	R		
	<.....i2.....>=====TM4=====<.....e2.....>=====TM5=====<....i3																																																																																																
	247	250	260	270	280	288A	290	300	310	320	326																																																																																						
hNOP	L	L	S	G	S	R	E	K	D	R	N	L	R	R	I	T	R	L	V	L	V	V	A	V	F	V	G	C	W	T	P	V	Q	V	F	V	L	A	Q	G	L	-	G	V	Q	P	S	S	E	T	A	V	A	I	L	R	F	C	T	A	L	G	Y	V	N	S	C	L	N	P	I	L	Y	A	F	L	D	E	N	F																	
hKOP	L	L	S	G	S	R	E	K	D	R	N	L	R	R	I	T	R	L	V	L	V	V	A	V	F	V	V	C	W	T	P	I	H	I	F	I	L	V	E	A	L	-	G	S	T	S	H	S	T	A	A	L	S	S	Y	F	C	I	A	L	G	Y	T	N	S	S	L	N	P	I	L	Y	A	F	L	D	E	N	F																		
hMOP	M	L	S	G	S	K	E	K	D	R	N	L	R	R	I	T	R	M	V	L	V	V	A	V	F	I	V	C	W	T	P	I	H	I	Y	V	I	K	A	L	V	T	I	-	P	E	T	T	F	Q	T	V	S	W	H	F	C	I	A	L	G	Y	T	N	S	C	L	N	P	V	L	Y	A	F	L	D	E	N	F																		
hDOP	L	L	S	G	S	K	E	K	D	R	S	L	R	R	I	T	R	M	V	L	V	V	G	A	F	V	V	C	W	A	P	I	H	I	F	V	I	V	W	T	L	V	D	I	R	R	D	P	L	V	V	A	A	L	H	L	C	I	A	L	G	Y	A	N	S	S	L	N	P	V	L	Y	A	F	L	D	E	N	F																		
	>=====TM6=====<.....e3.....>=====TM7=====<.																																																																																																

Figure 17: Comparaison des séquences des récepteurs opioïdes MOP, DOP, KOP et NOP humains. Les acides aminés identiques sont représentés en gras. TM, hélice transmembranaire; e, boucle extracellulaire; i, boucle intracellulaire. Les extrémités N et C-terminales extramembranaires ne peuvent pas être alignées.

De même que les ligands exogènes, ces ligands endogènes présentent un spectre de sélectivité pour les récepteurs opioïdes (voir tableau 4). Ces différents peptides endogènes sont largement distribués dans le cerveau mais sont retrouvés également dans plusieurs organes périphériques (Mollereau et al., 1996; Pasternak, 1988). Ainsi, d'un point de vue physiologique, ces ligands endogènes sont impliqués dans des fonctions aussi variées que la douleur, la cognition, les voies motrices, la régulation de fonctions autonomes (systèmes cardiaque, respiratoire, digestif, endocrine) etc. (Pasternak, 1988). Enfin, il est à noter que la structure de base de certains ligands endogènes a été utilisée pour la synthèse de ligands exogènes comme le DAMGO.

b) Ligands exogènes

De façon générale, il existe deux catégories de ligands exogènes : les ligands peptidiques et les ligands non peptidiques. Le tableau 4 répertorie certains des ligands exogènes des récepteurs MOP, DOP et KOP.

Mis à part la morphine, l'héroïne et la méthadone sont les ligands exogènes les plus connus du récepteur MOP. D'ailleurs, à l'instar du fentanyl et de la morphine, la méthadone est aussi utilisée cliniquement. Le DAMGO, un dérivé d'enképhaline est l'agoniste peptidique de synthèse le plus sélectif du récepteur MOP. Le CTOP et la naloxone sont, quant à eux, des antagonistes respectivement spécifique et sélectif du récepteur MOP.

Le DADLE est un agoniste peptidique du récepteur DOP beaucoup plus stable que ses ligands peptidiques endogènes comme la Met-enképhaline. La naltrindone et le ICI174864 sont des antagonistes sélectifs du récepteur DOP.

L'U-50-488 et la nor-binaltorphimine (Nor-BNI) sont respectivement agoniste et antagoniste non peptidiques du récepteur KOP.

Le récepteur NOP possède plusieurs agonistes hexapeptidiques, des agonistes partiels et antagonistes peptidiques mais aussi des agonistes et antagonistes non peptidiques dont certains sont communs avec d'autres récepteurs opioïdes comme le lofentanyl (Zaveri, 2003).

A partir des années 90, le clonage des récepteurs opioïdes puis leur expression hétérologue dans des cellules mammifères ont permis de définir plus précisément leurs propriétés pharmacologiques.

B. Clonage des récepteurs opioïdes

L'expression de la banque d'ADNc de cellules NG108-15 de souris, lignée exprimant une forte densité de récepteur DOP, a permis le clonage de son gène après un screening par des ligands radiomarqués spécifiques (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992). Le récepteur DOP de souris est ainsi le premier récepteur opioïde à avoir été cloné. Ce premier clonage a permis celui d'autres

récepteurs opioïdes. En effet, le récepteur MOP de rat a été cloné par homologie à l'aide d'une sonde d'ADNc de rat correspondant au récepteur DOP de souris (Chen et al., 1993). En cherchant à cloner de nouveaux récepteurs à la somatostatine, Yasuda *et al* ont cloné le gène KOP de souris (Yasuda et al., 1993). Le récepteur NOP a été cloné après amplification PCR d'une banque d'ADNc humains et de souris avec des amorces codant pour des régions conservées du récepteur DOP et de la somatostatine (Mollereau et al., 1994).

Il est à noter que les profils pharmacologiques *in vivo* des récepteurs opioïdes suggèrent que pour chacun d'eux plusieurs sous-types existent. D'ailleurs, plusieurs variants d'épissage du récepteur MOP ont été clonés. Cependant il apparaît que ces variants ne rendent pas compte des différences de profils pharmacologiques observées *in vivo* (Waldhoer et al., 2004). L'hétérodimérisation des récepteurs opioïdes pourrait être une explication alternative.

Le clonage des récepteurs opioïdes a mis en évidence qu'ils appartiennent à la famille des RCPG de la rhodopsine. Les récepteurs opioïdes sont composés d'environ 400 acides aminés à 60 % identiques avec la plus forte homologie au niveau des hélices transmembranaires et des trois boucles intracellulaires et la plus grande diversité pour les extrémités N et C-terminales ainsi que pour les boucles extracellulaires (voir figure 17). Par ailleurs, ces quatre récepteurs possèdent deux résidus cystéines dans la première et deuxième boucle extracellulaire formant probablement un pont disulfure. De même, le motif DRY très conservé dans la famille des RCPG de la rhodopsine est retrouvé chez les quatre récepteurs. Enfin, ceux-ci sont également glycosylés sur plusieurs résidus asparagine au niveau du domaine N-terminal et possèdent des sites de palmitoylation en C-terminal (Law et al., 2000; Waldhoer et al., 2004).

C. Distribution des récepteurs opioïdes dans le système nerveux

Comme indiqué précédemment, l'utilisation de ligands radiomarqués spécifiques a rendu possible dès les années 70 la localisation des récepteurs opioïdes dans le cerveau. Le clonage des récepteurs opioïdes a permis d'affiner leur localisation à l'aide d'anticorps dirigés contre les récepteurs clonés et de la visualisation de leur ARNm par hybridation *in situ*. De façon générale, bien qu'ils co-localisent dans de nombreux tissus, la distribution de chaque récepteur opioïde dans le système nerveux central est spécifique suggérant ainsi pour chacun d'eux des rôles physiologiques à la fois croisés mais aussi différents. L'objectif de ce paragraphe est uniquement de donner un aperçu très général de la distribution des récepteurs opioïdes dans le système nerveux central de rongeurs. Des descriptions plus détaillées ont fait l'objet de revues (Mansour et al., 1995; Meunier, 1997; Satoh et Minami, 1995).

1- Récepteur MOP

La distribution du récepteur MOP montre qu'il est présent dans presque toutes les régions du cerveau avec cependant une préférence pour le télencéphale (noyau accumbens, noyaux latéraux et médians de l'amygdale), le thalamus, le *locus coeruleus*, l'aire tegmentale ventrale (VTA), la substance grise périaqueducale.

Au niveau de la moelle épinière, le récepteur MOP est surtout concentré dans la couche II et plus discrètement dans les couches III, IV et V.

2- Récepteur DOP

Le récepteur DOP est largement distribué dans le striatum dorsal, le noyau accumbens, les couches I, II et IV du cortex cérébral ou encore l'amygdale. En revanche, il est en plus faible quantité dans le thalamus, l'hypothalamus, la substance grise périaqueducale et le *locus coeruleus*. Dans la moelle épinière, le récepteur DOP se retrouve notamment dans les couches II et III.

3- Récepteur KOP

Le récepteur KOP est majoritairement distribué dans le noyau accumbens, le striatum dorsal, l'amygdale, l'hypothalamus, l'aire tegmentale ventrale et dans la couche II de la moelle épinière.

4- Récepteur NOP

Le récepteur NOP est, entre autres, abondant dans les aires corticales et cortico-limbiques, l'hypothalamus ou dans le tronc cérébral et au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière.

Enfin, il est à noter que d'autres tissus tels que les intestins, le cœur, les reins expriment les récepteurs opioïdes au niveau des terminaisons nerveuses (Mollereau et Mouledous, 2000; Pugsley, 2002). Ils sont également retrouvés au niveau de certains globules blancs (Sharp, 2006). Ainsi cette large distribution des récepteurs opioïdes dans le système nerveux central et les tissus périphériques rend compte de l'implication du système opioïde dans de nombreuses fonctions biologiques de l'organisme évoquées au paragraphe III-A-2-a (page 44).

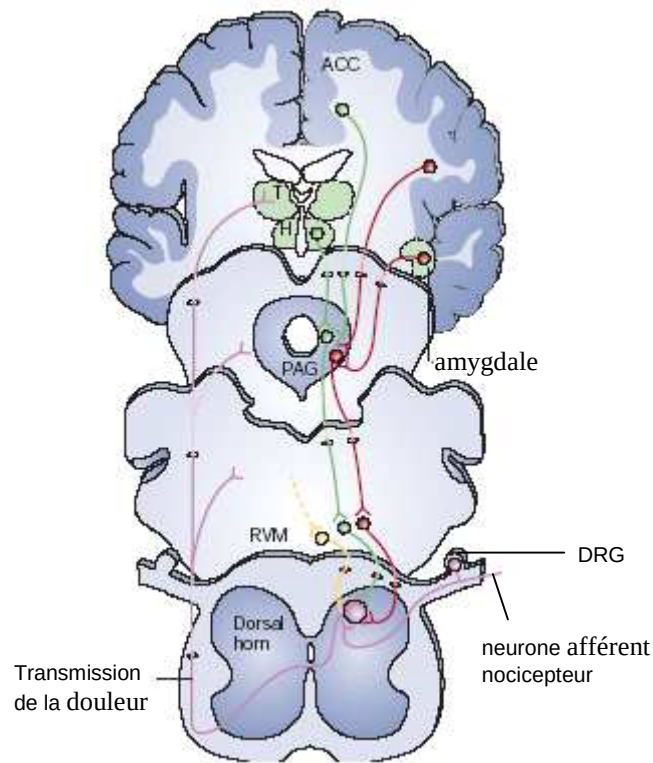


Figure 18 : Le circuit principal de la douleur. Une douleur active un neurone afférent nocicepteur qui transmet l'information à un neurone relais de la corne dorsale de la moelle épinière en libérant des neurotransmetteurs excitateurs. La voie ascendante aboutit au tronc cérébral et au thalamus qui innervent différentes régions du cortex cérébral impliquées dans la sensation douloureuse. La voie descendante passe notamment par la PAG et la RVM. D'après Fields, 2004. ACC (cortex cingulaire antérieur), DRG (ganglion de racine dorsale), H (hypothalamus), PAG (substance grise périaqueducule), RVM (médulla rostroventrale), T (thalamus).

D. Effets d'un traitement aigu à la morphine

L'activation des récepteurs opioïdes conduit à de multiples conséquences d'un point de vue physiologique : analgésie, dépression respiratoire, euphorie, inhibition du transit gastro-intestinal etc. (Waldhoer et al., 2004). Ainsi, même si l'analgésie n'est pas l'unique effet produit par un traitement aux opiacés, ceux-ci et plus particulièrement la morphine sont connus et utilisés cliniquement pour leur capacité à soulager des douleurs sévères chroniques ou aiguës. De ce fait, dans ce chapitre, j'évoquerai uniquement les propriétés analgésiques des opiacés en me focalisant sur les agonistes du récepteur MOP. En effet, bien que l'ensemble des récepteurs opioïdes soient impliqués dans la modulation de la sensation douloureuse, les plus puissants analgésiques agissent en activant le récepteur MOP (Fields, 2004).

1- L'analgésie

a) Le circuit principal de la douleur

Selon l'Association Internationale de l'Etude de la Douleur, « la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel, ou décrite en terme d'un tel dommage ». Cette définition illustre le caractère subjectif de la douleur puisque selon elle la douleur dépend du vécu et de l'état actuel de chaque individu. Cette définition de la douleur évoque aussi son caractère pluridimensionnel puisqu'une douleur psychogène est associée à une douleur réelle. De cette définition découle également le rôle protecteur de la douleur pour l'individu puisqu'elle signale qu'une blessure peut intervenir ou doit être traitée.

La douleur trouve son origine dans la stimulation de différents nocicepteurs correspondant aux extrémités des neurones sensoriels afférents dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions de racine dorsale (DRG) (voir figure 18). L'activité de ces neurones afférents est corrélée à l'intensité du stimulus. Il existe trois grands types de nocicepteurs : thermique, mécanique et « pluripotents », ces derniers sont capables d'identifier plusieurs types de stimuli (Kandel et al., 2000). L'ensemble de ces nocicepteurs sont stimulés à partir d'un certain seuil afin de détecter sélectivement des stimuli potentiellement dommageables pour l'individu.

Les neurones sensoriels afférents qui transmettent l'influx nociceptif (fibres A δ , A β et C) aboutissent majoritairement au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière où ils libèrent en particulier du glutamate et des neuropeptides (ex : substance P). Ces neurotransmetteurs vont alors activer des neurones relais qui vont à leur tour transmettre l'information nociceptive à travers cinq voies ascendantes possibles notamment les voies spinothalamique, spinoréticulaire et spinomesencéphalique (Kandel et al., 2000). Ainsi par l'intermédiaire d'interneurones,

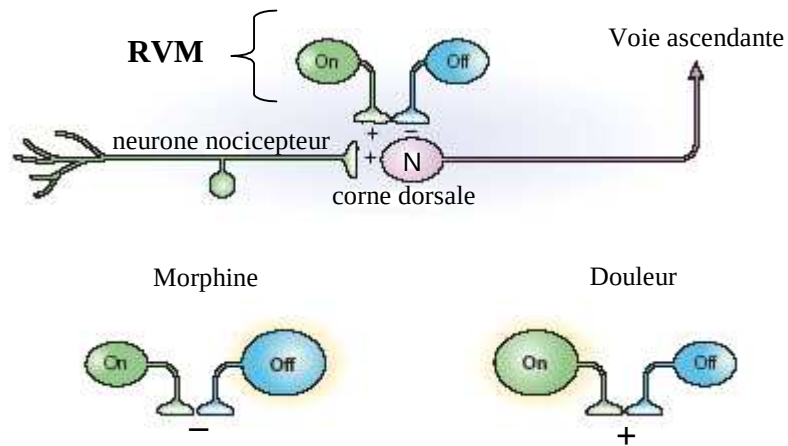


Figure 19 : Schématisation de l'implication des cellules *on* / *off* dans le circuit de la douleur. Les cellules *on* / *off* de la RVM respectivement activent (+) et inhibent (-) la transmission du message douloureux au niveau de la corne dorsale. Un traitement à la morphine conduit à une désinhibition des cellules *off* et une inhibition des cellules *on* et donc contribue à diminuer l'intensité douloureuse. D'après Fields, 2004. N (neurone relais de la corne dorsale), RVM (médulla rostroventrale).

l'information nociceptive remonte au niveau supraspinal jusqu'au thalamus lui-même en relation avec le cortex cérébral.

Il existe aussi des voies descendantes de contrôle de la douleur. La mieux caractérisée passe par la substance grise périaqueducale (ou PAG) innervée par l'hypothalamus, le cortex ou encore l'amygdale. La PAG est à son tour capable de moduler la nociception par des connexions avec la médulla rostroventrale (RVM) qui innerve la corne dorsale de la moelle épinière bouclant ainsi le circuit (Nestler et al., 2001b).

b) L'analgésie induite par la morphine

Le récepteur MOP est présent dans tous les centres impliqués dans la modulation du signal nociceptif : la corne dorsale, le cortex, l'amygdale, l'hypothalamus, la PAG ou encore la RVM (Fields, 2004). De façon générale, la morphine induit l'analgésie à travers l'inhibition pré / postsynaptique des neurones impliqués dans la transmission de l'influx nerveux aussi bien au niveau spinal que supraspinal. L'inhibition présynaptique consiste en particulier à diminuer la libération de neurotransmetteurs comme le glutamate ou la substance P tandis que l'inhibition postsynaptique consiste à élever le seuil d'excitabilité d'un neurone.

Au niveau spinal, la morphine est capable d'inhiber la transmission de la douleur à travers l'inhibition des neurones sensoriels afférents et des neurones relais de la corne dorsale (Fields, 2004).

Au niveau supraspinal, la morphine agit notamment en inhibant les neurones de la PAG et de la RVM (voir figure 18). Ainsi, le sectionnement des axones de la RVM qui projettent vers la corne dorsale réduit le pouvoir analgésique de la morphine (Fields, 2004). Plus précisément, la RVM possède notamment deux populations de neurones exerçant une modulation bidirectionnelle de la nociception en innervant directement la corne dorsale : les cellules **on** et **off** qui respectivement activent et inhibent la transmission du message nociceptif au niveau de la corne dorsale (voir figure 19). Des doses analgésiques de morphine induisent l'inhibition des cellules **on** parallèlement à la désinhibition des cellules **off** (Fields, 2004).

Ainsi, la morphine et plus généralement les agonistes du récepteur MOP exercent leur pouvoir analgésique en agissant sur différents points du circuit de la douleur aussi bien au niveau de la voie ascendante (ex : neurones relais) que de la voie descendante (ex : cellules **on** / **off**). L'effet analgésique des agonistes du récepteur MOP peut aussi être appréhendé au niveau cellulaire en se penchant par exemple sur le mécanisme d'inhibition pré / postsynaptique des neurones par la morphine.

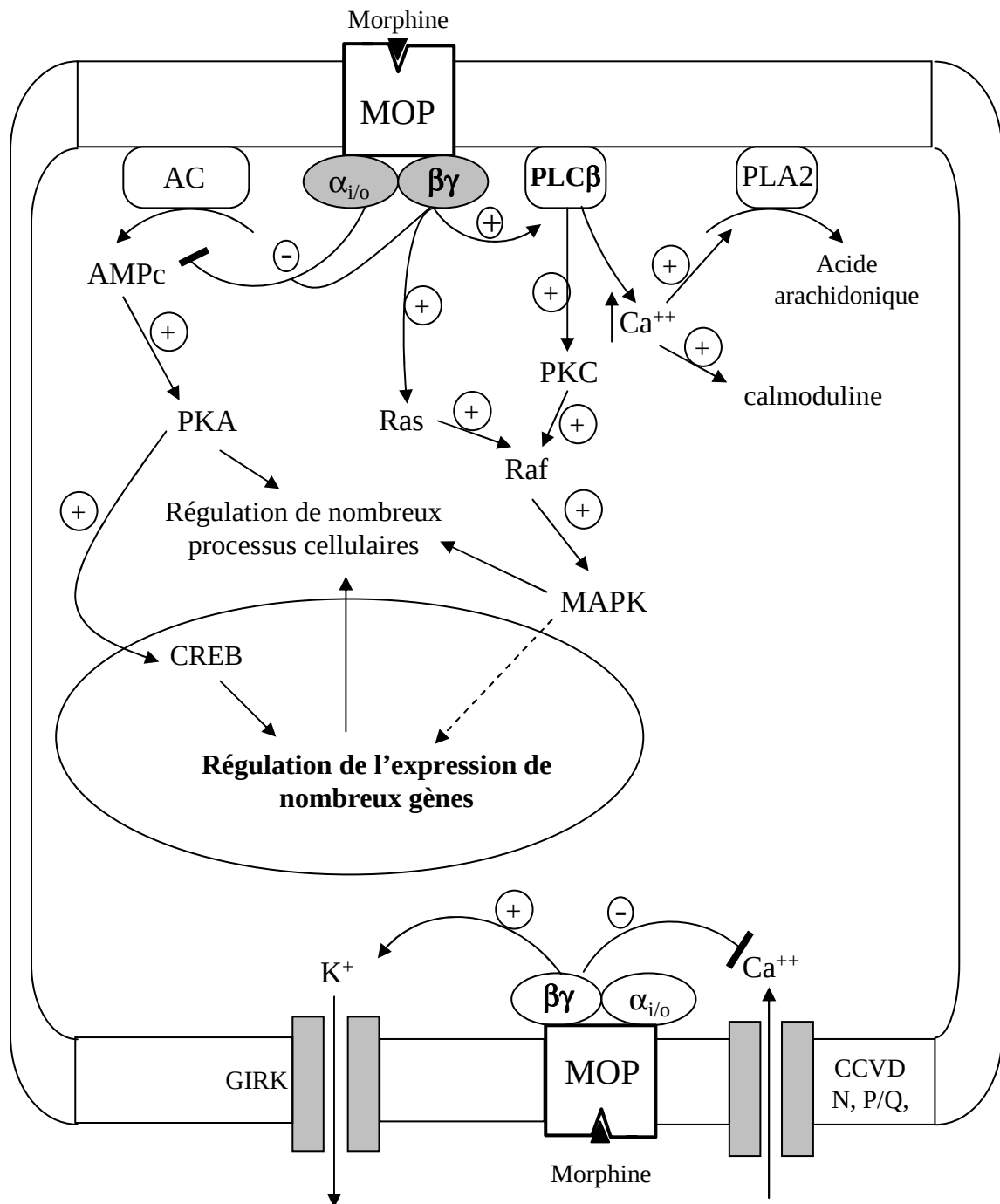


Figure 20 : Principales voies de signalisation modulées par le récepteur MOP dans les cellules eucaryotes. AC (adénylyl cyclase), CCVD (canaux calciques voltage-dépendants), CREB (cAMP responsive element binding protein), GIRK (G protein-activated inward by rectifying potassium channels), MAPK (mitogen-activated protein kinases), PLA2 (phospholipase A2), PLC (phospholipase C), PKA (protéine kinase A), PKC (protéine kinase C).

2- Effets cellulaires d'un traitement à la morphine

Les récepteurs opioïdes sont couplés majoritairement aux protéines G hétérotrimériques de type $G_{i/o}$ bien que des travaux montrant leur couplage aux protéines de type G_s (Chakrabarti et al., 2005a; Szucs et al., 2004) et G_z (Garzon et al., 1998) ont été publiés. Par conséquent, la régulation des effecteurs cellulaires suite à un traitement aux opiacés est efficacement bloquée par la toxine pertussique qui inhibe l'activation des protéines $G_{i/o}$ en ADP-ribosylant spécifiquement leurs sous-unités $G\alpha$ (Law et al., 2000).

Comme pour de nombreux RCPG, l'activation des récepteurs opioïdes conduit à la modulation de la concentration intracellulaire de seconds messagers tels que l'AMPc et le calcium. Les principaux effecteurs des récepteurs opioïdes sont l'AC, les canaux potassiques et calciques et la voie des MAP kinases (voir figure 20 et tableau 1).

a) Inhibition de l'adénylyl cyclase

Les récepteurs opioïdes sont majoritairement négativement couplés à l'AC faisant ainsi diminuer le taux intracellulaire d'AMPc. En effet, la liaison d'un opioïde sur son récepteur conduit à l'activation des sous-unités $G\alpha_{i/o}$ et $G\beta\gamma$ toutes deux capables d'inhiber plusieurs isoformes de l'AC (Patel et al., 2001; Sunahara et Taussig, 2002).

Au niveau cellulaire, la diminution de l'AMPc conduit à l'inhibition d'un courant entrant de cations dépendant du voltage appelé I_h (Williams et al., 2001). Ce courant contribue à l'établissement du potentiel membranaire de repos et à l'activité électrique spontanée de neurones ou de cellules cardiaques. Ainsi, l'inhibition de la conductance I_h réduit l'excitabilité électrique des neurones et pourrait être impliquée dans le pouvoir analgésique des opiacés (Ingram et Williams, 1994).

Une deuxième conséquence de l'inhibition de l'AC est probablement une diminution de la libération de neurotransmetteurs normalement stimulée par l'AMPc *via* la PKA (Protein Kinase AMPc dépendante) (Bonci et Williams, 1997; Williams et al., 2001).

Enfin plus généralement, la diminution du taux intracellulaire d'AMPc s'accompagne d'une baisse de l'activité de la PKA ce qui module l'état de phosphorylation et donc l'activité de nombreuses cibles protéiques dont certaines restent à caractériser.

Il est à noter qu'une augmentation de l'activité de l'AC a été révélée dans certains tissus comme le bulbe olfactif après un traitement opioïde (Law et al., 2000). Ce phénomène peut s'expliquer par un couplage préférentiel des récepteurs avec la protéine G_s ou encore par l'expression dans ces tissus d'un pool d'AC (isoformes 2 et 7) stimuable par $G\beta\gamma$.

b) Régulation calcique

Tout comme l'AMPc, le calcium est un second messenger des neurones dont le taux intracellulaire peut être régulé par les opioïdes.

i) *Inhibition des canaux calciques*

L'activation des récepteurs opioïdes réduit les courants calciques en inhibant, *via* la sous-unité G $\beta\gamma$, l'activité des canaux dépendants du voltage en particulier de types N et P/Q (Law et al., 2000). L'augmentation du taux intracellulaire de calcium est indispensable à l'exocytose des vésicules synaptiques (Sudhof, 2004). En effet, au niveau de la zone active présynaptique l'association des synaptotagmines 1 ou 2 avec des protéines du complexe SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) induit la formation d'un intermédiaire de fusion entre une vésicule d'exocytose et la membrane plasmique. Un flux entrant de calcium déstabilise cet intermédiaire, après complexation du calcium à la synaptotagmine 1 ou 2, ce qui conduit à la libération du contenu vésiculaire (Sudhof, 2004). Par conséquent, une inhibition de l'entrée de calcium au niveau de la zone active conduit à une diminution de la libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique. D'un point de vue physiologique, la conséquence est encore une fois une réduction de l'efficacité de la transmission synaptique de l'influx nerveux.

ii) *Mobilisation du calcium intracellulaire*

Un traitement opioïde est capable de stimuler la voie de signalisation de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) suite à l'activation de la phospholipase C β par la sous-unité G $\beta\gamma$. Cette voie de transduction conduit, entre autres, à la mobilisation de stocks intracellulaires de calcium dans la cellule (Law et al., 2000; Williams et al., 2001). Le calcium possède à son tour des cibles protéiques comme la calmoduline ou la phospholipase A2 (Landry et al., 2006). De plus, de façon similaire à l'AMPc pour les PKA, le calcium et le DAG modulent l'activité des PKC (Protein Kinase Calcium dependent) qui régulent à leur tour, par l'intermédiaire de phosphorylations, l'activité de leurs protéines cibles.

Comme nous venons de le voir, l'administration d'opiacés est capable de réguler en particulier des voies majeures de la transduction du signal : la voie de l'AMPc et les voies dépendantes du calcium. Ainsi, l'activation des récepteurs opioïdes influence les taux intracellulaires de deux seconds messagers cellulaires, l'AMPc et le calcium, qui à leur tour modulent respectivement l'activité des kinases PKA et PKC. Il s'ensuit un contrôle au niveau de la

phosphorylation d'un large panel de protéines et de leur activité. On comprend dès lors la complexité et la variété des modifications cellulaires induites par les opioïdes.

c) Activation de la conductance potassique

Au niveau postsynaptique, les opiacés induisent une augmentation du flux potassique vers l'extérieur de la cellule en activant différents canaux potassiques (Law et al., 2000; Williams et al., 2001). Cela se traduit par l'hyperpolarisation de la membrane plasmique réduisant l'excitabilité des neurones. Parmi ces canaux potassiques, les GIRK stimulés par $G\beta\gamma$ sont certainement les plus importants d'un point de vue physiologique puisque le pouvoir analgésique des opiacés est réduit chez des souris knock-out pour GIRK2 (Ikeda et al., 2002).

d) Activation de la voie des MAP Kinases

La voie des MAP kinases est encore une autre voie de signalisation activée par les opioïdes à travers la sous-unité $G\beta\gamma$ (Law et al., 2000; Williams et al., 2001). Celle-ci est capable d'activer la petite protéine G Ras qui à son tour active la protéine Raf conduisant à l'activation des MAP kinases (Qi et Elion, 2005). Au niveau cellulaire, les MAP kinases sont impliquées dans des processus très divers allant de la prolifération à l'apoptose cellulaire en passant par la morphologie cellulaire ou encore l'expression de gènes (Qi et Elion, 2005). D'un point de vue neurologique, les MAP kinases sont impliquées dans la plasticité synaptique (Sweatt, 2004). La cascade des MAP kinases conduit à la phosphorylation de facteurs de transcription, de protéines du cytosquelette, du métabolisme etc. (Qi et Elion, 2005). Ainsi, le réseau complexe de signalisation des MAP kinases offre, encore une fois, au système opioïde de nombreuses opportunités pour réguler tout un panel fonctions cellulaires.

La transduction du signal opioïde apparaît donc comme un phénomène complexe. Cette complexité franchit un degré supérieur lors d'un traitement chronique puisque l'organisme va chercher à s'adapter à la prise d'opiacés. Au niveau cellulaire cela va se traduire par des adaptations des voies de signalisation afin de contrecarrer l'effet aigu de la drogue. L'adaptation cellulaire la mieux caractérisée est la sensibilisation de la voie de l'AMPC, phénomène impliqué notamment dans la dépendance mais aussi dans la tolérance à la morphine (Maldonado et al., 1996; Nestler, 2004; Waldhoer et al., 2004).

E. La tolérance et la dépendance aux opiacés

Même si la morphine reste un analgésique de choix pour traiter les douleurs sévères, une limitation majeure de son utilisation à long terme est le développement des phénomènes de tolérance et de dépendance. La tolérance et la dépendance résultent d'une adaptation de l'organisme à la prise de drogue. Par exemple, le corps s'oppose à une action prolongée de l'opiacé en diminuant sa capacité à y répondre : c'est le phénomène de tolérance (Meunier, 1992). Le degré de la tolérance varie en fonction de l'opiacé administré (Bailey et Connor, 2005) et ne se développe pas pour tous les effets physiologiques des opiacés. Elle apparaît pour l'analgésie d'où la nécessité d'augmenter les doses pour obtenir la même efficacité contre la douleur, pour la dépression respiratoire mais pas pour le miosis et la constipation (Magistretti, 1992).

La dépendance à la morphine a deux composantes : la **dépendance physique** et l'**addiction**. La dépendance physique se manifeste lorsque la prise de drogue est interrompue ou lors de l'administration d'un antagoniste. L'organisme exprime alors un état de dépendance physique par un syndrome d'excitation caractéristique : le syndrome de sevrage ou de manque dont les principaux symptômes (tremblements, vomissements, diarrhées, agitation, irritabilité) (Meunier, 1992) sont globalement opposés aux effets aigus inhibiteurs des opiacés. La dépendance physique est donc un état latent et réversible qui résulte des changements adaptatifs de l'organisme développés au cours de l'administration prolongée de la drogue (Meunier, 1992).

L'addiction (ou dépendance psychique) est un état persistant correspondant à un besoin impérieux de se procurer de la drogue et à sa consommation compulsive malgré les conséquences néfastes qui s'en suivent (Hyman et al., 2006). Même s'il existe parfois une confusion entre l'addiction et la dépendance physique, ces deux pathologies sont bien distinctes. L'une des meilleures illustrations est probablement l'usage de cocaïne qui induit chez ses consommateurs une puissante addiction sans provoquer de véritable syndrome de sevrage (Nestler, 2004). De plus, des héroïnomanes ou morphinomanes ne présentant plus de syndrome de manque restent cependant exposés à un fort risque de rechute sur des périodes de plusieurs années (Nestler, 2001a; Waldhoer et al., 2004). Pour rendre compte de sa persistance, l'addiction doit donc résulter de changements moléculaires, cellulaires voire anatomiques extrêmement stables (Nestler, 2001a).

Comme nous le verrons dans les prochains chapitres, la dépendance physique implique essentiellement la voie noradrénergique et notamment le *locus coeruleus* (Lane-Ladd et al., 1997; Maldonado, 1997; Meunier, 1992; Nestler et Aghajanian, 1997) tandis que l'addiction implique principalement la voie dopaminergique mésocorticolimbique (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005).

La tolérance et la dépendance physique partagent probablement des mécanismes moléculaires communs puisque la sévérité du sevrage et l'intensité de la tolérance corrèlent bien *in*

vivo (Way et al., 1969). Aussi, l'acquisition de la dépendance physique et la tolérance est atténuée en présence d'un antagoniste du récepteur NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) au glutamate, récepteur impliqué dans la plasticité synaptique (Trujillo, 2000; Trujillo et Akil, 1991). L'un des mécanismes moléculaires communs pourrait bien être la sensibilisation de l'AC qui contribue à l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs au niveau synaptique (Nestler et Aghajanian, 1997; Williams et al., 2001). Malgré ces probables similitudes, la tolérance et la dépendance physique peuvent être découplées comme par exemple chez les souris knock-out pour la β -arrestine 2 (Bohn et al., 1999) suggérant qu'ils engagent des circuits neuronaux et / ou des mécanismes moléculaires différents.

Dans tous les cas, le premier événement moléculaire impliqué dans ces effets à longs termes de la morphine est sa liaison sur son récepteur. En effet, des souris knock-out pour le récepteur MOP ne développent ni analgésie ni dépendance à la morphine (Matthes et al., 1996).

F. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la tolérance aux opiacés

Comme indiqué dans le paragraphe III-D (page 48), l'analgésie engendrée par la morphine résulte notamment de l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs de la douleur et de la diminution de l'excitabilité des neurones appartenant au circuit de la douleur. La tolérance à la morphine serait due non seulement à une augmentation compensatrice de l'activité excitatrice de neurones du circuit de la douleur chroniquement inhibés par la drogue mais également à une perte du pouvoir inhibiteur de la drogue (Varga et al., 2003). Ce dernier phénomène correspondrait en particulier à des adaptations moléculaires au niveau du récepteur MOP : désensibilisation, internalisation et downrégulation (Bailey et Connor, 2005; Waldhoer et al., 2004). Dans les prochains chapitres je m'intéresserai majoritairement au récepteur à la morphine.

1- Adaptations au niveau du récepteur

a) Désensibilisation du récepteur : découplage du récepteur avec les protéines G

Un découplage du récepteur avec ses protéines G diminuerait l'efficacité de la transmission du signal du récepteur vers les effecteurs réduisant ainsi la capacité inhibitrice de la morphine sur l'activité neuronale (Nestler, 1997).

La désensibilisation du récepteur MOP n'affecte pas toutes les régions du cerveau. Cependant, les régions présentant une désensibilisation concernent celles du cerveau impliquées dans la nociception (Sim-Selley et al., 2000; Waldhoer et al., 2004).

La phosphorylation des récepteurs opioïdes par les GRK puis leur séquestration par les arrestines est l'une des voies de découplage la mieux caractérisée (voir figure 16 paragraphe II-E-1

page 32) (Bailey et Connor, 2005). Cette voie a d'ailleurs été impliquée dans la tolérance à la morphine puisque chez des souris knock-out pour la β -arrestine 2, le pouvoir analgésique de la morphine est augmenté et la tolérance diminuée (Bohn et al., 2000). Malgré tout, un lien direct entre la désensibilisation du récepteur MOP et la tolérance reste à définir puisque d'autres RCPG peuvent être séquestrés par la voie dépendante de l'arrestine.

D'autres mécanismes peuvent expliquer un découplage du récepteur MOP : la diminution du nombre de protéines Gi (Meunier, 1992) ou encore leur séquestration par des protéines RGS (Garzon et al., 2005). Dans ce dernier cas, le travail de Garzon *et al* montre que dans la PAG, la protéine RGS9-2 diminue l'efficacité de couplage du récepteur MOP avec les protéines $G\alpha_{i/o}$ en les séquestrant une fois activées. Ce résultat est cohérent avec le knock-out de RGS9-2 chez des souris puisque chez elles le pouvoir analgésique de la morphine augmente tandis que le phénomène de tolérance diminue (Zachariou et al., 2003). Cependant il reste difficile à montrer, tout comme chez les souris knock-out pour la β -arrestine 2, que la diminution de la tolérance observée n'est pas due en réalité au plus fort pouvoir analgésique de la drogue observé chez ces animaux transgéniques (Waldhoer et al., 2004).

b) Internalisation du récepteur

Les RCPG et plus particulièrement les récepteurs opioïdes peuvent être internalisés par une voie dépendante de l'arrestine et de la clathrine (voir paragraphe II-E-1 page 32). Ainsi a-t-il été d'abord suggéré que l'internalisation du récepteur MOP pouvait conduire à la diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire et ainsi conduire à une diminution de l'efficacité d'un traitement morphinique. Cependant, il est apparu que la morphine n'induit en général pas d'internalisation du récepteur MOP *in cellulo* (Waldhoer et al., 2004). Or, chez l'animal la morphine induit une tolérance à l'analgésie supérieure à d'autres agonistes du récepteur MOP et ce pour des doses équivalents (Bailey et Connor, 2005). Afin d'expliquer cette contradiction, la faculté de la morphine à induire le phénomène de tolérance a alors été attribuée à sa faible capacité à déclencher l'internalisation du récepteur MOP dans des modèles cellulaires contrairement à d'autres ligands comme le DAMGO ou la méthadone (Bailey et Connor, 2005). Ainsi, selon la théorie RAVE (Relative Activity Versus Endocytosis) l'endocytose du récepteur induite par un ligand aurait un rôle protecteur contre le développement de la tolérance (Waldhoer et al., 2004; Whistler et al., 1999). Deux hypothèses, pouvant apparaître à la fois complémentaires (Whistler et al., 1999) et contradictoires (Bailey et Connor, 2005), soutiennent cette théorie. La première considère que l'absence d'endocytose du récepteur empêche son recyclage et sa resensibilisation à la membrane. Le récepteur resterait par exemple séquestré et désensibilisé à la membrane par la

voie GRK / arrestine (voir figure 16). La seconde suggère que le signal généré par la morphine se propage de façon disproportionnée à l'intérieur de la cellule puisque le récepteur reste à la membrane. La tolérance résulterait alors d'une adaptation rendue nécessaire par l'activation continue du récepteur MOP (Finn et Whistler, 2001; Whistler et al., 1999).

Cependant, ces hypothèses reposent principalement sur des observations effectuées sur des modèles cellulaires. *In vivo*, le trafic cellulaire du récepteur MOP est plus complexe. Ainsi, il a été montré que la morphine est capable d'induire l'endocytose du récepteur MOP de façon dépendante de l'arrestine dans des cultures primaires de neurones du noyau accumbens (Haberstock-Debic et al., 2005) ou encore sa redistribution au niveau des dendrites des neurones du noyau accumbens (Haberstock-Debic et al., 2005).

c) Downrégulation des récepteurs

La downrégulation des récepteurs opioïdes correspond à la diminution du nombre de ces récepteurs. Ainsi, la diminution des cibles de la morphine conduirait à réduire son influence au niveau cellulaire (Waldhoer et al., 2004). La diminution du nombre de récepteurs opioïdes à la surface cellulaire peut être due à une baisse de la transcription / traduction du récepteur (Nestler, 1997) ou à son internalisation suivie de sa dégradation par la voie lysosomale (Marie et al., 2003) ou du protéasome (Chaturvedi et al., 2001).

Cependant, bien que la downrégulation du récepteur MOP ait été mise en évidence dans plusieurs modèles cellulaires, *in vivo* elle n'est que rarement observée (Harrison et al., 1998). Ainsi, la downrégulation du récepteur MOP suite à un traitement chronique par la drogue, n'est probablement pas un événement déterminant dans l'acquisition de la tolérance à la morphine.

Dans tous les cas, la désensibilisation, l'internalisation et la downrégulation du récepteur à la morphine ne permet pas par exemple d'intégrer le rôle du récepteur NMDA au glutamate (Trujillo et Akil, 1991) dans l'acquisition de la tolérance ou encore le fait que l'administration de très faibles doses d'antagonistes est capable d'empêcher le développement de cet effet secondaire (Crain et Shen, 1995; Wang et al., 2005b). Ainsi, la tolérance aux opiacés ne résulte pas uniquement d'une diminution de leur pouvoir inhibiteur sur l'activité neuronale. Des effets compensatoires excitateurs sont aussi à l'origine de l'apparition de la tolérance.

2- Exemples d'effets compensatoires excitateurs

a) Couplage du récepteur MOP avec la protéine Gs

Tout comme d'autres analgésiques la morphine est capable d'exercer sur les neurones des ganglions dorsaux un double effet à la fois inhibiteur (comme nous l'avons précédemment vu) et excitateur (Crain et Shen, 1996). Cet effet excitateur est absent lorsque la morphine est administrée en présence d'une dose picomolaire d'antagoniste (Crain et Shen, 1995). Encore plus intéressant, un tel co-traitement augmente le pouvoir analgésique de la morphine et empêche l'apparition du phénomène de tolérance. Wang *et al* ont montré par co-immunoprécipitation qu'un traitement chronique à la morphine augmente le couplage du récepteur MOP avec la protéine G_s dans la moelle épinière de rats (Wang et al., 2005b). Ce transfert de couplage de la protéine G_{i/o} vers G_s n'est plus observé lors d'un co-traitement morphine / très faible dose de naloxone. De ce fait, si l'on considère que l'antagoniste à très faible dose cible sélectivement les récepteurs MOP couplés à G_s (Waldhoer et al., 2004), il est possible de proposer que le pouvoir excitateur de la morphine est dû au couplage partiel du récepteur MOP avec la protéine G_s. Ce pouvoir excitateur serait dans un premier temps « noyé » par la prépondérance du pouvoir inhibiteur de la morphine puis se révélerait au fur et à mesure que la durée du traitement s'allonge contribuant par conséquent au phénomène de tolérance.

b) Sensibilisation de la voie de l'AMPC

La sensibilisation de la voie de l'AMPC permet de compenser l'inhibition chronique de l'AC par la morphine avec comme conséquence le retour à un niveau contrôle, voire l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPC.

La sensibilisation de la voie AMPC est l'adaptation à un traitement chronique à la morphine la mieux caractérisée (Nestler et Aghajanian, 1997). En effet, elle a été décrite dans de nombreuses régions du cerveau comme le *locus coeruleus*, le noyau accumbens, l'amygdale, la VTA mais aussi dans la corne dorsale de la moelle épinière (Nestler, 2001a; Waldhoer et al., 2004) et est directement impliquée dans le phénomène de dépendance physique à la morphine (Lane-Ladd et al., 1997; Meunier, 1992; Nestler et Aghajanian, 1997).

La sensibilisation de la voie AMPC est aussi impliquée dans l'acquisition de la tolérance (Nestler, 2001a). En effet, elle est capable de potentialiser la libération de neurotransmetteurs (Bonci et Williams, 1997), en particulier au cours d'un traitement chronique à la morphine dans des régions du cerveau impliquées dans le circuit douloureux comme la RVM (Bie et Pan, 2005).

Il est à noter que l'expression de nombreux gènes est sous la dépendance de la voie de l'AMPC en particulier suite à l'activation des PKA dont l'une des cibles est le facteur de

transcription CREB (cAMP Response Element Binding Protein) (McClung et Nestler, 2003). Il est donc possible que la sensibilisation de la voie de l'AMPC, *via* la protéine CREB, contribue à la plasticité synaptique, phénomène impliqué dans la tolérance aux opiacés (Bailey et Connor, 2005; Trujillo, 2000; Zachariou et al., 2003).

3- Implication des systèmes anti-opioïdes dans le phénomène de tolérance

Certains peptides endogènes sont connus pour réduire les effets physiologiques des opioïdes. Ces systèmes appelés anti-opioïdes comprennent en particulier, la cholécystokinine (ou CCK), le neuropeptide FF (NPFF) et plus paradoxalement aussi la nociceptine (Mollereau et al., 2005). Toujours de façon paradoxale, plusieurs peptides anti-opioïdes sont doués à la fois d'un potentiel analgésique et anti-analgésique en particulier en fonction du site d'administration (Harrison et al., 1998). La nociceptine est par exemple capable d'inhiber les cellules *off* de la RVM provoquant ainsi un effet pronociceptif supraspinal et d'inhiber les cellules relais de la moelle épinière provoquant cette fois une analgésie spinale. Une augmentation d'activité des systèmes anti-opioïdes lors d'un traitement chronique à la morphine pourrait représenter un effet compensatoire impliqué dans le phénomène de tolérance. Ainsi, il a été montré qu'un traitement chronique à la morphine élève le niveau de NPFF dans le fluide cébrospinal et des anticorps dirigés contre NPFF sont capables de restaurer le pouvoir analgésique de la morphine chez des rats devenus tolérants à la drogue (Harrison et al., 1998).

Aujourd'hui, de nombreuses adaptations moléculaires suite à une activation chronique du récepteur MOP sont connues et corrélées à l'apparition de la tolérance. Même si elles n'apparaissent pas toujours avoir de liens entre elles, elles semblent toutes converger vers une adaptation du circuit neuronal de la douleur à son inhibition chronique par l'analgésique. Par ailleurs, une inhibition de l'acquisition de la tolérance peut s'accompagner d'une diminution de l'intensité de la dépendance (Crain et Shen, 1995; Trujillo et Akil, 1991; Zachariou et al., 2003), suggérant ainsi des mécanismes moléculaires en partie communs. Cependant, les symptômes, les réseaux neuronaux, les adaptations impliquées dans le phénomène de tolérance ne permettent pas d'expliquer par exemple l'état de manque ou les propriétés addictives des drogues. Les prochains chapitres chercheront à éclaircir ces deux points.

G. Circuits neuronaux impliqués dans la dépendance à la morphine

La dépendance à la morphine et, plus généralement, aux drogues résulte de l'adaptation de plusieurs régions du cerveau exposées de façon répétée à la drogue. L'ensemble de ces adaptations

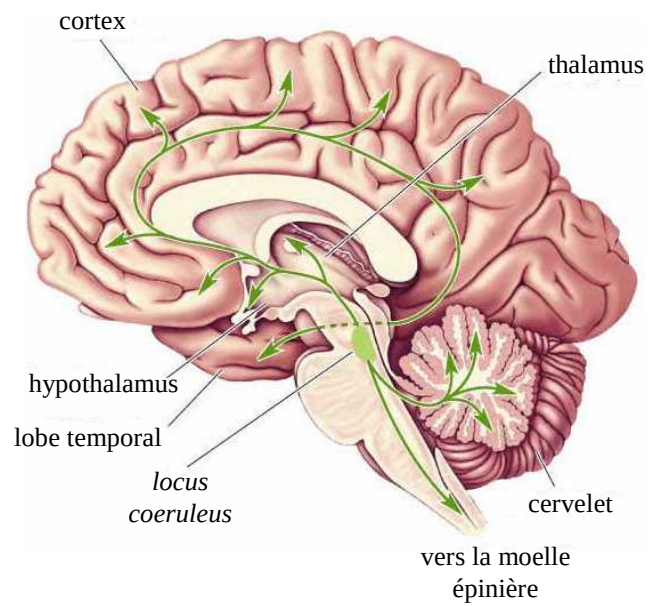


Figure 21: Projections noradrénergiques du *locus coeruleus*. Le *locus coeruleus*, situé dans le tronc cérébral, est le principal noyau noradrénergique du cerveau. Ces neurones projettent vers de nombreuses régions du cerveau, certaines sont indiquées sur cette figure.

conduit à des manifestations et des comportements pathologiques tels que le syndrome de sevrage ou la consommation et la recherche compulsives de drogue, symptômes caractéristiques de l'état de dépendance (Nestler et Aghajanian, 1997). L'identification des régions du cerveau engagées dans la mise en place de ces symptômes est une nécessité pour la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires liés à la dépendance aux drogues. C'est ainsi que la voie noradrénergique et plus particulièrement son noyau principal, le *locus coeruleus*, est le circuit majeur responsable de la dépendance physique révélée lors du syndrome de sevrage (Lane-Ladd et al., 1997; Maldonado, 1997; Meunier, 1992; Nestler et Aghajanian, 1997). L'addiction, quant à elle, implique notamment la voie dopaminergique mésocorticolimbique qui inclut en particulier la VTA, le noyau accumbens, l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005).

1- La voie noradrénergique et la dépendance physique à la morphine

Afin de clarifier la suite de l'exposé, il est à noter que l'intensité de la dépendance physique induite par la morphine (ou une autre drogue) est classiquement mesurée à travers l'intensité de plusieurs symptômes révélés chez l'animal après un sevrage spontané ou induit par un antagoniste. Ces symptômes sont en particulier : fréquence des sauts, tremblements du corps et des pattes, reniflements ou encore diarrhées et perte de poids (Maldonado et al., 1996; Punch et al., 1997).

a) Implication de la noradrénaline dans la dépendance physique à la morphine

La noradrénaline ou norépinéphrine est à la fois une hormone et un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines tout comme la dopamine. La première indication de l'implication de la voie noradrénergique dans la dépendance provient des travaux de Vogt qui a observé une diminution du taux de noradrénaline dans le cerveau de chats chez lesquels une forte dose de morphine avait été administrée (Vogt, 1954). Plus tard, des études ont révélé qu'une administration aiguë de morphine conduit à une diminution du taux d'adrénaline dans plusieurs régions du cerveau. Ce taux tend à retourner vers la normale suite à un traitement chronique suggérant un phénomène d'adaptation (Maldonado, 1997).

Autre indication, l'administration de clonidine qui diminue la libération présynaptique de noradrénaline atténue le syndrome de sevrage (Meunier, 1992). Encore plus explicite, un syndrome de sevrage précipité par la naloxone induit dans le cortex préfrontal une augmentation rapide de la concentration extracellulaire en noradrénaline pour atteindre un pic après 30 minutes tout en restant élevée durant 90 minutes. Cette cinétique se superpose avec l'intensité des symptômes du sevrage suggérant que ces derniers sont déclenchés par une neurosécrétion accrue de noradrénaline (Rossetti

et al., 1993). Ainsi ces travaux suggèrent que le *locus coeruleus*, la source majeure d'innervation noradrénergique du cerveau, est impliqué dans l'apparition des signes somatiques du sevrage.

b) Le *locus coeruleus* joue un rôle majeur dans l'expression des signes somatiques du sevrage

Le *locus coeruleus* est un petit noyau du tronc cérébral composé d'environ 12 500 neurones chez les humains (Nestler et al., 2001b). Il correspond à plus de la moitié des neurones noradrénergiques du cerveau (Nestler et al., 1999). Malgré sa petite taille les neurones du *locus coeruleus* possèdent de nombreuses projections vers l'ensemble du système nerveux central : cortex cérébral, hippocampe, hypothalamus, cervelet, moelle épinière etc. (voir figure 21) (Nestler et al., 1999; Rasmussen, 1995). De façon générale le *locus coeruleus* est connu pour jouer un rôle, entre autres, dans la régulation de l'attention, de la vigilance et dans l'activité du système nerveux autonome (Nestler et Aghajanian, 1997; Nestler et al., 1999). Enfin, il est important de noter que le *locus coeruleus* exprime une forte densité de récepteurs MOP (Mansour et al., 1987; Rasmussen, 1995).

Plusieurs travaux suggèrent un rôle prépondérant du *locus coeruleus* dans les effets de la morphine. Un traitement aigu par cet opiacé diminue l'activité neuronale du *locus coeruleus*. Cette activité retourne à la normale après un traitement chronique reflétant une tolérance à la drogue (Maldonado, 1997). Cependant lors du sevrage d'un rat rendu dépendant à la morphine, une hyperactivité des neurones du *locus coeruleus* est observée avec une augmentation de la libération de noradrénaline au niveau des zones innervées par le *locus coeruleus* (Rasmussen, 1995). Aussi, la région du cerveau la plus sensible pour l'induction d'un syndrome de sevrage après une injection locale d'un antagoniste chez des rats dépendants à la morphine est le *locus coeruleus* (Maldonado et al., 1992). Enfin, la diminution et l'augmentation spécifique de l'activité neuronale du *locus coeruleus* respectivement atténue et aggrave l'intensité de plusieurs signes du sevrage (Han et al., 2006).

Malgré tout, le rôle précis du *locus coeruleus* dans la dépendance aux opiacés reste encore débattu (Christie et al., 1997; Delfs et al., 2000). L'activité du *locus coeruleus* est contrôlée par des projections afférentes libérant des neurotransmetteurs excitateurs (Christie et al., 1997; Meunier, 1992; Rasmussen, 1995). Ainsi, le *locus coeruleus* ne pourrait être qu'un relais du circuit neuronal impliqué dans la révélation du sevrage. Aussi, l'injection localisée d'antagonistes dans des régions voisines du cerveau comme la PAG déclenche également un intense syndrome de sevrage (Maldonado et al., 1992). Enfin, tous les signes caractéristiques du sevrage ne sont pas atténués par l'inhibition de l'activité électrique du *locus coeruleus* (Han et al., 2006; Lane-Ladd et al., 1997).

c) Les autres régions de contrôle potentiel du sevrage

L'hyperactivité du *locus coeruleus* observée lors du sevrage pourrait être la conséquence de sa stimulation par des neurones afférents libérant des acides aminés excitateurs (Maldonado, 1997; Meunier, 1992). D'ailleurs, la libération de glutamate et d'aspartate au niveau du *locus coeruleus* augmente lors du sevrage (Rasmussen, 1995). De plus, l'injection d'antagonistes des récepteurs aux acides aminés excitateurs au niveau du *locus coeruleus* diminue son activité tout en atténuant l'intensité du sevrage (Maldonado, 1997; Rasmussen, 1995). Plus précisément, le noyau réticulaire paragigantocellulaire (ou PGi) faisant partie de la RVM est la source afférente principale d'acides aminés excitateurs vers le *locus coeruleus*. Ainsi la lésion du PGi atténue l'excitabilité du *locus coeruleus* (Maldonado, 1997; Rasmussen, 1995).

La PAG a elle aussi été impliquée dans l'expression des signes somatiques du sevrage (Maldonado et al., 1992; Punch et al., 1997). La PAG est une région afférente de la PGi et pourrait par conséquent jouer un rôle indirect dans l'excitation du *locus coeruleus* révélée lors du sevrage (Christie et al., 1997). D'ailleurs selon Christie *et al*, la PAG serait la région du cerveau responsable de l'initiation de l'expression de plusieurs signes du sevrage (Bagley et al., 2005; Christie et al., 1997).

Enfin certains travaux, moins nombreux, suggèrent que le noyau accumbens contribue lui aussi à l'expression des signes somatiques du sevrage (Harris et Aston-Jones, 1994; Zachariou et al., 2006).

En conclusion même si le rôle du *locus coeruleus* dans la dépendance physique aux opiacés reste aujourd'hui controversé, il est indéniable que les neurones noradrénergiques du cerveau y compris ceux du *locus coeruleus* sont hyperactifs lors du sevrage (Christie et al., 1997; Delfs et al., 2000). De ce fait, le *locus coeruleus* a été abondamment utilisé comme une région modèle du cerveau pour comprendre les adaptations moléculaires causées par un traitement chronique à la morphine. Aujourd'hui nombre de ces adaptations, notamment la sensibilisation de la voie AMPc, ont depuis été identifiées dans d'autres régions du cerveau (Nestler, 2004).

2- La voie dopaminergique mésocorticolimbique et l'addiction

a) L'addiction est une forme pathologique de l'apprentissage et de la mémoire : implication du circuit de la récompense

La récompense est une expérience émotionnelle qui se traduit par une sensation positive perçue par un animal. Ainsi, l'activation du circuit neuronal de la récompense produit du plaisir

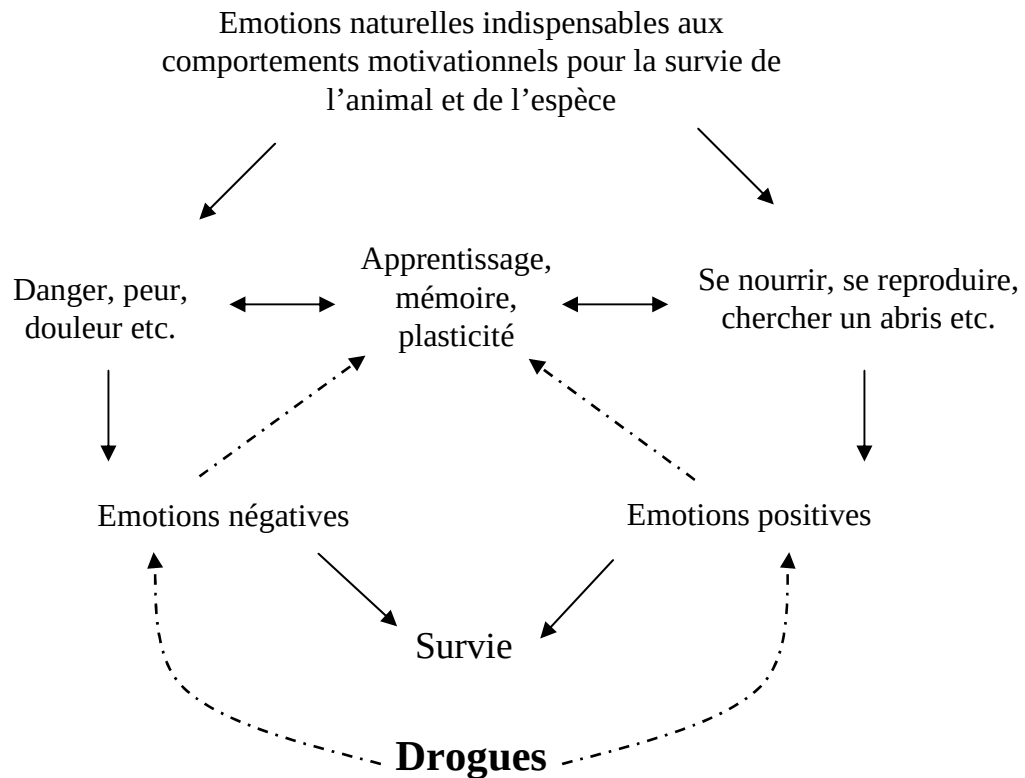


Figure 22: Les systèmes émotionnel et motivationnel contribuent à la survie de l'espèce. Les drogues agissent sur le système limbique en procurant des émotions positives et négatives. Elles affectent durablement le comportement animal par l'intermédiaire d'adaptations neuronales comparables à celles de l'apprentissage et de la mémoire. D'après Kelley, 2004.

(émotions **positives**) et initie un apprentissage permettant d'associer ce plaisir avec une circonstance, un stimulus, un environnement etc. Au contraire, l'inhibition de ce circuit conduit à des émotions **négatives** qui sont elles aussi associées à un contexte (Hyman et al., 2006; Kelley, 2004).

Dans des conditions normales, le circuit de la récompense est impliqué dans les phénomènes motivationnels indispensables aux comportements vitaux afin d'optimiser les chances de survie de l'animal (Kelley, 2004). Plus précisément, le circuit de la récompense à travers l'apprentissage contribue à motiver l'animal vers la recherche par exemple de nourriture, d'eau ou d'opportunités d'accouplement (émotions positives) ou vers la fuite du danger, de la douleur (émotions négatives).

La plupart des drogues (opiacés, cocaïne, nicotine, amphétamines, alcool etc.) sont capables d'altérer de façon persistante le circuit de la récompense conduisant ainsi à des comportements pathologiques durables. En effet, à l'instar de ce qui est appelé les récompenses naturelles (nourriture, eau etc.), les drogues exercent un effet « renforçant » positif sur le circuit de la récompense (Hyman et al., 2006). L'une des conséquences sur l'animal est un comportement motivé majoritairement par le désir compulsif de réitérer l'expérience de la récompense et donc de la drogue. La mémorisation de la récompense ainsi que la motivation à rechercher et à vouloir de la drogue sont révélées chez le rat et la souris par le paradigme de la préférence de place conditionnée. Concrètement, un rongeur rendu dépendant à la drogue passera plus de temps dans un lieu qu'il a associé avec une présence de drogue plutôt que dans un autre lieu tout autant accessible (Hyman et al., 2006). Des paradigmes d'autoadministration permettent aussi d'appréhender ces phénomènes.

Parallèlement, les drogues exercent aussi un effet « renforçant » négatif sur le circuit de la récompense. Cela se traduit par une volonté de l'animal à éviter les effets néfastes de la drogue (dysphorie, anxiété, irritabilité, douleur, syndrome de sevrage) dévoilés lors de l'arrêt de la prise de drogue (Kelley, 2004). Cet état est révélé chez le rat et la souris par le paradigme de l'aversion de place conditionnée. Le rongeur rendu dépendant à la drogue passera moins de temps dans un lieu qu'il a associé avec la précipitation du syndrome de sevrage que dans un autre lieu tout autant accessible (Delfs et al., 2000).

La dangerosité de la récompense générée par la drogue s'explique d'abord du fait qu'elle devient surévaluée par rapport aux récompenses naturelles. De ce fait, la vie du toxicomane se résume à trouver les moyens pour obtenir de la drogue et ce malgré les conséquences sociales qui peuvent en découler. D'autre part, contrairement aux récompenses naturelles, la récompense générée par les drogues ne contribue pas à la survie de l'espèce (se nourrir, se défendre, se reproduire) et de surcroît est délétère pour la santé de l'individu (Hyman et al., 2006).

En conclusion, l'addiction est notamment la conséquence de deux phénomènes se superposant (voir figure 22). D'une part un effet « renforçant » **positif** de la drogue qui contribue à

Tableau 5: Cibles pharmacologiques directes ou indirectes des principales drogues. D'après Nestler, 2001 et Hyman *et al*, 2006. DOP (delta opioid receptor), GABA (acide γ -amino butyrique), NMDA (N-Méthyl-D-Asparate), MOP (mu opioid receptor).

Droque	Récepteur Ciblé	Action
Opiacés	Opi�ides MOP et DOP	Agonistes
Cocaïne	Dopamine (D1 et D2)	Inhibiteur du transporteur de dopamine (inhibe la « recapture »)
Nicotine	Nicotinique � l'acétylcholine	Agoniste
Alcool	GABA et NMDA	Agoniste GABA _A et antagoniste NMDA
Cannabis	Cannabino�de 1	Agoniste

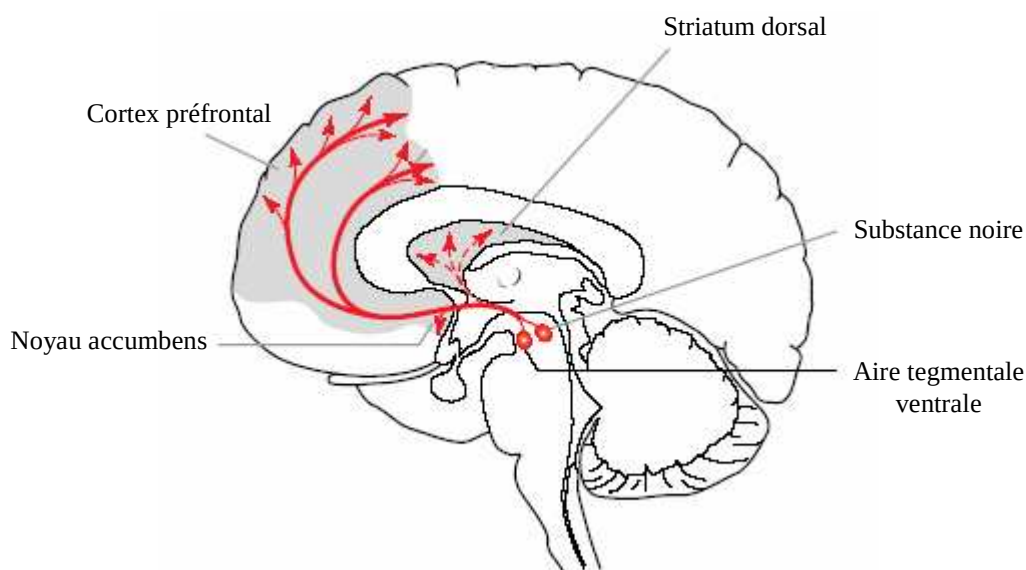


Figure 23: Principales projections dopaminergiques impliquées dans la dépendance aux drogues. Les noyaux dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale projettent en particulier vers le noyau accumbens et le cortex préfrontal. La substance noire est la source dopaminergique du striatum dorsal. D'après Hyman *et al*, 2006.

motiver le comportement vers la recherche de la récompense induite par la drogue et d'autre part un effet « renforçant » **négatif** du sevrage qui contribue au désir d'échapper aux effets néfastes consécutifs à l'arrêt de la prise de drogue (Kelley, 2004). L'apprentissage, la mémoire et la plasticité neuronale participent à l'installation à long terme de cet état pathologique. Le glutamate et la dopamine joueraient un rôle clé dans la mise en place de ces phénomènes. Ainsi, des neurones glutamatergiques et dopaminergiques sont largement distribués dans plusieurs régions du cortex et du système limbique (Kelley, 2004).

b) Effets d'un traitement aigu par une drogue sur le circuit dopaminergique mésocorticolimbique

i) *Les propriétés addictives des drogues résultent en particulier d'une action commune sur la voie aire tegmentale ventrale- noyau accumbens*

Les drogues sont des substances chimiques de nature particulièrement diverses. De ce fait, elles agissent sur le système nerveux central et périphérique sur des cibles moléculaires distinctes (voir tableau 5) ce qui explique en partie les différents comportements observés suite à la prise de ces drogues (Nestler, 2005).

Malgré cette disparité pharmacologique, toutes les drogues convergent vers l'activation du circuit de la récompense et notamment le circuit dopaminergique mésocorticolimbique (Nestler, 2001a; Nestler, 2005). Ce réseau est formé en particulier par des neurones dopaminergiques de la VTA qui projettent notamment vers le noyau accumbens et le cortex préfrontal (voir figure 23). La majorité des travaux concernant l'addiction se sont focalisés sur le réseau formé par la VTA et le noyau accumbens puisqu'il s'agit d'une cible privilégiée des drogues qui rend compte de leur capacité à induire une récompense (Nestler, 2005). Ainsi, une administration aiguë de toutes les drogues augmente la transmission de dopamine vers le noyau accumbens (voir figure 24) (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005).

Le message codé par la dopamine au niveau du noyau accumbens n'est pas précisément connu. Il ne semble pourtant pas que la dopamine soit nécessaire pour ressentir le plaisir lié à la prise de drogue ni pour mémoriser cette récompense puisque des souris incapables de synthétiser de la dopamine continuent de manifester une préférence de place après un traitement chronique à la morphine (Hnasko et al., 2005). Cependant, la dopamine serait nécessaire pour motiver l'animal vers l'obtention / la recherche de la récompense. En d'autres termes, en absence de dopamine un animal peut toujours aimer quelque chose mais ne peut le vouloir. Ainsi la transmission dopaminergique vers le noyau accumbens ferait le lien entre le plaisir associé à la prise de drogue et la motivation qui conduit au comportement pathologique (Hyman et al., 2006).

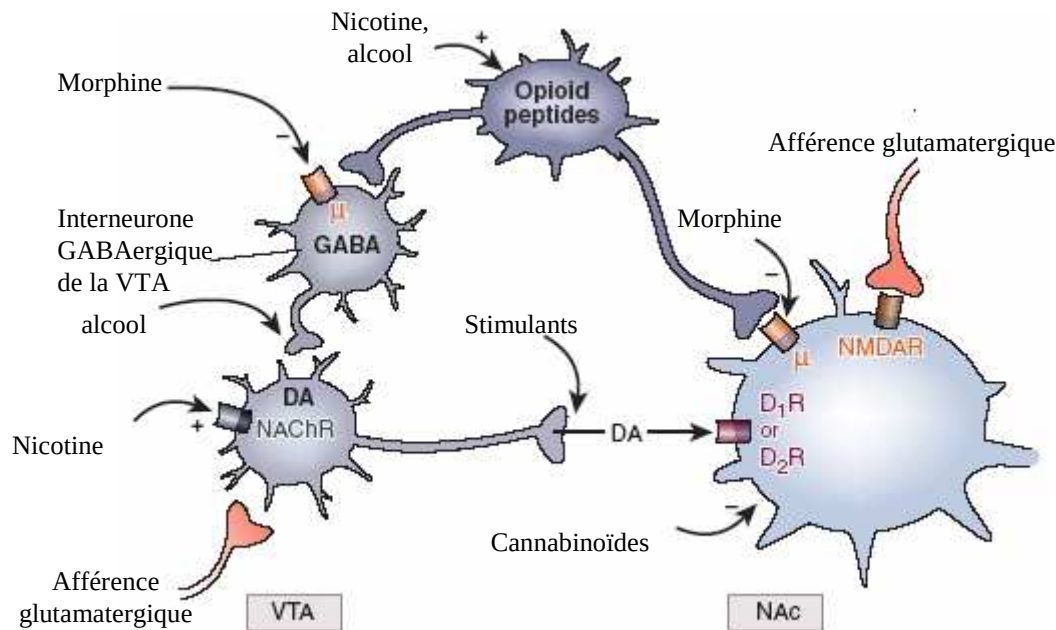


Figure 24: Mécanisme d'action simplifié de la morphine, de l'alcool, de la nicotine, des stimulants, des cannabinoïdes sur le circuit de la récompense. L'ensemble des drogues augmente la transmission de dopamine de la VTA vers le noyau accumbens (NAc). La morphine agit à deux niveaux du circuit de la récompense. La morphine inhibe l'activité des interneurons GABAergiques conduisant à désinhiber les neurones dopaminergiques de la VTA. La morphine inhibe aussi directement les neurones du NAc exprimant le récepteur MOP. Les stimulants (cocaïne, amphétamines) induisent une accumulation de dopamine dans l'espace synaptique VTA-NAc. La nicotine active les neurones de la VTA en se liant sur le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (NACHR). La nicotine et l'alcool activeraient également le système opioïde endogène. Le mécanisme d'action de l'alcool et des cannabinoïdes est plus complexe, ils agiraient aussi bien au niveau de la VTA que du NAc. D'après Hyman *et al*, 2006 et Nestler, 2005. DA (dopamine), D1R (récepteur à la dopamine de type 1), D2R (récepteur à la dopamine de type 2), NMDAR (N-Méthyl-D-Aspartate Receptor), VTA (aire tegmentale ventrale), μ (récepteur MOP).

ii) *Mécanisme d'action de la morphine sur la voie VTA-noyau accumbens*

La morphine agit à deux niveaux de la voie VTA-noyau accumbens (voir figure 24). D'abord au niveau de la VTA, la morphine est capable d'inhiber des interneurons GABAergiques qui inhibent de façon tonique l'activité des neurones dopaminergiques. Ainsi, la morphine entraîne la désinhibition des neurones dopaminergiques de la VTA ce qui provoque l'augmentation de la libération de dopamine en particulier au niveau du noyau accumbens (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005).

Par ailleurs, les neurones du noyau accumbens expriment aussi le récepteur MOP (voir figure 24). La morphine est donc capable d'agir directement sur ces neurones ce qui permettrait d'induire une récompense indépendamment de la dopamine (Hnasko et al., 2005; Hyman et al., 2006). Cette dopamine va se lier sur les récepteurs D1 (couplés Gs) et D2 (couplés Gi) exprimés à la surface des medium spiny neurones du noyau accumbens.

c) *Effets d'un traitement chronique à la morphine*

Un traitement chronique à la morphine mais aussi plus généralement à d'autres drogues induit des adaptations au niveau des circuits neuronaux précédemment décrits contribuant au phénomène d'addiction. Certaines de ces adaptations sont présentées dans ce chapitre.

i) *Sensibilisation de la voie dopaminergique par un traitement chronique à la morphine*

A l'instar des psychostimulants (cocaïne et amphétamine) un traitement chronique à la morphine provoque une sensibilisation de la voie dopaminergique (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005). Cette adaptation se manifeste par une libération accrue de dopamine suite à une prise de drogue ou à un stimulus associé à la drogue (Nestler, 2005). De ce fait, il est suggéré que la sensibilisation de la voie dopaminergique contribue à augmenter la motivation de l'animal à chercher de la drogue. D'ailleurs chez le rongeur, cette sensibilisation se manifeste en particulier par une élévation de l'activité motrice (Carlezon et al., 1997). Parallèlement à la voie mésocorticolimbique, la sensibilisation de la voie dopaminergique nigro-stiée (voir figure 23) serait également impliquée dans l'augmentation de l'activité motrice observée chez le rongeur suite à un traitement chronique à la morphine (Volpicelli et al., 1999). De plus cette sensibilisation apparaît être une adaptation durable puisqu'elle peut se manifester chez l'animal plusieurs mois après un sevrage (Hyman et al., 2006; Williams et al., 2001). Ainsi, la sensibilisation de la voie dopaminergique pourrait être impliquée dans l'expression du besoin compulsif du toxicomane de se procurer de la drogue et ce même après une longue période d'abstinence (Nestler, 2005).

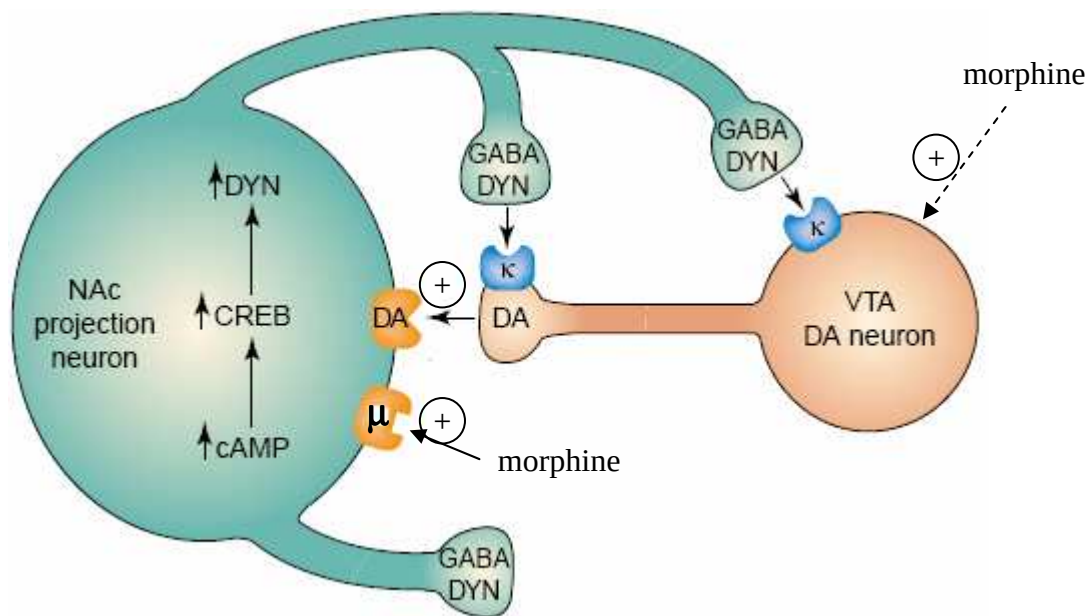


Figure 25: Activation de la boucle de régulation négative NAc-VTA après un traitement chronique à la morphine. Un traitement chronique à la morphine sensibilise la voie de l'AMPC dans les neurones du noyau accumbens (NAc) contenant des projections GABAergiques vers la VTA. Ainsi, l'activité de la protéine CREB augmente. L'une de ses cibles est le gène codant pour la prodynorphine. La libération de dynorphine au niveau des terminaisons GABAergiques inhibent l'activité des neurones de la VTA qui expriment le récepteur KOP (κ). D'après Nestler 2004. CREB (cAMP Responsive Element Binding protein), DA (dopamine), DYN (Dynorphine), μ (récepteur MOP).

ii) Activation d'une boucle de régulation négative

Un traitement chronique à la morphine (mais aussi à la cocaïne) induit l'activation d'une boucle de régulation négative entre le noyau accumbens et les neurones dopaminergiques de la VTA (voir figure 25) (Nestler, 2004; Nestler, 2005). Des neurones du noyau accumbens possédant des projections GABAergiques vers la VTA sont capables de libérer au niveau des neurones dopaminergiques de la VTA de la dynorphine dont la synthèse augmente au cours d'un traitement chronique à la morphine. La dynorphine est alors capable d'inhiber les neurones dopaminergiques de la VTA qui expriment le récepteur KOP. La conséquence qui s'apparente à un phénomène de tolérance conduit donc à diminuer la libération de dopamine vers le noyau accumbens et s'oppose à la sensibilisation des neurones de la VTA (Hyman et al., 2006). Cette inhibition du circuit de la récompense pourrait contribuer aux aspects aversifs comme la dysphorie révélés lors d'un sevrage (Hyman et al., 2006; Nestler, 2005).

iii) Un traitement chronique à la morphine induit une plasticité structurale

Le comportement pathologique persistant d'un toxicomane reflète très vraisemblablement des adaptations durables voire irréversibles au niveau des réseaux neuronaux impliqués dans la dépendance aux drogues (Nestler, 2004; Nestler, 2005). Effectivement, il apparaît qu'une exposition chronique à la morphine conduit à une plasticité structurale au niveau de la voie VTA-noyau accumbens (Robinson et Kolb, 2004; Spiga et al., 2005) mais aussi dans d'autres régions impliquées dans la mémoire comme l'hippocampe (Liao et al., 2005).

Un traitement chronique à la morphine réduit la taille des neurones dopaminergiques de la VTA. Ce phénomène pourrait contribuer à la diminution de la libération de dopamine lors du sevrage au même titre que l'activation de la boucle de régulation négative présentée dans le paragraphe précédent (Nestler, 2001a).

Un traitement chronique à la morphine conduit aussi à une diminution de la densité en épines dendritiques des neurones du noyau accumbens mais aussi du cortex préfrontal (Nestler, 2005; Robinson et Kolb, 2004). Ce phénomène est important d'un point de vue de la force de transmission du signal nerveux puisque la majorité des connexions synaptiques neuronales se font au niveau des dendrites et de leurs épines (Liao et al., 2005; Robinson et Kolb, 2004). De tels changements structuraux peuvent persister au moins un mois après l'arrêt de l'administration de drogue chez l'animal. De plus, une récompense naturelle comme la nourriture ne produit pas de telles modifications au niveau du noyau accumbens suggérant que les adaptations structurales durables sont spécifiques aux drogues toxicomanogènes (Robinson et Kolb, 2004).

Les réarrangements structuraux au niveau synaptique montrent une nouvelle fois que le développement de la dépendance aux drogues partage des mécanismes communs avec ceux de l'apprentissage et de la mémoire qui sont peut-être responsables des effets persistants de l'addiction.

Dans ce chapitre j'ai cherché à montrer comment différents circuits neuronaux pouvaient rendre compte des différents symptômes de la dépendance aux drogues. Ainsi, les symptômes somatiques du syndrome de sevrage impliqueraient plutôt la voie noradrénergique tandis que ceux de l'addiction la voie dopaminergique mésocorticolimbique (Nestler, 2004). Ceci permettrait d'expliquer pourquoi certaines drogues comme la cocaïne peuvent être addictives sans induire de dépendance physique. Cependant cette dichotomie se heurte au fait que la voie noradrénergique possède aussi des connexions avec la voie dopaminergique et *vice versa* mais aussi au fait que les circuits neuronaux sont connectés entre eux de façon complexe. Ainsi il n'est pas surprenant que des travaux montrent que le noyau accumbens est impliqué dans la dépendance physique (Harris et Aston-Jones, 1994; Zachariou et al., 2006) ou réciproquement que la voie noradrénergique est vraisemblablement impliquée dans l'addiction (Delfs et al., 2000).

Après ce descriptif des circuits neuronaux responsables de la dépendance à la morphine, le prochain chapitre présentera certains mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation à un traitement chronique.

H. Mécanismes moléculaires de la dépendance à la morphine

1- Adaptations moléculaires à un traitement chronique par la morphine dans le locus coeruleus

Dans ce chapitre, je me restreindrai aux adaptations moléculaires qui ont été décrites dans le *locus coeruleus* (pour les raisons évoquées au paragraphe III-G-1-c page 61) et plus particulièrement à la sensibilisation de la voie de l'AMPc. Cependant, il est à noter que cette adaptation moléculaire est aussi impliquée dans l'augmentation de l'excitabilité d'autres régions du cerveau importantes pour l'expression du syndrome de sevrage comme la PAG (Bagley et al., 2005; Punch et al., 1997).

a) Rôle de la sensibilisation de la voie AMPc

Comme indiqué au paragraphe III-F-2-b (page 57), la sensibilisation de la voie de l'AMPc qui permet de compenser l'inhibition chronique de l'AC par la morphine est l'adaptation moléculaire la mieux établie suite à un traitement chronique par la drogue (Nestler et Aghajanian,

1997). Les conséquences de cette adaptation sont non seulement le retour à un niveau contrôle, voire l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc après un traitement chronique mais aussi durant le sevrage un rebond de l'activité de l'AC qui n'est plus inhibée par la drogue (Nestler, 2004).

La sensibilisation de la voie de l'AMPc jouerait un rôle capital dans l'établissement de la dépendance aux opiacés (Meunier, 1992; Nestler, 1997; Nestler, 2004). Les travaux de Punch *et al* qui ont tiré partie de l'utilisation d'inhibiteurs et d'activateurs spécifiques de la PKA (protéine directement activée par l'AMPc) illustrent particulièrement bien ces propos. En effet, l'injection dans le *locus coeruleus* d'un inhibiteur spécifique de la PKA, juste avant la précipitation du sevrage, diminue l'intensité de plusieurs signes somatiques caractéristiques du sevrage chez le rat dépendant à la morphine. Encore plus convaincant, l'injection dans le *locus coeruleus* d'un activateur spécifique de la PKA produit chez des rats jamais traités par la morphine un quasi syndrome de sevrage reflété par l'expression de signes somatiques caractéristiques du sevrage (Punch et al., 1997). Ainsi, la révélation du syndrome de sevrage serait, en partie au moins, le fait d'un accroissement brutal du taux intracellulaire d'AMPc.

Au niveau du *locus coeruleus*, un traitement chronique par la morphine s'accompagne notamment de l'augmentation de l'expression des AC1 et 8, des sous-unités régulatrice de type II et catalytique de la PKA et du facteur de transcription CREB (voir figure 26) (Lane-Ladd et al., 1997). Ces adaptations moléculaires seraient à l'origine de la sensibilisation de la voie de l'AMPc dans le *locus coeruleus* (Nestler et al., 1999). Voyons maintenant plus précisément le rôle du facteur de transcription CREB.

b) Rôle du facteur de transcription CREB

La protéine CREB est un facteur de transcription capable d'activer la transcription des gènes en se liant sur le site cAMP-Response Element (CRE) d'un promoteur. Une accumulation d'AMPc contribue *via* la PKA à phosphoryler la protéine CREB conduisant à l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle sur le site CRE puis à la transcription des gènes cibles (Carlezon et al., 2005). A noter que d'autres kinases sont également capables de phosphoryler la protéine CREB (ex : la kinase IV dépendante de la calmoduline) (Nestler, 2001a).

Un traitement aigu à la morphine inhibe la phosphorylation de la protéine CREB dans le *locus coeruleus*. Cette inhibition est levée après un traitement chronique et la précipitation du sevrage induit une très forte phosphorylation de la protéine CREB (Guitart et al., 1992).

Les travaux de Maldonado *et al* ont montré que la protéine CREB joue un rôle fondamental dans l'acquisition de la dépendance physique à la morphine. En effet, la plupart des signes du sevrage

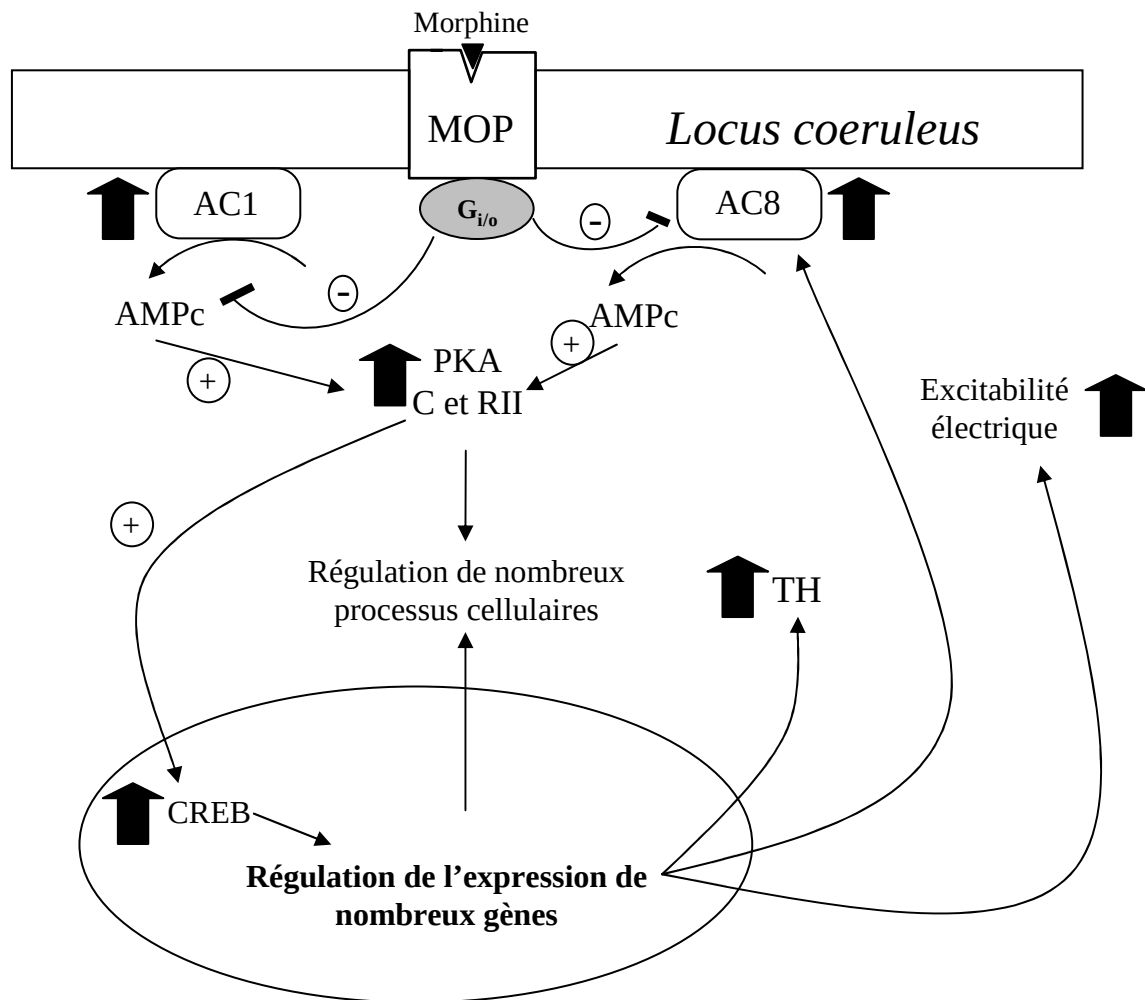


Figure 26: Schématisation des adaptations moléculaires à un traitement morphinique dans le *locus coeruleus*. Un traitement chronique à la morphine conduit à des adaptations homéostatiques (flèches pleines) globalement opposées à ses effets aigus. La sensibilisation de la voie AMPc est l'adaptation moléculaire la mieux caractérisée. Elle s'accompagne de l'augmentation de l'activité de la protéine CREB ce qui induit l'expression de la tyrosine hydroxylase (TH) et de l'adénylyl cyclase 8 (AC) et participe à la potentialisation de l'excitabilité des neurones du *locus coeruleus*. L'ensemble de ces adaptations contribue au développement de la dépendance physique à la morphine. D'après Nestler, 1997. C (sous-unité catalytique de la PKA), CREB (cAMP Responsive Element Binding protein), RII (sous-unité régulatrice de type II de la PKA), PKA (Protein Kinase A).

sont fortement atténués après un traitement chronique par la drogue chez des souris knock-out pour les isoformes *alpha* et *delta* de CREB (Maldonado et al., 1996).

Au niveau du *locus coeruleus* une étude de type transcriptomique utilisant des puces à ADN a montré qu'un traitement chronique à la morphine ainsi que la précipitation d'un sevrage régulent la transcription de nombreux gènes dont 20 % sont connus pour être régulés par la voie AMPc / CREB (McClung et al., 2005). Plus précisément, la précipitation du sevrage induit la régulation d'un plus grand panel de gènes. Ce résultat corrèle bien avec l'effet rebond de l'activité de l'AC observé lors d'un sevrage. Ce résultat corrèle aussi avec une augmentation de l'activité transcriptionnelle de CREB dans le *locus coeruleus* après précipitation du sevrage (augmentation d'activité révélée par l'expression de la β -galactosidase sous contrôle du site CRE) (Shaw-Lutchman et al., 2002).

Dans le *locus coeruleus* de rats, l'induction de l'expression de l'AC8 et de la tyrosine hydroxylase lors d'un traitement chronique à la morphine est sous la dépendance de la protéine CREB (voir figure 26) (Lane-Ladd et al., 1997). L'élévation de l'expression de la tyrosine hydroxylase permettrait d'augmenter la capacité des neurones du *locus coeruleus* à libérer de la noradrénaline lors d'un sevrage puisque cette enzyme catalyse une étape limitante de la biosynthèse de ce neurotransmetteur (Nestler et al., 1999). Plus généralement, lors d'un traitement chronique à la morphine la protéine CREB régulerait, entre autres, l'expression des gènes de la dopamine β -hydroxylase (une autre enzyme de la voie de biosynthèse de la noradrénaline) mais aussi des sous-unités $\alpha 1$ de l'ATPase Na^+ / K^+ et GluR1 du récepteur AMPA au glutamate (McClung et al., 2005). La modulation de la transcription de ces deux derniers gènes tout comme pour l'AC8 pourrait contribuer à l'augmentation de l'excitabilité du *locus coeruleus* après un traitement chronique par la morphine (Han et al., 2006).

En accord avec cette dernière hypothèse, la surexpression de la protéine CREB dans le *locus coeruleus* augmente son excitabilité suite à une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire (Han et al., 2006). Au contraire, son invalidation fonctionnelle par des oligonucléotides antisens (Lane-Ladd et al., 1997) ou par surexpression d'une forme dominante négative de CREB (Han et al., 2006) diminue l'excitabilité du *locus coeruleus*. Comme indiqué au paragraphe III-G-1-b (page 60), ces augmentation et diminution de l'activité neuronale du *locus coeruleus* sont corrélées respectivement à la potentialisation et l'atténuation de l'intensité de plusieurs signes somatiques du sevrage après traitement chronique à la morphine.

En conclusion, l'excitabilité du *locus coeruleus* observée lors du syndrome de sevrage semble être la composante de deux phénomènes : i) l'augmentation de la libération d'acides aminés excitateurs provenant de neurones afférents ii) l'augmentation intrinsèque de l'excitabilité des

neurones du *locus coeruleus* (Maldonado, 1997; Nestler et al., 1999; Rasmussen, 1995). Dans les deux cas, la sensibilisation de la voie AMPc semble jouer un rôle essentiel puisqu'elle augmente l'excitabilité du *locus coeruleus* via la protéine CREB et qu'elle potentialise la neurotransmission dans plusieurs régions du cerveau (Williams et al., 2001). Enfin, l'activation des facteurs de transcription puis l'expression de leurs gènes cibles sont très certainement en partie responsables des adaptations moléculaires et cellulaires à long terme induites par une exposition répétée à la morphine et plus généralement à de nombreuses drogues (Nestler et Aghajanian, 1997). Le facteur de transcription CREB est par ailleurs impliquée dans les mécanismes moléculaires de l'apprentissage et la mémoire (Carlezon et al., 2005; Hyman et al., 2006).

2- **Adaptations moléculaires à un traitement chronique par la morphine au niveau de la voie VTA-noyau accumbens**

Dans ce chapitre, je m'intéresserai en particulier aux rôles des facteurs de transcription CREB et Δ FosB au niveau de la voie VTA-noyau accumbens impliquée dans le développement de l'addiction. En effet, la régulation de la transcription des gènes est un mécanisme majeur conduisant à moduler de façon stable l'activité des neurones et par conséquent le circuit dans lesquels ils fonctionnent (Nestler, 2001a).

Il est à noter que la cocaïne est la « drogue modèle » utilisée pour établir les adaptations moléculaires sur la voie VTA-noyau accumbens suite à un traitement chronique. Cependant, même s'il est possible que de nombreux mécanismes d'adaptation moléculaire soient partagés entre les deux drogues (Nestler, 2005), je me restreindrai, sauf en cas de précision, à celles ayant été décrites pour la morphine.

a) Rôles de la sensibilisation de la voie de l'AMPc et du facteur de transcription CREB après un traitement chronique à la morphine

Un traitement chronique à la morphine conduit à la sensibilisation de la voie de l'AMPc dans la VTA et le noyau accumbens (Nestler, 2001a; Waldhoer et al., 2004) provoquant une augmentation de l'activité de la protéine CREB (Nestler, 2005; Nestler et al., 2001a).

i) *Au niveau de la VTA*

La sensibilisation de la voie de l'AMPc au niveau des interneurons de la VTA conduit à la potentialisation de la libération de GABA lors du sevrage (Bonci et Williams, 1997). Bonci et Williams suggèrent que ce phénomène est responsable de la super-inhibition des neurones dopaminergiques de la VTA lors de la précipitation du sevrage. Cette diminution du niveau basal de

dopamine dans le circuit de la récompense lors du sevrage pourrait participer (voir aussi paragraphe suivant) à l'état dépressif observé à l'arrêt de la prise de drogue (Nestler, 2005).

Les travaux de Olson *et al* ont, quant à eux, cherché à comprendre le rôle de la protéine CREB dans la VTA suite à un traitement par la drogue (Olson et al., 2005). Ainsi, un traitement chronique à la morphine accroît l'activité de la protéine CREB révélée par l'augmentation de l'expression de la β -galactosidase sous contrôle de l'élément CRE. La surexpression de la protéine CREB dans ce tissu conduit à l'augmentation du niveau d'expression de la tyrosine hydroxylase et de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA. Bien que l'impact de ces adaptations sur l'addiction ne soit pas précisément connu, il est possible qu'elles contribuent à la potentialisation des neurones de la VTA à libérer de la dopamine au cours de la prise de morphine. Cependant le rôle de la protéine CREB au niveau de la VTA dans le développement de l'addiction est assez complexe. En effet, la surexpression de la protéine CREB dans la VTA augmente ou diminue la sensibilité de l'animal à la drogue (révélée par le paradigme de la préférence de place conditionnée) selon qu'elle soit induite respectivement dans la région rostrale ou caudale de la VTA. Cette dichotomie serait la conséquence de différences neuroanatomiques entre ces deux sous-régions de la VTA.

Contrairement à la VTA, le rôle de l'augmentation de l'activité de la protéine CREB dans le noyau accumbens est moins ambigu et relayé par plus de travaux.

ii) Au niveau du noyau accumbens

D'un point de vue fonctionnel, la surexpression de la protéine CREB dans le noyau accumbens s'accompagne de l'élévation de l'excitabilité des neurones (Dong et al., 2006) ainsi que de la diminution de la récompense induite par la morphine chez l'animal (Barrot et al., 2002). Ainsi, l'augmentation de l'activité de la protéine CREB après un traitement chronique serait un mécanisme d'adaptation conduisant en quelque sorte à une tolérance envers la récompense induite par la drogue. Cette inhibition du circuit de la récompense pourrait conduire lors de l'arrêt de la drogue à un état dépressif (dysphorie) et donc à une aversion (Carlezon et al., 2005; Nestler, 2004; Nestler, 2005), phénomène impliqué dans l'addiction.

L'une des cibles de la protéine CREB est le gène codant pour la prodynorphine, le précurseur de la dynorphine (Hyman et al., 2006; McClung et al., 2005). De ce fait, l'augmentation de l'activité de la protéine CREB inhiberait indirectement le circuit de la récompense en activant la boucle de régulation négative décrite au paragraphe III-G-2-c-ii (page 65) (Hyman et al., 2006; Nestler, 2004). Ces résultats suggèrent que des antagonistes du récepteur KOP pourraient être utilisés pour diminuer les émotions aversives révélées précocement lors de l'arrêt de la prise de drogue (Nestler, 2004).

L'activation de la voie AMPc / CREB / dynorphine paraît donc impliquée dans les symptômes émotionnels précoces révélés lors de l'arrêt de la prise de drogue. Cependant, ces adaptations moléculaires ne semblent pas persister plus de quelques jours et donc ne peuvent pas rendre compte des modifications comportementales particulièrement durables caractéristiques de l'addiction (Nestler, 2001a).

b) Induction du facteur de transcription Δ FosB dans le noyau accumbens

La protéine Δ FosB est le produit d'expression d'une forme tronquée de l'ARNm du gène FosB (Nestler, 2004). Cette protéine fait partie de la famille des facteurs de transcription de type Fos qui comprend les protéines c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2 (Nestler et al., 2001a). Ces facteurs de transcription forment des hétérodimères avec les protéines de type Jun pour se lier sur un site AP-1 (Activator Protein 1) au niveau d'un promoteur et réguler l'expression de gènes cibles (Hyman et al., 2006; Nestler et al., 2001a).

Suite à l'administration aiguë de nombreuses drogues dont la morphine, les protéines c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2 sont exprimées rapidement (après 1 à 4 heures de traitement) mais de façon transitoire (retour au niveau de base après 4 à 12 heures de traitement) (Nestler, 2001a). Le rôle fonctionnel de ces inductions transitoires n'est pas clairement défini (Hyman et al., 2006). L'expression de la protéine Δ FosB, quant à elle, est induite uniquement après un traitement chronique puis s'accumule (Nestler, 2005). Du fait de sa stabilité, le facteur de transcription Δ FosB reste exprimé dans les neurones du noyau accumbens plusieurs semaines après l'arrêt de la prise de drogue (Nestler, 2001a; Nestler et al., 2001a). Cette stabilité a été récemment attribuée à sa phosphorylation par la caséine kinase 2 qui la protège d'une dégradation par le protéasome (Ulery et al., 2006). De part cette stabilité, la protéine Δ FosB constitue un candidat potentiel permettant de rendre compte de la persistance des symptômes de l'addiction même après plusieurs semaines de sevrage (Nestler et al., 2001a).

Peu de travaux ont étudié le rôle de l'expression de la protéine Δ FosB dans le noyau accumbens après un traitement chronique à la morphine contrairement à la cocaïne. Cependant récemment, Zachariou *et al* ont montré que la surexpression de la protéine Δ FosB dans le noyau accumbens de souris augmente l'effet de récompense induit par la morphine. Selon les auteurs, ce résultat provient de la capacité de la protéine Δ FosB à inhiber la transcription du gène codant pour la prodynorphine révélant ainsi une régulation complexe et réciproque de ce gène par les protéines Δ FosB et CREB (Zachariou et al., 2006). Etant donné la plus grande stabilité de la protéine Δ FosB par rapport à la protéine CREB, il est probable que le facteur de transcription Δ FosB soit responsable de l'expression des gènes conduisant à des adaptations moléculaires, cellulaires et

structurales durables suite à une administration chronique de drogue (McClung et Nestler, 2003; Nestler et al., 2001a). L'une de ces adaptations persistantes pourrait être la conséquence de l'expression de la protéine BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) dont le gène est une cible de Δ FosB (McClung et Nestler, 2003). En effet, la protéine BDNF est impliquée dans la réorganisation structurale des réseaux synaptiques observée suite à un traitement chronique à une drogue (Nestler, 2001a; Robinson et Kolb, 2004).

Un autre gène cible de la protéine Δ FosB est la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA alors que celui de la sous-unité GluR1 est une cible de la protéine CREB (McClung et Nestler, 2003). Ainsi, ces deux facteurs de transcription pourraient être impliqués le développement des potentialisation / dépression à long terme (LTP / LTD) du message nerveux, des formes de plasticité synaptique induites par des drogues comme la cocaïne et la morphine. D'ailleurs il a déjà été montré dans le cadre de l'apprentissage et de la mémoire que la voie de l'AMPC / CREB est engagée dans le développement des phénomènes de LTP et LTD (Carlezon et al., 2005).

3- Plasticité synaptique et traitement chronique à la morphine

Notons d'abord que la LTP est un processus de renforcement synaptique qui se traduit par une augmentation de la réponse postsynaptique à la suite d'une stimulation présynaptique, la LTD correspond au phénomène inverse (Bear et Malenka, 1994).

Dans les précédents paragraphes nous avons vu que les mécanismes de l'apprentissage et de la mémoire partagent des points communs avec ceux de l'addiction (remodelage de la connectivité des synapses, activation de facteurs de transcription tels que CREB). L'un de ces points communs concerne donc la plasticité synaptique qui correspond d'une part à un remodelage des connexions synaptiques mais aussi à la modulation de l'efficacité de transfert du message nerveux au niveau de ces connexions (Hyman et al., 2006). Les phénomènes de LTP et LTD reflètent ainsi cette deuxième forme de plasticité synaptique et pourraient donc être impliqués dans les adaptations neuronales qui se développent suite à une exposition chronique à une drogue (Hyman et al., 2006; Nestler, 2001a; Williams et al., 2001). Cette plasticité engage particulièrement les connexions synaptiques qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur et par conséquent implique les récepteur AMPA, NMDA et métabotropiques du glutamate (Bear et Malenka, 1994; Malenka et Bear, 2004).

Dans le cadre de la dépendance aux drogues, il apparaît qu'un traitement chronique à la morphine induit une forme de LTP dépendante des récepteurs AMPA / NMDA dans la VTA (Saal et al., 2003). Au niveau du noyau accumbens peu de données existent concernant la morphine, cependant un traitement à la cocaïne induit une forme de LTD dans ce noyau (Hyman et al., 2006).

D'un point de vue fonctionnel, la LTP induite dans la VTA suite à un traitement à la morphine pourrait être impliquée dans le phénomène de sensibilisation de l'animal à la morphine puisque la surexpression de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA potentialise ce comportement addictif (Carlezon et al., 1997; Nestler, 2005). Carlezon *et al* (Carlezon et Nestler, 2002) suggèrent que l'induction de la sous-unité GluR1 dans la VTA est une adaptation moléculaire cruciale dans le développement du phénomène de sensibilisation pour de nombreuses drogues.

Dans cette introduction, je me suis limité à décrire certains mécanismes neurobiologiques qui contribuent à la dépendance aux drogues et plus particulièrement à la morphine. Malgré tout, il est nécessaire d'ajouter que la toxicomanie est une pathologie fortement influencée par le contexte psychologique et social mais aussi par le pool génétique de chaque individu (Nestler, 2000). Ainsi, l'addiction aux drogues et particulièrement celle aux opiacés est une maladie psychiatrique à caractère héréditaire (Goldman et al., 2005). Bien que ce constat soit paradoxal, puisque la consommation d'une drogue est initiée par la volonté de l'individu, un parallèle avec d'autres maladies peut-être réalisé. En effet, le développement d'un cancer ou d'une maladie cardiovasculaire est également influencé non seulement par le pool génétique mais aussi par l'hygiène et le style de vie de l'individu. Selon Goldman *et al*, la découverte des gènes de prédisposition à la vulnérabilité aux drogues permettra non seulement de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques mais également de mieux personnaliser un traitement (Goldman et al., 2005).

I. Conclusion

L'une des avancées majeures ces dix dernières années concernant la neurobiologie de la dépendance aux drogues est la découverte que cette pathologie possède de nombreuses similitudes avec les mécanismes de l'apprentissage et de la mémoire (Kelley, 2004). De la même manière que d'autres types de mémoire, la dépendance aux opiacés impliquerait des modifications de la fonction synaptique comme la dépression ou la sensibilisation de la neurotransmission ainsi que des changements structuraux plus durables, voire irréversibles, tels que la croissance ou la rétractation des connexions synaptiques.

La recherche sur l'implication du circuit de la récompense dans le phénomène de l'addiction a permis plus généralement d'accroître les connaissances sur la neurobiologie de la motivation. Ces avancées peuvent aussi bénéficier à la compréhension d'autres maladies psychiatriques telles que la dépression ou encore à d'autres pathologies aux comportements compulsifs comme la boulimie (Nestler, 2004).

Depuis quelques années déjà, la recherche sur le mécanisme d'action des drogues a tiré profit de techniques à grande échelle comme la génomique afin d'identifier des adaptations moléculaires à l'origine de la dépendance (Bibb et al., 2001; McClung et Nestler, 2003). Une autre méthodologie à grande échelle et complémentaire à la génomique est la protéomique. La complémentarité de cette approche peut être illustrée, dans le cadre de l'addiction, par le facteur de transcription Δ FosB dont le transcrit est particulièrement instable contrairement à la protéine. Ainsi, une telle adaptation moléculaire aurait peu de chances d'être identifiée par une approche de type génomique (Nestler, 2001b).

Dans le prochain chapitre, j'évoquerai les grandes lignes du principe de l'analyse protéomique et plus particulièrement de la protéomique différentielle, un outil de choix pour identifier des adaptations moléculaires en particulier suite à un traitement par une drogue (Nestler, 2001b; Williams et al., 2004).

IV. Protéomique

A. Complémentarité de la génomique et de la protéomique

Le génome décrit l'ensemble des gènes codés par l'ADN d'un organisme (Morrison et al., 2002). Par analogie au génome, le terme protéome définit, quant à lui, l'ensemble des protéines exprimées par un génome dans un tissu, une cellule ou encore dans un compartiment cellulaire et ce à un instant donné. De part cette définition, il s'ensuit non seulement que le génome et le protéome sont intimement liés, mais également qu'un seul génome conduit à une multitude de protéomes. En effet, le protéome d'une cellule donnée varie en fonction de son environnement, des signaux qu'elle reçoit, de son stade de différenciation et de son cycle cellulaire, ou encore de son état physiopathologique. Ainsi, par opposition à un génome statique, la cellule possède un protéome dynamique (Godovac-Zimmermann et Brown, 2001).

De même que le protéome, le transcriptome qui représente l'ensemble des ARNm d'une cellule à un instant donné, est dynamique. Toutefois, le nombre de transcrits ne permet pas d'estimer l'abondance des protéines qui sont les garantes des fonctions cellulaires (Burbaum et Tobal, 2002; Pandey et Mann, 2000). De plus, une seule séquence génomique peut générer de multiples formes de protéines du fait des régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Citons d'abord l'épissage alternatif de l'ARNm qui, à partir d'un même transcrit non mûré, peut générer différentes séquences d'ARNm. Ensuite la machinerie traductionnelle peut reconnaître alternativement différents codons « start » et / ou « stop » sur la séquence de l'ARNm. Enfin, le déphasage du cadre de lecture conduira à la traduction d'un même ARNm à partir de différents codons (Morrison et al., 2002). Ainsi, les protéines ne sont pas des produits invariants des gènes. C'est ainsi que l'on estime qu'environ 30 000 gènes humains coderaient pour plus d'un million de protéines différentes en considérant les modifications post-traductionnelles (Godovac-Zimmermann et Brown, 2001; Righetti et al., 2005).

Depuis une dizaine d'années, le séquençage et l'annotation du génome de nombreux organismes fournissent une somme importante d'informations concernant le fonctionnement d'une cellule ou l'origine de certaines pathologies. Ce n'est d'ailleurs pas un hasard si l'intérêt des laboratoires pour l'analyse du protéome s'est intensifié suite aux données fournies par le décodage des génomes. Cependant, la fonction d'un gène dépend avant tout de l'activité de la protéine traduite qui en découle. Or cette activité dépend de l'abondance de la protéine, de sa localisation sub-cellulaire, de ses interactions et enfin de ses modifications post-traductionnelles (Pandey et Mann, 2000). Ces caractéristiques ne peuvent pas être prédites au niveau du génome mais uniquement établies au niveau du protéome. On peut alors définir la protéomique comme l'étude de

l'ensemble des protéines ou d'un sous-ensemble de protéines, de leur abondance, de leur localisation, de leurs modifications, de leurs interactions afin de définir la fonction de l'expression des gènes (Burbaum et Tobal, 2002; Pandey et Mann, 2000). De fait, les applications de la protéomique sont particulièrement larges. Elle permet d'identifier une protéine, d'établir son abondance relative ou absolue au sein d'un protéome (Cheng et al., 2006), de décortiquer ses réseaux d'interactions (Becamel et al., 2002), d'identifier ses modifications post-traductionnelles (Marotti et al., 2002) ou encore de découvrir des marqueurs moléculaires d'une pathologie ou une cible pharmacologique (Alfonso et al., 2005).

B. Stratégie générale d'une approche protéomique

Même si elle n'a émergé que dans les années 90, la protéomique utilise des techniques comme l'électrophorèse, la chromatographie ou la spectrométrie de masse (MS) qui existent depuis de nombreuses années. Ce n'est cependant que depuis deux décennies que ces techniques ont été améliorées, parallèlement au décodage du génome, et peuvent désormais être mises en œuvre pour l'étude du protéome à grande échelle.

1- Préparation de l'échantillon

Dans une approche de type protéomique, la préparation de l'échantillon biologique est incontestablement une étape clé. Ceci est d'autant plus vrai dans le domaine de la protéomique appliquée aux neurosciences puisque disséquer un cerveau, tissu particulièrement hétérogène, sans contaminations provenant d'une région adjacente est un réel défi (Choudhary et Grant, 2004; Mouldous et al., 2003).

De façon plus générale, il est indispensable que l'échantillon soit le plus reproductible possible d'un point de vue qualitatif et quantitatif. La variabilité biologique de l'échantillon peut être atténuée en réduisant la complexité du matériel biologique à analyser. Par exemple, une lignée cellulaire sera moins variable qu'un tissu (Molloy et al., 2003). De même, une préparation la plus simple possible de l'échantillon contribuera aussi à une meilleure reproductibilité (Gorg et al., 2004).

L'échantillon analysé doit être représentatif de son état original au sein de la cellule. Ainsi, lors de l'étape de lyse des cellules, des inhibiteurs de protéases sont quasi systématiquement utilisés pour maintenir l'intégrité des protéines. Dans le même ordre d'idée, l'étude des phosphorylations des protéines nécessite l'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases.

Le mode de préparation de l'échantillon doit être compatible avec la ou les techniques qui seront utilisées ultérieurement. Par exemple, les sels ou d'autres molécules chargées comme l'ADN

contenus dans un échantillon vont interférer avec l'isoélectrofocalisation des protéines, première étape d'une électrophorèse bidimensionnelle (Gorg et al., 2004).

Enfin, contrairement à la génomique qui possède la technique PCR (pour Polymerase Chain Reaction) comme méthode d'amplification du matériel biologique à analyser, la protéomique ne dispose pas de procédé comparable. Ainsi, malgré les avancées technologiques qui améliorent régulièrement la sensibilité des méthodes adaptées à la protéomique, l'analyse des protéines de faible abondance telles que les facteurs de transcription reste un challenge. Pour remédier à cette limitation, il est possible de fractionner le protéome entier d'une cellule afin d'en réduire la complexité et / ou de l'enrichir en une certaine famille de protéines (membranaires, nucléaires, mitochondriales etc.) (Choudhary et Grant, 2004). Il est également possible de réaliser une purification sélective d'un sous protéome : phosphoprotéome, glycoprotéome, etc. (Mann et Jensen, 2003).

Dans tous les cas, après une préparation adéquate de l'échantillon biologique à analyser, l'analyse protéomique se poursuit par une étape de séparation.

2- Séparation du protéome

La séparation des protéines avec une grande reproductibilité et une grande résolution est une exigence mais aussi un challenge pour l'analyse du protéome. Les deux méthodes de séparation utilisées en protéomique sont l'électrophorèse et la chromatographie. En raison de la complexité du protéome, une séparation multidimensionnelle est particulièrement utile afin d'accroître la résolution, de minimiser le nombre de protéines ou peptides présents dans une fraction et d'augmenter les chances d'enrichir une protéine peu abondante (Morrison et al., 2002).

a) L'électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (ou 2-DE) consiste en la séparation des protéines dans une première dimension en fonction de leur point isoélectrique et dans une seconde dimension selon leur masse moléculaire. La 2-DE est historiquement la technique de séparation des protéines ayant contribué le plus à l'émergence de la protéomique. Malgré l'apparition plus tardive de méthodes de séparations chromatographiques multidimensionnelles, elle reste la technique de choix permettant l'analyse robuste et quasi routinière d'un échantillon protéique complexe (Gorg et al., 2004; Herbert et al., 2001). En effet, la 2-DE peut dans les meilleurs des cas fournir une carte protéique hautement résolutive de plus de 5000 spots et environ 2000 de façon routinière (Gorg et al., 2004). Un autre intérêt de la 2-DE est de permettre la séparation de protéines se distinguant uniquement par une modification post-traductionnelle. Notamment, un chapelet horizontal de spots à différents points

isoélectriques est caractéristique d'une même protéine à différents états de phosphorylation (Mann et Jensen, 2003).

i) *Première dimension : Isoélectrofocalisation des protéines (IEF)*

Le principe de l'IEF repose sur le caractère amphotère des protéines. Sur un gradient de pH, une protéine chargée migrera sous l'effet du champ électrique vers l'électrode de charge opposée jusqu'à ce qu'elle atteigne un équilibre correspondant à son point isoélectrique où elle possède une charge globale neutre. La 2-DE est donc une méthode de choix pour analyser les protéines phosphorylées puisque la phosphorylation d'une protéine modifie sa charge électrique (Mann et Jensen, 2003).

Dans les années 80, la mise au point de gradients de pH immobilisés (ou IPG) a apporté un net progrès par rapport aux *Carrier Ampholytes* pour procéder à l'IEF des protéines (Bjellqvist et al., 1982). Les IPG sont plus reproductibles, ont une capacité de charge protéique plus importante et offrent la possibilité de réaliser des gradients de pH non linéaires. Il existe aujourd'hui un très large panel d'IPG vendu sous forme de bandelettes (ou strip) permettant d'analyser aussi bien des protéines acides que basiques ou encore des IPG avec des gammes de pH très étroites rendant possible la séparation de protéines ayant un ΔpI de seulement 0,001 (Gorg et al., 2004).

ii) *Seconde dimension : électrophorèse SDS-PAGE*

La seconde dimension consiste en une électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) classique. Elle permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Ainsi, la 2-DE consiste à coupler une IEF des protéines en première dimension avec une SDS-PAGE en seconde. La résolution de la séparation obtenue dépendra de la gamme de pH couverte par l'IEF (3-10, 4-7, 5-6 etc.) et de sa linéarité ou non, de la longueur des strips (de 7 à 54 cm), et de la longueur des gels SDS-PAGE. Quant à sa sensibilité, la 2-DE permet de détecter jusqu'à moins de 1 ng de protéines (Gorg et al., 2004; Mackintosh et al., 2003) selon le procédé de révélation des protéines (voir paragraphe IV-C-2-a page 87).

Les principales limitations de la 2-DE résident dans l'analyse des protéines basiques, des protéines de haut et faible poids moléculaires mais aussi dans celle des protéines hydrophobes telles que les protéines membranaires (Gorg et al., 2004). En effet, alors qu'elles constituent environ 30 % du protéome total, les protéines membranaires sont sous-représentées après séparation par une 2-DE en particulier en raison de leur hydrophobicité. Même si des protocoles de solubilisation des

protéines hydrophobes ont été spécifiquement mis au point pour l'analyse en 2-DE (Chevallet et al., 1998), les meilleures stratégies séparatives restent, pour elles, la SDS-PAGE monodimensionnelle et la chromatographie liquide (Gorg et al., 2004; Wu et al., 2003).

b) La chromatographie

La séparation d'une molécule par chromatographie repose sur le partage de celle-ci entre une phase stationnaire et une phase mobile. En fonction de la nature de la phase stationnaire utilisée, les molécules seront séparées selon un critère physico-chimique différent. En protéomique, la chromatographie s'applique en règle générale à séparer les peptides issus de la digestion, le plus souvent par la trypsine, de l'échantillon à analyser.

La chromatographie liquide (LC) sur phase inverse sépare les peptides en fonction de leur hydrophobicité, les plus hydrophobes étant retenus préférentiellement. Actuellement, la phase inverse est la chromatographie liquide la plus répandue en protéomique en raison de la compatibilité, avec la spectrométrie de masse, des solvants organiques (acétonitrile, méthanol, acide formique etc.) utilisés pour la phase mobile (Shi et al., 2004). Ainsi, il est possible de coupler en ligne cette chromatographie liquide avec un spectromètre de masse à ionisation électrospray (ESI). C'est ce que l'on appelle couramment la LC-MS ou sous sa forme miniaturisée plus sensible, la nanoLC-MS (présentée au paragraphe IV-B-3-b-I page 82).

La LC-MS peut rentrer soit dans le cadre de l'identification d'une protéine préalablement séparée par 2-DE puis digérée par une protéase soit faire partie du processus de séparation du protéome. Dans ce dernier cas, l'étape de protéolyse précède classiquement l'étape de séparation contrairement à la stratégie passant par la 2-DE. Cependant à l'instar de la 2-DE, il est à noter qu'aujourd'hui en analyse protéomique, la LC peut rentrer aussi dans le cadre d'une séparation des protéines entières.

Comme indiqué au paragraphe IV-B-2 (page 77), une séparation en deux dimensions est parfois nécessaire dans la mise en œuvre d'une stratégie de type protéomique. A l'instar de l'électrophorèse, il existe des stratégies chromatographiques multidimensionnelles, comprenant deux LC en tandem LC/LC (en général une colonne échangeuse d'ions suivie d'une phase inverse), couplées en ligne avec un spectromètre de masse. En recourant à cette approche, couramment appelée MudPIT (pour Multidimensional Protein Identification Technology), Wu *et al* ont identifié plus de 1600 protéines d'homogénats de cerveau dans des proportions physiologiques (30 % de protéines membranaires) (Wu et al., 2003).

En conclusion, les méthodes de séparations chromatographiques offrent aux utilisateurs de grandes sensibilité et reproductibilité de même que la possibilité d'étudier un plus large panel de protéines. Cependant, ces méthodes sont moins routinières que la 2-DE et nécessitent la mise au point d'une étape supplémentaire de marquage des peptides si l'objectif est de réaliser une étude quantitative du protéome.

3- **Identification des protéines par spectrométrie de masse**

La MS est une technique d'analyse plutôt ancienne puisque ses fondements remontent à plus de cent ans. Ce n'est cependant que depuis la fin des années 80 que la MS est devenue applicable à l'étude des biomolécules par le développement de méthodes d'ionisation douces. Ces deux méthodes sont l'électrospray ou ESI (Fenn et al., 1989) et la désorption laser assistée par matrice ou MALDI (Tanaka K et al, 1988; Karas et Hillenkamp, 1988). JB Fenn et K. Tanaka, les auteurs de ces avancées technologiques ont d'ailleurs été récompensés par le prix Nobel de chimie en 2002.

Une fois les peptides générés par protéolyse, leurs rapports masse / charge (m/z) sont déterminés par spectrométrie de masse. Deux stratégies rendent alors possible l'identification de la protéine : la cartographie peptidique et le séquençage de peptides (Aebersold et Goodlett, 2001).

a) Cartographie peptidique (Peptide Mass Fingerprint, PMF) en MALDI-TOF

i) *Principe général du MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight)*

Dans ce paragraphe, je n'évoquerai que le principe général de l'ionisation d'un échantillon en mode MALDI car les mécanismes détaillés de ce processus sont encore débattus (Karas et al., 2000). L'échantillon à analyser ou analyte, tel que les digests protéolytiques d'une protéine d'intérêt, est co-cristallisé avec une matrice en large excès sur une plaque métallique (voir figure 27). Cet excès de matrice contribue alors à limiter l'agrégation des peptides à analyser. Le cristal est ensuite bombardé par un faisceau laser pulsé. L'énergie du laser est absorbée par la matrice et partiellement transférée à l'échantillon tout en préservant l'intégrité des molécules d'intérêt. L'énergie absorbée par la matrice provoque sa désorption en phase gazeuse entraînant l'échantillon. La matrice favoriserait aussi l'ionisation des biomolécules en leur transférant un proton. De façon générale, soulignons que l'ionisation en MALDI génère très majoritairement des ions monochargés.

Une source MALDI est très couramment associée à un analyseur TOF (voir figure 28). La séparation des ions est alors fondée sur leur différence de vitesse. En effet, les ions de même charge formés dans la source sont accélérés de sorte qu'ils pénètrent dans l'analyseur avec une énergie

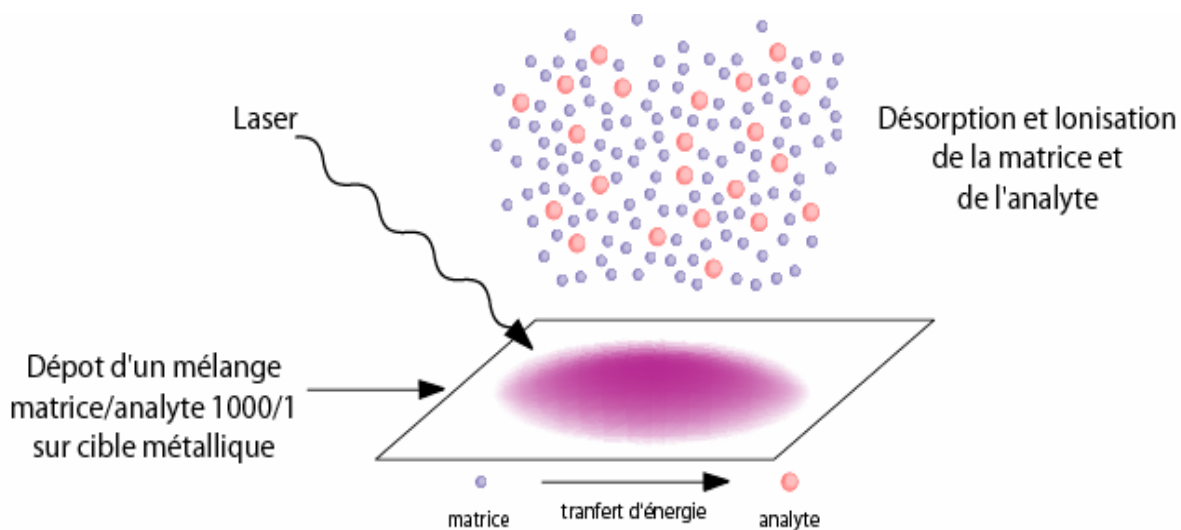


Figure 27 : Principe de l'ionisation par désorption laser assistée par la matrice (MALDI). L'échantillon à analyser est co-cristallisé avec une matrice en large excès sur une plaque métallique. L'énergie émise par le laser est absorbée par les molécules de matrice provoquant alors leur désorption et entraînant ainsi l'échantillon. Des réactions radicalaires conduiraient au transfert de protons de la matrice vers les biomolécules. Les ions ainsi formés sont ensuite envoyés au spectromètre de masse.

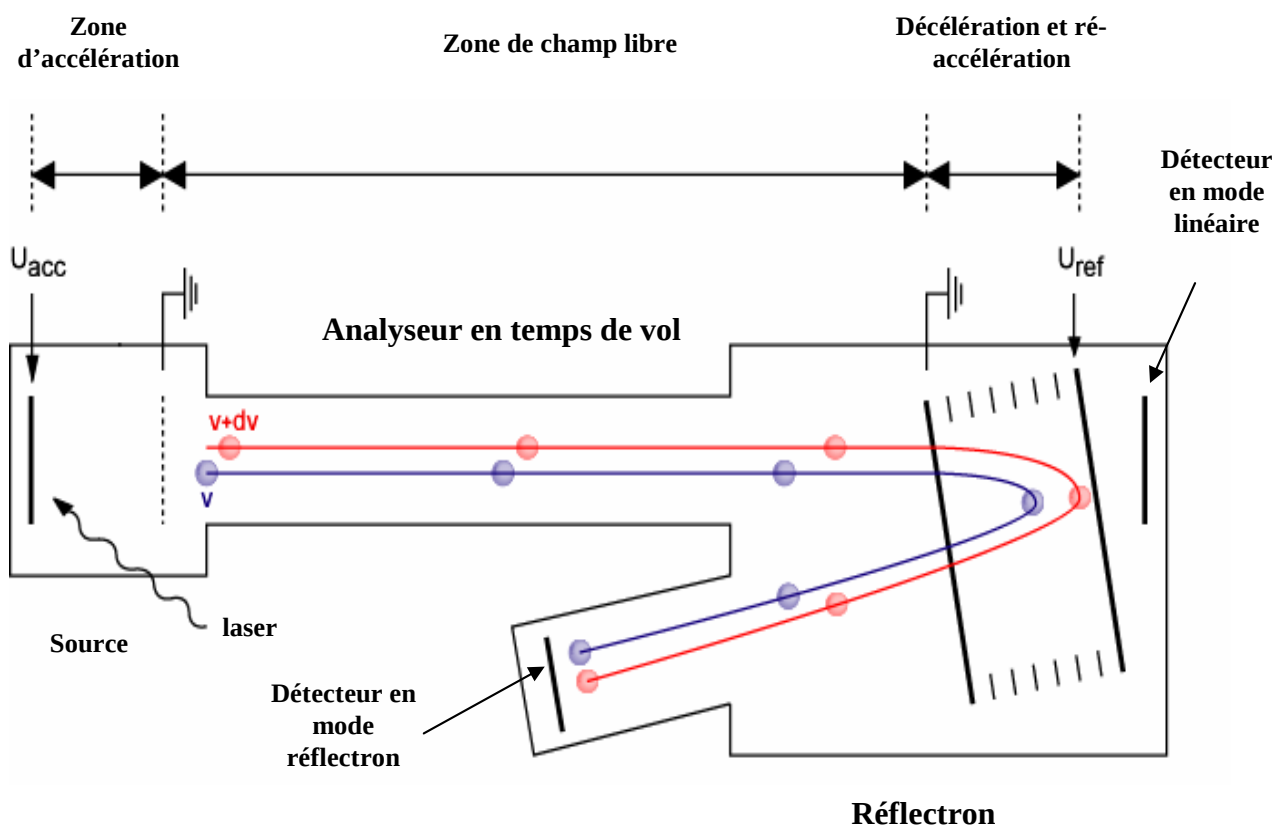


Figure 28 : Principe d'un analyseur en temps de vol (TOF) en mode réflectron. Les ions sont initialement accélérés et sortent de la source avec la même énergie cinétique. Les ions de rapport m/z différents auront des vitesses différentes et seront séparés en fonction du temps nécessaire à leur arrivée au détecteur. Le mode réflectron permet de corriger les dispersions en énergie cinétique initiale et donc en vitesse. Les ions de même rapport m/z sont refocalisés par un miroir électrostatique constitué d'une série d'électrodes qui imposent un champ électrique opposé à la direction du champ accélérateur et s'oppose ainsi à la progression des ions. Puis les ions sont ré-accelérés dans la direction opposée vers un autre détecteur. Un ion de vitesse $v+dv$ aura pénétré plus loin dans le réflectron qu'un ion de vitesse v , la distance de vol allongée compensera alors le surplus de vitesse initiale. U_{acc} (tension accélératrice), U_{ref} (tension du réflectron).

cinétique identique $Ec = 0,5 \cdot \left(\frac{d}{t}\right)^2 m = zeU_{acc} = \text{constante}$, avec m la masse de l'ion, $\frac{d}{t}$ sa vitesse, z sa charge (+1 en général), e la charge élémentaire d'un électron et U_{acc} le potentiel d'accélération des ions. Par conséquent d'après cette relation, le temps nécessaire à l'ion pour parcourir un tube de vol donné ne dépend que de sa masse et de sa charge ce qui permet de déterminer son rapport m/z .

Un analyseur TOF en mode réflectron permet de corriger les dispersions initiales en énergie cinétique des ions à l'aide d'un miroir électrostatique améliorant ainsi la résolution de l'analyse (voir figure 28).

ii) Cartographie peptidique

Rappelons d'abord que les peptides analysés en MS sont issus de la digestion des protéines d'intérêt par une protéase, communément la trypsine, reconnaissant des sites de coupure le long de la séquence de la cible. La trypsine est l'une des protéases les plus spécifiques. Elle clive les protéines du côté C-terminal des lysines et arginines générant, en raison de la fréquence d'apparition de ces résidus dans une séquence protéique, des peptides de taille optimale pour l'analyse en MS. Rappelons ensuite que les ions produits par une source MALDI sont très généralement monochargés. Pour ces deux raisons, le spectrogramme de masse d'un mélange peptidique issu de la digestion spécifique de la protéine d'intérêt correspond en quelque sorte à son empreinte moléculaire. La stratégie d'identification consiste alors à comparer la cartographie peptidique obtenue expérimentalement avec celles provenant de la digestion théorique *in silico* des protéines contenues dans les banques de données (Burbaum et Tobal, 2002; Gorg et al., 2004).

Les principaux avantages de cette méthode d'identification résident d'une part dans la résolution et la précision de l'analyseur en temps de vol permettant une grande spécificité de recherche dans les banques de données protéiques et d'autre part dans la rapidité de l'analyse, une demi-journée pouvant suffire à identifier une cinquantaine de protéines. Par contre, la principale faiblesse réside dans l'analyse de mélanges de peptides (issus de plusieurs protéines) co-cristallisés avec la matrice sur une plaque MALDI. C'est le cas par exemple lorsque la séparation des protéines n'a pas été suffisamment résolutive ou lors d'une contamination de l'échantillon par des protéines exogènes, kératines notamment. Dans ces situations, un phénomène de diminution d'ionisation des peptides (phénomène de suppression) ou d'écrasement des signaux par les peptides contaminants induisent une perte d'information. De plus le spectre de masse d'un mélange de protéines conduit généralement à une ambiguïté d'identification après interrogation des banques de données. Dans de tels cas, un recours est alors le séquençage sélectif des peptides en mode LC ESI-MS/MS, stratégie plus longue dans sa mise en œuvre mais plus informative du fait de l'obtention d'une séquence en acides aminés des peptides.

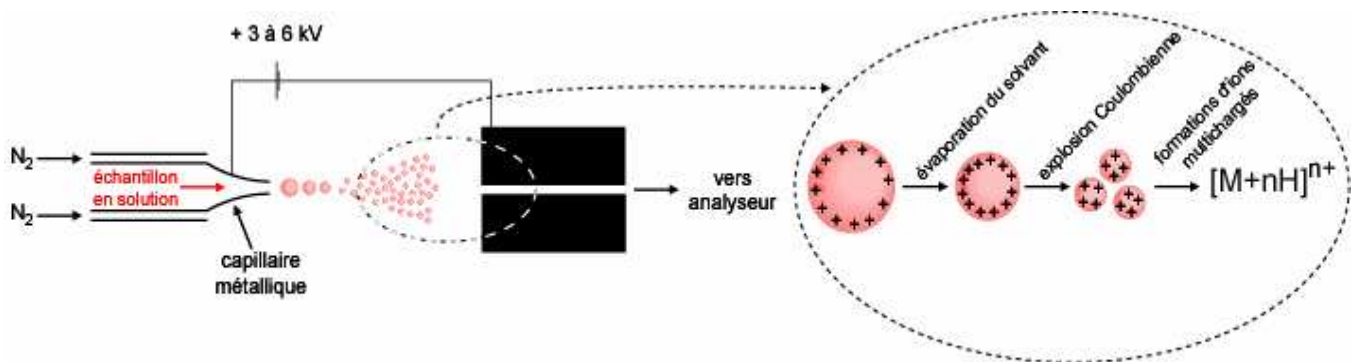


Figure 29 : Principe de l'ionisation par Electrospray (ESI). Un échantillon en solution est porté à un haut potentiel électrique lors de son passage à travers un capillaire métallique. Sous l'effet du champ électrique et du pompage, les gouttelettes chargées sont dirigées vers l'analyseur. Au cours de ce vol, les gouttelettes sont désolvatées créant une accumulation de charge à leur surface. Lorsque la densité de charge devient trop grande, les gouttelettes explosent jusqu'à la formation d'espèces désolvatées et multichargées. En mode nanospray, le débit d'échantillon à travers le capillaire n'est plus que de 20-200 nL / min contre 0,02-1 mL / min en électrospray. Le voltage au capillaire est moindre (1,3 à 3 kV) et le flux d'azote aidant à la désolvatation et à la focalisation du spray n'est plus nécessaire.

b) Identification par séquençage peptidique en mode LC ESI-MS/MS

i) *Principe général de l'électrospray*

Une solution d'échantillon dans un solvant organique est introduite dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique (plusieurs kilovolts) (voir figure 29). Le champ électrique intense appliqué en sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes qui est acheminé vers l'analyseur. Au cours de ce transport, en raison de l'évaporation du solvant, la densité de charge des gouttelettes s'accroît. Lorsque celle-ci devient trop élevée, les gouttelettes se fragmentent par explosions coulombiennes successives jusqu'à l'obtention d'ions multichargés et désolvatés.

Une amélioration de la technique d'électrospray a été introduite avec la miniaturisation du système appelée le nanospray. Cette nouvelle source a été redessinée pour être adaptée à des débits de l'ordre de 20-200 nL/min en sortie de nanoLC. Dans ce nouveau système, l'aiguille consiste en un capillaire de très faible diamètre interne. Du fait du faible débit, le voltage appliqué au capillaire est également réduit. La technique de nanospray permet d'augmenter la sensibilité, d'améliorer la stabilité du spray et d'utiliser des solvants aqueux.

ii) *Séquençage par spectrométrie de masse en tandem LC ESI-MS/MS*

Cette fois l'identification ne repose plus sur l'empreinte peptidique de la protéine mais sur le séquençage sélectif de plusieurs peptides de cette protéine. Après un premier balayage en mode MS, certains peptides sont alors analysés en mode MS/MS. Les peptides tryptiques ionisés au niveau de la source du spectromètre de masse entrent dans un premier analyseur dont le rôle est de sélectionner un ion dit « parent ». Ce dernier est ensuite fragmenté dans une chambre de collision pour produire des ions fragments appelés ions « fils ». La fragmentation de l'ion « parent » en ions « fils » n'est pas dictée par le hasard mais se fait avec une certaine sélectivité, préférentiellement au niveau du squelette carboné, les liaisons les plus fragiles d'un peptide. Ainsi, la spectrométrie de masse en tandem fournit une information de séquence sur un ou plusieurs peptides permettant d'identifier la protéine dont ils découlent par comparaison avec les fragmentations préférentielles *in silico* des protéines contenues dans les banques de données.

Une source MALDI permet aussi de réaliser de la spectrométrie de masse en tandem, par exemple avec un appareil de type MALDI TOF-TOF. De plus il existe désormais la possibilité de coupler une source MALDI avec une LC (stratégie de type LC-MALDI TOF-TOF) (Wall et al., 2002). Cependant à l'heure actuelle, le couplage de la LC avec un spectromètre de masse à

ionisation électrospray reste plus répandu dans les laboratoires. Dans tous les cas, l'avantage majeur du couplage avec une LC réside en sa capacité à séparer les peptides ce qui simplifie l'analyse de mélanges de protéines.

4- Bioinformatique

La bioinformatique est l'outil essentiel pour l'interprétation des données fournies par la MS. Elle a contribué à l'essor de la protéomique en augmentant de façon considérable la vitesse et la qualité d'analyse des données. Bien évidemment, la bioinformatique ne se limite pas à l'identification des protéines mais catalogue de nombreuses informations sur les protéines : localisation du gène, fonctions, interactions, domaines, modifications post-traductionnelles, profil d'expression etc. Dans ce chapitre j'aborderai succinctement quelques banques de données et la façon de les interroger.

a) Les banques de données protéiques

Les banques de données ont particulièrement bénéficié du séquençage et de l'annotation du génome de nombreux organismes. Il existe deux grands types de banques. D'abord les banques dites répertoires qui sont redondantes et ne listent que les séquences protéiques en ne fournissant que peu d'informations subsidiaires (ex : NCBI, GenPept). Puis il existe des banques moins redondantes, enrichies de multiples informations (ex : PIR, Swiss-Prot, TrEMBL) (Apweiler et al., 2004).

Swiss-Prot et PIR (Protein Information Resource) sont des banques non redondantes additionnées de nombreuses informations fonctionnelles et bibliographiques. Les séquences soumises à Swiss-Prot sont particulièrement contrôlées, ce qui la rend de haute qualité mais aussi plus pauvre en séquences. TrEMBL est la traduction annotée puis compilée de toutes les séquences nucléotidiques codées contenues dans la DDBJ / EMBL / GenBank (DNA Data Bank of Japan / European Molecular Biology Database / GenBank) (Apweiler et al., 2004).

La banque NCBI compile les sources provenant de la traduction des séquences nucléotidiques de la DDBJ / EMBL / GenBank de même que des séquences de Swiss-Prot, PIR etc. Généralement, l'identification d'une protéine commence en interrogeant une banque non redondante et bien annotée telle que Swiss-Prot. S'il n'y a pas d'identification, une banque moins restrictive comme TrEMBL pourra être interrogée.

b) Interrogation des banques de données

L'interrogation se fait à l'aide de logiciels d'identification (Mascot, Protein Prospector, etc.) faisant le lien entre les données acquises par spectrométrie de masse et les banques de données. Ces logiciels diffèrent par le format d'entrée des données expérimentales et le mode de calcul du score. Outre les masses expérimentales des peptides, plusieurs paramètres sont pris en compte pour l'interrogation des banques de données et pour le calcul du score des candidats protéiques, j'en évoquerai seulement quelques-uns :

- **L'identité de l'enzyme de restriction** est un critère majeur puisque d'elle dépend la nature des digests protéiques *in silico*. De plus, zéro, un ou deux sites de clivage possiblement manqués par peptide peut être précisé.
- **La « provenance » de l'échantillon** permet de réduire l'interrogation aux protéines d'un organisme : humain, levure etc.
- **Des modifications** éventuelles affectant les peptides telles que des phosphorylations, oxydation des méthionines ou acétylation amino-terminale peuvent être indiquées. De même des modifications obligatoires comme la carbamidométhylation des cystéines réalisée par l'expérimentateur en amont de l'analyse par spectrométrie de masse peuvent être précisées. Cette dernière modification permet de « dérouler » la protéine et ainsi accroître l'accès de la trypsine aux sites de coupure.
- Un **critère de tolérance** entre la masse expérimentale du peptide et sa masse théorique doit être spécifié. La tolérance accordée dépend du mode de calibration interne / externe du spectromètre de masse lors de l'acquisition des spectres et de la précision intrinsèque liée à la géométrie de l'instrument utilisé.

L'interrogation des banques de données après une analyse en MS/MS est réalisée de façon similaire en prenant en compte comme critère principal l'information séquentielle qui en découle. En général, la géométrie du spectromètre de masse utilisé est précisée puisque d'elle dépend le type d'ions fils générés en MS/MS.

Il n'existe pas de critères généraux de validation de l'identification d'une protéine suite à l'interrogation des banques de données. Cette validation est réalisée par l'expérimentateur lui-même qui peut prendre en compte, entre autres, le score attribué par le logiciel d'identification, l'ensemble

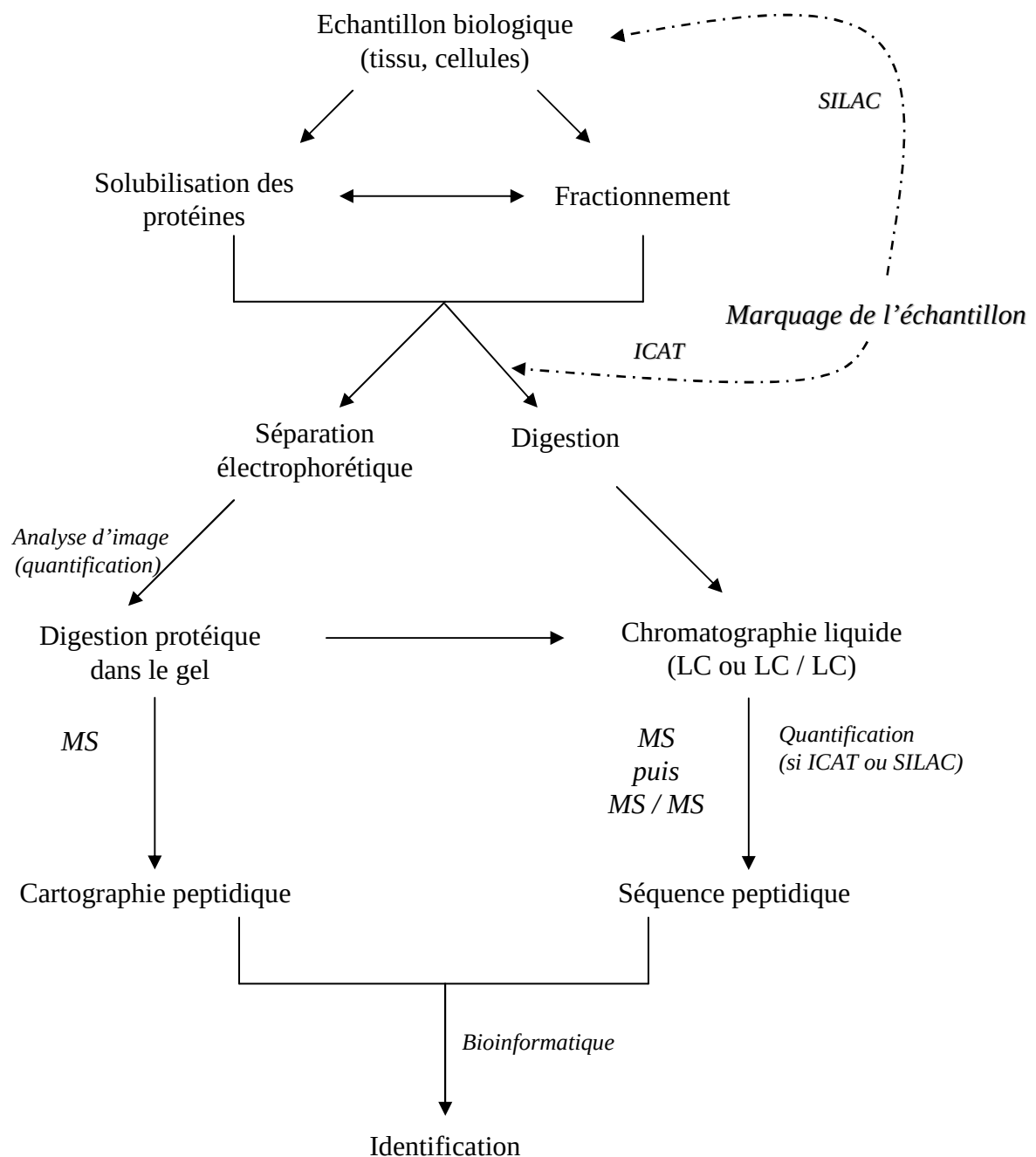


Figure 30 : Stratégies couramment mises en œuvre dans une étude de type protéomique différentielle. ICAT (Isotope Coded Affinity Tags), LC (chromatographie liquide), LC / LC (chromatographies liquides en tandem), MS (spectrométrie de masse), MS / MS (spectrométrie de masse en tandem), SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture).

de la liste des résultats générés par l'interrogation, l'adéquation entre les points isoélectriques / masses expérimentales et théoriques de la protéine identifiée etc.

Après ce descriptif sur les étapes incontournables dans une étude protéomique, voyons plus spécifiquement le rôle de la protéomique différentielle, sa mise en œuvre et ses applications qui sont parmi les plus nombreuses dans le domaine de la protéomique.

C. Protéomique différentielle

La protéomique différentielle consiste à comparer deux protéomes: cellules traitées par un agent quelconque *versus* non traitées, tissu sain *versus* tissu malade etc. Concrètement l'objectif est d'identifier des modifications d'expression de protéines (plus abondantes ou moins abondantes) ou des modifications post-traductionnelles entre les deux protéomes. Puis l'idée est d'associer ces modifications avec des perturbations physiologiques ou des états physiopathologiques pour des applications médicales particulièrement nombreuses. En cancérologie, il peut s'agir de trouver des marqueurs les plus spécifiques possibles de la maladie. Par exemple les cancers pancréatiques et colorectaux manquent cruellement de marqueurs précoces de la maladie, or un diagnostic précoce est primordial pour augmenter les chances de survie du patient (Alfonso et al., 2005; Chen et al., 2005). Certains marqueurs permettent aussi d'estimer l'évolution de la maladie (Duggan et Williamson, 2004) et d'aider le médecin dans le choix du traitement le mieux adapté à la pathologie (Liu et al., 2006). Une autre application de la protéomique différentielle consiste aussi à identifier une ou plusieurs cibles protéiques associées à un phénomène biologique ou encore à une maladie. Dans ce dernier cas, l'objectif est souvent double : mieux appréhender les bases moléculaires de la pathologie et trouver une cible pharmacologique (Li et al., 2006; Unwin et al., 2005).

Globalement, pour réaliser une étude de protéomique différentielle, deux approches standard s'offrent à l'expérimentateur : i) la première passe par la quantification au niveau du spectromètre de masse et nécessite le marquage préalable des protéines ou des peptides ii) la seconde passe par une quantification par coloration des protéines puis analyse d'image le plus souvent après une séparation par 2-DE (voir figure 30).

1- Première approche : quantification au niveau du spectromètre de masse

Cette première approche de protéomique différentielle passe en général par une stratégie de type LC-MS/MS ou LC/LC-MS/MS et nécessite un marquage de l'échantillon avant l'étape de séparation (voir figure 30). Ce marquage est, en effet, indispensable pour la quantification relative des peptides par spectrométrie de masse car le signal MS n'est pas quantitatif de façon intrinsèque.

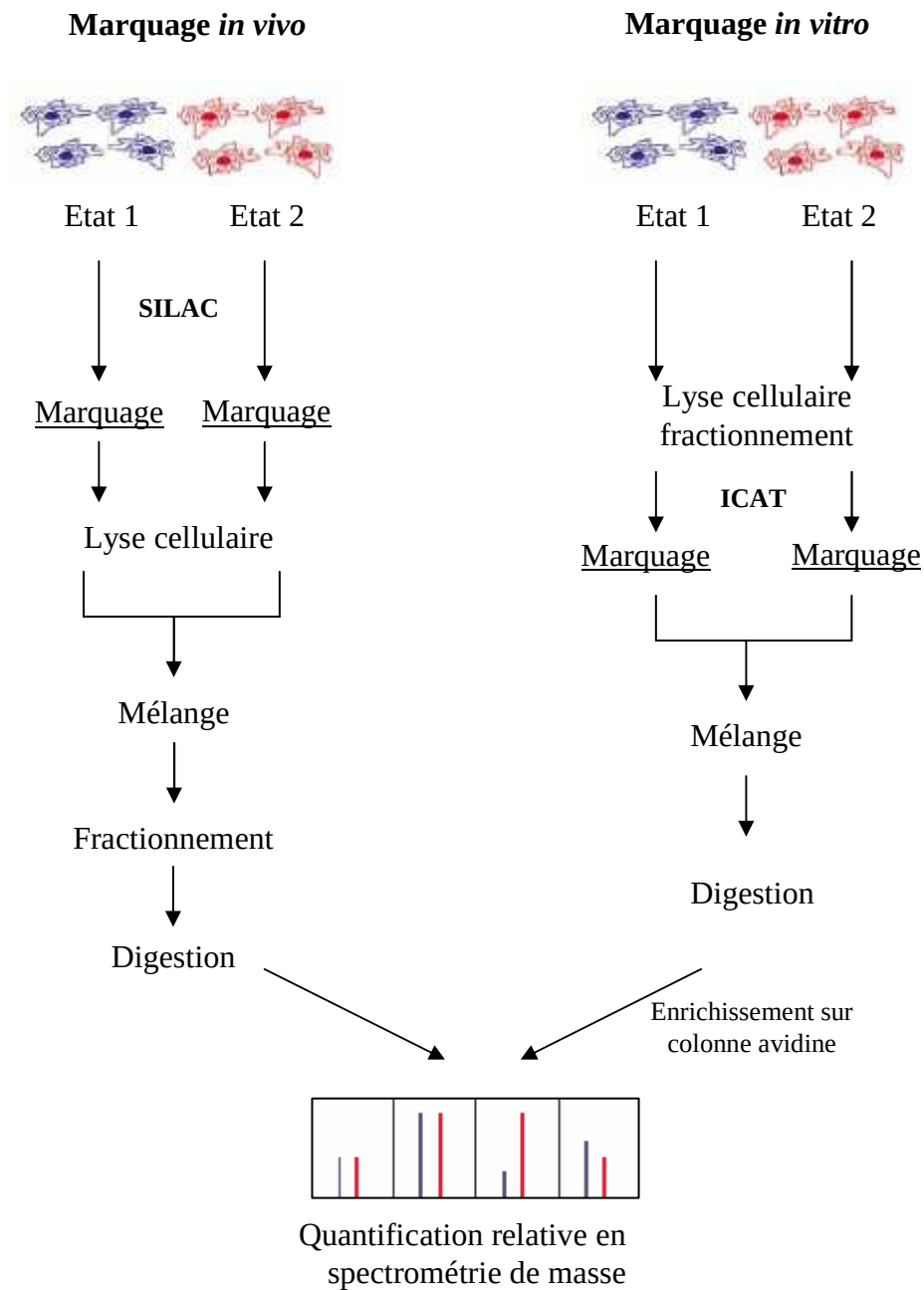


Figure 31: Stratégies couramment mises en œuvre pour une quantification protéique par marquage SILAC et ICAT. ICAT (Isotope Coded Affinity Tags), SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture).

La stratégie la plus courante consiste à marquer différemment les deux échantillons à comparer avec un isotope stable léger *versus* lourd qui induit un incrément de masse suffisant pour être détecté en spectrométrie de masse. Les deux échantillons ainsi marqués peuvent alors être analysés simultanément en mode MS. Le rapport des aires des pics mesurées par MS pour chaque couple peptidique (qui co-élue en sortie de LC) traduit alors le rapport relatif de la quantité de la protéine dans les deux échantillons (voir figure 31). Selon la stratégie utilisée, le marquage isotopique peut se faire *in cellulo* (ex : SILAC pour Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture, marquage N^{14} / N^{15}) ou *in vitro* (ex : ICAT pour Isotope Coded Affinity Tags, eau lourde / légère) (Sechi et Oda, 2003).

a) Marquage par le réactif ICAT

Le réactif ICAT est certainement le tag ou l'étiquette moléculaire le plus communément utilisé pour réaliser une étude de protéomique différentielle depuis sa commercialisation sous forme de kit par *Applied Biosystems* en l'an 2000. Les réactifs ICAT sont constitués de trois parties : i) une partie réactive qui permet de lier de façon covalente le réactif aux cystéines d'une protéine ii) une région linker qui porte la partie isotopique C^{12} *versus* C^{13} iii) une région biotine (potentiellement clivable) qui permet la purification sur colonne avidine des peptides ou protéines marqués (Leitner et Lindner, 2004).

La procédure générale consiste à marquer les deux échantillons protéiques à comparer avec l'ICAT léger *versus* lourd. Les deux échantillons peuvent ensuite être combinés. Après digestion des protéines par la trypsine, les peptides marqués sont purifiés sur colonne avidine réduisant par l'occasion la complexité de l'échantillon à analyser. La région biotine peut alors être clivée. Enfin, les peptides purifiés sont analysés en LC-MS/MS pour être quantifiés en mode MS et identifiés par MS/MS (voir figure 31).

Outre sa sensibilité, l'intérêt majeur de la stratégie ICAT est son applicabilité à toute sorte d'échantillons biologiques et notamment les tissus (Cheng et al., 2006; Schrimpf et al., 2005). Elle est par ailleurs aussi adaptée à une quantification relative des protéines après séparation sur 2-DE (Froment et al., 2005). Ses inconvénients principaux résident non seulement dans sa mise au point difficile mais aussi dans la seule analyse des protéines contenant au moins une cystéine. Chez l'homme, 80 % des protéines contiennent au moins une cystéine (Leitner et Lindner, 2004).

b) Marquage SILAC

Une alternative à l'utilisation des étiquettes ICAT est la méthode SILAC de marquage des protéines *in cellulo* (voir figure 31). Le principe consiste à cultiver deux groupes de cellules dans

Tableau 6 : Propriétés des principaux colorants fluorescents disponibles sur le marché. Le seuil de sensibilité donné correspond à celui indiqué dans les références.

* la sensibilité dépend du degré de glycosylation (Pro-Q Emerald) ou de phosphorylation (Pro-Q Diamond) de la protéine.

Colorant fluorescent	Spécificité	Sensibilité	Référence
SYPRO Orange / Red	protéome total	1 à 10 ng	Steinberg TH <i>et al</i> , 1996
SYPRO Ruby	protéome total	1 ng	Berggren KN <i>et al</i> , 2002
Deep Purple	protéome total	100 pg	Mackintosh JA <i>et al</i> , 2003
Pro-Q Emerald	glycoprotéome	5 à 18 ng*	Hart C <i>et al</i> , 2003
Pro-Q Diamond	phosphoprotéome	2 à 10 ng*	Steinberg TH <i>et al</i> , 2003

deux milieux de culture se distinguant uniquement par la présence d'un acide aminé léger *versus* lourd qui sera assimilé par le protéome (Ong et al., 2003). Par la suite, la quantification des peptides de digestion se fait en mode MS de façon similaire que pour la méthode ICAT. Cependant, le volume de données est supérieur puisque la cystéine, le résidu ciblé par les ICAT, est l'un des acides aminés les moins abondants. Ainsi, la méthode SILAC fournit-elle une plus grande couverture de séquence de l'ensemble du protéome ce qui peut être à la fois un avantage et un inconvénient. Par exemple, cela rend possible l'étude des modifications post-traductionnelles (Bose et al., 2006; Zhang et al., 2006) qui sont par contre souvent perdues par la méthode ICAT si elles n'affectent pas un peptide contenant une cystéine. Cependant, cette grande couverture de séquence engendre une énorme quantité de données complexes à compiler, rendant parfois utile le fractionnement (Ong et al., 2003). Enfin, l'inconvénient majeur de la stratégie SILAC est sa limitation à l'étude du protéome de cellules en culture.

2- Seconde approche : quantification après électrophorèse

Malgré l'avènement de méthodes performantes permettant de réaliser une analyse quantitative après séparation du protéome par LC, la 2-DE reste une méthode de choix largement employée dans l'accomplissement d'une étude de protéomique différentielle (Gorg et al., 2004; Herbert et al., 2001). Après séparation des protéomes par 2-DE, la stratégie consiste à révéler les protéines avec le colorant adéquat. Après numérisation des gels d'électrophorèse, une analyse d'image permet de mesurer les volumes (*densité optique x surface*) de chaque couple (traité *versus* non traité) de spots protéiques. Le rapport volumique de chaque couple traduit alors le rapport relatif existant à l'origine dans les échantillons comparés. Le tout couplé à une analyse statistique permet la détection des spots d'intérêt qui sont ultérieurement identifiés par MS.

a) Révélation des protéines

Plusieurs techniques de révélation des protéines présentes dans un gel d'acrylamide existent. Le colorant idéal doit être sensible avec un faible rapport signal sur bruit, doit avoir une large gamme dynamique linéaire pour relier l'intensité de coloration avec l'abondance de la protéine, doit être facile à mettre en œuvre, compatible avec la spectrométrie de masse et peu coûteux. Malheureusement, aucun colorant ne possède l'ensemble de ces propriétés. Ainsi, le choix de la coloration est crucial. Il est souvent le résultat d'un compromis entre sensibilité, compatibilité avec la spectrométrie de masse et coût. En protéomique, trois colorations sont couramment utilisées : le bleu de coomassie colloïdal, le nitrate d'argent, et les colorants fluorescents.

i) Colorants visibles

La coloration au bleu de coomassie colloïdal G250 est compatible avec la MS, facile à mettre en œuvre, reproductible du fait qu'il s'agit d'une coloration à l'équilibre, et peu coûteuse. Cependant la limite de détection est de l'ordre de 10 ng ce qui peut s'avérer trop faible si l'on s'intéresse à des protéines faiblement exprimées (Jin et Choi, 2004; Westermeier et Marouga, 2005).

L'avantage majeur de la coloration au nitrate d'argent réside dans sa grande sensibilité jusqu'à moins de 1 ng de protéines selon le protocole utilisé. Sa reproductibilité, certes plus faible que le bleu de coomassie colloïdal, permet tout de même une quantification des spots révélés (Rabilloud, 2000). Ses principaux inconvénients concernent sa faible gamme de linéarité et sa faible compatibilité avec la spectrométrie de masse même si encore une fois, l'identification reste possible en fonction du protocole de coloration (Shevchenko et al., 1996).

ii) Colorants fluorescents

Il existe aujourd'hui toute une gamme de colorants fluorescents commercialisés sous le nom de *Sypro* (*Orange, Red, Ruby* etc.). Ces colorants ont une sensibilité du même ordre que le nitrate d'argent, une plus grande gamme de linéarité que les colorants visibles et sont complètement compatibles avec la MS (voir tableau 6). Ils sont donc très intéressants pour les analyses quantitatives (Berggren et al., 2002; Steinberg et al., 1996). Cependant, les *Sypro* génèrent de nombreux grains artéfacts lors de la révélation des gels d'électrophorèse complexifiant par conséquent l'étape d'analyse d'image. Un autre colorant fluorescent le *Deep Purple* qui apparaît encore plus sensible (environ 100 pg de protéines) fournit, quant à lui, des images de meilleure qualité (Mackintosh et al., 2003).

Enfin, je citerai les colorants fluorescents Pro-Q emerald (Hart et al., 2003) et Pro-Q diamond (Steinberg et al., 2003) commercialisés, quant à eux, pour révéler de façon spécifique respectivement le glycoprotéome et le phosphoprotéome. Ces colorants présentent l'avantage de pouvoir être compatibles avec une révélation ultérieure du protéome total permettant une analyse globale et séquentielle des multiples protéomes cellulaires. Malgré les fortes potentialités de ces colorants pour des applications protéomiques, peu de travaux relatent encore l'usage de ces colorants fluorescents (Davis et al., 2006; Kanninen et al., 2004; Unwin et al., 2005), peut-être du fait de leur relative nouveauté.

De façon générale, l'inconvénient majeur des colorants fluorescents réside dans l'investissement lourd qu'ils représentent, aussi bien concernant leur propre tarif que le prix d'achat des scanners indispensables à leur usage. Par ailleurs, les protéines étant invisibles à l'oeil nu,

l'extraction manuelle à partir du gel des spots d'intérêt est plus laborieuse. Pour ces raisons financières et pratiques, les colorants visibles restent à l'heure actuelle toujours couramment utilisés en protéomique.

iii) *La 2D-DIGE (Differential In-Gel Electrophoresis)*

La 2D-DIGE est une technique utilisant des fluorophores de type Cyanine 3 ou 5 (Cy3 ou Cy5) qui se lient spécifiquement et de façon covalente au groupe amine ϵ des lysines (Monteoliva et Albar, 2004). Les Cy3 et Cy5 ont des propriétés spectrales différentes ce qui permet de visualiser l'émission de leur fluorescence indépendamment l'une de l'autre. La procédure générale de la 2D-DIGE est comme suit (voir figure 32). Les deux échantillons à comparer sont marqués avec la Cy3 *versus* la Cy5 (avec un rendement du marquage d'environ 3 %) puis mélangés et séparés sur une même 2-DE. Les Cy3 et Cy5 ayant la même masse et la même charge, les protéines marquées possèdent donc en théorie la même mobilité électrophorétique. Puis, les spots fluorescents sont visualisés alternativement (sans étape de coloration) en utilisant les longueurs d'onde d'excitation adéquates. La disponibilité d'une troisième cyanine (Cy2) permet de recourir au marquage d'un troisième échantillon souvent utilisé comme étalon interne (Monteoliva et Albar, 2004; Van den Bergh et Arckens, 2004).

La 2D-DIGE offre en plus des avantages liés au marquage fluorescent, la possibilité de séparer deux échantillons sur le même gel éliminant par conséquent les variations techniques (différence de charge en protéines, profil de migration, homogénéité de coloration etc.) qui accompagnent la mise en œuvre de deux gels. De plus, la possibilité d'introduire un étalon interne pour chaque spot augmente la précision de la quantification (Monteoliva et Albar, 2004; Van den Bergh et Arckens, 2004).

En plus de son coût de mise en œuvre, l'un des inconvénients de la DIGE réside dans le retard de migration, notamment pour les protéines de faible masse, entre les protéines marquées (environ 3 %) et les protéines non marquées. Ainsi, chaque spot est représenté deux fois. Le spot marqué étant en minorité, l'excision du spot d'intérêt nécessite en général une coloration du gel pour le situer (Van den Bergh et Arckens, 2004; Wheelock et al., 2006).

b) *Analyse d'image*

Comme indiqué précédemment l'analyse d'image conduit à la détection des spots présentant un différentiel entre les protéomes comparés et qui seront par conséquent soumis à une identification par MS.

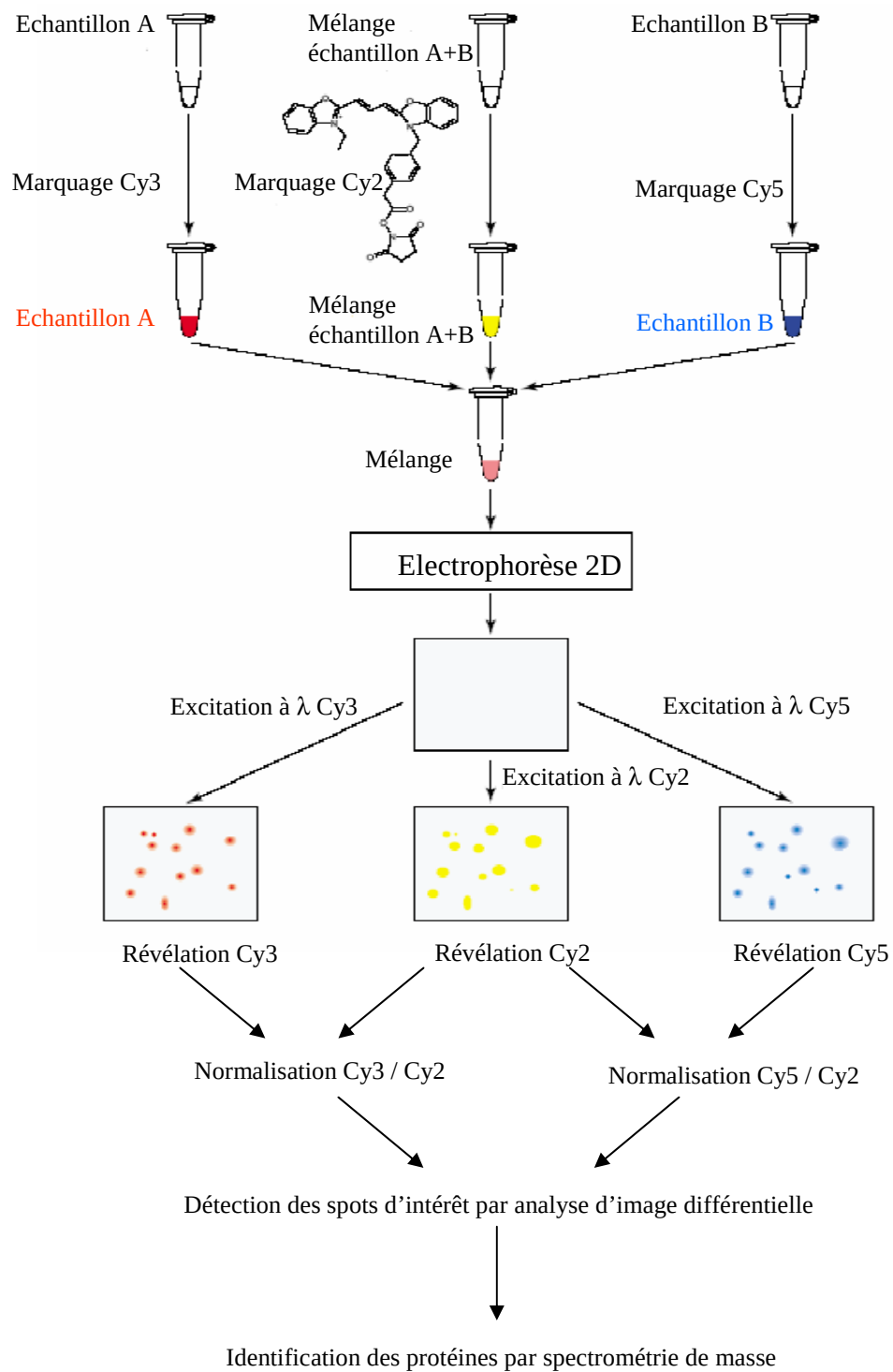


Figure 32: Procédure générale de la 2-D DIGE par l'utilisation d'un standard interne et de trois fluorophores. D'après Van der Bergh *et al*, 2004.

La première étape consiste à convertir le gel en un format numérisé à l'aide d'un scanner. L'analyse d'image proprement dite est réalisée à l'aide d'un logiciel. Il en existe plusieurs sur le marché. Certains comme *Image Quant* d'Amersham et *Quantity One* de Bio-Rad sont destinés à l'analyse de profils en une dimension, d'autres comme *Image Master 2D / Mélanie* d'Amersham, *PDQuest* de Bio-Rad ou *Progenesis* de Nonlinear Dynamics aux profils en deux dimensions. Ces logiciels diffèrent par le mode d'interaction avec l'utilisateur mais possèdent globalement les mêmes fonctionnalités. La procédure générale est comme suit :

- La première étape de l'analyse consiste à « **nettoyer** » **l'image** de ses imperfections (grains de coloration par exemple) et à définir le bruit de fond du gel. Cette étape est automatisée et nécessite peu d'interventions de l'utilisateur.
- La **détection des spots** (2D) ou des bandes protéique (1D). Il s'agit de l'étape la plus cruciale de l'analyse puisque la précision et la fiabilité des résultats dépendent de l'exactitude de cette détection. Une bonne détection consiste en la capacité de l'algorithme du logiciel à séparer deux spots adjacents, délimiter leurs frontières correctement quelques soient leurs formes et intensités et à discriminer les vrais des faux spots. La performance de la détection automatique dépend de la qualité des gels d'électrophorèse en termes de résolution / coloration et de la complexité de l'échantillon. Cependant, bien qu'automatisée, cette étape requiert en général une longue intervention manuelle de l'utilisateur pour améliorer la précision de la détection. Effectivement, les algorithmes ne sont pas encore suffisamment puissants devant l'hétérogénéité de formes, d'intensités et de qualité de séparation des spots sur l'ensemble de l'électrophorèse. Ainsi, même si les algorithmes des logiciels sont continuellement améliorés, une détection précise totalement automatique des spots n'est pas encore à l'ordre du jour pour des échantillons complexes (Englbrecht et Facius, 2005; Gorg et al., 2004).
- La **superposition des gels** plus communément appelée sous son anglicisme : « **matching** ». Il s'agit pour le logiciel d'apparier l'ensemble des spots équivalents des gels analysés pour former des groupes de spots. Cette étape permet de voir par exemple si un spot apparaît, disparaît ou change de place en fonction l'échantillon. La qualité du « **matching** » dépend de la qualité de la détection des spots mais aussi, encore une fois de celle des gels. Les algorithmes des logiciels sont malgré tout

capables de corriger d'éventuelles distorsions des gels avec un minimum d'intervention de l'utilisateur.

- **Quantification des spots.** L'abondance d'un spot est représentée par son volume qui est le produit de sa densité optique par sa surface. La qualité de la quantification dépend bien évidemment d'une délimitation précise et homogène des spots sur l'ensemble des gels mais aussi de la capacité du logiciel à donner une réponse linéaire entre volume réel et volume quantifié sur une large gamme de volumes (Rosengren et al., 2003). Afin de s'affranchir au maximum de la variabilité technique inhérente à la 2-DE (différence de charge en protéines, homogénéité de la coloration etc.), le volume de chaque spot est normalisé par rapport à la somme des volumes de l'ensemble des spots détectés.

$$\text{Volume spot (i) normalisé} = \text{volume spot (i)} / \sum_n^i \text{volumes n spots.}$$

L'interprétation des données est effectuée sur ce volume normalisé des spots.

- **Interprétation des données.** L'extraction des données peut être réalisée par le logiciel sous différentes formes : tableaux chiffrés, histogrammes etc. Une analyse statistique est ensuite indispensable pour détecter les spots dont le volume varie de façon significative (valeur $p < 0,05$) entre les deux échantillons comparés. Plus l'expérience sera reproduite plus le nombre de faux négatifs et de faux positifs sera faible. Selon Molloy *et al* (Molloy et al., 2003), pour être capable de générer des résultats significatifs, une étude quantitative sur un échantillon biologique relativement simple comme une lignée cellulaire nécessite d'être reproduite trois à quatre fois contre huit pour un tissu ou une culture primaire de cellules.

Des travaux cherchant à comparer entre eux la puissance de certains logiciels d'analyse d'image ont révélé peu de différences en terme de performance globale (Raman et al., 2002; Rosengren et al., 2003). Cependant, les logiciels étant continuellement mis à jour, on ne sait pas à l'heure actuelle si l'un d'eux est plus performant. En tous les cas, ces travaux suggèrent que la qualité de l'analyse d'image dépend notamment de celle des gels bidimensionnels et que l'utilisateur joue un rôle actif dans cette analyse.

D. Analyse du phosphoprotéome

La phosphorylation constitue probablement la modification post-traductionnelle la plus courante. A un instant donné, on estime qu'un tiers (Raggiaschi et al., 2005) voire la moitié (Reinders et Sickmann, 2005) des protéines sont phosphorylées. La phosphorylation est une modification covalente qui affecte très majoritairement les résidus sérine / thréonine / tyrosine (O-phosphate) mais aussi dans une moindre mesure d'autres acides aminés comme les hydroxyprolines (O-phosphate), lysines, histidines (N-phosphate) ou cystéines (S-phosphate) (Reinders et Sickmann, 2005). Les phosphorylations sont des modifications réversibles dont la liaison est assurée par diverses kinases, sur des séquences consensus. L'élimination des groupements phosphate est assurée, quant à elle, par des phosphatases. Ainsi le phénomène de phosphorylation-déphosphorylation reflète particulièrement bien la dynamique du protéome (Mukherji, 2005). L'état de phosphorylation d'une protéine est impliqué dans la régulation de processus fonctionnels aussi divers que sa localisation cellulaire, ses interactions avec d'autres protéines, son activité, son repliement, sa dégradation etc. Ainsi de part cette variété, les phosphorylations ont une influence prépondérante dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation du cycle cellulaire ou la transduction du signal, faisant de la phosphorylation la modification post-traductionnelle la plus étudiée (Reinders et Sickmann, 2005).

L'étude du phosphoprotéome consiste à identifier les modulations de l'état de phosphorylation des protéines ou encore à cartographier les sites de phosphorylation le long de la séquence protéique. Dans ce chapitre, je n'évoquerai que les méthodes les plus courantes d'analyse du phosphoprotéome après séparation par 2-DE.

1- Enrichissement en phosphoprotéines

De nombreuses protéines de signalisation sont faiblement exprimées dans la cellule et la fraction protéique phosphorylée est souvent relativement faible (1 à 2 % de la protéine totale) (Kalume et al., 2003; Reinders et Sickmann, 2005). Ainsi, afin d'augmenter la sensibilité de l'analyse des phosphoprotéines, il est parfois utile de procéder à leur enrichissement. Voyons quelques méthodes d'enrichissement des phosphoprotéines :

- **Immunoprécipitation.** Cette méthode est souvent limitée (mais pas exclusivement (Gronborg et al., 2002)) à l'enrichissement des protéines phosphorylées sur un résidu tyrosine en raison de la moins bonne spécificité des anticorps anti-phospho thréonine / sérine (Kalume et al., 2003; Raggiaschi et al., 2005; Reinders et Sickmann, 2005). Le champ d'investigation est alors rétréci puisque le ratio de phosphorylation des

protéines sur une sérine / thréonine / tyrosine serait respectivement de 1800 / 200 / 1 (Gronborg et al., 2002).

- **Colonne d'affinité.** Les colonnes de type IMAC (pour Immobilized Metal Affinity Chromatography) permettent d'enrichir assez simplement l'ensemble des phosphoprotéines / peptides (chargés négativement) par chromatographie d'affinité en utilisant des cations métalliques (Fe^{3+} , Ga^{3+} , Al^{3+} ...) immobilisés. La limite de cette technique réside dans sa spécificité puisque des protéines ou peptides riches en résidus acides peuvent également être retenus par la colonne tandis que d'autres, faiblement phosphorylés, peuvent être élués. Cette méthode, compatible par la suite avec une analyse de type LC-MS ou MALDI-TOF, est majoritairement utilisée pour l'enrichissement de peptides phosphorylés (Raggiaschi et al., 2005; Reinders et Sickmann, 2005).
- **Modification chimique.** La stratégie consiste à modifier spécifiquement les protéines ou peptides phosphorylés pour leur ajouter une étiquette ou les immobiliser de façon covalente sur une colonne avant de les éluer. Plusieurs méthodes ont été décrites (Reinders et Sickmann, 2005). La plupart inclut une β élimination du phosphate lié sur une sérine ou thréonine pouvant affecter également les résidus O-glycosylés, générant de faux positifs (Mukherji, 2005; Reinders et Sickmann, 2005). Dans tous les cas, ces modifications chimiques nécessitent une succession de réactions pouvant accroître la complexité de l'échantillon ou causer la perte de l'information recherchée par l'occurrence de réactions parasites ou incomplètes (Reinders et Sickmann, 2005).

Eventuellement enrichies, les phosphoprotéines sont séparées par 2-DE de façon équivalente à tout autre échantillon.

2- Stratégies de détection des protéines phosphorylées après séparation par 2-DE

a) Western-blot

Bien que sensible et applicable à des tissus (Kim et al., 2005), cette méthode nécessite la disponibilité d'anticorps spécifiques. Or comme indiqué précédemment, les anticorps universels anti-phospho sérine / thréonine ne sont pas encore suffisamment validés. Enfin et surtout, la

technique de western-blot requiert une étape de transfert des protéines sur une membrane accroissant du même coup la variabilité de la méthode (Raggiaschi et al., 2005).

b) Marquage isotopique au ^{32}P (ou ^{33}P)

Le marquage isotopique au ^{32}P est l'une des plus vieilles méthodes pour révéler les phosphoprotéines. L'incorporation du ^{32}P par les protéines se fait en cultivant les cellules dans un milieu marqué. Outre sa grande sensibilité et son utilisation possible *in vivo* (Reinders et Sickmann, 2005), l'avantage de cette méthode réside dans sa capacité à révéler toutes les phosphoprotéines. Cependant, la manipulation du ^{32}P est contraignante pour la sécurité de l'utilisateur. Par ailleurs, le marquage au ^{32}P induit de nombreux effets cellulaires parasites comme la fragmentation de l'ADN ou la modification du cycle cellulaire (Raggiaschi et al., 2005; Reinders et Sickmann, 2005). Enfin, l'intensité du marquage varie en fonction du temps d'incubation des cellules avec le ^{32}P ainsi que du turnover des phosphoprotéines (Chen et al., 2004).

c) Coloration au Pro-Q diamond

Le Pro-Q diamond est un colorant fluorescent commercialisé pour révéler les protéines phosphorylées sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine. Bien que moins sensible que l'immunorévélation et le marquage ^{32}P , il permet tout de même la détection de 2 à 10 ng de protéines en fonction de leur degré de phosphorylation (Steinberg et al., 2003). Les premiers travaux expérimentant le Pro-Q diamond montrent que le profil de spots obtenu est particulièrement différent de celui obtenu avec un colorant révélant le protéome total aussi bien après une séparation sur gel bidimensionnel (Steinberg et al., 2003; Unwin et al., 2005; Wang et al., 2005c) que monodimensionnel (Schulenberg et al., 2003). Qui plus est, de nombreuses protéines colorées par le Pro-Q diamond sont connues pour être phosphorylées (Davis et al., 2006; Hayduk et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère donc une bonne spécificité du Pro-Q diamond pour les phosphoprotéines faisant de lui un bon outil pour étudier les voies de transduction du signal aussi bien au sein d'un tissu (Davis et al., 2006) que de cellules en culture (Unwin et al., 2005).

Dans le chapitre suivant de ce manuscrit j'évoquerai comment la protéomique différentielle a déjà permis d'identifier des adaptations moléculaires à un traitement chronique par la morphine pour ensuite définir les objectifs de mon travail de thèse.

V. Objectifs de mon travail de thèse

A. La protéomique pour l'étude des effets chroniques de la morphine

La dépendance à la morphine est un phénomène complexe associé à des changements physiologiques et structuraux notamment au niveau des régions du cerveau impliquées dans le système de la récompense : noyau accumbens, aire tegmentale ventrale, cortex préfrontal etc. Une telle plasticité au niveau de ces réseaux neuronaux ne peut s'expliquer que par des changements moléculaires trouvant leur origine dans le traitement par la drogue. Certains d'entre eux sont déjà bien identifiés comme l'induction du facteur de transcription Δ FosB ou la sensibilisation de la voie de l'AMPC (Lane-Ladd et al., 1997; Nestler, 2005; Zachariou et al., 2006). Cependant une vision plus large des modifications moléculaires induites par la drogue dans les régions du cerveau critiques pour la dépendance à la morphine fait toujours défaut. C'est dans ce cadre précis que la protéomique différentielle apparaît, à la vue des précédents chapitres, particulièrement adéquate pour ouvrir de nouvelles pistes concernant les adaptations moléculaires à une drogue.

De façon surprenante, le premier travail faisant appel à une telle stratégie pour l'étude de l'effet d'une drogue n'a été publié qu'en 2004 avec une analyse différentielle des protéines phosphorylées sur une tyrosine dans le cortex frontal après traitement chronique par le butorphanol (Kim et al., 2004) puis par la morphine (Kim et al., 2005). Ont suivi des études des modifications du protéome total des synaptosomes du cortex cérébral par une stratégie ICAT (Prokai et al., 2005) et du noyau accumbens après séparation du protéome par 2-DE (Li et al., 2006), le tout après un traitement morphinique. L'ensemble de ces travaux montre que la protéomique différentielle est capable de révéler de nouvelles adaptations moléculaires jusqu'alors insoupçonnées. Malgré tout, le principal obstacle réside dans la difficulté d'attribuer ces adaptations moléculaires spécifiquement à une forme de dépendance (physique / psychique) plutôt qu'à un autre phénomène (tolérance, analgésie etc.) induit également par la drogue ou encore à une autre adaptation à plus long terme. Pour résoudre cette ambiguïté des validations *in vivo* par knock-down / out ou surexpression de l'ensemble des protéines identifiées suivies d'études comportementales sont indispensables. Or de telles validations à grande échelle ne sont actuellement pas envisageables techniquement. Ainsi, est-il d'abord nécessaire au sein de toutes les modifications identifiées de pouvoir discriminer celles réellement susceptibles d'être impliquées dans le phénomène sur lequel l'expérimentateur est focalisé. C'est dans cette optique qu'apparaît l'intérêt d'étudier, dans un premier temps, les effets de la morphine par protéomique différentielle sur un modèle cellulaire. Dans le cas de la dépendance, une idée est de rechercher d'abord des modifications moléculaires par protéomique puis d'examiner si elles sont corrélées à une adaptation cellulaire telle que la sensibilisation de l'AC connue pour

être impliquée dans le développement de la dépendance chez l'animal (Meunier, 1992; Nestler, 2005). Si tel est le cas, une validation *in vivo* peut alors être envisagée. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objet de ma thèse consistant à **identifier par protéomique différentielle des adaptations moléculaires à un traitement morphinique dans le neuroblastome humain SH-SY5Y**.

B. Choix de la lignée cellulaire de neuroblastome humain SH-SY5Y

La lignée cellulaire a été choisie afin que les adaptations moléculaires à un traitement par la morphine soient les plus représentatives possibles de celles qui peuvent survenir dans des régions du cerveau.

Les cellules SH-SY5Y sont issues d'un sous-clonage de la lignée SK-N-SH (Muller et al., 1989). Ces cellules possèdent donc des caractéristiques qui les apparentent à des neurones bien plus que d'autres systèmes cellulaires tels que les CHO (Chinese Hamster Ovary) ou les HEK (Human Embryonic Kidney). Les cellules SH-SY5Y sont capables de libérer des neurotransmetteurs comme la dopamine (Ault et Werling, 2000) ou encore la noradrénaline (Goodall et al., 1997). La lignée exprime de façon endogène le récepteur MOP fonctionnel dont l'activation inhibe l'activité de l'AC. Un traitement chronique à la morphine conduit à la sensibilisation de l'AC révélée lors du sevrage (Yu et al., 1990). Ainsi, la lignée SH-SY5Y exprime de façon endogène au moins une partie de l'arsenal moléculaire impliqué dans les effets à long terme de la morphine. Il s'agit donc d'un modèle significatif pour l'étude des adaptations moléculaires à un traitement morphinique.

Cependant avant mon arrivée au laboratoire, cette lignée a été optimisée par surexpression du récepteur MOP. Dans cette nouvelle lignée stable, l'efficacité et la puissance de la morphine révélées en termes d'inhibition aiguë de l'AC ainsi que de l'intensité de sa sensibilisation après un traitement chronique par la drogue sont augmentées. Cela suggère que les adaptations moléculaires à la morphine sont accentuées ce qui présente un intérêt majeur pour leur détection par une approche de type protéomique différentielle.

C. Plan de mon travail

La première partie de mon travail a consisté à rechercher les modifications moléculaires induites par la morphine au niveau du protéome total révélé au bleu de coomassie colloïdal. Pour cela deux protéomes ont été étudiés :

- D'une part le protéome d'un microdomaine membranaire enrichi en protéines de signalisation : les rafts-DRM. Les protéines ont alors été séparées par électrophorèse monodimensionnelle.
- D'autre part un échantillon protéique plus large correspondant au protéome de l'ensemble de la cellule. Cette fois les protéines ont été séparées par une technique plus résolutive : l'électrophorèse bidimensionnelle.

La seconde partie de mon travail a consisté à rechercher les modifications moléculaires induites par la morphine au niveau du phosphoprotéome révélé par le colorant fluorescent Pro-Q Diamond. De façon similaire, les phosphoprotéomes des rafts-DRM et de l'ensemble de la cellule ont été successivement analysés après un traitement par la morphine.

. Matériels et méthodes

Tableau 7 : Protocoles expérimentaux des traitements réalisés. Les pré / post-traitements sont réalisés directement dans du milieu de culture frais. Le post-traitement lors du sevrage est réalisé après aspiration du milieu de culture dans lequel était réalisé le prétraitement et un rinçage des cellules avec 20 mL de tampon phosphate (PBS) à 37°C. FSK (forskoline), nal (naloxone).

Type de traitement	Prétraitement		Post-traitement	
	Contrôle	Traité	Contrôle	Traité
Aigu	eau	morphine (1 μ M)		
Chronique	eau	morphine (1 μ M)		
Sevrage	eau	morphine chronique (1 μ M)	1 μ M nal + 5 μ M FSK	1 μ M nal + 5 μ M FSK

A. Culture cellulaire et traitements

Les cellules eucaryotes de neuroblastome humain SH-SY5Y ont été transfectées de façon stable avant mon arrivée au laboratoire avec le plasmide pRC-CMV contenant l'ADNc humain du récepteur MOP à la morphine fusionné à l'extrémité N-terminale au tag T7.

Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide composée de 95% d'air et de 5% de CO₂ en boîtes de Pétri dans du milieu DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium with glutamax *Gibco BRL*) riche en glucose (4,5 g/L) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (*Gibco BRL*), 50 µg/mL de gentamycine (*Sigma*), et 400 µg/mL de généticine (*Gibco BRL*) permettant de sélectionner les cellules contenant le plasmide T7-MOP pRC-CMV.

La veille de chaque traitement, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais. Le traitement est réalisé directement dans la boîte de culture parallèlement à un contrôle strict. Si le traitement se prolonge plus de 24h, celui-ci est renouvelé chaque jour dans du milieu frais. Pour les traitements chroniques des cellules SH-SY5Y à la morphine suivis d'un sevrage, les boîtes de Pétri de 140 cm sont dans un premier temps rincées avec 20 mL de tampon phosphate (PBS) à 37°C puis les cellules sont à nouveau incubées pendant 10 min à 37°C dans du milieu de culture frais contenant de la naloxone à 1 µM et de la forskoline à 5 µM (voir tableau 7).

B. Mesure de l'activité de l'adénylyl cyclase

L'activité de l'adénylyl cyclase est mesurée en quantifiant l'AMPc accumulé dans les cellules suite à un traitement. La méthode repose sur l'incorporation d'adénine tritiée dans le pool d'ATP intracellulaire puis la séparation de l'AMPc tritié sur colonne d'alumine (Alvarez et Daniels, 1992). L'accumulation d'AMPc est stimulée par la forskoline en présence des agents à tester et d'inhibiteurs de phosphodiésterases.

Des plaques de culture de 24 puits sontensemencées la veille de l'expérience à raison de 200 000 cellules par puits dans 500 µL de milieu de culture. Le lendemain celui-ci est remplacé par 500 µL de milieu frais contenant les différents agents, morphine sulfate (*Francoxia*), naloxone, MG115 (*Sigma*), lactacystine (*Sigma*) aux concentrations appropriées. Après incubation le temps désiré, le milieu de culture est à nouveau éliminé et remplacé par 200 µL de milieu frais contenant les agents à tester, 0,1 µM d'adénine froide et 1 µCi d'adénine tritiée (*Amersham*) pendant 1h à 37°C. Les cellules sont alors rincées 4 fois avec 500 µL / puits de tampon Krebs-Ringer-HEPES (KRH : KCl 5 mM, NaCl 125 mM, CaCl₂ 1,5 mM, MgSO₄ 1,25 mM, KH₂PO₄ 1,25 mM, Glucose 8 mM, Hepes 25 mM pH 7,7 et BSA 0,05%) à 37°C. L'activité de l'adénylyl cyclase est stimulée

pendant 10 min à 37°C par 5 μ M de forskoline (*Sigma*) dans 200 μ L de KRH contenant les inhibiteurs de phosphodiesterases : isobutylméthylxanthine (IBMX) (*Sigma*) et RO 20-1724 (*BIOMOL Research Laboratories*) à 1 μ M. Après les 10 min de stimulation, la réaction est arrêtée par 30 μ L de HCl à 2,2 N provoquant la lyse des cellules et donc la libération de leur contenu. Les surnageants sont ensuite déposés sur colonne contenant chacune 0,65 g d'alumine acide sèche (*Sigma*). Les colonnes sont lavées avec 4 mL de HCl à 5 mM, puis avec 500 μ L d'acétate d'ammonium 0,1 M. L'AMPc retenu sur la colonne est élué par 3 mL d'acétate d'ammonium à 0,1 M et récupéré dans des fioles à scintillation. Après ajout de 7,5 mL de liquide à scintillation (*Ready ProteinTM Beckman Coulter*), la quantité d'AMPc tritié élue est mesurée par un compteur à scintillation liquide (*Packard liquid scintillation analyser Tri-CARB 2100-TR*) pendant 1 ou 3 min. Chaque expérience est faite en triplet et répétée au moins trois fois.

C. Préparation des fractions DRM

3 boîtes de Pétri de 140 mm de diamètre (soit environ 8.10^7 cellules) sont grattées dans du PBS à 4°C, centrifugées à 1000g pendant 10 min puis congelées à -70°C pendant au moins 1h. Le culot est repris dans 1,7 mL de MBS à 4°C (25 mM de MES, 0,15 M NaCl) contenant des inhibiteurs de protéases (*Complete tablets EDTA-free, Roche*) et 1% (v:v) de Triton X-100 (*Sigma*). Après agitation douce pendant 20 min à 4°C, 1,5 mL de lysat cellulaire est dilué dans un volume égal de sucrose à 80% (w:v), composant la fraction 40% d'un gradient de sucrose discontinu préparé dans du MBS (3 mL de sucrose 40% (w:v), 6 mL de sucrose 30% (w:v) et 2,5 mL de sucrose 5% (w:v)) puis ultracentrifugé à 200 000 g, pendant 18h à 4°C (*KONTRON Ultracentrifuge TGA-65*).

Des fractions de 1 mL sont récupérées (à partir du haut du tube) et le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline, protéine enrichie dans les DRM, est effectué sur 50 μ L de chaque fraction avec 1 mL de p-nitrophényl phosphate à 16 mM (*Sigma diagnostics*). Après incubation 1h à 37°C, la densité optique (DO) à 405 nm est mesurée au spectrophotomètre (*Lambda16 Perkin Elmer*). Les fractions possédant la plus forte activité en phosphatase alcaline (fractions 3 et 4) sont rassemblées dans 22 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, 1 mM d'EDTA (T_{50E1}) et culottées par ultracentrifugation (*KONTRON Ultracentrifuge TGA-65*) à 100 000 g pendant 2h20 à 4°C. Le culot composant la fraction DRM est rincé délicatement avec 10 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 et repris dans 150 μ L de T_{50E1} puis la concentration en protéines est dosée par la méthode de Lowry en utilisant une gamme étalon BSA (Bovine Serum Albumin).

Brièvement, 1 mL de réactif (Na₂CO₃, NaOH 0,1 N contenant 1% (v:v) de CuSO₄ 1% et 1% (v:v) de tartrate double Na⁺, K⁺, 2%) est ajouté à 100 μ L d'échantillon à doser. Après une première

incubation de 30 min à température ambiante, 100 µL de folin (*Sigma*) dilué deux fois dans l'eau sont additionnés aux échantillons à doser et après une seconde incubation dans les mêmes conditions, la DO est mesurée à 650 nm (*Lambda16 Perkin Elmer*).

Pour la préparation des fractions DRM dans le cadre de l'analyse du phosphoprotéome, une seule modification du protocole est réalisée. Des inhibiteurs de phosphatases, cocktails d'inhibiteurs de phosphatases 1 et 2 (*Sigma*), sont ajoutés (dilution au 1/100^{ème} conformément aux recommandations du fournisseur) tout au long de la préparation à partir de l'étape de solubilisation des cellules dans le MBS à 1 % de Triton X-100.

D. Séparation du protéome des DRM par électrophorèse SDS-PAGE

50 µg de protéines (ou 100 µg pour l'analyse du phosphoprotéome) de la fraction DRM sont solubilisés dans du tampon de Laemmli (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 % (w:v), glycérol 10 % (v:v), β-mercaptoéthanol 5 % (v:v), bleu de bromophénol 0,02 %), chauffés 5 min à 95°C et séparés par électrophorèse monodimensionnelle verticale (gels de 16 x 16 cm, épaisseur 1,5 mm *Hoefer SE 600 Ruby Amersham*) SDS-PAGE à 12 % de polyacrylamide (*Euromedex*). La séparation est réalisée à 25 mA dans le gel de concentration (polyacrylamide 6 %, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w:v) de SDS, 0,1 % (w:v) d'APS, 0,1 % (v:v) de TEMED) et 50 mA dans le gel de séparation (polyacrylamide 12 %, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % de SDS, 0,1% d'APS, 0,04 % de TEMED) dans un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM de glycine, 0,1% (w:v) de SDS) thermostaté à 18 °C.

E. Révélation du protéome et du phosphoprotéome

1- Coloration au bleu de coomassie colloïdal

Les protéines sont révélées par coloration du gel sur la nuit au bleu de coomassie colloïdal (17 % (w:v) de sulfate d'ammonium, 34 % (v:v) de méthanol, 3 % (v:v) d'acide orthophosphorique et 0,1 % (w:v) de bleu de coomassie brillant G-250 *Sigma*) puis une nouvelle coloration environ 2h le lendemain. Après décoloration deux fois 30 min dans de l'acide acétique 1 % (v:v), le gel est numérisé par le scanner GS-800 Calibrated Densitometer *Bio-Rad*.

2- Coloration au Pro-Q Diamond

Le Pro-Q Diamond est un colorant fluorescent développé par *Molecular Probes* permettant de révéler spécifiquement les protéines phosphorylées (Steinberg et al., 2003). Les gels d'électrophorèse sont colorés au Pro-Q Diamond conformément aux indications du fournisseur. Les gels sont fixés une première fois 1h puis une seconde fois sur la nuit dans 500 mL de 50 % (v:v) de méthanol, 10 % (v:v) d'acide acétique, lavés 3 fois 15 min dans 500 mL d'eau puis colorés pendant 2h à l'obscurité dans 250 mL de Pro-Q Diamond. Afin de diminuer le bruit de fond, les gels sont décolorés toujours à l'obscurité 3 fois 30 min avec 500 mL d'acétate de sodium 50 mM pH 4 dans 20 % (v:v) d'acétonitrile puis lavés 2 fois 5 min dans 500 mL d'eau.

Le phosphoprotéome est révélé grâce au Typhoon Trio scanner (*Amersham*) après excitation du fluorophore à 532 nm et application du filtre d'émission à 580 nm. Le photomultiplicateur est réglé à 500 V de sorte que l'intensité du signal émis par les bandes protéiques ne soit pas saturée. Les gels sont ensuite directement mis à colorer dans du bleu de coomassie colloïdal puis à nouveau scannés au GS-800 Calibrated Densitometer afin de visualiser le profil du protéome et de vérifier la spécificité de coloration du Pro-Q Diamond.

F. Analyse d'image par le logiciel Quantity One

L'image du gel est analysée par le logiciel Quantity One de *Bio-Rad* conformément aux instructions du fournisseur. Brièvement, la densité de chaque bande protéique est exprimée en fonction de sa densité optique et de sa largeur (DO x mm) dans le gel après soustraction du bruit de fond. Pour s'affranchir d'éventuelles erreurs de quantités de protéines déposées dans le gel, la densité de chacune des bandes est normalisée en fonction de la somme des densités de toutes les bandes détectées dans la piste. Deux autres méthodes de normalisation permettant d'exprimer chaque bande en fonction d'une bande référence ou alors de la densité totale d'une piste ont été testées et donnent les mêmes résultats. L'analyse statistique est réalisée avec un test de Student sur les densités normalisées de chaque bande protéique. Les bandes protéiques dont les densités normalisées varient de façon significative ($p < 0,05$) lors d'un traitement sont sélectionnées pour être identifiées par spectrométrie de masse.

G. Western blot

Les échantillons solubilisés dans du tampon de Laemmli contenant 5 % (v:v) de β -mercaptoéthanol sont chauffés 5 min à 95°C et soumis à une électrophorèse SDS-PAGE. Les

extraits totaux sont obtenus directement par solubilisation dans du tampon de Laemmli des cellules cultivées dans des plaques 24 puits. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra Amersham) par transfert humide à 4°C, 25 volts sur la nuit dans du tampon à 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 192 mM glycine dans 20 % (v:v) d'éthanol.

La membrane de nitrocellulose est bloquée par les protéines du lait (5 % (w:v) de lait écrémé en poudre *Régilait*, 0,1 % (v:v) de Tween dans du tampon Tris Buffer Saline (TBS) à 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 8 g / L de NaCl) pendant 1h à température ambiante. Par la suite, les anticorps primaires monoclonaux anti-flotilline 1 (*Transduction Laboratories*), anti-Tag T7 couplé HRP (*Novagen*) et polyclonaux anti-actine (*Sigma*), anti-G α i (C-10, réagissant contre les sous-unités G α ₁, G α ₂, et G α ₃; *Santa Cruz Biotechnology*), anti-G β (T-20, réagissant contre les sous-unités G β ₁, G β ₂, G β ₃, et G β ₄; *Santa Cruz Biotechnology*) et anti-G γ ₂ (*Santa Cruz Biotechnology*) sont dilués (1/400 pour l'anti-flotilline, 1/5000 pour l'anti-Tag T7, 1/5000 pour l'anti-actine, 1/500 pour l'anti-G α i, 1/2000 pour l'anti-G β et 1/500 pour l'anti-G γ ₂) dans du TBS-Tween 0,1 %, 5 % de lait pendant 1h. Après trois rinçages de 10 min dans du TBS-Tween 0,1 %, la membrane est incubée pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Horseradish Peroxidase) dilué au 1/2000^e dans du TBS-Tween 0,1 %, 5 % de lait. Suite à trois nouveaux rinçages, l'immunorévélation est réalisée par chimioluminescence (ECL plus *Amersham*).

Les films sont numérisés avec le scanner GS-800 Calibrated Densitometer et l'intensité des blots est quantifiée grâce au logiciel Quantity One en utilisant l'actine comme étalon interne.

H. Préparation des extraits cellulaires totaux pour l'électrophorèse bidimensionnelle

Après traitement, les cellules cultivées dans une boîte de Pétri de 140 mm de diamètre sont grattées dans du PBS à 4°C, centrifugées 10 min à 1000g, puis congelées à -70°C.

1- Solubilisation des protéines

Les culots cellulaires sont suspendus dans 500 μ L de tampon de lyse contenant du Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, des inhibiteurs de protéases (*Complete mini tablets EDTA-free*, *Roche*), les cocktails d'inhibiteurs de phosphatases 1 et 2 (*Sigma*) dans le cas de l'analyse du phosphoprotéome et 1% (v:v) de Triton X-100. Les protéines sont alors solubilisées 3h à 4°C et le matériel insoluble est éliminé par 20 min de centrifugation à 20000g à 4°C.

2- Précipitation des protéines au méthanol / chloroforme

La précipitation des protéines au méthanol / chloroforme permet d'éliminer des contaminants de l'échantillon (sels, acides nucléiques, lipides etc.) afin d'améliorer l'électrofocalisation des protéines lors de la première dimension d'une électrophorèse bidimensionnelle. Ainsi, le surnageant protéique précédemment récupéré est mélangé avec 2 mL de méthanol, 500 µL de chloroforme et 1,5 mL d'eau puis centrifugé à 20000g pendant 5 min à température ambiante. Le disque protéique obtenu est alors lavé avec 1,5 mL de méthanol. Après une nouvelle centrifugation, le culot de protéines est séché 10 min sous vide et resuspendu dans 400 µL de tampon 2D (*Cellular and organelle membrane solubilizing reagent*, Sigma).

3- Réduction et alkylation des protéines.

Les protéines sont réduites pendant 1h à température ambiante dans 5 mM de tributylphosphine (Sigma) puis alkylées à l'obscurité par 15 mM d'iodoacétamide pendant 1h30. La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée par un dosage de Bradford (Sigma) en utilisant une gamme étalon BSA. Brièvement, 1,5 mL de réactif de Bradford est ajouté à 50 µL d'échantillon dilué 10 fois dans du tampon 2D. L'absorbance est mesurée à 595 nm (*Lambda16 Perkin Elmer*) après 5 min d'incubation à température ambiante.

I. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle

1- Isoélectrofocalisation

250 µL de tampon 2D contenant la quantité de protéines à déposer (300 ou 600 µg), 1,2 µL de tampon IPG pH 3-10 ou 4-7, 2 µL d'orange G 1 % (w:v) sont utilisés pour réhydrater passivement 6h durant des bandelettes (ou strips) de 13 cm (*Amersham*) de pH immobilisé 3-10 non linéaire (IPG strips 3-10 NL) ou 4-7 linéaire (IPG strips 4-7) dans un sarcophage adéquat.

L'isoélectrofocalisation des protéines s'effectue dans un IPGphor IEF Cell (*Amersham*) à 20°C en limitant le courant à 50 µA / strip. Après les 6h de réhydratation passive puis 6h de réhydratation active à 30V, le voltage est augmenté à 300V pendant 4h. Après un gradient linéaire de 8h de 300V à 8000V, la focalisation des protéines se poursuit à 8000V jusqu'à atteindre un total de 80000V.h. Enfin, les strips sont équilibrées 2 fois 10 min dans un tampon SDS contenant 6M d'urée, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 30% (v:v) de glycérol, 2 % (w:v) de SDS et 0,01 % (w:v) de bleu de bromophénol.

2- Electrophorèse SDS-PAGE

La seconde dimension consiste en la séparation, par une électrophorèse SDS-PAGE classique, (*Hoefer SE 600 Ruby Amersham*) des protéines précédemment focalisées. Les strips sont placées au dessus d'un gel polyacrylamide 12 % de dimensions 160 x 160 x 1 mm et immobilisées dans de l'agarose 0,5 % (w:v) préparé dans le tampon de migration. La migration est réalisée à 10 mA / gel dans des conditions identiques à celles du paragraphe D (page 101) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne la limite inférieure du gel.

J. Révélation du protéome total et du phosphoprotéome

1- Coloration au bleu de coomassie colloïdal

Après séparation du protéome total par électrophorèse bidimensionnelle, les protéines sont révélées au bleu de coomassie colloïdal comme indiqué au paragraphe E-1 (page 101). Les gels sont ensuite numérisés au scanner GS-800 Calibrated Densitometer *Bio-Rad*.

2- Coloration au Pro-Q diamond

Après séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle, les phosphoprotéines sont révélées au Pro-Q Diamond avec seulement une modification par rapport à la procédure décrite au paragraphe E-2 (page 102) : le photomultiplicateur est réglé à 530 V de sorte que le signal émis par les spots ne soit pas saturé.

Les gels sont ensuite directement mis à colorer dans du bleu de coomassie colloïdal puis à nouveau scannés au GS-800 Calibrated Densitometer afin de visualiser le profil du protéome total et de vérifier la spécificité de coloration du Pro-Q Diamond.

K. Analyse d'image par le logiciel Image Master 2D Platinum

Les gels bidimensionnels sont analysés avec le logiciel de traitement d'image Image Master 2D Platinum (*Amersham Biosciences*). Brièvement, les spots révélés par les colorations au bleu de coomassie colloïdal ou Pro-Q Diamond sont détectés automatiquement grâce à l'algorithme du logiciel puis corrigés manuellement afin d'affiner la détection. Ainsi, le volume de chaque spot correspondant au produit de sa surface par son intensité moyenne (densité optique) est obtenu. Le

volume de chaque spot est normalisé par rapport au volume de l'ensemble des spots détectés sur le gel (spot (i) normalisé = volume spot (i) $\bigg/ \sum_n^i$ volumes n spots).

Les gels sont « matchés » c'est-à-dire superposés à un gel de référence afin d'apparier chacun des spots précédemment détecté à son spot correspondant sur l'ensemble des autres gels formant ainsi un groupe de spots. Tous les groupes de spots équivalents sont analysés par un test de Student comparant un groupe de spots issu des « gels contrôles » *versus* le même groupe de spots issu des « gels traités ». Les spots dont les volumes relatifs varient de façon significative ($p < 0,05$) lors d'un traitement sont sélectionnés pour être identifiés par spectrométrie de masse.

L. Identification des protéines par spectrométrie de masse

1- Excision et lavage des protéines d'intérêt

Les spots (2D) ou bandes (1D) d'intérêt sont excisés manuellement à partir d'un gel préparatif coloré au bleu de coomassie colloïdal. Après excision des protéines, le gel est scanné afin de vérifier si les bons spots / bandes ont été découpés. Les morceaux de gel sont lavés à l'eau puis décolorés d'abord dans 160 μ L d'un mélange eau / acétonitrile 1:1 (v:v) puis dans 160 μ L d'un mélange 0,1 M NH_4HCO_3 (bicarbonate d'ammonium) / acétonitrile 1:1 (v:v). Après déshydratation dans 80 μ L d'acétonitrile, les morceaux de gels sont séchés sous vide.

2- Réduction et alkylation de bandes 1D

Les bandes 1D sont réhydratées avec 10 mM de DTT dans 0,1 M de NH_4HCO_3 pendant 35 min à 56°C sous agitation puis déshydratées deux fois dans 150 μ L d'acétonitrile. Les cystéines des protéines sont alors alkylées dans 50 μ L d'iodoacétoamide à 55 mM dans 0,1 M de NH_4HCO_3 pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Puis les bandes sont lavées avec 150 μ L de NH_4HCO_3 à 0,1 M et déshydratées deux fois dans 150 μ L d'acétonitrile. Les bandes 1D sont alors séchées sous vide. Pour les spots de gels bidimensionnels ce processus n'est pas effectué car les protéines ont déjà été réduites et alkylées avant leur séparation (voir paragraphe H-3 page 104).

3- Digestion trypsique

Les morceaux de gel sont réhydratés dans un volume suffisant de trypsine (*Promega*) à 12,5 ng/ μ L dans 12,5 mM de NH_4HCO_3 pour les spots 2D et 50 mM de NH_4HCO_3 pour les bandes 1D. La digestion se fait sur la nuit à 37°C.

4- Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La cartographie peptidique est obtenue en mode réflectron positif par un spectromètre de masse de type MALDI-TOF / TOF (4700 Proteomics analyser ; *Applied Biosystems*). 0,5 μ L de surnageant de digest peptidique est déposé sur la plaque MALDI avec 0,3 μ L de matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (5 mg / mL dans eau / acétonitrile / TFA, 50:50:0,1 (v:v:v)) pour obtenir des co-cristaux matrice / échantillon après séchage à l'air. Les spectres de masses sont enregistrés dans une gamme de m / z allant de 700 à 3500 et calibrés au moyen des peptides issus de l'autodigestion de la trypsine.

Les spectres analysés par le logiciel GPS Explorer (*Applied Biosystems*) sont confrontés à la banque de données Swiss-Prot restreinte à l'humain via le logiciel de recherche Mascot. L'interrogation est réalisée avec un critère de tolérance de 30 ppm, sans aucun clivage trypsique manqué, la carbamidométhylation des cystéines en tant que modification obligatoire tandis que l'oxydation des méthionines et la N-acétylation des protéines sont considérées comme possibles. Une protéine est identifiée si son score calculé par le logiciel GPS explorer est supérieur ou égal à 99 %. D'autres critères sont également pris en compte : l'écart de score avec la deuxième protéine proposée, le pourcentage de couverture de séquence ou encore l'adéquation entre les masses moléculaires et les points isoélectriques mesurés et théoriques.

5- Extraction peptidique

Les peptides sont extraits deux fois des bouts de gel pendant 30 min à 37°C : une première fois en milieu basique dans 30 μ L de 25 mM NH_4HCO_3 / acétonitrile 1:1 (v:v) puis en milieu acide dans 30 μ L d'acide formique à 5 % / acétonitrile 1:1 (v:v). Les surnageants issus de ces extractions sont mélangés et concentrés sous vide jusqu'à un volume d'environ 10 μ L.

6- Analyse par nanoLC-ESI-Q-TOF (nanoLiquid Chromatography-Electrospray-Quadrupole-Time of Flight)

Lorsque l'identification par cartographie peptidique n'est pas concluante, l'identité des protéines est confirmée par une analyse de type MS / MS. Les extraits peptidiques sont analysés par

nanoLC-MS/MS sur un appareil de type ESI-Q-TOF (QSTAR XL, *Applied Biosystems*) en mode positif avec un voltage de 2,1 kV appliqué sur l'aiguille de couplage. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne de type C₁₈ (75 µm de diamètre x 15 cm PepMap, *LC Packings*) à un débit de 200 nL / min et un gradient linéaire d'acétonitrile dans l'eau (de 5 à 50 %) pendant 40 min en présence de 0,1 % (v:v) d'acide formique. Les données MS et MS / MS sont enregistrées avec un cycle de 5 sec. Au cours de chaque cycle les données MS sont accumulées pendant 1 sec. Puis pour chaque donnée MS, les deux ions les plus intenses sont sélectionnés pour être analysés par MS / MS. L'énergie de collision est ajustée automatiquement en fonction de la taille et de la charge de l'ion « parent ». Une exclusion dynamique de 30 sec est réalisée pour éviter une nouvelle sélection des mêmes ions « parents ».

Les données analysées par le logiciel Analyst QS sont confrontées à la banque de données Swiss-Prot restreinte à l'humain en utilisant le logiciel Mascot. Le critère de tolérance en MS et MS / MS est fixé à 0,5 Da et deux clivages manqués par la trypsine sont autorisés. La carbamidométhylation des cystéines est fixée en tant que modification obligatoire tandis que l'oxydation des méthionines et la N-acétylation des protéines sont considérées comme possibles. L'identification est considérée positive si une protéine est identifiée sur la base d'au moins deux peptides séquencés possédant un score supérieur au seuil de significativité déterminé par le logiciel Mascot. Les mêmes critères que pour l'identification par cartographie peptidique réalisée en mode MALDI sont également vérifiés.

. Résultats et discussion

- I. Analyse protéomique des adaptations moléculaires induites par la morphine dans les cellules SH-SY5Y**
- A. Protéome des DRM-rafts : « Long-term morphine treatment enhances protéasome-dependent degradation of G β in human neuroblastoma SH-SY5Y cells : correlation with onset of adenylate cyclase sensitization »**

Long-Term Morphine Treatment Enhances Proteasome-Dependent Degradation of G β in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells: Correlation with Onset of Adenylate Cyclase Sensitization

Lionel Moulédous, Jérémie Neasta, Sandrine Uttenweiler-Joseph, Alexandre Stella, Mariette Matondo, Maïthé Corbani, Bernard Monsarrat, and Jean-Claude Meunier

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France

Received April 1, 2005; accepted May 18, 2005

ABSTRACT

The initial aim of this study was to identify protein changes associated with long-term morphine treatment in a recombinant human neuroblastoma SH-SY5Y clone (sc2) stably overexpressing the human μ -opioid (MOP) receptor. In MOP receptor-overexpressing sc2 cells, short-term morphine exposure was found to be much more potent and efficacious in inhibiting forskolin-elicited production of cAMP, and long-term morphine exposure was shown to induce a substantially higher degree of opiate dependence, as reflected by adenylate cyclase sensitization, than it did in wild-type neuroblastoma cells. Differential proteomic analysis of detergent-resistant membrane rafts isolated from untreated and chronically morphine-treated sc2 cells revealed long-term morphine exposure to have reliably induced a 30 to 40% decrease in the abundance of five proteins, subsequently identified by mass spectrometry as G protein sub-

units α_{i2} , α_{i3} , β_1 , and β_2 , and prohibitin. Quantitative Western blot analyses of whole-cell extracts showed that long-term morphine treatment-induced down-regulation of G β but not of the other proteins is highly correlated ($r^2 = 0.96$) with sensitization of adenylate cyclase. Down-regulation of G β and adenylate cyclase sensitization elicited by long-term morphine treatment were suppressed in the presence of carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-norvalinal (MG-115) or lactacystin. Thus, sustained activation of the MOP receptor by morphine in sc2 cells seems to promote proteasomal degradation of G β to sensitize adenylate cyclase. Together, our data suggest that the long-term administration of opiates may elicit dependence by altering the neuronal balance of heterotrimeric G proteins and adenylate cyclases, with the ubiquitin-proteasome pathway playing a pivotal role.

It is widely agreed that dependence elicited by repeated drug use reflects neuronal changes that durably alter synaptic transmission within select neural circuits in the central nervous system (Koob et al., 1998; Kelly, 2004; Nestler, 2004). These plastic changes are likely to be similar to those underlying memory formation and storage, as has been doc-

umented in simple neuronal systems, with second messengers such as cAMP playing a key role (Kandel, 2001). Indeed, one fundamental neuronal change associated with long-term opiate exposure is “hypertrophy of the cAMP system” (Collier and Francis, 1975). Hypertrophy of the cAMP system may be brought about by a compensatory adaptation of neuronal adenylate cyclase (AC) to long-term opiate inhibition known as adenylate cyclase sensitization (ACS) (Thomas and Hoffman, 1987; Johnston and Watts, 2003).

Long-term treatment of many cell types with drugs such as morphine that inhibit AC induce enhanced activity of the enzyme after withdrawal of the inhibitory drug (Thomas and Hoffman, 1987). The phenomenon was first reported by Sharma et al. (1975a,b), who found that pretreatment of hybrid glioma X neuroblastoma NG 108–15 cells with mor-

This work was supported by La Mission Interministérielle de Lutte Contre La Drogue et La Toxicomanie/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (Aide à la Recherche 1999), and CNRS (“Protéomique et Génie des Protéines” program grant PGP 03/057). Financial support from the Région Midi-Pyrénées and the Génomipôle Toulouse/Midi-Pyrénées to B.M. is also gratefully acknowledged.

L.M. and J.N. contributed equally to this work.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/mol.105.013391.

ABBREVIATIONS: AC, adenylate cyclase; ACS, adenylate cyclase sensitization; DRM, detergent-resistant membrane; MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization; TOF, time of flight; ESI, electrospray ionization; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; MG-115, carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-norvalinal; wt, wild type; MOP, μ -opioid; CHO, Chinese hamster ovary; TM, total membrane; KRH, Krebs-Ringer-HEPES; MES, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; MBS, modified Barth’s solution; Ro20-1724, 4-[(3-butoxy-4-methoxyphenyl)-methyl]-2-imidazolidinone.

phine for at least 12 h, upon removal of the drug, led to an increase in both basal and prostaglandin E_1 -stimulated AC activity. The morphine-treated cells were considered to be dependent on morphine in the sense that they required the drug to maintain normal levels of AC activity and intracellular cAMP. The opiate-dependent status of these cells was characterized by an overshoot of cAMP upon withdrawal of the drug. ACS has since been observed in several other cell types, including human neuroblastoma SH-SY5Y cells (Yu et al., 1990) and transfected non-neuronal cells expressing the μ -opioid (MOP) receptor (Avidor-Reiss et al., 1995). In MOP receptor-transfected CHO cells, the onset of ACS is independent of protein synthesis and does not occur in pertussis toxin-pretreated cells, indicating a requirement for the activation of a $G_{i/o}$ type of heterotrimeric G protein (Avidor-Reiss et al., 1995). Moreover, in COS cells cotransfected with the MOP receptor and different AC isoenzymes, long-term morphine treatment is found to sensitize isoforms 1, 5, 6, and 8, with sensitization of isoform 5 being particularly marked, but not isoforms 2, 3, 4, and 7 (Avidor-Reiss et al., 1996, 1997).

There is evidence that long-term morphine treatment induces ACS in the brain as well. For example, levels of AC activity and protein kinase A, activation of which is a foreseeable consequence of hypertrophy of the cAMP pathway, have been shown to be increased in the brain of rats who received long-term treatment with morphine (Nestler and Tallman, 1988; Duman et al., 1988; Terwilliger et al., 1991; Maldonado et al., 1995). Likewise, gene disruption of two of the three types of cAMP response element-binding protein, activation of which is also expected to result from hypertrophy of the cAMP pathway, attenuates symptoms of morphine withdrawal in mice (Maldonado et al., 1996).

In the present study, we sought to identify protein changes elicited by long-term exposure of neuroblastoma cells to morphine and attempted to relate these changes to opiate dependence, as reflected by sensitization of adenylate cyclase. To this end, a recombinant human neuroblastoma SH-SY5Y subclone (sc2) stably overexpressing the human MOP receptor was used in which long-term morphine treatment induced a substantially higher degree of dependence than in wild-type cells. Protein changes elicited by long-term morphine exposure were sought by comparison of the subproteome of detergent-resistant membrane (DRM) raft preparations isolated from drug-naïve and continually morphine-treated sc2 cells. DRM rafts isolated from various cell types are indeed enriched in signaling proteins, including heterotrimeric G proteins (von Haller et al., 2001; Foster et al., 2003; Blonder et al., 2004), and there is mounting evidence that G protein-coupled receptor-mediated transmembrane signaling is spatially confined to these membrane microdomains (Cooper, 2003; Chini and Parenti, 2004; Ostrom and Insel, 2004). In addition, the raft proteome must be composed of considerably fewer protein species than the whole-cell proteome, thus allowing for a more quantitative analysis. Therefore, we expected that protein changes elicited by long-term morphine exposure in sc2 cells would be more readily detected in the raft subproteome than in the whole-cell proteome. Indeed, quantitative proteomic analysis of DRM rafts isolated from untreated and continually morphine-treated SH-SY5Y sc2 cells revealed long-term morphine exposure to have induced a 30 to 40% decrease in the abundance of several proteins, subsequently identified by mass spectrometry as G protein

subunits α_2 , α_3 , β_1 , and β_2 , and prohibitin. Down-regulation of G β but not of the other proteins is strictly correlated with the amplitude of ACS elicited by continually applied morphine, suggestive of a cause-and-effect relationship. Furthermore, down-regulation of G β elicited by long-term morphine treatment is shown to be totally suppressed in the presence of MG-115 or lactacystin. These data suggest that in sc2 cells, sustained activation of the MOP receptor may sensitize adenylate cyclase by promoting proteasomal degradation of G β . Most importantly, they identify the ubiquitin-proteasome pathway as being potentially involved in opiate dependence.

Materials and Methods

Cell Culture and Transfection. SH-SY5Y neuroblastoma cells were transfected with N-terminal T7-tagged human μ -opioid receptor in pRC-CMV using Lipofectamine. Stably transfected G418-resistant cells were grown in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10% fetal calf serum, 50 μ g/ml gentamicin, and 400 μ g/ml G418 (all from Invitrogen) in 5% CO_2 at 37°C.

Membrane Preparation. Cells were harvested in ice-cold phosphate-buffered saline, frozen at $-70^\circ C$ for 1 h, thawed, and homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, in a Potter Elvehjem tissue grinder (VWR Int., Fontenay-sous-Bois, France). The nuclear pellet was discarded by centrifugation at 1000g for 10 min, and the total membrane (TM) fraction was collected upon centrifugation at 100,000g for 35 min. Protein concentration was determined by the method described by Lowry et al. (1951), with bovine serum albumin used as standard.

Measurement of Opiate Binding Sites. Opiate binding sites were assayed for the TM fraction from neuroblastoma cell by using [3H]diprenorphine (50 Ci/mmol; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). Membranes (10–60 μ g of protein) were incubated for 1 h at 25°C with increasing concentrations of tritiated ligand in 0.5 ml of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. Nonspecific binding was determined in the presence of 1 μ M concentration of unlabeled diprenorphine. Bound radioligand was collected by filtration on glass-fiber filters (GF/B; Whatman, Clifton, NJ), and radioactivity counting was performed in a Packard model 2100TR liquid scintillation analyzer (PerkinElmer).

Measurement of Intracellular cAMP. Twenty-four-well plates were seeded with $\sim 2 \times 10^5$ SH-SY5Y cells in culture medium and incubated for approximately 16 h at 37°C. The culture medium was then replaced with fresh medium containing the various agents morphine sulfate (Francopia, Paris, France), MG-115, or lactacystin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), or vehicle. After incubation for the desired time, the culture medium was removed, and 300 μ l of fresh medium was added containing 0.1 μ M adenine and 1 μ Ci [3H]adenine (24 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) with or without morphine. After 1 h at 37°C, the cells were rinsed four times with 500 μ l of HEPES-buffered Krebs-Ringer saline (KRH; 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM $MgSO_4$, 1.5 mM $CaCl_2$, 1.25 mM KH_2PO_4 , 25 mM HEPES, 8 mM glucose, and 0.5 mg/ml bovine serum albumin, pH 7.4), and 200 μ l of fresh KRH was added to each well. Intracellular accumulation of cAMP was initiated by the addition of 100 μ l of KRH containing 5 μ M forskolin (Sigma), 0.1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma), 0.1 mM Ro20-1724 (BIOMOL Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA). After exactly 10 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 30 μ l of HCl 2.2 M and rapid mixing. The [3H]cAMP content was determined by selective batch elution on acidic alumina columns, essentially as described by Alvarez and Daniels (1992).

Isolation of DRM Fraction. Cells ($\sim 8 \times 10^7$ per gradient) were harvested in ice-cold phosphate-buffered saline, frozen at $-70^\circ C$ for 1 h, and resuspended in 1.7 ml of MBS [25 mM MES and 0.15 M NaCl] containing proteinase inhibitors (Complete Mini tablets;

Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and 1% Triton X-100 (Sigma). After 20 min of gentle agitation at 4°C, the lysate was mixed with an equal volume of ice-cold 80% sucrose in MBS buffer. Of the 40% sucrose/cell lysate solution, 3 ml was transferred to 12-ml Polyallomer centrifuge tubes (Beckman Coulter, Fullerton, CA) on ice, overlaid successively with 6 ml of 30% sucrose and 2.5 ml of 5% sucrose in MBS, and centrifuged at 200,000g for 18 h at 4°C in a Kontron Ultracentrifuge TGA-65. Twelve 1-ml fractions were collected from the top down. Alkaline phosphatase activity was measured in 50 μ l of each fraction using FAST *p*-nitrophenyl phosphate tablet sets (Sigma). Fractions with the highest alkaline phosphatase activity (fractions 3 and 4 corresponding to low-density DRMs) were pooled, mixed with 22 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 1 mM EDTA, and recentrifuged at 100,000g for 2.3 h at 4°C. The DRM pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 1 mM EDTA, and protein concentration was determined using the Lowry assay.

Gel Electrophoresis and Image Analysis. DRM proteins were solubilized in 1 $\times$ Laemmli sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol, boiled for 5 min at 100°C, and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on 12% polyacrylamide gels (16 $\times$ 16 cm, 1.5 mm thick) using a Hoefer SE 600 Ruby device. Gels were stained with colloidal Coomassie blue [17% (w/v) ammonium sulfate, 34% (v/v) methanol, 3% (v/v) orthophosphoric acid, and 0.1% (w/v) brilliant blue G-250] for 24 h. Gels were scanned using a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA) and analyzed using Quantity One software (Bio-Rad). Band size was calculated as the area under the intensity profile curve after background subtraction. To account for possible variation in protein load, Student's *t* test statistical analysis was performed on normalized band densities with reference to the summed band density for the whole lane. Two other normalization methods, such as expression of band density either as a fraction of the total density for the lane or relative to the density of a single reference band, gave similar results.

Western Blot Analysis. Samples were solubilized in 1 $\times$ SDS-PAGE sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol by boiling for 5 min at 100°C. Proteins were subjected to SDS-PAGE followed by liquid transfer on nitrocellulose membranes (Hybond-C Extra; Amersham). The following antibodies were used for immunoblotting: monoclonal anti-flotillin 1 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) and anti-T7 Tag (Novagen, Madison, WI), polyclonal anti-actin (Sigma), polyclonal anti-G α i (C-10, reactive with G α i1, G α i2, and G α i3 subunits; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and anti-G β (T-20, reactive with G β 1, G β 2, G β 3, and G β 4 subunits; Santa Cruz Biotechnology). After enhanced chemiluminescence revelation (Amersham), X-ray films were scanned using a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). When required, blots were quantified using Quantity One software (Bio-Rad) relative to the actin used as internal standard.

In-Gel Protein Digestion. The gel pieces were washed and dried under vacuum. Proteins were reduced and alkylated by rehydration with 10 mM dithiothreitol in 0.1 M NH₄HCO₃ for 35 min at 56°C followed by incubation in 55 mM iodoacetamide in 0.1 M NH₄HCO₃ for 30 min at room temperature in the dark. Gel pieces were then washed with 0.1 M NH₄HCO₃ and acetonitrile and dried in a vacuum centrifuge. Gel pieces were rehydrated in a sufficient covering volume of modified trypsin solution (12.5 ng/ μ l in 50 mM NH₄HCO₃; Promega, Madison, WI) and incubated overnight at 37°C. Before peptide extraction, 0.5 μ l of the tryptic digest was spotted onto the MALDI target plate. Peptides were extracted three times at 37°C for 15 min with shaking, once using 50 mM NH₄HCO₃ and twice using 5% formic acid in 50% acetonitrile. The peptide mixture was concentrated in a vacuum centrifuge to a final volume of 10 μ l.

Mass Spectrometry Analysis and Database Search. MALDI-TOF mass spectrometry (MS) analyses were performed on a MALDI-TOF/TOF instrument (4700 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA). A 0.5- μ l sample of tryptic digest supernatant was applied on the MALDI target plate with 0.3 μ l of matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; 8 mg/ml in H₂O/acetonitrile/trifluoro-

acetic acid, 50:50:0.1). Mass spectra were acquired in an automated positive reflector mode, from *m/z* 700 to *m/z* 3500, and calibrated with autodigestion trypsin peaks. Peak lists from peptide mass mapping spectra were automatically extracted from the data stored in an Oracle database and electronically submitted for searching against human sequences in the Swiss-Prot and the National Center for Biotechnology Information databases, using Mascot software (Matrix Science, Boston, MA). Protein identification was systematically confirmed by MS/MS analyses. Tryptic peptide extracts were subjected to nanoLC-MS/MS analysis on an ESI-Qq-TOF mass spectrometer (QSTAR Pulsar; Applied Biosystems) operating in positive mode with a 2.1-kV spray voltage. Chromatographic separation was performed onto a 75- μ m internal diameter $\times$ 15 cm PepMap C18 precolumn using a linear gradient of increasing acetonitrile in water (5–50%) over 40 min with 0.1% formic acid as an ion-pairing agent. MS and MS/MS data were recorded continuously with a 5-s cycle time. Within each cycle, MS data were accumulated for 1 s followed by two MS/MS acquisitions of 2 s each on the two most abundant ions. Dynamic exclusion was used within 30 s to prevent repetitive selection of the same ions. Collision energies were automatically adjusted according to the charge state and mass value of the precursor ions. Mascot software was used for protein identification by searching in the Swiss-Prot and National Center for Biotechnology Information databases with MS/MS spectra. Species were restricted to human.

Data Analysis. Experimental data-fitting and statistical analysis were performed using Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical significance between groups of data was assessed using either Student's *t* test or one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test.

Results

Short- and Long-Term Effects of Morphine on Forskolin-Stimulated cAMP Production in Wild-Type and MOP Receptor-Overexpressing SH-SY5Y Clones. Because our own preliminary studies had shown that wild-type (wt), undifferentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells responded poorly to both short- and long-term exposure to morphine, we generated transfected clones overexpressing the human MOP receptor.

The parent (wt) neuroblastoma SH-SY5Y clone, which expresses 0.37 ± 0.01 pmol opiate binding sites/mg membrane protein, and two selected genetically engineered subclones thereof, sc4 and sc2, which express, respectively, 0.60 ± 0.04 and 2.2 ± 0.3 pmol opiate binding sites/mg membrane protein, were tested for short-term morphine exposure inhibition of forskolin-stimulated production of cAMP. Morphine was found to be far more potent and efficacious in inhibiting forskolin-stimulated production of cAMP in sc4 and sc2 cells than in wt cells (Fig. 1a). In wt cells, 10 μ M morphine, the highest concentration tested, elicited less than 30% inhibition, whereas the opiate inhibited forskolin-stimulated production of cAMP completely ($E_{\max} = 98 \pm 2\%$), with half-maximal inhibition being attained with 4 ± 0.6 nM morphine in sc2 cells. sc4 cells displayed an intermediate response toward morphine with maximum inhibition being $88 \pm 2\%$, with half-maximum inhibition at 31 ± 5 nM morphine.

Likewise, long-term morphine exposure elicited greater ACS—as assessed by forskolin-stimulated cAMP production after removal of the drug—in sc4 and sc2 cells than in wt cells (Fig. 1b). An 18-h exposure to 10 μ M morphine was found to increase forskolin-stimulated cAMP production 1.31 ± 0.42 -fold in wt cells, 1.51 ± 0.11 -fold in sc4 cells, and 2.56 ± 0.50 -fold in sc2 cells. This effect was independent of

protein synthesis (i.e., resisted cycloheximide treatment) and did not occur in pertussis toxin-pretreated cells (data not shown). Thus, in neuroblastoma cells, there seems to be a positive correlation between the level of expressed MOP receptor and the ability of not only short-term morphine exposure to inhibit AC activity but also long-term morphine exposure to induce ACS, a hallmark of opiate dependence.

In sc2 cells continually treated with morphine, the sensitized AC activity remained as potently and efficaciously inhibited by morphine as in drug-naïve cells. As Fig. 1c shows, the opiate acutely inhibited sensitized AC activity with EC_{50} and E_{max} values, respectively, of 5.9 ± 1.2 nM and $99.2 \pm 0.6\%$, similar to values (4 ± 0.6 nM and $98 \pm 2\%$) obtained in

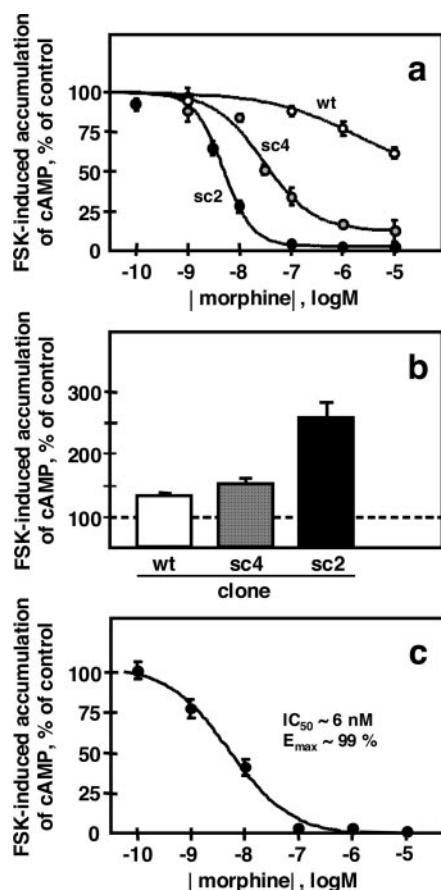


Fig. 1. Short- and long-term effects of morphine on forskolin-stimulated production of cAMP in human MOP receptor-overexpressing versus wild-type neuroblastoma SH-SY5Y clones. **a**, short-term morphine exposure is far more potent and efficacious in inhibiting forskolin-induced cAMP production in SH-SY5Y subclones 2 (sc2) and 4 (sc4) than in parent (wt) SH-SY5Y cells. The cells were incubated for 10 min with $5 \mu\text{M}$ forskolin and morphine at the indicated concentration and were assayed for cAMP content as described under *Materials and Methods*. Control refers to forskolin-stimulated cAMP production in the absence of morphine. **b**, long-term morphine exposure induces a substantially higher degree of adenylate cyclase sensitization in SH-SY5Y subclones 2 (sc2) and 4 (sc4) than in parent (wt) SH-SY5Y cells. Here, the cells were incubated with $10 \mu\text{M}$ morphine for 18 h, rapidly washed free of drug, and assayed for forskolin-stimulated cAMP production. Control refers to cells that had not been exposed to morphine. **c**, morphine-conditioned SH-SY5Y sc2 cells show unchanged response to short-term morphine exposure (compare with sc2 curve in **a**). Cells were incubated with $1 \mu\text{M}$ morphine for 6 h, washed free of drug, and assayed for inhibition of forskolin-stimulated cAMP production by morphine at the indicated concentration. Control refers to cells not exposed to morphine. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments with each measurement performed in triplicate.

untreated cells. This showed that morphine did not induce desensitization of the MOP receptor in SH-SY5Y cells. It also indicated that inhibition of the sensitized AC activity by morphine uses the same molecular pathway (i.e., the MOP receptor and a heterotrimeric $G_{i/o}$ protein), as does inhibition of the nonsensitized AC activity.

Time Course, Dose-Dependence, and Reversibility of Morphine-Induced ACS in SH-SY5Y sc2 Cells. Because it responded maximally, particularly in terms of ACS elicited by long-term morphine exposure, the MOP receptor-overexpressing SH-SY5Y subclone 2 was selected for further investigation. ACS elicited by treatment of sc2 cells with $1 \mu\text{M}$ morphine was time-dependent and developed slowly (Fig. 2a). Half-maximum sensitization was reached after 2.5 ± 0.4 h. Maximum sensitization required that the cells be exposed to $1 \mu\text{M}$ morphine for at least 12 h and amounted to approximately 4.5-fold.

ACS elicited by treatment of sc2 cells with morphine for 18 h was dose-related (Fig. 2b), with half-maximum sensitization, in this case approximately 2.15-fold, being observed in the presence of 64 ± 18 nM morphine. This is a substantially higher concentration than that (4 ± 0.6 nM) causing

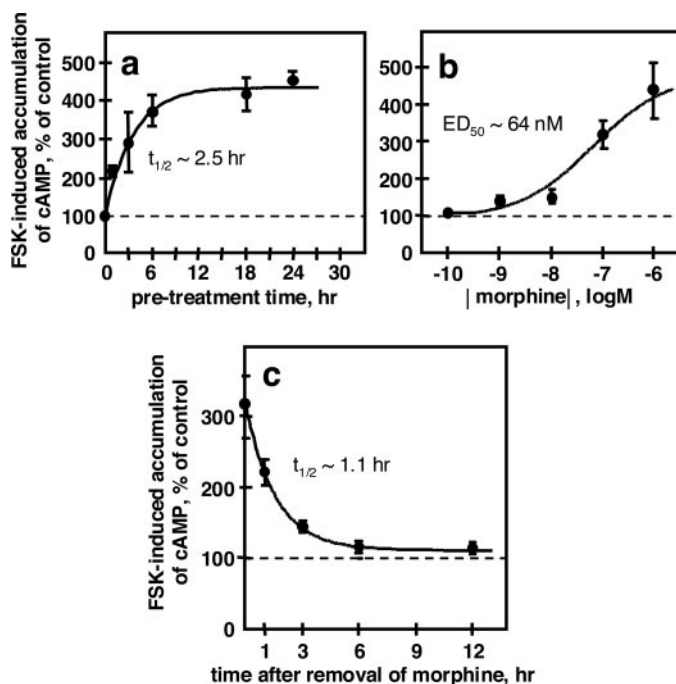


Fig. 2. AC sensitization elicited by long-term morphine exposure in SH-SY5Y sc2 cells is time-dependent, dose-related, and reversible. **a**, the time course of AC sensitization was determined by incubating the cells with $1 \mu\text{M}$ morphine for the indicated period of time, removal of the drug, and assay of forskolin-stimulated cAMP production as described under *Materials and Methods*. Half-maximum sensitization was attained approximately 2.5 h after exposure to morphine. **b**, dose-dependence of AC sensitization was determined by incubating cells for 18 h with morphine at the indicated concentration, washing free of the drug, and assaying for forskolin-stimulated cAMP production as described under *Materials and Methods*. Under these conditions, the concentration of morphine that caused half-maximum sensitization was estimated to be approximately 60 nM. **c**, the reversibility of AC sensitization was determined by incubating cells for 24 h with $1 \mu\text{M}$ morphine, drug removal, and assay of forskolin-stimulated cAMP production at the indicated time after drug removal. The AC-sensitized state waned completely within 6 h, with half-maximum desensitization being observed after approximately 1 h. Controls in **a**, **b**, and **c** refer to cells not exposed to morphine. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments with each measurement performed in triplicate.

half-maximum short-term inhibition of forskolin-stimulated cAMP production in these cells.

Finally, ACS elicited by long-term exposure to morphine was reversible (Fig. 2c) and diminished slowly upon drug removal. Challenging morphine-treated sc2 cells with forskolin at increasing time intervals after drug removal resulted in progressively decreased forskolin-stimulated production of intracellular cAMP, which returned to near control levels within approximately 6 h. The half-life of ACS elicited by a 24-h exposure to 1 μ M morphine was estimated to be 1.1 h.

Identification of Long-Term Morphine-Responsive Proteins in SH-SY5Y sc2 Cells. A proteomics approach limited to the proteome of detergent-resistant membrane rafts was implemented (see Introduction) to identify proteins that might have undergone changes in abundance or location in response to long-term morphine exposure in sc2 cells.

Membrane rafts were prepared from intact sc2 cells as a buoyant membrane fraction that is insoluble in cold Triton X-100 (1%, v/v), the so-called DRM fraction. This fraction, recovered at the 30/5% sucrose interface is enriched in specific raft markers, in this case alkaline phosphatase (Fig. 3a), a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, and flotillin (Fig. 3, b and c, left). It is also enriched in the G α i and G β subunits of heterotrimeric G proteins (Fig. 3c, middle and right) and contains the T7 epitope-tagged MOP receptor (Fig. 3d). This is consistent with the notion that morphine signaling may occur, at least in part, within DRM rafts in sc2 cells.

The DRM fraction isolated from untreated (6 and 24 h) morphine-treated, and continually (6 and 24 h) morphine-treated sc2 cells was solubilized with SDS, submitted to one-dimensional PAGE, and the proteins were stained with colloidal Coomassie blue. Figure 4a shows a representative one-dimensional protein map of the DRM fraction from neuroblastoma sc2 cells composed of at least 80 distinct protein bands.

Quantitative densitometric analyses of the stained gels indicated that short-term morphine exposure did not induce qualitative or quantitative detectable change in the rafts proteome from neuroblastoma cells (data not shown). In contrast, five protein bands (annotated I to V in Fig. 4a) were found to have been significantly down-regulated in rafts from continually morphine-treated cells. The identity of the protein(s) contained in these bands was determined by peptide mass fingerprinting using MALDI-MS and partial sequencing using nano-liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS, as described under *Materials and Methods*. Band I/II was found to contain heterotrimeric G protein subunits α i2 and α i3, bands III and IV, heterotrimeric G protein subunits β 1 and β 2, respectively, and band V, prohibitin (Fig. 4b). It is noteworthy that the down-regulated G protein subunits are established inhibitors of AC, especially isoform i, which is expressed in neuroblastoma SH-SY5Y cells (see *Discussion*). A 6-h pretreatment with morphine resulted in a significant decrease in the relative amount of G β 1 ($-16.1 \pm 2.7\%$; $p = 0.0236$) but not of G α i2, G α i3, G β 2, or prohibitin. A 24-h pretreatment with morphine caused a significant reduction in the relative amounts of the five proteins G α i2 ($-16.8 \pm 2.3\%$; $p = 0.0423$), G α i3 ($-25.9 \pm 1.6\%$; $p = 0.0175$), G β 1 ($-24.1 \pm 6.2\%$; $p = 0.0246$), G β 2 ($-34.1 \pm 5.6\%$; $p = 0.0148$) (Fig. 4c), and prohibitin ($-38.4 \pm 6.4\%$; $p = 0.0464$).

Down-regulation of the G protein subunits elicited by long-

term morphine treatment was confirmed by Western blot analysis of whole neuroblastoma cell extracts using antibodies to G α i and G β . Figure 5 shows that in comparison with no pretreatment, pretreatment of the cells with morphine for 6 h induced a significant decrease in the amount of G β ($-28.5 \pm 6.3\%$, $p = 0.004$) but no significant change in the amount of G α i ($8.9 \pm 9.5\%$; $p = 0.3816$). Pretreatment of the cells with morphine for 24 h resulted in further down-regulation of G β ($-35.6 \pm 6.1\%$, $p = 0.0012$) and substantial down-regulation of G α i ($-35.7 \pm 4.9\%$, $p = 0.0003$). Down-regulation of G β but not G α i (or prohibitin) was apparent after 6 h of exposure to morphine, a condition producing submaximal ACS in sc2 cells (Fig. 2a), making it clear that down-regulation of G β but not G α i (or prohibitin) could be correlated to ACS in SH-SY5Y sc2 cells. The remainder of the study therefore focused specifically on G β .

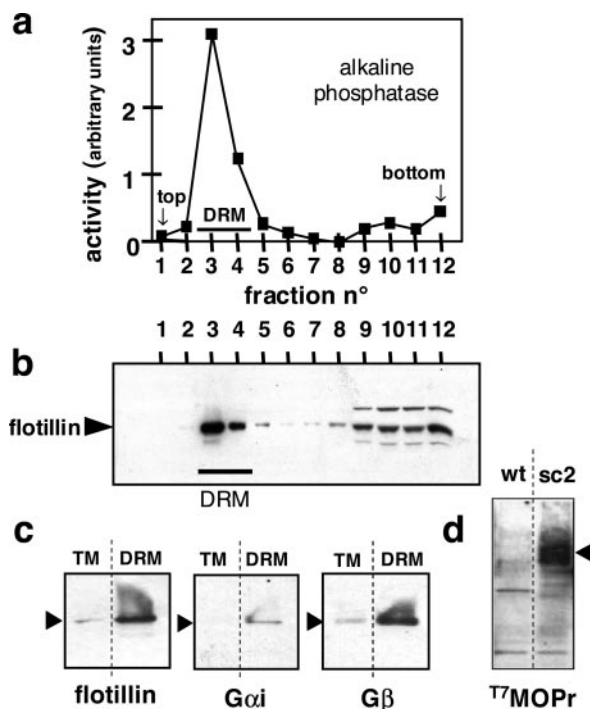


Fig. 3. Isolation of DRM rafts from SH-SY5Y sc2 cells. Cells were lysed in cold Triton X-100, and the lysate was floated by ultracentrifugation in a discontinuous sucrose density gradient as described under *Materials and Methods*. Each 1-ml gradient fraction was probed for the presence of alkaline phosphatase and flotillin, established membrane rafts markers. a, assay of 50- μ l aliquots of each fraction for alkaline phosphatase activity indicates that the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme is recovered for the most part in the low-density fraction (labeled DRM) at the 30/5% sucrose interface near the top of the gradient. Much less activity is detected in the detergent-solubilized fractions at the bottom of the gradient. b, low-density fractions 3 and 4 (labeled DRM) at the 30/5% sucrose interface are enriched in flotillin. A 20- μ l aliquot of each gradient fraction was submitted to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed for flotillin-1 using a specific antibody. c, in comparison with the TM fraction (the high-speed pellet from whole-cell homogenates), the DRM fraction seems to be substantially enriched in flotillin (left). Equal amounts (10 μ g) of protein from pooled gradient fractions 3 and 4 (DRM fraction) and the TM fraction were submitted to SDS-PAGE and immunoblotted using an antibody to flotillin-1 (left). The TM and DRM fractions were also compared for heterotrimeric G protein subunits α i (middle) or G β (right) content by immunoblotting with the appropriate antibody, as described above. As is observed for flotillin, the DRM fraction is substantially enriched in G α i and G β compared with the TM fraction. d, the T7-epitope tagged MOP receptor is present in the DRM fraction isolated from SH-SY5Y sc2 cells but not in that from wt cells, used as control. Immunoblotting was with an anti-T7 antibody.

Correlation between Levels of G β and ACS in SH-SY5Y sc2 Cells. A high degree of correlation existed between levels of G β and the amplitude of ACS elicited by long-term morphine treatment in SH-SY5Y sc2 cells. Quantitative Western blot analysis showed that down-regulation of G β closely paralleled ACS with respect to both the duration of exposure to morphine and the morphine dose. Half-maximum down-regulation of G β was attained after approximately 2 h of treatment with 1 μ M morphine (Fig. 6a), a duration close to that (2.5 h) necessary to produce half-maximum ACS (Fig. 2a). Likewise, the concentration of morphine eliciting half-maximum down-regulation of G β (Fig. 6b) was calculated to be approximately 50 nM, similar to that (64 nM) producing half-maximum ACS (Fig. 2b) under the same conditions. Linear regression analysis of normalized experimental data shown in Figs. 2, a and b, and 6, a and b,

reveals the high correlation ($r^2 = 0.9619$) between ACS and down-regulation of G β (Fig. 6c), a strong indication that morphine-elicited down-regulation of G β is involved in AC sensitization. On the other hand, the decrease in ACS observed in morphine-treated cells after removal of the drug was paralleled by an up-regulation of G β , with cellular levels returning to control (untreated cells) values 6 h after withdrawal (i.e., when ACS was no longer present) (Fig. 6d).

Effects of Inhibiting Proteasome Activity on Morphine-Induced Down-Regulation of G β and ACS in SH-SY5Y sc2 Cells. Because the ubiquitin-proteasome pathway provides one potential mechanism of G protein degradation (see *Discussion*), we tested whether blocking proteasome activity could affect long-term morphine-induced down-regulation of G β and ACS in SH-SY5Y sc2 cells. sc2 cells were therefore treated with MG-115 or lactacystin, two inhibitors of proteasome activity, for 6 h in the absence or presence of morphine.

Treating sc2 cells with either proteasome inhibitor alone

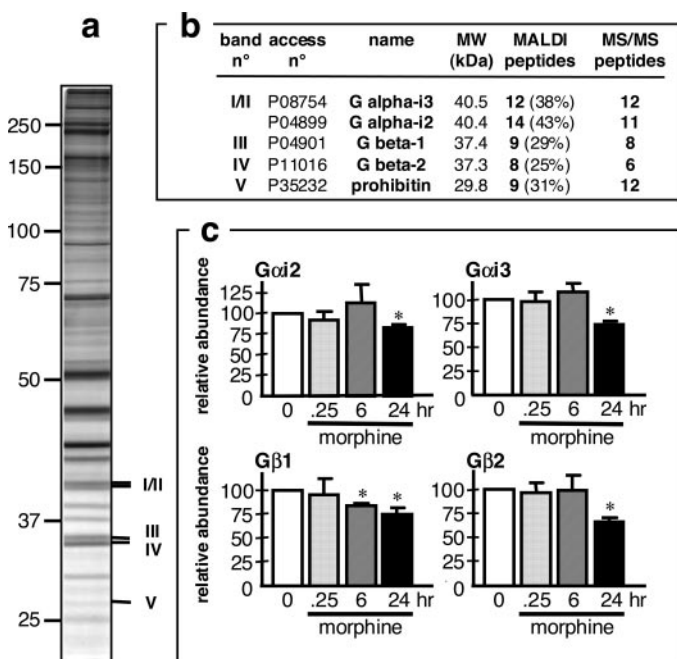


Fig. 4. Identification of morphine-responsive proteins in detergent-resistant membrane rafts isolated from SH-SY5Y sc2 cells. a, representative one-dimensional (SDS-PAGE) protein map of DRM rafts isolated from SH-SY5Y sc2 cells. Staining was with colloidal Coomassie blue and revealed up to 80 distinct protein bands. Marker relative molecular mass (M_r) is indicated to the left (in kilodaltons). The position of the five continually morphine-responsive (down-regulated) proteins is indicated in Roman numerals to the right. b, MALDI-MS and ESI-MS/MS protein identification reveals band(s) I/II to contain heterotrimeric G protein subunits α 2 and α 3, bands III and IV, heterotrimeric G protein subunits β 1 and β 2, respectively, and band V, prohibitin. MALDI peptides: the number of assigned peptides with $M_r(\text{expt}) - M_r(\text{calc}) < 20$ ppm and 0 or 1 trypsin miscleavage. The percentage of the full-length sequence covered by the matching peptides is indicated in parentheses. MS/MS peptides: the number of peptides for which the spectrum allowed protein identification with Mascot individual ion scores > 28 , indicating that the match is statistically significant ($p < 0.05$). The accession number is that of the Swiss-Prot database. c, down-regulation of Gai2, Gai3, G β 1, and G β 2 elicited by long-term morphine exposure is time-dependent. SH-SY5Y sc2 cells were exposed to 1 μ M morphine for 0.25 (15 min), 6, or 24 h, and the DRM rafts were isolated and processed for densitometric quantification of the four morphine-responsive proteins as described under *Materials and Methods*. Note that only G β 1 is significantly down-regulated after 6-h exposure to morphine, a condition that produces submaximal AC sensitization in sc2 cells (Fig. 2a). Unfilled bars represent the amount of protein in DRM rafts from cells not exposed to morphine. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of at least four separate experiments. *, $p < 0.05$.

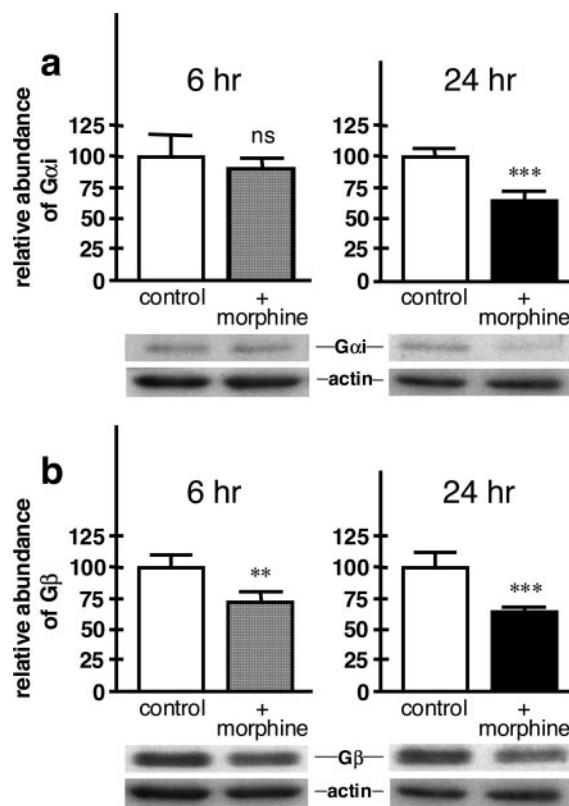


Fig. 5. Long-term morphine exposure down-regulates heterotrimeric G protein α and β subunits in SH-SY5Y sc2 cells: validation by quantitative immunoblot analysis in whole-cell extracts. a, SH-SY5Y sc2 cells were exposed to 1 μ M morphine for 6 (left) or 24 h (right) and were processed for SDS-PAGE and immunoblotting using an antibody to Gai1-3, as described under *Materials and Methods*. Significant down-regulation ($-35.7 \pm 4.9\%$) of Gai was observed after 24 h but not after 6 h of treatment, results similar to those observed by densitometric analysis (Fig. 4c). b, same as in a, except that immunoblotting was with an antibody to G β 1-4. Significant down-regulation ($-28.5 \pm 6.3\%$) is manifest after a 6-h treatment with morphine, confirming the densitometric analysis (Fig. 4c). Treatment (24 h) with morphine (right) induced $35.6 \pm 6.1\%$ down-regulation of G β . Gai and G β protein abundance was determined relative to an actin (morphine-unresponsive) internal standard. Unfilled bars represent the amount of protein in extracts from cells not exposed to morphine. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of at least four separate experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant ($p > 0.05$).

was found to enhance forskolin-stimulated synthesis of intracellular cAMP (Fig. 7a, left). However, treatment with proteasome inhibitor alone did not result in any significant change in G β abundance, as assessed by quantitative Western blot analysis of whole-cell extracts (Fig. 7a, right). Thus, in contrast to ACS induced by long-term morphine treatment, ACS elicited by the proteasome inhibitors seemed to be independent of G β . We verified (data not shown) that neither MG-115 nor lactacystin enhanced incorporation of [3 H]adenine into the intracellular ATP pool (see *Materials and Methods*) or induced up-regulation of the AC stimulatory G α s subunit.

Long-term exposure of sc2 cells to morphine in the presence of MG-115 or lactacystin did not produce any further enhancement of forskolin-stimulated production of cAMP over that elicited by either proteasome inhibitor alone (Fig.

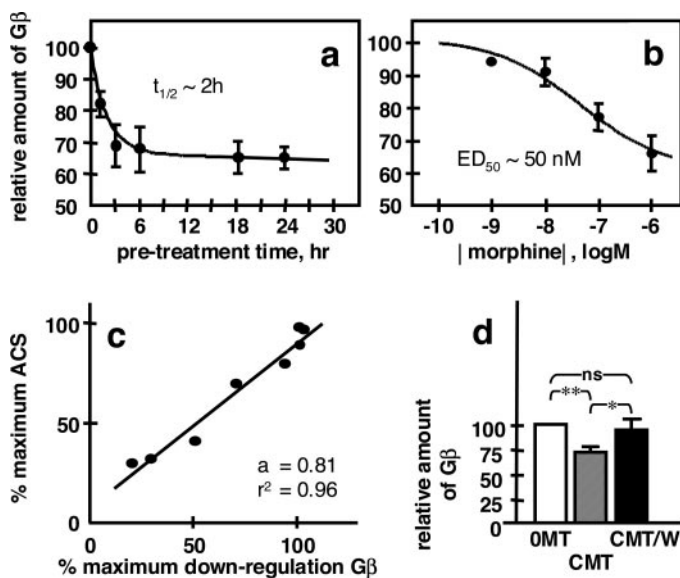


Fig. 6. Morphine-induced down-regulation of G β is highly correlated with AC sensitization in SH-SY5Y sc2 cells. **a**, down-regulation of G β elicited by long-term exposure to morphine shows a time course similar to that of AC sensitization. Cells were incubated with 1 μ M morphine for the indicated period of time and processed for Western blot quantification of G β as described under *Materials and Methods*. Half-maximum down-regulation of G β was attained after approximately 2 h. **b**, down-regulation of G β elicited by long-term exposure to morphine shows a dose dependence similar to that of AC sensitization. Here, the cells were incubated for 18 h with morphine at the indicated concentration and processed for Western blot quantification of G β as described under *Materials and Methods*. The concentration of morphine causing half-maximum down-regulation of G β was estimated to be approximately 50 nM. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments. **c**, correlation between AC sensitization and G β down-regulation elicited by long-term exposure to morphine in SH-SY5Y sc2 cells. Experimental data shown in Fig. 2, **a** and **b**, were normalized to the percentage of maximum AC sensitization, and those shown in Fig. 6, **a** and **b**, were normalized to the percentage of maximum G β down-regulation; **a** is the linear regression slope. **d**, withdrawal of morphine-conditioned SH-SY5Y sc2 cells from morphine induces G β repletion. Drug-naive (OMT), continually morphine-treated (CMT), and continually morphine-treated and withdrawn (CMT/W) cells were assayed for G β content by Western blot. Long-term morphine treatment was with 1 μ M morphine for 24 h, ensuring maximum AC sensitization (Fig. 2a). CMT/W cells were assayed 6 h after removal of the drug, a condition that ensures the complete reversal of AC sensitization (Fig. 2c). In comparison with control (OMT) cells, CMT cells show a significantly diminished G β content, whereas CMT/W cells show a G β content not significantly different from that of control cells. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ns, not significant ($p > 0.05$).

7b, left). This could be taken to mean that proteasome inhibition suppressed the ability of morphine to promote AC sensitization, although it cannot be excluded that the proteasome inhibitors prohibit further morphine sensitization by locking the enzyme into a maximally sensitized state. We were unable to identify experimental conditions, such as dose and/or duration of treatment with proteasome inhibitor, whereby ACS induced by proteasome inhibitor and morphine could be dissociated. However, whereas long-term morphine treatment induced substantial down-regulation of G β in the absence of proteasome inhibitors, it did not so in the presence of MG-115 or lactacystin (Fig. 7b, right). The failure of long-term morphine to induce G β down-regulation in MG-115- or lactacystin-treated cells provides a clear indication that down-regulation of G β is brought about by proteasomal degradation of the G protein subunit.

Discussion

The primary aim of this study was to identify protein changes elicited by long-term morphine treatment in an improved cellular model of opiate dependence [i.e., a recombinant human neuroblastoma SH-SY5Y clone (sc2)] stably overexpressing the MOP receptor, the principal if not exclusive vector of short- and long-term morphine actions in vivo (Matthes et al., 1996). In sc2 cells, morphine is shown to be far more potent and efficacious in acutely inhibiting forskolin-induced cAMP production, and long-term morphine exposure is shown to induce a degree of ACS, a hallmark of opiate dependence, substantially higher than that observed in wild-type cells. On the basis of mRNA content, SH-SY5Y cells are expected to express AC1 and AC8 (Jang and Juhn, 2001), two of the four AC isoforms shown previously to be sensitized upon long-term morphine treatment (Avidor-Reiss et al., 1997). However, it remains to be firmly established which particular AC isoform(s) morphine sensitizes in the neuroblastoma SH-SY5Y clone used in the present study.

Our proteomics analysis in which the proteomes of detergent-resistant membrane rafts isolated from drug-naive and morphine-treated cells were compared has detected the significant down-regulation of five proteins, subsequently identified by mass spectrometry to be the heterotrimeric G protein subunits α 2, α 3, β 1, and β 2, and prohibitin. Down-regulation of the α and β subunits was confirmed by Western blot analysis of whole-cell extracts using G protein subunit-specific antibodies. It is noteworthy that quantitatively similar decreases in subunit abundance are observed in whole cells and the DRM fraction thereof, suggesting that the down-regulated G protein subunits are essentially confined to membrane rafts. This is consistent with the large enrichment in G α i and G β subunits of the DRM fraction and the presence therein of the MOP receptor. It also indicates that the decrease in abundance of the α and β subunits elicited by long-term morphine treatment is caused by degradation rather than relocation to another subcellular compartment, such as the nonraft fraction of the plasma membrane or the cytosol.

Morphine-induced down-regulation of the five morphine-responsive proteins proceeded in an ordered way, with down-regulation of G β preceding that of G α i and prohibitin. There was clear down-regulation of G β , but not of G α i or prohibitin, after 6-h exposure of the cells to the drug, a condition that

caused submaximal sensitization of adenylate cyclase. This indicated a possible correlation of G β abundance, but not G α i or prohibitin, with ACS. Indeed, G β abundance and the amplitude of adenylate cyclase sensitization were found to be tightly coupled in SH-SY5Y sc2 cells. The increase in ACS with the duration of morphine exposure or with the dose of morphine was closely paralleled by a decrease in the amount of G β . On the other hand, the decrease of AC sensitization seen after removal of the drug in morphine-pretreated cells was accompanied by an increase in the amounts of G β . The close correlation between down-regulation of G β and ACS in SH-SY5Y cells suggests a cause-and-effect relationship, although the precise mechanistic link remains to be determined. However, from a knowledge that AC1 and AC8 mRNA is present in neuroblastoma cells (Jang and Juhn, 2001) and that AC1 (Nielsen et al., 1996) and perhaps AC8 (Steiner et al., 2005) are inhibited by G β γ , one possible mechanism whereby morphine sensitizes adenylate cyclase could be by the removal of a direct G β γ -mediated inhibitory constraint. Indeed, this hypothetical mechanism may apply to the other morphine-sensitizable AC isoforms as well, because scavengers of G β γ were reported previously to block morphine-induced sensitization of AC5 and AC6 (Avidor-Reiss et al., 1996; Rubenzik et al., 2001), two AC isoforms also known to be inhibited by G β γ (Bayewitch et al., 1998). However, it is possible that in other cellular models, mechanisms other than down-regulation link G protein subunits with AC sensitization. For example, in MOP receptor-transfected CHO cells, long-term morphine exposure has been shown to induce changes in detergent solubility rather than abundance of G α i and G β 1, correlated with the onset of AC sensitization (Bayewitch et al., 2000).

The other important observation of the present study is

that down-regulation of G β elicited by long-term morphine treatment in SH-SY5Y sc2 cells is totally blocked by MG-115 or lactacystin. Thus, down-regulation of G β is most probably caused by degradation by the proteasome (i.e., long-term morphine stimulates proteasomal degradation of G β to sensitize AC in these cells). Because the β subunit is normally associated with a γ subunit to form a quasi-irreversible $\beta\gamma$ heterodimer in the cell (Gautam et al., 1998), down-regulation of G β is likely to reflect degradation of the entire G $\beta\gamma$ heterodimer. There is now strong evidence for the specific degradation of heterotrimeric G protein subunits by the ubiquitin-proteasome pathway, including G α 1 (Madura and Varshavsky, 1994; Marotti et al., 2002), G α o (Busconi et al., 2000), G α i3 (Fischer et al., 2003), and G $\beta\gamma$ (Obin et al., 2002; Hamilton et al., 2003). For instance, proteasome-dependent degradation of G β , which we find to be down-regulated in morphine-conditioned neuroblastoma cells, was recently shown to be initiated by ubiquitylation of the γ subunit (Obin et al., 2002), consistent with a recent report that the γ 2 subunit is an N-end rule ubiquitylation substrate (Hamilton et al., 2003). It is interesting that proteasomal degradation of heterotrimeric G protein subunits seems to be dependent on accessory/adaptor regulatory proteins, such as phosducin (Obin et al., 2002), the regulator of G protein signaling RGS-GAIP (Fischer et al., 2003), and perhaps also the activator of G protein signaling 3 (AGS3), which was recently reported to slow down the degradation of G α i and to suppress AC sensitization elicited by prolonged stimulation of the α 2-adrenergic receptor in CHO cells (Sato et al., 2004). Morphine could use analogous molecular pathways, particularly the activity-dependent ubiquitylation of G γ , and the proteasomal degradation of the ubiquitylated G $\beta\gamma$ heterodimer to sensitize adenylate cyclase in SH-SY5Y sc2 cells.

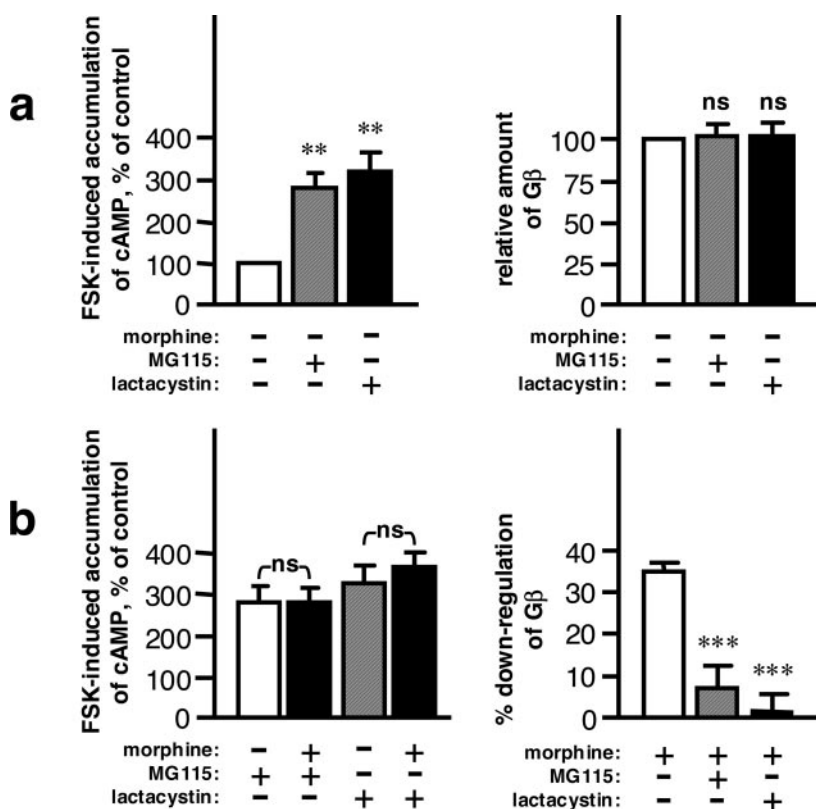


Fig. 7. Proteasome inhibitors block both down-regulation of G β and AC sensitization elicited by long-term morphine exposure in SH-SY5Y sc2 cells. **a**, in control, morphine-naïve cells, MG-115 or lactacystin alone induce enhanced forskolin-stimulated production of cAMP (left), but neither of the two proteasome inhibitors affect cellular G β content (right). Cells were incubated with 3 μ M MG-115 or 10 μ M lactacystin for 6 h, in the absence of morphine, and assayed for forskolin-induced accumulation of cAMP or processed for Western blot G β quantification, as described under *Materials and Methods*. **b**, in the presence of MG-115 or lactacystin, morphine did not induce further enhancement of forskolin-induced accumulation of cAMP over that produced by MG-115 or lactacystin alone in SH-SY5Y sc2 cells (left). Morphine did not induce down-regulation of G β under these conditions (right). Cells were incubated with 1 μ M morphine in the presence of 3 μ M MG-115 or 10 μ M lactacystin for 6 h and assayed for forskolin-stimulated production of cAMP and G β content, as described above. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant ($p > 0.05$).

It is clear that another critical issue will be to show that long-term morphine exposure acts in the same way in the brain as it is proposed here to do in neuroblastoma SH-SY5Y cells (i.e., via the proteasome). Although there is as yet no available direct evidence for the involvement of the proteasome in drug dependence, recent *in vivo* studies have established a role for regulators of G protein signaling in this process, with changes in RGS9 (Zachariou et al., 2003) or AGS3 (Bowers et al., 2004) brain levels contributing to the behavioral and neural plasticity associated with long-term administration of morphine or cocaine in rodents. These molecular adaptations, together with the emergent recognition that these accessory proteins function as drug-dependent regulators of heterotrimeric G protein processing by the UP pathway (see above), suggest a role of the proteasome in mediating the long-term effects of abused drugs. It is tempting to speculate that proteasomal degradation of G β elicited by sustained activation of the MOP receptor by morphine in the brain contributes to "hypertrophy of the cAMP system", the hallmark of opiate dependence. So far, there is only mixed evidence for regulation of G β levels in the brain of continually morphine-treated rats. Although a pioneer Western blot analysis failed to detect any significant down-regulation of G β in locus coeruleus and frontal cortex (Nestler et al., 1989), a recent quantitative proteomic analysis of synaptic plasma membranes isolated from cerebral cortex has documented, among other protein changes, the down-regulation of G β (Prokai et al., 2005).

In conclusion, the present work has suggested a plausible molecular mechanism for opiate-induced sensitization of adenylyl cyclase, a hallmark of opiate dependence, and identified the proteasome as mediating adaptations to long-term opiate exposure in cultured neuroblastoma cells *in vitro*. Further studies are needed to generalize the role of the ubiquitin-proteasome pathway in the actions of long-term morphine exposure *in vivo*.

Acknowledgments

We thank Dr. Christopher Topham for stylistic supervision of the manuscript.

References

- Alvarez R and Daniels DV (1992) A separation method for the assay of adenylyl cyclase, intracellular cyclic AMP and cyclic-AMP phosphodiesterase using tritium-labeled substrates. *Anal Biochem* **203**:76–82.
- Avidor-Reiss T, Bayewitch M, Levy R, Matus-Leibovitch N, Neto I, and Vogel Z (1995) Adenylyl cyclase superactivation in μ -opioid receptor-transfected Chinese hamster ovary cells following chronic opioid treatment. *J Biol Chem* **270**:29732–29738.
- Avidor-Reiss T, Nevo I, Levy R, Pfeuffer T, and Vogel Z (1996) Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation: involvement of G β γ . *J Biol Chem* **271**:21309–21315.
- Avidor-Reiss T, Nevo I, Saya D, Bayewitch M, and Vogel Z (1997) Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific. *J Biol Chem* **272**:5040–5047.
- Bayewitch ML, Avidor-Reiss T, Levy R, Pfeuffer T, Nevo I, Simonds WF, and Vogel Z (1998) Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various G β γ subunits. *FASEB J* **12**:1019–1025.
- Bayewitch ML, Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Simonds WF, and Vogel Z (2000) Alterations in detergent solubility of heterotrimeric G proteins after chronic activation of G β γ -coupled receptors: changes in receptor solubility are in correlation with onset of adenylyl cyclase superactivation. *Mol Pharmacol* **57**:820–825.
- Blonder J, Hale ML, Lucas DA, Schaefer CF, Yu L-R, Conrads TP, Issaq HJ, Stiles BG, and Veenstra TD (2004) Proteomic analysis of detergent-resistant membrane rafts. *Electrophoresis* **25**:1307–1318.
- Bowers MS, McFarland K, Lake RW, Peterson YK, Lapish CC, Gregory ML, Lanier SM, and Kalivas PW (2004) Activator of G protein signaling 3: a gatekeeper of cocaine sensitization and drug seeking. *Neuron* **42**:269–281.
- Busconi L, Guan J, and Denker BM (2000) Degradation of heterotrimeric G α _s subunits via the proteasome pathway is induced by the hsp90-specific compound geldanamycin. *J Biol Chem* **275**:1565–1569.
- Chini B and Parenti M (2004) G protein-coupled receptors in rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol* **32**:325–338.
- Collier HOJ and Francis DL (1975) Morphine abstinence is associated with increased brain cyclic AMP. *Nature (Lond)* **255**:159–162.
- Cooper DM (2003) Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* **375**:517–529.
- Duman RS, Tallman JF, and Nestler EJ (1988) Acute and chronic opiate regulation of adenylyl cyclase in brain: specific effects in locus coeruleus. *J Pharmacol Exp Ther* **24**:1033–1039.
- Fischer T, De Vries L, Meerloo T, and Farquhar MG (2003) Promotion of Gai3 subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:8270–8275.
- Foster LJ, de Hoog CL, and Mann M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:5813–5818.
- Gautam N, Downes GB, Yan K, and Kisselev O (1998) The G protein $\beta\gamma$ complex. *Cell Signal* **10**:447–455.
- Hamilton MH, Cook LA, McRackan TR, Schey KL, and Hildebrandt JD (2003) γ_2 Subunit of G protein heterotrimer is an N-end rule ubiquitylation substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:5081–5086.
- Jang I-S and Juhnn Y-S (2001) Adaptation of cAMP signaling system in SH-SY5Y neuroblastoma cells following expression of a constitutively stimulatory G protein alpha, Q227L Gs α . *Exp Mol Med* **33**:37–45.
- Johnston CA and Watts VJ (2003) Sensitization of adenylyl cyclase: a general mechanism of neuroadaptation to persistent activation of G $\alpha_{v/o}$ -coupled receptors? *Life Sci* **73**:2913–2925.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science (Wash DC)* **294**:1030–1038.
- Kelly AE (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* **44**:161–179.
- Koob GF, Sanna PP, and Bloom FE (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron* **21**:467–476.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275.
- Madura K and Varshavsky A (1994) Degradation of G alpha by the N-end rule pathway. *Science (Wash DC)* **265**:1454–1458.
- Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J, and Schutz G (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science (Wash DC)* **27**:657–659.
- Maldonado R, Valverde O, Garbay C, and Roques BP (1995) Protein kinases in the locus coeruleus and periaqueductal gray matter are involved in the expression of opiate withdrawal. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **35**:565–575.
- Marotti LA, Newitt R, Aebersold R, and Dohlman HG (2002) Direct identification of a G protein ubiquitination site by mass spectrometry. *Biochemistry* **41**:5067–5074.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, et al. (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Nature (Lond)* **383**:819–823.
- Nestler EJ (2004) Historical review: molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* **25**:210–218.
- Nestler EJ, Erdoz JJ, Terwilliger R, Duman RS, and Tallman JF (1989) Regulation of G proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Res* **476**:230–239.
- Nestler EJ and Tallman JF (1988) Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. *Mol Pharmacol* **33**:127–132.
- Nielsen MD, Chan GCK, Poser SW, and Storm DR (1996) Differential regulation of type I and type VIII calcium-stimulated adenylyl cyclases by G γ -coupled receptors *in vivo*. *J Biol Chem* **271**:33308–33316.
- Obin M, Lee BY, Meinke G, Bohm A, Lee RH, Gaudet R, Hopp JA, Arshavsky VY, Willardson BM, and Taylor A (2002) Ubiquitylation of the transducin $\beta\gamma$ subunit complex. Regulation by phosducin. *J Biol Chem* **277**:44566–44575.
- Ostrom RS and Insel PA (2004) The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* **143**:235–245.
- Prokai L, Zharikova AD, and Stevens SM Jr (2005) Effect of morphine exposure on the synaptic plasma-membrane subproteome of rats: a quantitative protein profiling study based on isotope-coded affinity tags and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **40**:169–175.
- Rubenzik M, Varga E, Stropova D, Roeske WR, and Yamamura HI (2001) Expression of α -transducin in Chinese hamster ovary cells stably transfected with the human δ -opioid receptor attenuates chronic opioid-induced adenylyl cyclase superactivation. *Mol Pharmacol* **60**:1076–1082.
- Sato M, Gettys TW, and Lanier SM (2004) AGS3 and signal integration by G α_s - and G α_i -coupled receptors: AGS3 blocks the sensitization of adenylyl cyclase following prolonged stimulation of a G α_i -coupled receptor by influencing processing of G α_i . *J Biol Chem* **279**:13375–13382.
- Sharma SK, Nirenberg M, and Klee WA (1975a) Dual regulation of adenylyl cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**:3092–3096.
- Sharma SK, Nirenberg M, and Klee WA (1975b) Morphine receptors as regulators of adenylyl cyclase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**:590–594.
- Steiner D, Avidor-Reiss T, Schallmach E, Butovsky E, Lev N, and Vogel Z (2005) Regulation of adenylyl cyclase type VIII splice variants by acute and chronic G β γ -coupled receptor activation. *Biochem J* **386**:341–348.
- Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Severino KA, Crain SM, and Nestler EJ (1991) A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res* **54**:100–110.
- Thomas JM and Hoffman BB (1987) Adenylyl cyclase supersensitivity: a general

- means of cellular adaptation to inhibitory agonists? *Trends Pharmacol Sci* **8**:308–311.
- von Haller PD, Donohoe S, Goodlett DR, Aebersold R, and Watts JD (2001) Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics* **1**:1010–1021.
- Yu VC, Eiger S, Duan DS, Lameh J, and Sadee W (1990) Regulation of cyclic AMP by the mu-opioid receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **55**:1390–1396.

Zachariou V, Georgescu D, Sanchez N, Rahman Z, DiLeone R, Berton O, Neve RL, Sim-Selley LJ, Selley DE, Gold SJ, et al. (2003) Essential role of RGS9 in opiate action. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:13656–13661.

Address correspondence to: Dr. Jean-Claude Meunier, IPBS-CNRS UMR5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 04, France. E-mail: jean-claude.meunier@ipbs.fr

B. Suite de ces travaux

1- Dans les cellules SH-SY5Y : la protéine $G\gamma_2$ est downrégulée après un traitement de 6h à la morphine

Après avoir mis en évidence la dégradation par le protéasome de la protéine $G\beta$ dans les cellules SH-SY5Y traitées de façon chronique à la morphine, nous avons voulu savoir si cette dégradation reflétait plus globalement celle du dimère $G\beta\gamma$. Ainsi, nous avons cherché si une protéine de type $G\gamma$ subit aussi une dégradation dépendante du protéasome avec la même cinétique que celle mise en évidence pour la protéine $G\beta$.

Nous nous sommes intéressés à la protéine $G\gamma_2$ puisque les travaux d'Hamilton *et al* ont montré que cette protéine est un substrat de dégradation du protéasome par la voie « N-end rule » *in vitro* (Hamilton et al., 2003). Ainsi, les cellules SH-SY5Y ont été traitées en présence ou non d'inhibiteur de protéasome (MG115) par 1 μ M de morphine pendant 6h, temps nécessaire pour induire une downrégulation significative de la protéine $G\beta$. Un western blot anti- $G\gamma_2$ est alors réalisé sur les extraits totaux. Comme le montre la figure 33, un tel traitement induit une downrégulation d'environ 30 % de la protéine $G\gamma_2$. De plus cette downrégulation est inhibée en présence de MG115. Ces résultats suggèrent qu'un traitement chronique à la morphine conduit à la dégradation par le protéasome d'un dimère $G\beta\gamma_2$. De part les travaux de Obin *et al* (Obin et al., 2002) et d'Hamilton *et al* (Hamilton et al., 2003), il est possible de proposer qu'un traitement chronique à la morphine conduit à l'ubiquitinylation de la sous-unité $G\gamma_2$ par la voie « N-end rule » permettant l'adressage du dimère $G\beta\gamma_2$ vers la dégradation par le protéasome. Des travaux sont actuellement en cours dans l'équipe pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

2- Chez la souris

L'objectif des travaux initiés au cours de ma thèse était d'identifier des adaptations moléculaires à un traitement chronique à la morphine dans les cellules modèles SH-SY5Y. Il ne s'agit que d'une étape dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les effets à long terme de la morphine. En effet, des études *in vivo* sont indispensables pour valider l'importance de telles modifications dans le cadre de la dépendance aux opiacés. Ainsi, une collaboration entre l'équipe de Jean-Claude Meunier et de Bernard Francés du Centre de Recherches sur la Cognition Animale de Toulouse a été mise en place.

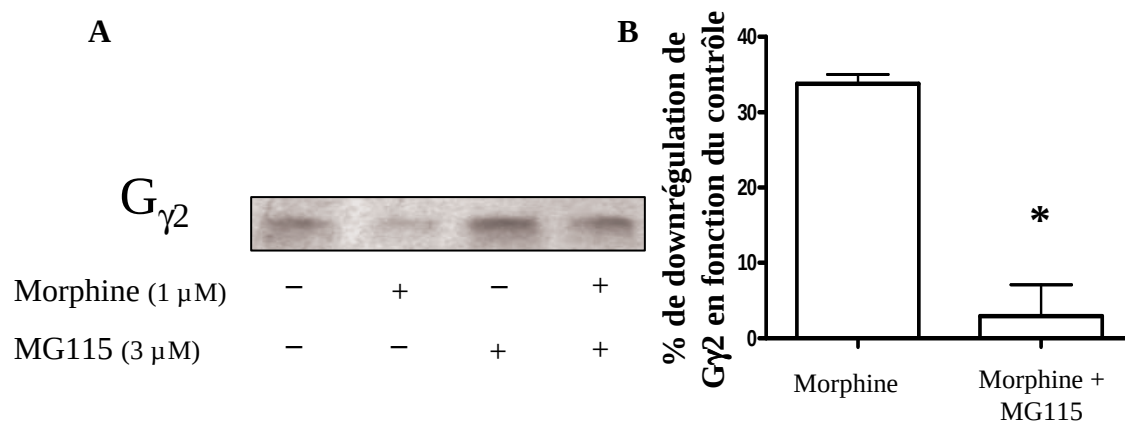


Figure 33 : Un traitement de 6h à la morphine induit une dégradation par le protéasome de la protéine $G_{\gamma 2}$ dans les cellules SH-SY5Y. **A-** Les cellules sont traitées dans des plaques de 24 puits puis solubilisées directement dans du tampon de Laemmli. Les extraits totaux sont soumis à une électrophorèse SDS-PAGE à 17 % de polyacrylamide. Après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, un western blot anti- $G_{\gamma 2}$ est réalisé. **B-** La quantification est réalisée à l'aide du logiciel Quantity One en utilisant une bande non spécifique comme étalon interne (* $p < 0,01$ t-test, $n = 4$).

a) Un traitement chronique à la morphine conduit à la downrégulation de $G\gamma_2$ dans le noyau accumbens de souris

Les premiers travaux effectués dans le cadre de cette collaboration montrent qu'un traitement chronique à la morphine, induisant chez la souris une dépendance physique, conduit à une downrégulation significative ($p = 0,04$) d'environ 20 % de la protéine $G\gamma_2$ dans le noyau accumbens. Ce résultat suggère que des adaptations moléculaires à la morphine dans des régions du cerveau impliquées dans la dépendance aux drogues peuvent être reproduites dans le modèle cellulaire SH-SY5Y. Il reste encore à savoir si cette downrégulation est le résultat d'une dégradation par le protéasome. En ce qui concerne la protéine $G\beta$, aucune downrégulation n'a été mise en évidence dans le noyau accumbens de souris pour les mêmes conditions de traitement à la morphine. Cependant, l'anticorps utilisé pour le western blot est capable de reconnaître les sous-unités $G\beta_1$, 2, 3 et 4. Il est donc possible que la downrégulation d'une unique sous-unité soit en quelque sorte « noyée » par la détection des autres sous-unités non affectées par le traitement à la morphine. L'utilisation d'anticorps plus spécifiques permettra de vérifier cette hypothèse.

b) La lactacystine inhiberait la préférence de place conditionnée induite par la morphine chez la souris

Parallèlement aux études biochimiques précédentes, des tests comportementaux ont été initiés chez la souris. L'objectif étant de savoir si le protéasome est impliqué d'une façon ou d'une autre dans l'acquisition de la dépendance à la morphine. Pour répondre à cette question des souris ont été traitées à la morphine et soumises à un test de préférence de place conditionnée. Les premiers résultats suggèrent que les souris ayant reçu une injection de lactacystine (un inhibiteur spécifique du protéasome) directement dans le noyau accumbens préalablement au traitement à la morphine ne présenteraient plus de préférence de place. Ces travaux effectués sur un nombre encore restreint de souris restent à confirmer sur un plus large panel d'animaux.

- C. Protéome total de la cellule: « Effect of long-term exposure of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to morphine: a whole cell proteomic analysis »**

Research

Open Access

Effect of long-term exposure of SH-SY5Y cells to morphine: a whole cell proteomic analysis

Jérémie Neasta¹, Sandrine Uttenweiler-Joseph², Karima Chaoui¹, Bernard Monsarrat², Jean-Claude Meunier¹ and Lionel Moulédous^{*1}

Address: ¹Unité Mécanismes d'action des substances opioïdes, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 04, France and ²Unité Spectrométrie de masse et structure des biomolécules, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 04, France

Email: Jérémie Neasta - neasta@ipbs.fr; Sandrine Uttenweiler-Joseph - sandrine.uttweiler@ipbs.fr; Karima Chaoui - karima.chaoui@ipbs.fr; Bernard Monsarrat - bernard.monsarrat@ipbs.fr; Jean-Claude Meunier - jcm@ipbs.fr; Lionel Moulédous* - lionel.mouledous@ipbs.fr

* Corresponding author

Published: 21 December 2006

Received: 19 September 2006

Proteome Science 2006, 4:23 doi:10.1186/1477-5956-4-23

Accepted: 21 December 2006

This article is available from: <http://www.proteomesci.com/content/4/1/23>

© 2006 Neasta et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Opiate addiction reflects plastic changes that durably alter synaptic transmission within relevant neuronal circuits. The biochemical mechanisms of these adaptations remain largely unknown and proteomics-based approaches could lead to a broad characterization of the molecular events underlying adaptations to chronic drug exposure.

Results: Thus, we have started proteomic analyses of the effects of chronic morphine exposure in a recombinant human neuroblastoma SH-SY5Y clone that stably overexpresses the μ -opioid receptor. Cells were treated with morphine for 6, 24 and 72 hours, the proteins were separated by 2-D gel electrophoresis and stained with Coomassie blue, and the protein map was compared with that obtained from untreated cells. Spots showing a statistically significant variation were selected for identification using mass spectrometric analyses.

Conclusion: A total of 45 proteins were identified, including proteins involved in cellular metabolism, cytoskeleton organization, vesicular trafficking, transcriptional and translational regulation, and cell signaling.

Background

Opiate addiction, a pathological form of learning and memory associated with repeated drug use or administration, reflects neuronal adaptive/plastic changes that durably alter synaptic transmission within relevant circuits in the central nervous system [1-4]. The biochemical mechanisms underlying the functional and structural adaptations to chronic opiate exposure remain largely unknown. Elucidating them in details is important, as this is expected to reveal novel pharmacological strategies for

preventing formation and/or expression of dependence, with potential benefits for the treatment of chronic pain and addiction.

The biochemical mechanisms of drug dependence have begun to be examined globally by using DNA microarray- and/or proteomics-based approaches. Thus, DNA microarray-based approaches have been used in order to study gene expression induced by drugs of abuse [5], including opiates [6,7], but interpretation of the results is limited –

mRNA levels do not necessarily reflect proteins levels [8] – and no information about post-transcriptionally modified proteins is provided. In principle, proteomics-based approaches could lead to a much broader characterization of the molecular events underlying drug dependence. Yet, the successful application of differential proteomics to identify drug-induced protein changes in the central nervous system represent a technical challenge because of its cellular heterogeneity [9].

Obviously, sample heterogeneity is much less of a problem in cultured clonal cell lines than in nerve tissue. Thus, we have started proteomic analyses of the effects of chronic morphine exposure in a recombinant human neuroblastoma SH-SY5Y clone that stably overexpresses the μ -opioid (MOP) receptor. Wild-type SH-SY5Y cells express low levels of MOP receptor, and even lower (3- to 4-fold) levels of delta opioid (DOP) receptor [10], and are only poorly responsive to both acute and long-term morphine treatment [11]. In marked contrast, in MOP receptor-overexpressing cells, acute morphine is much more potent and efficacious in inhibiting forskolin-elicited production of cAMP, and chronic morphine induces a higher degree of adenylate cyclase sensitization, a hallmark of opiate dependence, than in the parent (wild type) cells [11]. The dramatically increased responsiveness of MOP-overexpressing over wild-type cells is an indication that the observed effects are MOP receptor- rather than DOP receptor-mediated. The cells were treated with morphine for 6, 24 and 72 hours, the proteins were separated by 2-D electrophoresis (2-DE) and stained with colloidal Coomassie blue, and the protein map was compared with that obtained from untreated cells. Spots showing a statistically significant variation were selected for identification using a combination of MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) and nanoLC-ESI-Q-TOF MS/MS (liquid-chromatography electrospray ionization quadrupole time of flight) analyses. A total of 45 proteins were found to have varied in abundance in the course of long-term exposure to morphine, including proteins involved in cellular metabolism, cytoskeleton organization, vesicular trafficking, transcriptional and translational regulation, and cell signaling.

Results

Figure 1 shows a representative bi-dimensional map of the proteome of untreated (control) neuroblastoma SH-SY5Y cells. Colloidal Coomassie blue protein staining, followed by automatic feature detection and manual editing enabled visualization of about 950 individual spots on a 2-D gel.

The protein map of neuroblastoma cells having been treated with 1 μ M morphine for 6 hours was compared

with that of untreated cells. A 6 h treatment with morphine was selected since such treatment was previously shown to elicit nearly maximum sensitization of adenylate cyclase, an index of opiate dependence, in these cells [11]. As shown on Figure 1, the protein pattern from 6 h-treated cells was globally very similar to that of control cells. After image analysis, the abundance of each spot was estimated relative to the abundance of all spots in the gel (see Methods). Four control gels were matched with four 6 h morphine-treatment gels and the spots showing a statistically significant variation in relative abundance (Student t test, $p < 0.05$) were selected for identification by mass spectrometry. Eighteen spots displayed such significant variation: 11 spots were upregulated by a factor 1.22 to 2.03 following morphine treatment, while 7 spots were downregulated by a factor 0.35 to 0.75. These spots were cut from a gel, digested by trypsin and analyzed by peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. When peptide mass fingerprinting data was not sufficient for confident identification, trypsin digests were also analyzed using nanoLC-ESI-MS/MS. The combination of these two methods enabled the unambiguous identification of 18 proteins whose name, accession number, change in relative abundance and MS data are summarized on Table 1. Spot numbers in this table refer to the ones in Figure 2, which depicts the location of every spot that was identified in this study on a representative 2-D gel. Spot 11 could not be identified while spot 24 contained a mixture of 2 proteins.

We next examined the proteome effects of exposing the neuroblastoma cells to morphine (1 μ M) for longer periods of time, *i.e.* 24 and 72 hours. Twenty one spots were found to display a significant variation in relative abundance after a 24 h morphine treatment: 11 spots were upregulated by a factor 1.18 to 1.84, whilst 10 spots were downregulated by a factor 0.45 to 0.84. Among these, 18 spots could be attributed to one protein, and 3 spots contained a mixture of 2 proteins (Table 2). 2 spots with similar molecular weights but different pIs contained the same protein (α -enolase). The relative volume of these 2 spots varied in opposite direction after morphine treatment suggesting a change in post-translational modification, possibly phosphorylation. Twenty-five spots displayed a significant variation in relative abundance after a 72 h morphine treatment: 5 spots were upregulated by a factor 1.1 to 1.79, whilst 20 spots were downregulated by a factor of 0.45 to 0.84. Among these, 21 could be attributed to one protein, 2 contained a mixture of 2 proteins, and 2 could not be identified (Table 3).

The pattern of morphine-responsive proteins was clearly dependent upon the duration of exposure of the cells to morphine. In fact, only 8 proteins were found to be significantly regulated at 2 or 3 time points. Vacuolar ATP syn-

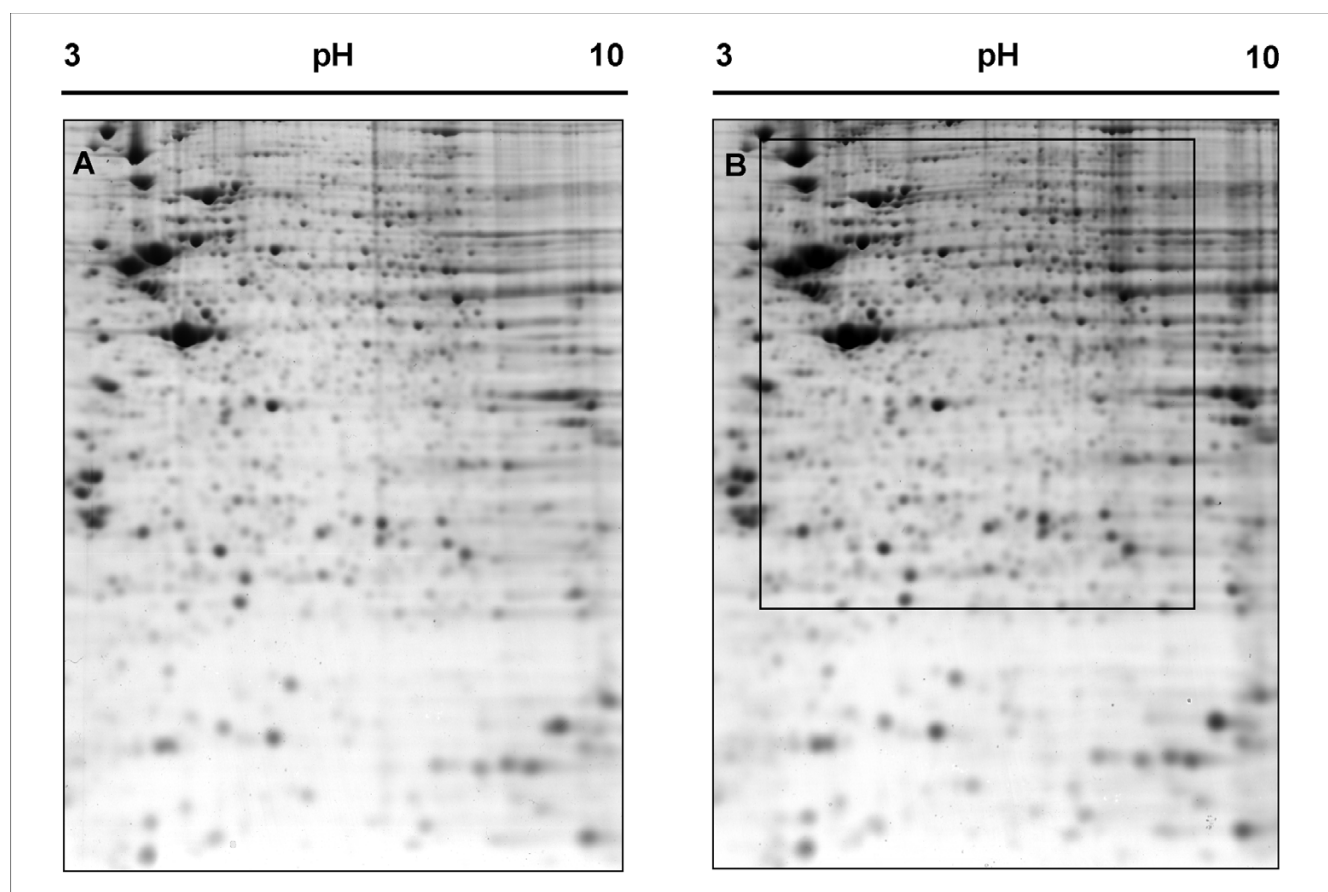


Figure 1
2-DE pattern of untreated (A) and 6 h morphine-treated (B) SH-SY5Y cells. Samples were resolved by 2-DE on non-linear pH 3–10 IPG strips followed by separation on a 12% SDS-PAGE gel in the second dimension. Proteins were visualized by colloidal coomassie staining. The box in 1B delineates the close-up presented on figure 2.

these subunit B and bifunctional purine biosynthesis protein were upregulated at 6 and 24 h. Rab7 was downregulated at 6 and 24 h while guanine nucleotide binding protein β subunit 2-like 1 (also known as RACK1) was downregulated at 6 and 72 h. Adenylosuccinate synthetase 2 was upregulated at 6 h and downregulated at 72 h. Septin 11 and spot 24 containing a mixture of Rab GDI β and mitochondrial-processing peptidase β were upregulated at 6 h, returned to baseline at 24 h and showed only a minor upregulation at 72 h. Finally, only malate dehydrogenase was downregulated at each time point.

Discussion

Overall, the present whole cell proteomic analysis has identified 53 proteins from 55 spots whose relative volume is modified upon morphine treatment in SH-SY5Y cells. Once mixtures are excluded, 45 morphine-responsive proteins can be classified according to cellular function (see Additional file 1). These are involved in cell metabolism, organization of the cytoskeleton, vesicle traf-

ficking, transcriptional regulation, protein translation, folding and degradation, and cell signaling.

The pattern of morphine-responsive proteins appears to be dependent on the duration of morphine treatment (compare Tables 1, 2 and 3), indicating that cellular adaptation to chronic morphine is a dynamic process. Such dynamic adaptation has previously been documented in the striatum of chronically morphine-treated rats, wherein various members of the Fos family of transcription factors are sequentially upregulated, implying that distinct sets of genes are regulated over time [3]. Alternatively, it is possible that changes could have been missed at some time point due to technical limitation. For example, RACK1 was found to be downregulated at each time point but this downregulation reached statistical significance only for the 6 and 72 h time points. The difficulty to detect subtle variations in low abundance proteins is a well known limitation of large scale proteomic studies. Thus, the present whole cell analysis failed to detect

Table 1: Proteins whose abundance in SH-SY5Y cells is regulated after 6 h of morphine treatment

Spot #	Protein	Accession # (a)	MW (Da)	Variation (% of control) (b)	MALDI peptides	% coverage	MS/MS peptides (c)
2	Elongation factor G I	Q96RP9	83506	42 ± 11	13	16	
3	Ezrin	P15311	69268	165 ± 26	10	15	
5	Lamin A/C	P02545	74139	203 ± 21	18	32	
9	Bifunctional purine biosynthesis protein	P31939	65088	122 ± 16	14	30	
11	no identification			52 ± 10			
14	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	P21281	56501	151 ± 17	18	54	
15	Rho-GTPase-activating protein I	Q07960	50461	166 ± 44			4
17	Septin-11	Q9NVA2	49267	141 ± 19	13	37	
18	ATP synthase beta chain	P06576	56560	35 ± 9	10	48	
24	Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	50663	136 ± 16	14	36	
	Mitochondrial-processing peptidase beta subunit	O75439	55072		12	25	
27	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Q99536	41920	141 ± 17	7	31	
28	Adenylosuccinate synthetase 2	P30520	50097	147 ± 14			5
36	40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Q08752	40632	174 ± 42	12	26	
44	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P40925	36295	50 ± 9	11	32	
49	Guanine nucleotide binding protein beta subunit 2-like 1	P63244	35077	75 ± 15	15	69	
52	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB gamma	Q15102	25734	70 ± 14			5
53	Triosephosphate isomerase	P60174	26538	186 ± 60	13	65	
54	Ras-related protein Rab-7	P51149	23490	56 ± 13	13	65	

^aSwiss-Prot primary accession number

^bMean ± S.D., control refers to untreated cells.

^cOnly peptides with a statistically significant Mascot score ($p < 0.05$) were considered

changes in heterotrimeric G protein β subunits and prohibitin whose relative abundance was previously shown to be decreased in the detergent-resistant membrane (DRM) raft fraction isolated from morphine-treated cells [11]. This is readily explained by the fact that standard sample preparation for 2-DE (the present study), which involves incubation with Triton X-100 at 4 °C followed by high speed centrifugation, has eliminated the DRM raft fraction and the proteins which this fraction is enriched in, including heterotrimeric G protein subunits [11]. In addition, the present study has focused onto the ~950 most abundant and soluble proteins of the cell, which represent only 1 to 10% of the total protein species likely to be expressed in a cell. This illustrates the necessity of combining both whole cell and sub-proteome targeted analyses to obtain a clear picture of the proteome of a given cell type.

Four recently published proteomic analyzes have addressed chronic morphine effects in the brain [12-15]. Seven of our morphine-responsive proteins, or closely related isoforms, were also found to be modified in these studies: ATP synthase beta chain, vacuolar ATP synthase subunit B, malate dehydrogenase, triosephosphate isomerase, rab GDP dissociation inhibitor beta, peptidyl-prolyl isomerase, and septin-11. These are indications that at least some of the brain protein changes associated with chronic morphine treatment *in vivo* can be reproduced in our cellular model *in vitro* after a relatively short time of

morphine exposure. Conversely, some of the new changes identified in our present *in vitro* study may provide hints as to what neuronal processes may be regulated upon chronic morphine treatment *in vivo*.

Ascribing a precise role for the identified proteins in mediating specific chronic morphine effects in neurons would be too speculative at this stage. However it appears noteworthy to highlight possible links between selected proteins identified in this study and known effects of chronic morphine. Similar to what was recently described for cocaine [16], some of morphine transcriptional effects could be mediated at the level of histone acetylation and chromatin remodeling since two histone acetyltransferase subunits (RuvB-like 1 and histone acetyltransferase type B subunit 2) are upregulated after 24 h of treatment. The variation in 20S proteasome subunit composition observed after 72 h of morphine is consistent with previous studies demonstrating a role for the ubiquitin/proteasome pathway in mediating chronic morphine effects [11,17].

Such transcriptional and post-translational regulations can lead to numerous changes in cellular function among which alterations in cellular architecture [18,19], vesicle trafficking [4] and signal transduction pathways are essential for drug-induced neuronal plasticity. Regarding neuronal architecture and synaptic remodelling, potentially interesting morphine targets are ERM proteins, septins

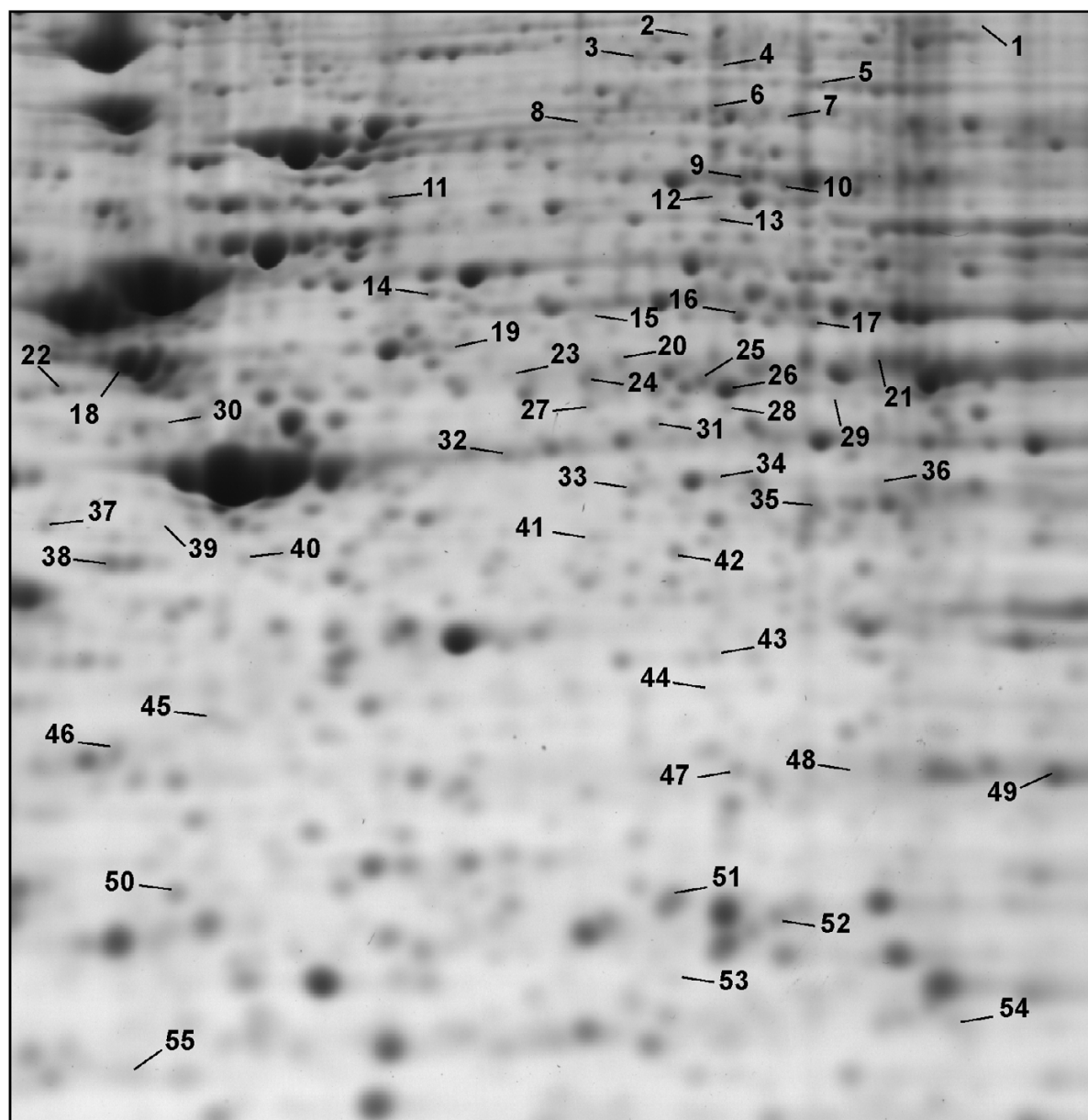


Figure 2

Close-up from a representative 2-D gel showing the spots whose abundance in SH-SY5Y cells is regulated after chronic morphine treatment. Spots numbers refer to numbers on Tables 1, 2 and 3 where quantitative analysis and mass spectrometric data are presented.

[20] and Rho-GTPase-activating protein 1 [21]. Concerning vesicular transport, the SNAP- α downregulation observed in our study is consistent with the recent observation that chronic morphine could induce an inhibition of SNARE complex formation [22]. Morphine could also act at the level of small GTPases of the rab family which

are essential for vesicle trafficking. The observed increase in rab GDP dissociation inhibitor beta after 72 h of morphine could result in an alteration of the amount of active rab proteins available for neurotransmitter release [23]. These data are all consistent with chronic morphine modifying neurotransmitter secretion and synapse efficacy.

Table 2: Proteins whose abundance in SH-SY5Y cells is regulated after 24 h of morphine treatment

Spot #	Protein	Accession # (a)	MW (Da)	Variation (% of control) (b)	MALDI peptides	% coverage	MS/MS peptides (c)
1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	Q92499	82432	54 ± 10	27	32	
7	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	P43304	80815	75 ± 7	15	22	
9	Bifunctional purine biosynthesis protein	P31939	65088	118 ± 11	14	30	
14	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	P21281	56501	131 ± 13	18	54	
16	RuvB-like 1	Q9Y265	50228	144 ± 32	16	66	
19	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	P49189	53802	145 ± 24	15	32	
	WD-repeat protein 12	Q9GZL7	48190		12	25	
20	Alpha-enolase	P06733	47038	45 ± 15	18	60	
21	Alpha-enolase	P06733	47038	184 ± 53			6
22	Histone acetyltransferase type B subunit 2	Q16576	47820	145 ± 65	10	30	
30	Heterogeneous nuclear riboprotein F		45853	181 ± 60	12	42	
	Eucaryotic translation initiation factor 3 subunit 5	O00303	37654		7	32	
32	Beta-succinyl CoA synthetase	Q7Z503	43611	74 ± 10	15	35	
33	Galactokinase	P51570	42272	58 ± 9	15	43	
35	Acyl-CoA hydrolase	Q00154	41796	166 ± 33	11	44	
37	Arsenical pump-driving ATPase	Q43681	38793	167 ± 29	8	26	
38	Serine-threonine kinase receptor associated protein	Q9Y3F4	38756	164 ± 31	14	48	
41	Protein phosphatase 2A, regulatory subunit B'	Q15257	40682	65 ± 8	10	30	
	Calponin-3	Q15417	36561		7	30	
42	Biliverdin reductase A	P53004	33428	84 ± 6	12	44	
44	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P40925	36295	49 ± 25	11	32	
46	Annexin A5	P08758	35806	152 ± 41	18	70	
51	Endoplasmic reticulum protein ERp29	P30040	28993	76 ± 14	8	46	
54	Ras-related protein Rab-7	P51149	23490	58 ± 12	13	65	

^aSwiss-Prot primary accession number

^bMean ± S.D., control refers to untreated cells.

^cOnly peptides with a statistically significant Mascot score ($p < 0.05$) were considered

Finally, chronic morphine induced a change in abundance of several signaling proteins: heterotrimeric G protein subunit α i2, serine-threonine kinase receptor associated protein and receptor for activated C kinase 1 (RACK1). The downregulation of G α i2 has already been described in our previous study [11] and will not be discussed further. The observed upregulation of serine-threonine kinase receptor associated protein provides a new link between morphine signaling and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [24]. RACK1 downregulation in brains of morphine-treated rats has been described previously but it has only been discussed in terms of changes in PKC activity since it was its only known function at this time [25]. Since then, RACK1 has been characterized as a scaffolding protein for many proteins involved in cell signaling [26]. Alterations in RACK1 abundance could thus coordinate changes in distinct signaling pathways and its role in molecular adaptations to drugs of abuse deserves further investigation [27].

Conclusion

In conclusion, our differential proteomics study has identified several candidate proteins that could be implicated in the molecular adaptation of neurons to chronic morphine treatment. In particular, changes in vesicular traf-

ficking and proteasome-dependent protein degradation are known to be critical for various forms of synaptic plasticity such as long term potentiation or depression [28,29]. These adaptations as well as their role in the development of drug dependence have now to be validated in animal models of addiction.

Methods

Cell culture and treatment

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were transfected with N-terminal T7-tagged human MOP receptor in pRC-CMV using lipofectamine [11]. Stably transfected G418-resistant cells were grown in high glucose DMEM (Gibco BRL) containing 10% fetal calf serum, 50 μ g/ml gentamicin (Gibco BRL), and 400 μ g/ml G418 (Gibco BRL), in 5% CO₂ at 37°C. Cells in 14 cm dishes were treated by diluting morphine sulphate directly in the culture medium. The cell density was adjusted so that the cultures were nearly confluent at the end of each treatment. For 72 h treatment, medium was changed and fresh morphine was added every day. Four independent experiments were performed for each treatment time.

Table 3: Proteins whose abundance in SH-SY5Y cells is regulated after 72 h of morphine treatment

Spot #	Protein	Accession # (a)	MW (Da)	Variation (% of control) (b)	MALDI peptides	% coverage	MS/MS peptides (c)
4	Radixin	P35241	68564	50 ± 17			4
6	no identification			48 ± 23			
8	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	70898	172 ± 48	11	23	
10	Lamin A/C	P02545	74139	78 ± 15	22	30	
12	T-complex protein 1, zeta subunit	P40227	57893	57 ± 17	15	29	
13	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Q14195	61963	57 ± 21	13	40	
17	Septin-11	Q9NVA2	49267	110 ± 3	13	37	
23	Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	50663	179 ± 61	11	34	
24	Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	50663	114 ± 6	14	36	
	Mitochondrial-processing peptidase beta subunit	Q75439	55072		12	25	
25	Proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	43787	54 ± 20	15	44	
26	Elongation factor 1-gamma	P26641	49988	89 ± 5	16	36	
28	Adenylosuccinate synthetase 2	P30520	50097	73 ± 16			5
29	Elongation factor 1-gamma	P26641	49988	51 ± 27	11	24	
	tRNA-nucleotidyltransferase 1	Q96Q11	50340		9	19	
31	Ornithine aminotransferase	P04181	48535	84 ± 3	14	37	
34	Septin-2	Q15019	41487	72 ± 15	12	36	
39	Ubiquitin-like 1 activating enzyme E1A	Q9UBE0	38450	45 ± 14	11	35	
40	Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting activity polypeptide 2	Q96C71	40493	65 ± 8	9	37	
43	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	P25325	33047	69 ± 9			6
44	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P40925	36295	73 ± 16	11	32	
45	Alpha-soluble NSF attachment protein	P54920	33247	45 ± 12	8	45	
47	Nuclear protein Hcc-1	P82979	23540	77 ± 9	9	41	
48	no identification			49 ± 32			
49	Guanine nucleotide binding protein beta subunit 2-like 1	P63244	35077	74 ± 9	15	69	
50	Proteasome subunit alpha type 3	P25788	28302	73 ± 13	8	46	
55	Proteasome subunit beta type 6	P28072	25358	143 ± 11	7	23	

^aSwiss-Prot primary accession number^bMean ± S.D., control refers to untreated cells.^cOnly peptides with a statistically significant Mascot score ($p < 0.05$) were considered**Sample preparation for 2-DE**

Following treatment, the culture medium was removed and the cells were scraped into PBS and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatant was discarded and the pellet was frozen and stored at -80°C for 2 hours. Cells were then resuspended in 500 μl of lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, proteinase inhibitors (Complete Mini tablets, Roche) and 1% (v:v) Triton X-100 (Sigma)], and protein extraction allowed to proceed for 3 h at 4°C . The extract was centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min at 4°C in order to remove cell debris and insoluble material. The supernatant was delipidated and desalted using methanol/chloroform precipitation by mixing with 2 ml of methanol, 500 μl of chloroform and 1.5 ml of water, and centrifuging at $20,000 \times g$ for 5 min, at room temperature. The pellet was washed with 1.5 ml of methanol and vacuum-dried. Proteins were then resuspended in 400 μl of 2-DE buffer (Cellular and Organelle Membrane Solubilizing Reagent, Sigma), reduced for 1 h at room temperature by adding tributylphosphine to a final concentration of 5 mM, and alkylated in the dark for 1.5 h at room temperature by

adding iodoacetamide to a final concentration of 15 mM. Protein concentration was determined by using the Bradford assay (Biorad).

Two-dimensional gel electrophoresis

The reduced and alkylated protein samples (300 μg) were used to rehydrate 13 cm pH 3–10 NL Immobilized pH Gradient (IPG) strips (Amersham Biosciences). 1.2 μl of IPG buffer pH 3–10 NL (Amersham Biosciences) and 2 μl of 1% (w:v) orange G were added to 250 μl of sample before application to the strip. Strips were focused on the IPGphor IEF (isoelectrofocusing) Cell (Amersham Biosciences) for 80000 Vh. After 6 h of passive rehydration and 6 h of active rehydration (30 V), the voltage was set to 300 V for 4 h. It was then increased from 300 to 8000 V during 8 h, followed by additional hours at 8000 V (until the desired volt $\times$ hour product is reached). Focused IPG strips were equilibrated in SDS-equilibration buffer containing 6 M urea, 2% (w:v) SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 30% (v:v) glycerol and 0.01% (w/v) bromophenol blue as a tracking dye for 2×10 min. The equilibrated strips were loaded onto 16×16 cm, 1 mm thick, 12%

polyacrylamide SDS gels. Runs were performed at 10 mA/gel (SE600 Ruby, Amersham Biosciences) until the bromophenol blue reached the bottom of the gel. Gels were then stained overnight using Coomassie colloidal blue (1 g/l, Sigma) and destained for 1 h in 1% (v/v) acetic acid solution.

Image analysis

Gels were scanned using a GS-800 Calibrated Densitometer (Biorad) and analyzed using ImageMaster Platinum software (Amersham Biosciences). Spots were detected on quadruplicate gels and manually edited. Normalization was performed by dividing the volume (OD $\times$ surface) of each spot by the total volume of every spot on the gel to give a %volume value. Gels were then matched and each group of equivalent spots was compared. In a preliminary experiment, 4 independent control gel were compared. Pair-wise comparison of spot %volumes gave linear regressions of the type $y = ax + b$ where $a = 1.03 \pm 0.06$ and $b = -0.0019 \pm 0.0034$, and a correlation coefficient of 0.95 ± 0.011 . Average coefficient of variation (SD/mean $\times$ 100) for all spot %volumes was 19.8 ± 10.1 . This level of reproducibility is indicative of a statistical power of 80 to 90% for a sample size of 4 and a 0.05 p-value [30]. Having assessed the reliability of our analyses, %volumes of spots from control gels were compared to those of spots from treated gels using a Student unpaired t test. Groups of spots showing a statistically significant difference in relative volume ($p < 0.05$, $df = 6$) between control and morphine-treated samples were first visually controlled in order to make sure that %volume changes were not due to spot detection or matching errors. Confirmed spots were then selected for identification by mass spectrometry.

In-gel protein digestion

Spots of interest were manually excised from a representative gel. The gel pieces were washed with water and destained first in 160 μ l of 50% (v:v) acetonitrile (ACN) in water then in 160 μ l of 50% (v:v) ACN in 0.1 M NH_4HCO_3 , dehydrated with 80 μ l ACN and dried in a vacuum centrifuge. Gel pieces were rehydrated in a sufficient covering volume of modified trypsin solution (12.5 ng/ μ l in 12.5 mM NH_4HCO_3 ; Promega) and incubated overnight at 37°C. Prior to peptide extraction, 0.5 μ l of the tryptic digest was spotted onto the MALDI target plate. Peptides were extracted two times at 37°C for 30 min with shaking, first using 50% 25 mM NH_4HCO_3 /50% ACN and then 5% formic acid/50% ACN in water. The peptide mixture was concentrated in a vacuum centrifuge to a final volume of about 10 μ l.

MALDI-TOF MS analysis

MALDI-TOF MS analyses were performed on a MALDI-TOF/TOF instrument (4700 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA). 0.5 μ l of tryptic digest super-

natant was loaded onto the MALDI target plate and air dried. 0.3 μ l of matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; 5 mg/ml in H_2O /acetonitrile/TFA, 50:50:0.1) was then added. Mass spectra were acquired in an automated positive reflector mode from m/z 700 to m/z 3500. Trypsin autolytic peptides (m/z 842.51 and 2211.10) were used to internally calibrate each spectrum to a mass accuracy within 30 ppm. Spectra were analyzed using GPS Explorer (version 3.5, Applied Biosystems) which acts as an interface between the Oracle database containing raw spectra and a local copy of the Mascot search engine (version 2.0; Matrix Science, London, U.K.). Peptide peaks with a signal/noise ratio greater than 10 were searched against human sequences in the Swiss-Prot database (Release 48 from September 2005; 194 317 entries). No missed cleavage was allowed and the data were searched using carbamidomethylation of cysteine as fixed modification whereas oxidation of methionine and N-acetylation of the proteins were considered as variable modifications. A protein was considered correctly identified if the Protein Score Confidence Interval calculated by the GPS Explorer Results Browser was greater than 99% (see Additional file 2).

NanoLC-ESI-Q-TOF MS/MS analysis

When MALDI-TOF data were not conclusive (protein score not significant), protein identification was confirmed by MS/MS analyses. Tryptic peptide extracts were subjected to nanoLC-MS/MS analysis on an ESI-Q-TOF mass spectrometer (QSTAR XL, Applied Biosystems) operating in positive mode with a 2.1 kV spray voltage. Chromatographic separation was performed onto a 75 μ m ID $\times$ 15 cm PepMap C18 column (Dionex/LC Packings, USA) at a flow rate of 200 nL/minute using a linear gradient of increasing ACN in water (5–50%) over 40 min with 0.1% formic acid as ion pairing agent. Data were acquired with Analyst QS (version 1.1, Applied Biosystems). MS spectra were acquired for one second. For each MS spectrum, the two most intense multiple charged peaks were selected for generation of subsequent Collision Induced Dissociation (CID) mass spectra. The collision energy was automatically adjusted based upon peptide charge and mass to charge (m/z) ratio. A dynamic exclusion window was applied to prevent repetitive selection of the same ions within 30 sec. Data were analyzed using Analyst QS software (version 1.1) and MS/MS centroid peak lists were generated using the Mascot.dll script (version 1.6b13). MS/MS centroid peaks were thresholded at 0% of the base peak. Data were searched against human sequences in the Swiss-Prot/TrEMBL database as of October 2005 using Mascot (version 2.0). Peptide tolerance in MS and MS/MS modes was 0.5 Da. Trypsin was designated as the protease, and up to two missed cleavages were allowed. Carbamidomethylation of cysteine was searched as fixed modification, while oxidation of methionine and amino-terminal

protein acetylation were allowed as variable modifications. Identification was considered positive if the protein was identified on the bases of at least two peptides with a score greater than the significance threshold score determined by the Mascot Search program (>36) (see Additional file 2).

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors read and approved the final manuscript.

JN carried out the proteomic studies, data analysis, and participated in drafting the manuscript.

SU carried out the mass spectrometric studies and helped to draft the manuscript.

KC participated in experiment and data analysis.

BM supervised mass spectrometric experiments.

JCM participated in the design of the study and in drafting the manuscript.

LM designed the study, supervised experiments and data analysis, and drafted the manuscript.

Additional material

Additional file 1

Functional classification of proteins regulated by chronic morphine.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1477-5956-4-23-S1.pdf>]

Additional file 2

Complete mass spectrometry data for identification.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1477-5956-4-23-S2.pdf>]

Acknowledgements

This work was supported by CNRS ("Protéomique et Génie des Protéines" programme grant PGP 03/057). Financial support from the Région Midi-Pyrénées and the Génopôle Toulouse/Midi-Pyrénées to BM is also gratefully acknowledged.

References

- Koob GF, Le Moal M: **Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction.** *Nat Neurosci* 2005, **8**:1442-1444.
- Meunier JC: **Opioid receptors, tolerance and dependence.** *Thérapie* 1992, **47**:495-502.
- Nestler EJ: **Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction.** *Nat Rev Neurosci* 2001, **2**:119-128.
- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O: **Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence.** *Physiol Rev* 2001, **81**:299-343.
- Rhodes JS, Crabbe JC: **Gene expression induced by drugs of abuse.** *Curr Opin Pharmacol* 2005, **5**:26-33.
- Ammon S, Mayer P, Riechert U, Tischmeyer H, Holtt V: **Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal.** *Brain Res Mol Brain Res* 2003, **112**:113-125.
- McClung CA, Nestler EJ, Zachariou V: **Regulation of gene expression by chronic morphine and morphine withdrawal in the locus ceruleus and ventral tegmental area.** *J Neurosci* 2005, **25**:6005-6015.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R: **Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:1720-1730.
- Williams K, Wu T, Colangelo C, Nairn AC: **Recent advances in neuroproteomics and potential application to studies of drug addiction.** *Neuropharmacology* 2004, **47 Suppl 1**:148-166.
- Kazmi SM, Mishra RK: **Comparative pharmacological properties and functional coupling of mu and delta opioid receptor sites in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.** *Mol Pharmacol* 1987, **32**:109-118.
- Mouledous L, Neasta J, Uttenweiler-Joseph S, Stella A, Matondo M, Corbani M, Monsarrat B, Meunier JC: **Long-term morphine treatment enhances proteasome-dependent degradation of G beta in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: correlation with onset of adenylate cyclase sensitization.** *Mol Pharmacol* 2005, **68**:467-476.
- Kim SY, Chudapongse N, Lee SM, Levin MC, Oh JT, Park HJ, Ho IK: **Proteomic analysis of phosphotyrosyl proteins in morphine-dependent rat brains.** *Brain Res Mol Brain Res* 2005, **133**:58-70.
- Prokai L, Zharikova AD, Stevens SM Jr.: **Effect of chronic morphine exposure on the synaptic plasma-membrane subproteome of rats: a quantitative protein profiling study based on isotope-coded affinity tags and liquid chromatography/mass spectrometry.** *J Mass Spectrom* 2005, **40**:169-175.
- Li KW, Jimenez CR, van der Schors RC, Hornshaw MP, Schoffmeier AN, Smit AB: **Intermittent administration of morphine alters protein expression in rat nucleus accumbens.** *Proteomics* 2006, **6**:2003-2008.
- Bierczynska-Krzysik A, Bonar E, Drabik A, Noga M, Suder P, Dylag T, Dubin A, Kotlinska J, Silberring J: **Rat brain proteome in morphine dependence.** *Neurochem Int* 2006, **49**:401-406.
- Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ: **Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum.** *Neuron* 2005, **48**:303-314.
- Rambhia S, Mantione KJ, Stefano GB, Cadet P: **Morphine modulation of the ubiquitin-proteasome complex is neuroprotective.** *Med Sci Monit* 2005, **11**:BR386-396.
- Robinson TE, Gorny G, Savage VR, Kolb B: **Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats.** *Synapse* 2002, **46**:271-279.
- Liao D, Lin H, Law PY, Loh HH: **Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:1725-1730.
- Cheng L, Itoh K, Lemmon V: **LI-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region.** *J Neurosci* 2005, **25**:395-403.
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A: **Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42.** *Neuron* 1997, **19**:625-634.
- Xu NJ, Yu YX, Zhu JM, Liu H, Shen L, Zeng R, Zhang X, Pei G: **Inhibition of SNAP-25 phosphorylation at Ser187 is involved in chronic morphine-induced down-regulation of SNARE complex formation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:40601-40608.
- Goody RS, Rak A, Alexandrov K: **The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:1657-1670.

24. Seong HA, Jung H, Choi HS, Kim KT, Ha H: **Regulation of transforming growth factor-beta signaling and PDK1 kinase activity by physical interaction between PDK1 and serine-threonine kinase receptor-associated protein.** *J Biol Chem* 2005, **280**:42897-42908.
25. Escriba PV, Garcia-Sevilla JA: **Parallel modulation of receptor for activated C kinase I and protein kinase C-alpha and beta isoforms in brains of morphine-treated rats.** *Br J Pharmacol* 1999, **127**:343-348.
26. McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ: **The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms.** *Mol Pharmacol* 2002, **62**:1261-1273.
27. Ron D, Jurd R: **The "ups and downs" of signaling cascades in addiction.** *Sci STKE* 2005, **2005**:re14.
28. Kennedy MJ, Ehlers MD: **Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity.** *Annu Rev Neurosci* 2006, **29**:325-362.
29. Ehlers MD: **Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system.** *Nat Neurosci* 2003, **6**:231-242.
30. Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA: **Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics.** *Proteomics* 2003, **3**:1912-1919.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Supplementary Table 1. Functional classification of proteins regulated by chronic morphine.

Metabolic enzymes	
Glycerol 3-phosphate dehydrogenase	sn-glycerol 3-P + NAD ⁺ = glycerone phosphate + NADH.
Alpha-enolase	Multifunctional enzyme that, as well as its role in glycolysis, plays a part in various processes such as growth control.
Adenylosuccinate synthetase 2	Plays an important role in the de novo pathway of purine nucleotide biosynthesis.
Bifunctional purine biosynthesis protein	Nucleotide biosynthesis; IMP biosynthesis.
Ornithine aminotransferase	L-ornithine + a 2-oxo acid = L-glutamate 5-semialdehyde + an L-amino acid.
Beta-succinyl CoA synthetase	Involved in nucleotide synthesis.
Galactokinase	Major enzyme for galactose metabolism.
Acyl-CoA hydrolase	Catalyzes the hydrolysis of acyl-CoAs to the free fatty acid and coenzyme A (CoASH).
Biliverdin reductase A	Bilirubin + NAD(P) ⁺ = biliverdin + NAD(P)H.
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Transfer of a sulfur ion to cyanide or to other thiol compounds.
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	(S)-malate + NAD ⁺ = oxaloacetate + NADH.
Triosephosphate isomerase	D-glyceraldehyde 3-phosphate = glycerone phosphate.
Nuclear proteins, transcriptional regulation	
Lamin A/C	Component of the nuclear lamina. Provides a framework for the nuclear envelope and may interact with chromatin.
RuvB-like 1	Component of the NuA4 histone acetyltransferase complex involved in transcriptional activation of select genes.
Histone acetyltransferase type B subunit 2	Core-histone-binding subunit that target histone acetyltransferases to their histone substrates.
Proliferation-associated protein 2G4	Involved in transcriptional repression, inhibits proliferation.
Nuclear protein Hcc-1	May participate in important transcriptional or translational control of cell growth, metabolism and carcinogenesis.
Protein translation, folding and degradation	
Elongation factor G 1	Promotes the GTP-dependent translocation of the nascent protein chain from the A-site to the P-site of the ribosome.
Elongation factor 1-gamma	Probably plays a role in anchoring the elongation complex to other cellular components.
ATP-dependent RNA helicase DDX1	Regulation of translational initiation.
Heat shock cognate 71 kDa protein	Chaperone
T-complex protein 1, zeta subunit	Molecular chaperone; assists the folding of proteins upon ATP hydrolysis.
40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIases accelerate the folding of proteins.
Endoplasmic reticulum protein ERp29	Plays an important role in the processing of secretory proteins within the endoplasmic reticulum.
Ubiquitin-like 1 activating enzyme E1A	The dimeric enzyme acts as a UBL1 (SUMO) E1 ligase.
Proteasome subunit alpha type 3	Part of a multicatalytic proteinase complex involved in the degradation of poly-ubiquitinated proteins.
Proteasome subunit beta type 6	See proteasome subunit alpha type 3

Supplementary Table 1. (continued)

Cytoskeleton-associated proteins	
Ezrin	Probably involved in connections of major cytoskeletal structures to the plasma membrane.
Radixin	Probably plays a crucial role in the binding of the barbed end of actin filaments to the plasma membrane.
Dihydropyrimidinase-related protein 3	Binds to F-actin, potentially regulates the cytoskeleton.
Septin-11	Involved in cytokinesis and in a variety of other processes involving organization of the cell cortex and exocytosis.
Septin-2	See septin-11
Rho-GTPase-activating protein 1	GTPase activator for the Rho, Rac and Cdc42 proteins, converting them to the putatively inactive GDP-bound state.
Vesicle-associated proteins	
Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	V-ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells.
ATP synthase beta chain	Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane. Catalytic subunit.
Rab GDP dissociation inhibitor beta	Regulates the GDP/GTP exchange reaction of most Rab proteins by inhibiting the dissociation of GDP from them.
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Homologous to VAT-1, the major protein of the synaptic vesicles of the electric organ of <i>Torpedo californica</i> .
Alpha-soluble NSF attachment protein	SNAP-alpha, Required for vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus.
Ras-related protein Rab-7	Involved in late endocytic transport. Contributes to the maturation of phagosomes (acidification).
Cell signaling	
Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting activity polypeptide 2	Alpha i2 subunit of heterotrimeric G proteins
Guanine nucleotide binding protein beta subunit 2-like 1	RACK1, anchors the activated PKC to the cytoskeleton. Involved in the organisation of signaling complexes.
Serine-threonine kinase receptor associated protein	Role in phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1 and TGF-beta signaling pathways.
Micellaneous	
Arsenical pump-driving ATPase	Anion-transporting ATPase. Catalyzes the extrusion of arsenite.
Annexin A5	Anticoagulant protein that acts as an indirect inhibitor of the thromboplastin-specific complex.
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB gamma subunit	Inactivates paf by removing the acetyl group at the sn-2 position (important for brain development).

Description of protein function is based on the annotations from the Swiss-Prot database.

II. Analyse protéomique des adaptations moléculaires induites par un traitement à la morphine sur le phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y

A. Introduction

La seconde partie de mon projet de thèse a consisté à analyser les modifications induites au niveau du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y suite à un traitement à la morphine. Comme indiqué dans le chapitre IV-D (page 92), les phosphorylations sont des modifications post-traductionnelles dynamiques (Mukherji, 2005), particulièrement courantes, capables de moduler la fonction d'une protéine (Raggiaschi et al., 2005; Reinders et Sickmann, 2005). De ce fait, les phosphorylations sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires.

L'activation des RCPG et notamment des récepteurs opioïdes peut conduire à l'activation de nombreuses protéines kinases telles que les PKA et PKC ou encore les MAP Kinases (Law et al., 2000; Williams et al., 2001). Plus particulièrement, plusieurs travaux suggèrent que les phosphorylations jouent un rôle majeur dans les adaptations à la morphine par exemple aussi bien au niveau du phénomène de la sensibilisation de l'AC (Chakrabarti et Gintzler, 2003; Chakrabarti et al., 2001) que de la libération de neurotransmetteurs (Bonci et Williams, 1997; Xu et al., 2004). Certains inhibiteurs de protéines kinases sont d'ailleurs capables de diminuer l'intensité de la tolérance à la morphine (Wang et Wang, 2006).

Récemment, les travaux de Kim *et al* ont montré qu'une stratégie de type protéomique différentielle est adaptée à l'identification de protéines qui sont phosphorylées suite à un traitement par la morphine (Kim et al., 2005). Cependant, ce travail se limite aux protéines phosphorylées au niveau des tyrosines c'est à dire une minorité des phosphoprotéines (Gronborg et al., 2002). Aussi, à l'heure actuelle aucune étude globale décrivant les protéines phosphorylées suite à un traitement aigu ou chronique à la morphine n'a été publiée. C'est pourquoi nous avons entrepris une analyse différentielle du phosphoprotéome suite à un traitement morphinique des cellules SH-SY5Y. Plus que descriptif, l'objectif de ce travail était d'identifier de nouvelles cibles moléculaires de la morphine et éventuellement de nouvelles voies cellulaires impliquées dans les effets aigus et / ou chroniques de la morphine.

La stratégie mise en place a consisté à analyser le phosphoprotéome des DRM (Detergent Resistant Membrane) et plus largement celui des cellules entières après séparation des protéines par électrophorèse. L'utilisation du colorant fluorescent Pro-Q Diamond nous est apparue comme le meilleur compromis pour l'analyse différentielle du phosphoprotéome. En effet, ce colorant est quantitatif, compatible avec une identification des protéines par spectrométrie de masse,

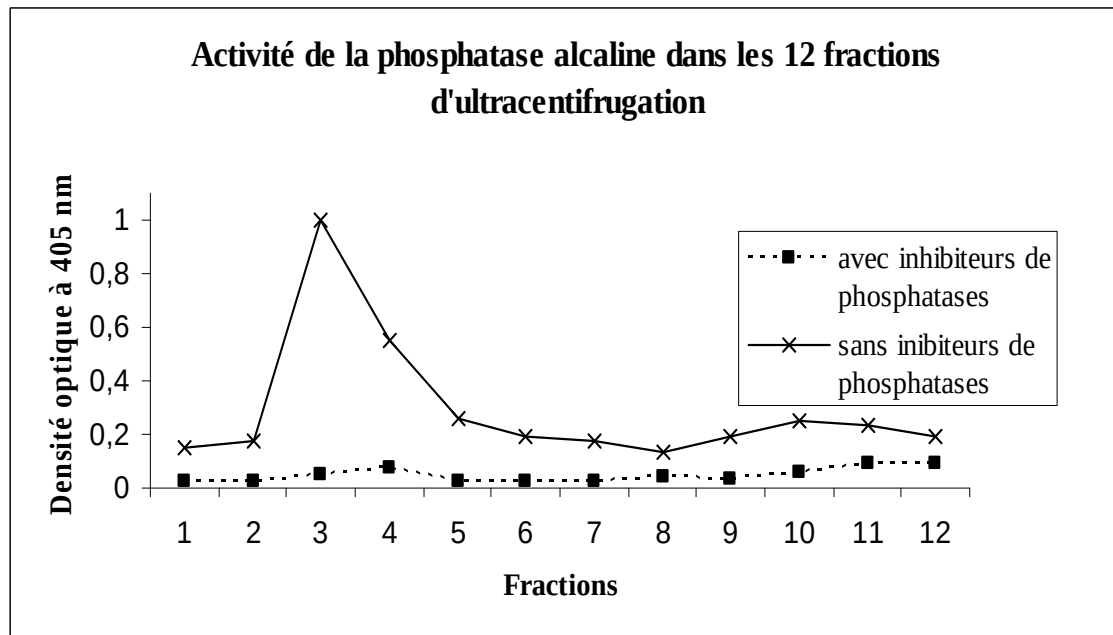


Figure 34: Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline dans les 12 fractions d'ultracentrifugation en fonction de l'utilisation ou non d'inhibiteurs de phosphatases dans le protocole de préparation des DRM. 50 μ L de chaque fraction sont dilués dans 1 mL de p-nitrophényl phosphate à 16 mM. Après incubation 1h à 37°C, la DO à 405 nm est mesurée au spectrophotomètre.

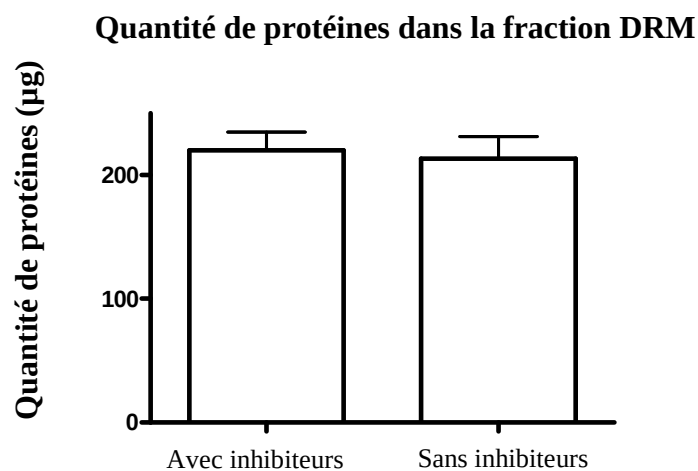


Figure 35: Quantité de protéines dans la fraction DRM en fonction de l'utilisation ou non d'inhibiteurs de phosphatases dans le protocole de préparation des DRM. La fraction DRM correspond aux fractions 3 et 4 d'ultracentrifugation. Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry. Les résultats représentent la moyenne de 6 dosages réalisés de façon indépendante.

suffisamment sensible (2 à 10 ng de phosphoprotéines) et surtout révèle à la fois les protéines phosphorylées sur une tyrosine, sérine et thréonine (Steinberg et al., 2003). D'un point de vue pratique la coloration des phosphoprotéines au Pro-Q Diamond est rapide, simple et évite la manipulation d'éléments radioactifs.

Trois types de traitements à la morphine ont été étudiés : i) traitement aigu ii) traitement chronique iii) traitement chronique suivi de la précipitation d'un sevrage.

B. Analyse du phosphoprotéome de la fraction DRM des cellules SH-SY5Y

Nous avons décidé d'initier une analyse différentielle du phosphoprotéome après un traitement à la morphine dans un premier temps au niveau de la fraction Detergent Resistant Membrane (DRM ou rafts) et ce pour deux raisons principales : i) d'une part, les données de la littérature montrent que cette fraction est enrichie en protéines de signalisation (Foster et al., 2003; Li et al., 2003; von Haller et al., 2001) ii) d'autre part, le protocole de préparation des DRM à partir des cellules SH-SY5Y permet d'obtenir des fractions enrichies en protéines G α i et G β et contenant le récepteur MOP révélé par la présence du tag T7 (Mouledous et al., 2005).

Ainsi, la stratégie mise en œuvre a consisté à préparer les fractions DRM en utilisant un protocole similaire à celui de notre précédente étude (Mouledous et al., 2005). Les protéines des DRM sont par la suite séparées par une électrophorèse SDS-PAGE. Les travaux de Schulenberg *et al* montrent que cette technique séparative est compatible avec la révélation du phosphoprotéome au Pro-Q Diamond (Schulenberg et al., 2003). L'objectif final est alors de détecter des modifications du degré de phosphorylation d'une ou plusieurs protéines ou de l'abondance d'une protéine phosphorylée après une analyse d'image par le logiciel Quantity One.

1- Mise au point de la révélation du phosphoprotéome des DRM

a) Caractérisation des DRM

La préparation de la fraction DRM des cellules SH-SY5Y (sous-clone 2) est réalisée avec une seule modification du protocole par rapport à précédemment (Mouledous et al., 2005). Des inhibiteurs de phosphatases à large spectre sont ajoutés aux tampons et gradients de sucrose tout au long de la préparation des DRM afin de préserver l'intégrité des phosphorylations, modifications post-traductionnelles particulièrement labiles (Reinders et Sickmann, 2005).

Suite à l'étape d'ultracentrifugation à l'équilibre sur gradient de sucrose, 12 fractions de 1 mL sont récupérées à partir du haut du tube. 50 μ L de chaque fraction sont dilués dans 1 mL de p-nitrophényl phosphate (dilution au 1/20^{ème}) afin de mesurer de façon relative l'activité de la

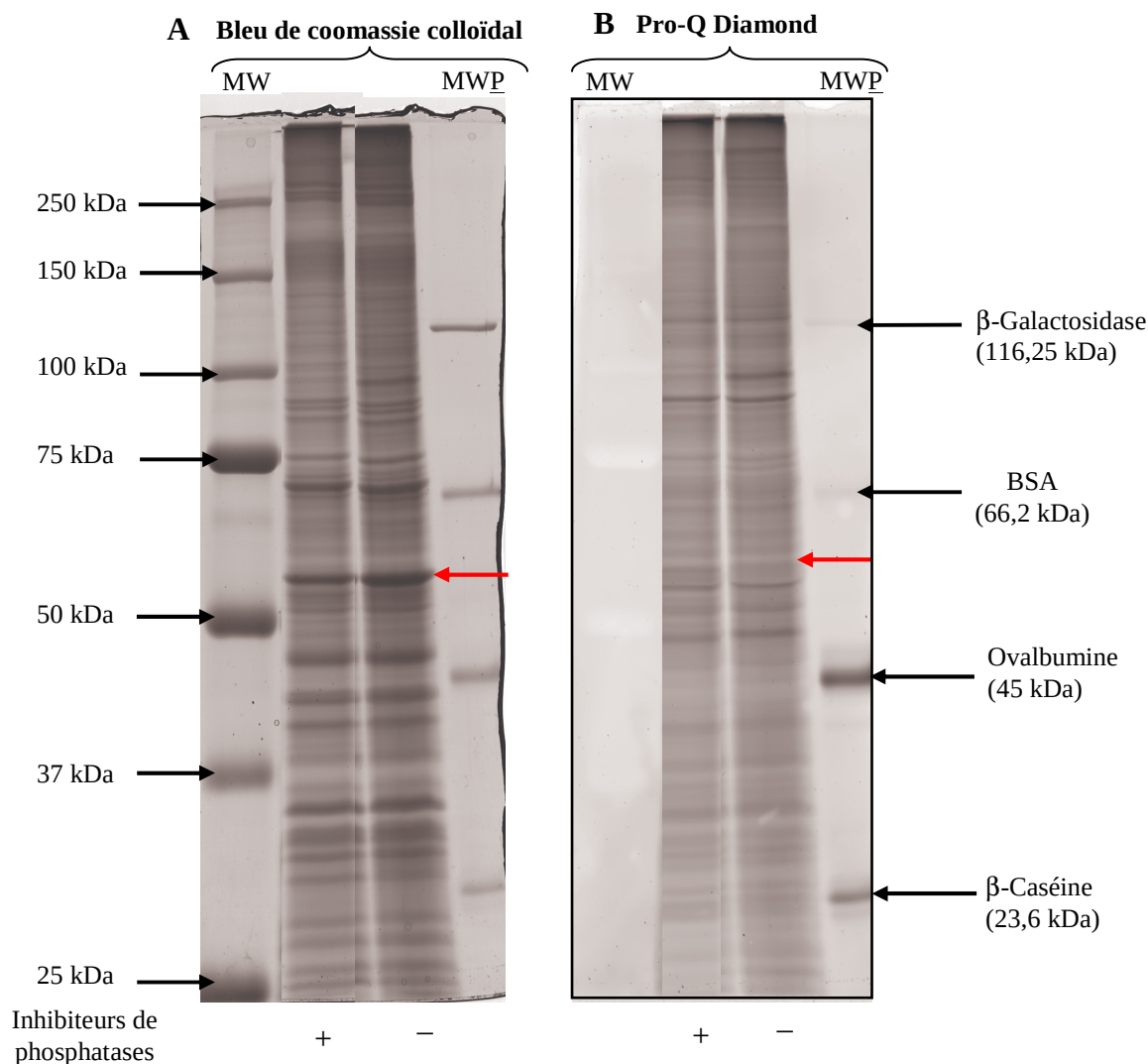


Figure 36: Comparaison du profil protéique des DRM après coloration au bleu de coomassie colloïdal et au Pro-Q Diamond. Les DRM des cellules SH-SY5Y sont préparés de façon parallèle en présence (+) ou non (-) d'inhibiteurs de phosphatases. 100 µg de protéines sont séparés sur gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. Le phosphoprotéome est révélé au Pro-Q Diamond (**B**) puis le protéome total est révélé au bleu de coomassie colloïdal (**A**). Seuls les marqueurs phosphorylés (ovalbumine et β-Caséine) sont révélés par le Pro-Q Diamond. La flèche rouge indique une protéine abondante dans le protéome des DRM mais non révélée par le Pro-Q Diamond. L'apparent retard de migration de la β-Caséine est probablement dû à sa phosphorylation et / ou à l'imprécision du marqueur coloré de 25 kDa. BSA (Bovine Serum Albumin), MW (marqueurs de masse moléculaire colorés), MWP (marqueur de masse moléculaire contenant 2 protéines phosphorylées).

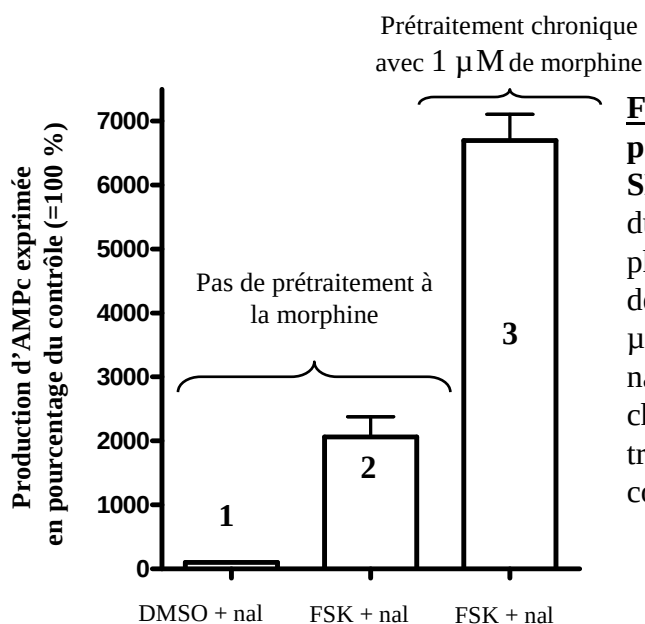


Figure 37: Activité de l'adénylyl cyclase révélée par l'accumulation d'AMPc dans les cellules SH-SY5Y. Les cellules sont incubées à 37°C dans du milieu de culture contenant des inhibiteurs de phosphodiésterases. L'AMPc produit après 10 min de stimulation ou non de l'adénylyl cyclase par 5 µM de forskoline (FSK) en présence de 1 µM de naloxone (nal) est dosé comme indiqué dans le chapitre « matériels et méthodes ». Les résultats de trois expériences sont exprimés en pourcentage du contrôle (DMSO + nal). DMSO (diméthylsulfoxyde).

phosphatase alcaline (voir figure 34). La figure 34 montre qu'en particulier dans les fractions 3 et 4, fractions dans lesquelles les DRM flottent à l'équilibre, l'activité de la phosphatase alcaline est faible lorsque la préparation des DRM est réalisée en présence d'inhibiteurs de phosphatases. Ainsi même dilués au $1/20^{\text{ème}}$, les inhibiteurs utilisés inhibent efficacement au moins une phosphatase appartenant à leur spectre d'action. Ce résultat suggère que dans les conditions d'utilisation recommandées par le fournisseur, les inhibiteurs de phosphatases sont efficaces.

Afin de vérifier que cette baisse d'activité de la phosphatase alcaline ne résulte pas d'une diminution de la quantité de protéines présentes dans les fractions 3 et 4, celle-ci est dosée (voir figure 35). Le dosage de protéines de la fraction DRM (fractions 3 et 4) par la méthode de Lowry ne révèle pas de différence quantitative entre les deux méthodes de préparation avec *versus* sans inhibiteurs de phosphatases.

Enfin, afin de vérifier que l'ajout d'inhibiteurs de phosphatases dans le protocole de préparation des DRM ne modifie pas de façon qualitative les protéines retrouvées dans la fraction 3 et 4, 100 µg de chacune des préparations protéiques sont séparés sur gel SDS-PAGE (voir figure 36-A). La révélation des protéines au bleu de coomassie colloïdal ne dévoile pas de différence reproductible de profil entre les deux méthodes de préparation de DRM.

L'ensemble de ces résultats suggère que la préparation des DRM en présence d'inhibiteurs de phosphatases permet d'isoler une fraction protéique qualitativement identique à celle décrite dans nos travaux précédents (Mouledous et al., 2005) tout en préservant les phosphorylations.

b) Révélation du phosphoprotéome des DRM

100 µg de protéines sont séparés sur gel SDS-PAGE. Le gel est coloré au Pro-Q Diamond comme indiqué dans le chapitre « matériels et méthodes » puis les protéines sont révélées au scanner Typhoon Trio (voir figure 36-B). Le même gel est par la suite coloré directement au bleu de coomassie colloïdal (voir figure 36-A).

c) Spécificité de coloration

D'un point de vue spécificité de coloration, il est à noter que les marqueurs de masse moléculaire non phosphorylés ne sont quasiment pas révélés par le Pro-Q Diamond (comparer A et B de la figure 36). Au contraire, les marqueurs phosphorylés sont spécifiquement révélés au Pro-Q Diamond. Ensuite, les profils protéiques du gel SDS-PAGE diffèrent selon le procédé de coloration. De plus les protéines colorées fortement au Pro-Q Diamond ne correspondent pas forcément aux protéines les plus abondantes colorées au bleu de coomassie colloïdal (comparer A et B de la figure 36). Par exemple la protéine indiquée par une flèche rouge sur la figure 36 est l'une des protéines

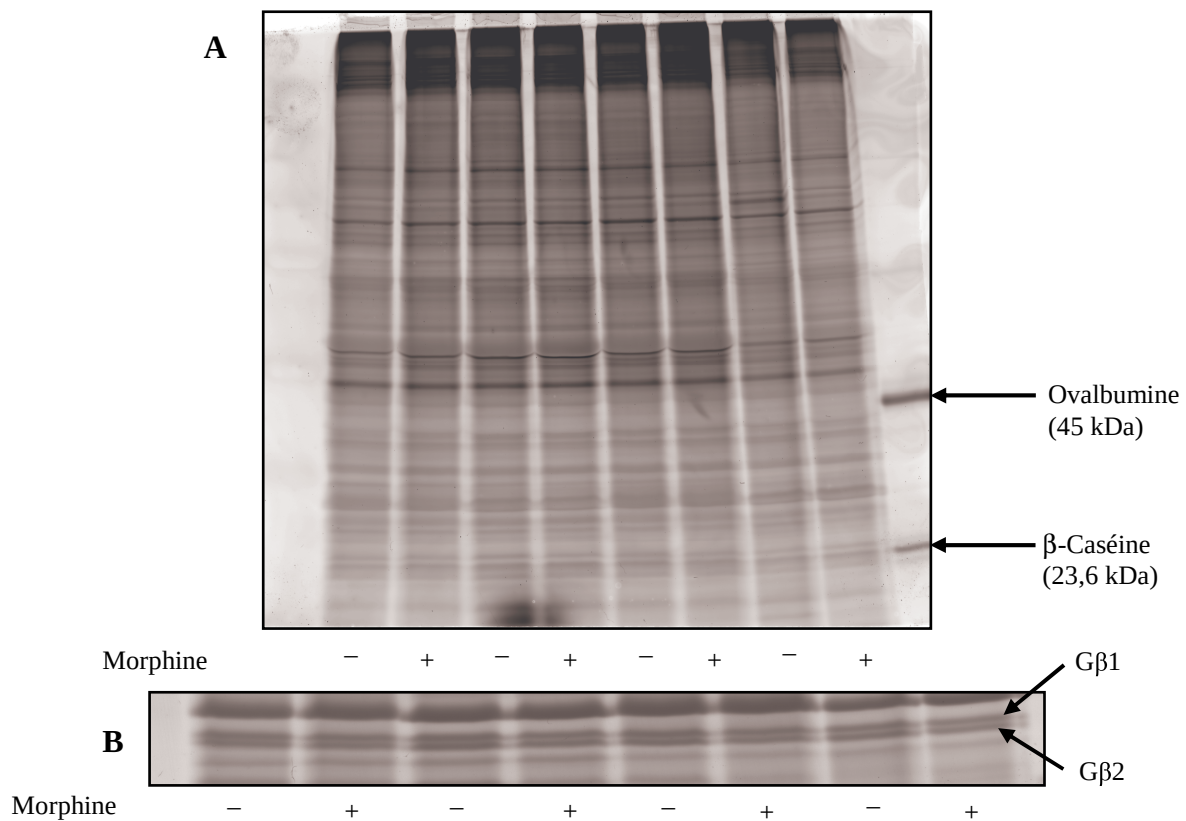


Figure 38: Phosphoprotéome des DRM après traitement chronique à la morphine des cellules SH-SY5Y. Les cellules SH-SY5Y sont traitées 24h avec 1 μ M de morphine (+) ou avec de l'eau (-) dans le milieu de culture. Les DRM sont préparés de façon parallèle et 100 μ g de protéines sont séparés sur gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. **A-** Le phosphoprotéome est révélé après coloration au Pro-Q Diamond. **B-** Zoom sur les protéines G β 1 et G β 2 du même gel coloré ultérieurement au bleu de coomassie colloïdal.

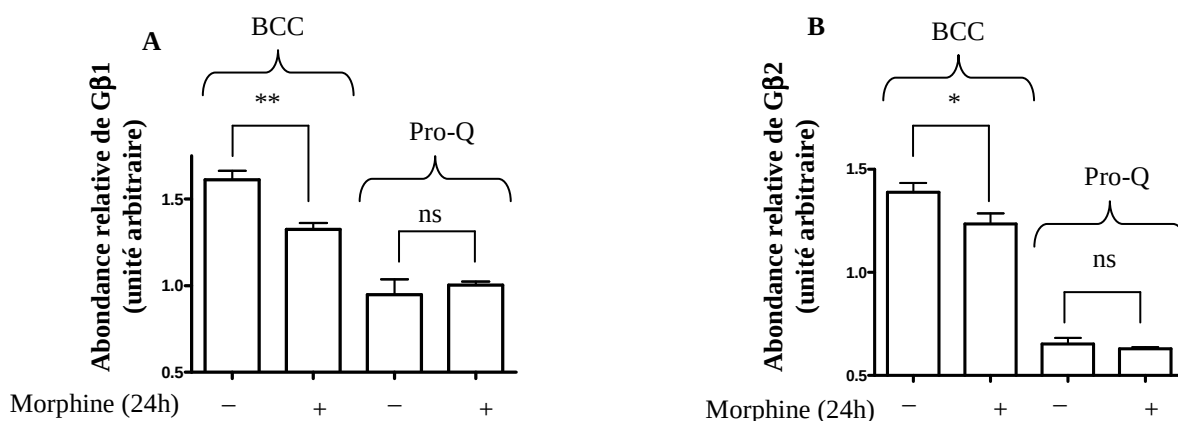


Figure 39: Quantification des bandes G β 1 et G β 2 par le logiciel Quantity One après coloration au bleu de coomassie colloïdal et Pro-Q Diamond. Les intensités relative des bandes correspondant aux protéines G β 1 (A) et G β 2 (B) révélées sur les gels de la figure 38 sont mesurées par le logiciel Quantity One comme indiqué dans le chapitre « matériels et méthodes ». BCC (coloration au Bleu de Coomassie Colloïdal), Pro-Q (coloration au Pro-Q Diamond), ** p < 0,01, * p < 0,05 t-test n=4, ns (non significatif).

les plus intensément colorées par le bleu de coomassie colloïdal. Au contraire l'intensité de coloration de cette même protéine au Pro-Q Diamond est particulièrement faible. L'ensemble de ces observations suggère que le Pro-Q Diamond ne possède pas la même spécificité de coloration que le bleu de coomassie colloïdal. Ainsi comme le proposent des travaux précédents ce colorant fluorescent révélerait spécifiquement les phosphoprotéines (Davis et al., 2006; Hayduk et al., 2004; Schulenberg et al., 2003; Steinberg et al., 2003). Cependant, il est surprenant que le profil protéique révélé au Pro-Q Diamond ne diffère ni quantitativement ni qualitativement selon que la méthode de préparation des DRM inclut ou non les inhibiteurs de phosphatases (voir figure 36-B).

d) Proportion relative entre phosphoprotéome et protéome

Le nombre total de protéines révélées par le Pro-Q Diamond (environ 40 après analyse par le logiciel Quantity One) est inférieur à celui révélé par le bleu de coomassie colloïdal, environ 80 protéines (comparer A et B de la figure 36). Selon Steinberg *et al* (Steinberg et al., 2003), la sensibilité du Pro-Q Diamond est de 2 à 10 ng de phosphoprotéines en fonction du degré de phosphorylation c'est à dire au moins aussi sensible que le bleu de coomassie colloïdal (Westermeier et Marouga, 2005). Par conséquent, le plus faible nombre de protéines révélées par le Pro-Q Diamond résulte probablement du fait que les phosphoprotéines ne représentent qu'un sous-ensemble de protéines dans les DRM. Ce constat est en accord avec la littérature qui prévoit qu'un tiers (Raggiaschi et al., 2005) voire la moitié (Reinders et Sickmann, 2005) du protéome total est phosphorylé. En ce qui concerne cette proportion dans les DRM, aucune donnée n'est disponible.

Ensuite, la plupart des bandes protéiques colorées par le Pro-Q Diamond sont de faible intensité, notamment celles de masse inférieure à 45 kDa. Cette faible intensité de coloration au Pro-Q Diamond par rapport au bleu de coomassie colloïdal suggère comme l'indiquent Reinders et Sickman que la fraction phosphorylée ne représente qu'une proportion mineure (1 à 2 %) d'une protéine totale (Reinders et Sickmann, 2005).

Enfin, il est à noter que l'image numérisée après coloration au Pro-Q Diamond est de moins bonne qualité (plus floue) que celle issue de la coloration au bleu de coomassie colloïdal.

Une fois les conditions d'étude du phosphoprotéome des DRM mises au point, nous avons initié une analyse différentielle de ce sous protéome après un traitement à la morphine.

2- Analyse différentielle du phosphoprotéome des DRM

Notre objectif était de réaliser une étude différentielle du phosphoprotéome des DRM après un traitement aigu à la morphine, chronique et enfin après un traitement chronique puis un sevrage précipité par la naloxone des cellules SH-SY5Y en culture. Le sevrage précipité par la naloxone

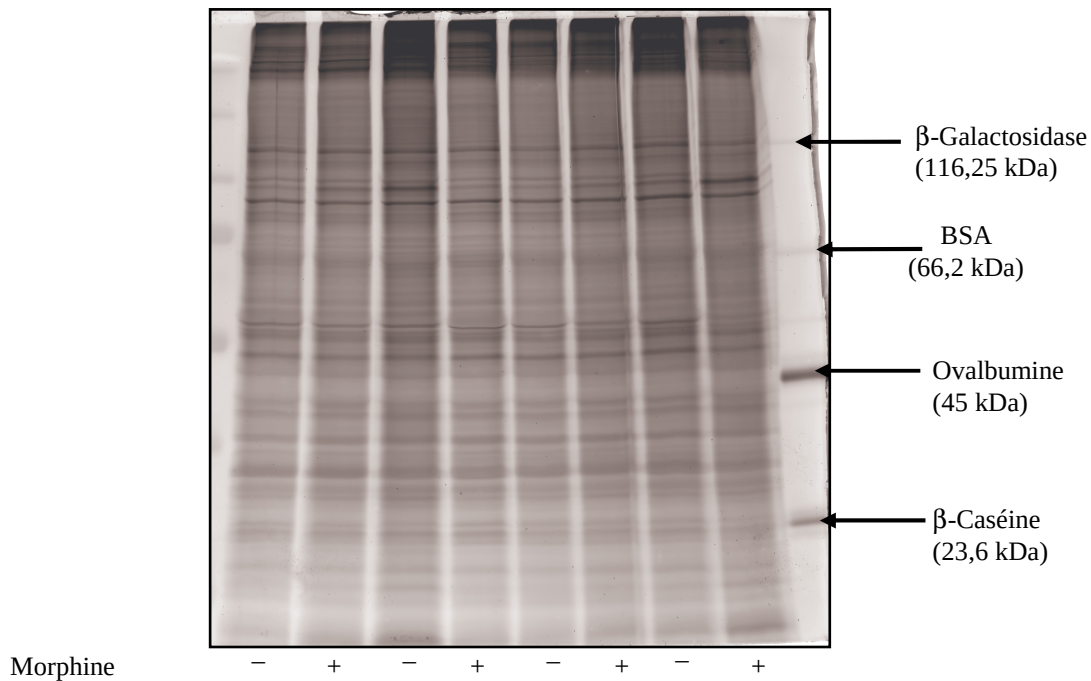


Figure 40: Phosphoprotéome des DRM après un traitement aigu à la morphine des cellules SH-SY5Y. Les cellules SH-SY5Y sont traitées 15 min avec 1 μ M de morphine (+) ou avec de l'eau (-) dans le milieu de culture. Les DRM sont préparés de façon parallèle et 100 μ g de protéines sont séparés sur gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. Le phosphoprotéome est révélé après coloration au Pro-Q Diamond. BSA (Bovine Serum Albumin).

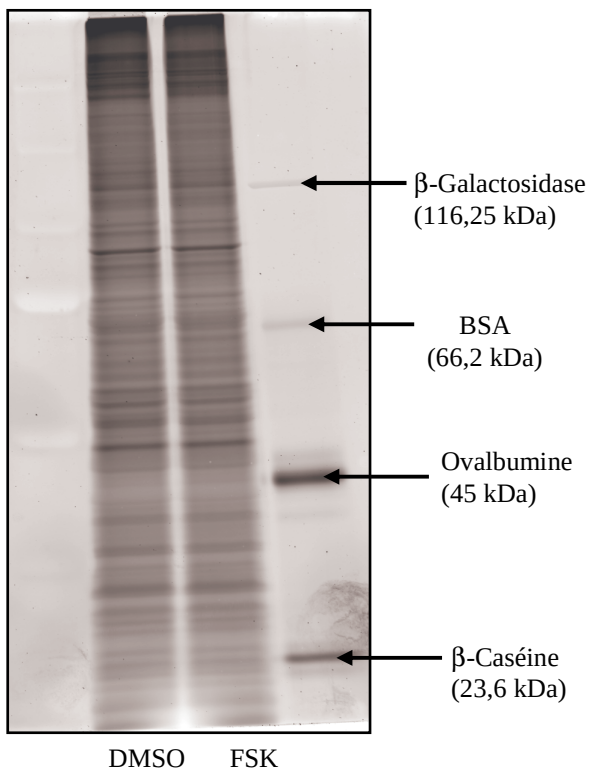


Figure 41: Phosphoprotéome des DRM des cellules SH-SY5Y après traitement à la forskoline. Les cellules SH-SY5Y sont traitées 10 min avec 5 μ M de forskoline (FSK) ou avec du DMSO (contrôle) dans le milieu de culture. Les DRM sont préparés de façon parallèle et 100 μ g de protéines sont séparés sur gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. Le phosphoprotéome est révélé après coloration au Pro-Q Diamond. BSA (Bovine Serum Albumin), DMSO (diméthylsulfoxyde).

peut être réalisé en présence de forskoline (un activateur de l'adénylyl cyclase) pendant 10 min afin de révéler la sensibilisation de l'adénylyl cyclase (AC). Lors d'un tel traitement, l'activité de l'AC est environ trois fois supérieure par rapport au contrôle (comparer les colonnes 2 et 3 de la figure 37) ce qui suggère que la protéine kinase A (PKA) est fortement activée pour phosphoryler ses cibles.

a) Première expérience : traitement chronique à la morphine

Dans un premier temps, les cellules SH-SY5Y sont traitées pendant 24h avec 1 μ M de morphine parallèlement à des cellules contrôles. Un tel traitement morphinique conduit à des adaptations moléculaires au niveau des cellules SH-SY5Y (Mouledous et al., 2005). Les DRM issus des cellules contrôles *versus* traitées sont préparés de façon parallèle, leur protéome est soumis à une séparation sur un gel SDS-PAGE et les protéines sont révélées au Pro-Q Diamond. Comme le montre la figure 38-A ce traitement chronique ne produit aucune modification reproductible au niveau du phosphoprotéome des DRM. La coloration ultérieure de ce même gel au bleu de coomassie colloïdal (voir les figure 38-B et 39) permet de vérifier que le traitement opéré produit comme attendu une downrégulation des protéines G β 1 et G β 2 (Mouledous et al., 2005). Cette observation indique que les cellules SH-SY5Y ont répondu de façon « normale » au traitement chronique à la morphine. Toujours en ce qui concerne les protéines G β 1 et G β 2, alors qu'elles sont downrégulées par le traitement chronique à la morphine leur intensité de coloration au Pro-Q Diamond ne varie pas significativement (voir figure 39). Cela suggère qu'une plus grande fraction de ces protéines est phosphorylée suite au traitement chronique par la drogue, phénomène décrit dans la littérature (Chakrabarti et Gintzler, 2003; Chakrabarti et al., 2001).

L'absence de différentiel reproductible au niveau du phosphoprotéome des DRM après un traitement chronique à la morphine peut s'expliquer notamment par deux raisons : i) un traitement chronique à la morphine ne produit aucune modification détectable au niveau du phosphoprotéome des DRM ii) le protocole de préparation des DRM et / ou de séparation puis de coloration au Pro-Q Diamond ne permet pas de révéler de différentiel.

b) Deuxième expérience : traitement aigu à la morphine

Dans un deuxième temps, les cellules SH-SY5Y sont traitées pendant 15 min avec 1 μ M de morphine parallèlement à des cellules contrôles. Puis le phosphoprotéome des DRM est analysé de façon identique que précédemment (voir la figure 40). La coloration des phosphoprotéines au Pro-Q Diamond ne révèle encore une fois aucun différentiel reproductible après un traitement aigu à la morphine.

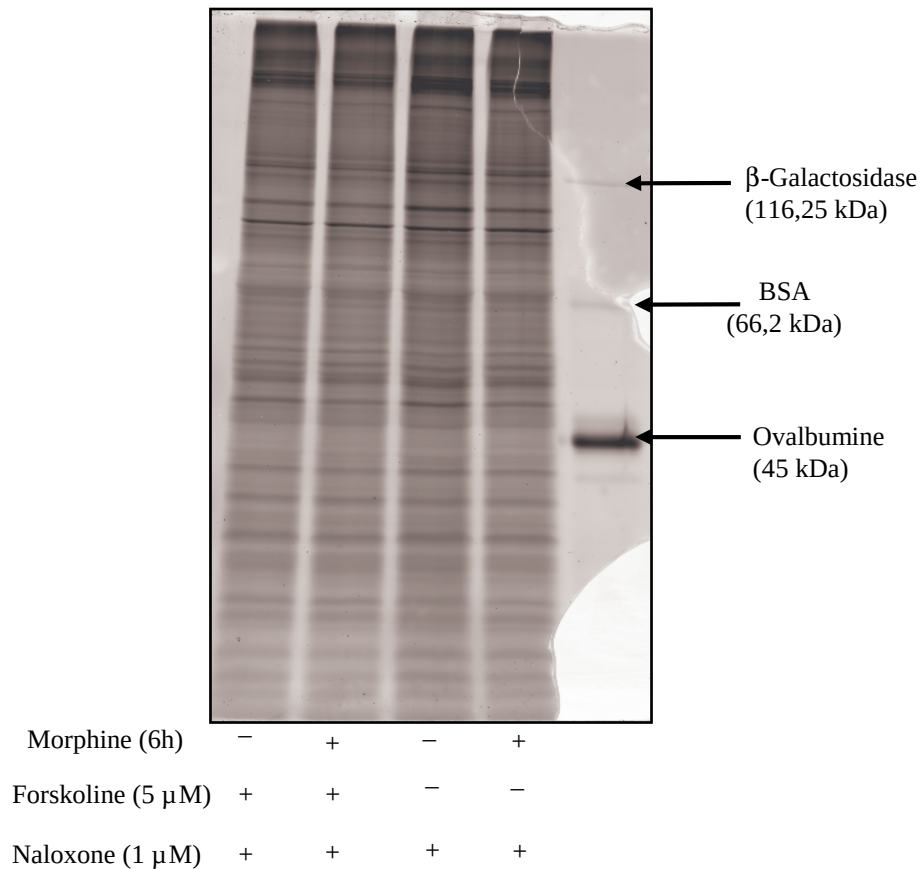


Figure 42: Phosphoprotéome des DRM après un traitement chronique à la morphine des cellules SH-SY5Y puis sevrage. Les cellules SH-SY5Y sont traitées 6h avec 1 μ M de morphine (+) ou avec de l'eau (-) dans le milieu de culture. Puis les cellules sont sevrées d'abord par un rinçage avec 20 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline) à 37°C directement dans les boîtes de culture de 14 cm puis pendant 10 min avec du milieu de culture contenant de la naloxone à 1 μ M avec (+) ou sans (-) forskoline à 5 μ M. Les DRM sont préparés de façon parallèle et 100 μ g de protéines sont séparés sur gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. Le phosphoprotéome est révélé après coloration au Pro-Q Diamond. BSA (Bovine Serum Albumin) .

Suite à ce résultat nous avons cherché à savoir si le protocole d'analyse que nous avons mis en œuvre est capable de révéler un différentiel au niveau du phosphoprotéome des DRM.

c) Troisième expérience : traitement à la forskoline.

Comme indiqué précédemment, la forskoline est un activateur de l'AC et donc indirectement aussi un activateur de la PKA. Nous avons décidé de réaliser deux traitements différents avec la forskoline. Le premier est un traitement de 10 min des cellules SH-SY5Y avec 5 μ M de forskoline ce qui augmente d'environ vingt fois l'activité de l'AC, révélée par l'accumulation d'AMPC, par rapport au contrôle (comparer les colonnes 1 et 2 de la figure 37). Le second traitement consiste à traiter de façon chronique (6h de morphine à 1 μ M) les cellules SH-SY5Y puis de réaliser un sevrage en présence de naloxone avec ou sans 5 μ M de forskoline pendant 10 min. Un sevrage de 10 min réalisé en présence de 5 μ M de forskoline (voir figure 37) induit une augmentation de l'activité de l'AC environ soixante fois et trois fois supérieure par rapport respectivement à l'activité basale (colonne 3 *versus* 1) et stimulée par la forskoline sans prétraitement à la morphine (colonne 3 *versus* 2). L'idée de réaliser de tels traitements était de potentialiser la phosphorylation des protéines en activant indirectement la PKA.

Comme le montrent les figures 41 et 42, aucun de ces traitements ne conduit à un différentiel au niveau du phosphoprotéome des DRM révélé au Pro-Q Diamond. Suite à ce résultat, nous avons cherché à savoir si des substrats de la PKA étaient présents dans les DRM. Pour cela nous nous sommes basés sur les travaux de von Haller *et al* qui ont identifié 71 protéines dans les DRM de lymphocytes T de type Jurkat (von Haller *et al.*, 2001). Sur les 143 substrats de la PKA contenus dans la base de données phospho.ELM (<http://phospho.elm.eu.org/>), seules trois protéines sur les 71 publiées par von Haller *et al* sont répertoriées. Parmi elles deux sont de masse moléculaire inférieure à 25 kDa et sont des protéines peu abondantes. La troisième, la vimentine avec une masse moléculaire de 53 kDa est potentiellement masquée sur une électrophorèse monodimensionnelle par la tubuline, une protéine particulièrement abondante d'environ 50 kDa.

L'ensemble de ces résultats indique probablement que le protocole d'analyse et / ou de préparation des DRM mis en œuvre ne permet pas de révéler de différentiel. Il est possible que les cibles de la morphine et de la PKA soient des protéines peu abondantes dans les DRM, masquées par les phosphoprotéines majoritaires qui, elles, ne sont pas modifiées. Une séparation des protéines sur gel bidimensionnel permet de révéler des modifications plus subtiles. Ainsi, la suite de mon projet a consisté à analyser le phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y suite à un traitement à la morphine après une séparation des protéines sur un gel bidimensionnel.

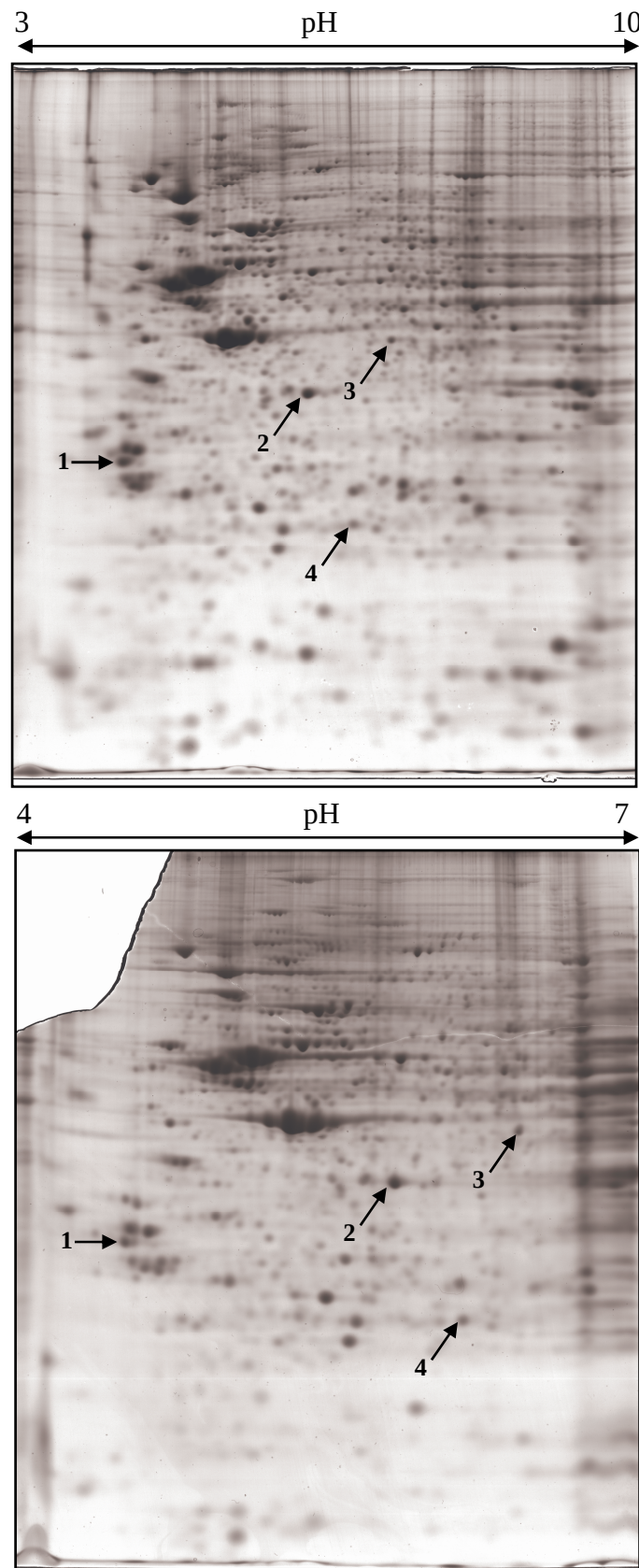


Figure 43: Séparation du protéome des cellules SH-SY5Y par électrophorèse bidimensionnelle sur une gamme de pH 3-10 ou 4-7. Les protéines sont séparées en seconde dimension sur un gel de polyacrylamide à 12 % et révélées au bleu de coomassie colloïdal. L'utilisation de bandelettes de gamme de pH 4-7 augmente la résolution de la séparation. Les flèches indiquent des spots identiques sur les deux profils.

C. Analyse globale du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y

Le second volet de l'analyse différentielle du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y après un traitement à la morphine a été réalisé sur un échantillon protéique plus large que celui des DRM. La stratégie mise en œuvre est de même type que celle présentée au paragraphe I-C (page 113). Ainsi, l'échantillon protéique correspondant à l'ensemble des protéines cellulaires solubilisées dans 1 % de Triton X-100 pendant trois heures à 4°C (en présence d'inhibiteurs de phosphatases) a été soumis à une séparation sur électrophorèse bidimensionnelle (2-DE). La 2-DE est une technique de choix pour analyser un échantillon protéique complexe (Gorg et al., 2004; Herbert et al., 2001) et en particulier les phosphoprotéines. En effet, la phosphorylation d'une protéine modifie son point isoélectrique ce qui change sa mobilité électrophorétique en première dimension (Mann et Jensen, 2003). Après séparation, le gel d'électrophorèse est coloré au Pro-Q Diamond puis au bleu de coomassie colloïdal. Les phosphoprotéines sont révélées grâce au scanner Typhoon Tryo et l'image analysée par le logiciel Image Master 2D Platinum. L'objectif est de détecter des modifications du degré de phosphorylation des protéines ou de l'abondance de phosphoprotéines après un traitement à la morphine.

1- Mise au point de la révélation du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y

a) Conditions expérimentales pour la séparation des phosphoprotéines par 2-DE

Des bandelettes (ou strips) de 13 cm à gradient linéaire de pH 4 à 7 (pH 4-7) ont été testées pour la séparation des protéines en première dimension. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à comparer la séparation bidimensionnelle des protéines en fonction de l'utilisation de bandelettes à pH 3 à 10 non linéaire (pH 3-10) ou des bandelettes à pH 4-7 (voir figure 43). De façon générale, l'utilisation de bandelettes à gamme de pH réduit a l'avantage pour une même longueur de bandelette d'augmenter la résolution de la séparation en première dimension.

Au niveau des pH acides, la figure 43 montre que la séparation protéique avec une bandelette de type pH 4-7 n'induit quasiment pas de perte de protéines d'un point de vue qualitatif. En effet, il semble que peu de protéines aient un point isoélectrique entre 3 et 4. Par exemple, le spot protéique noté 1 sur la figure 43 du côté acide de l'électrophorèse pH 3-10 est aussi retrouvé à l'extrémité de l'électrophorèse pH 4-7. Qui plus est, les protéines acides sont alors mieux résolues.

Au niveau des pH plus basiques l'utilisation de bandelettes pH 4-7 fait perdre trois unités de pH par rapport à la bandelette pH 3-10 et par conséquent un certain nombre de protéines sont exclues de l'analyse. Cependant, il est à noter que la plupart de ces protéines exclues de l'analyse focalise sur la partie de l'électrophorèse bidimensionnelle pH 3-10 la moins bien résolue (pH

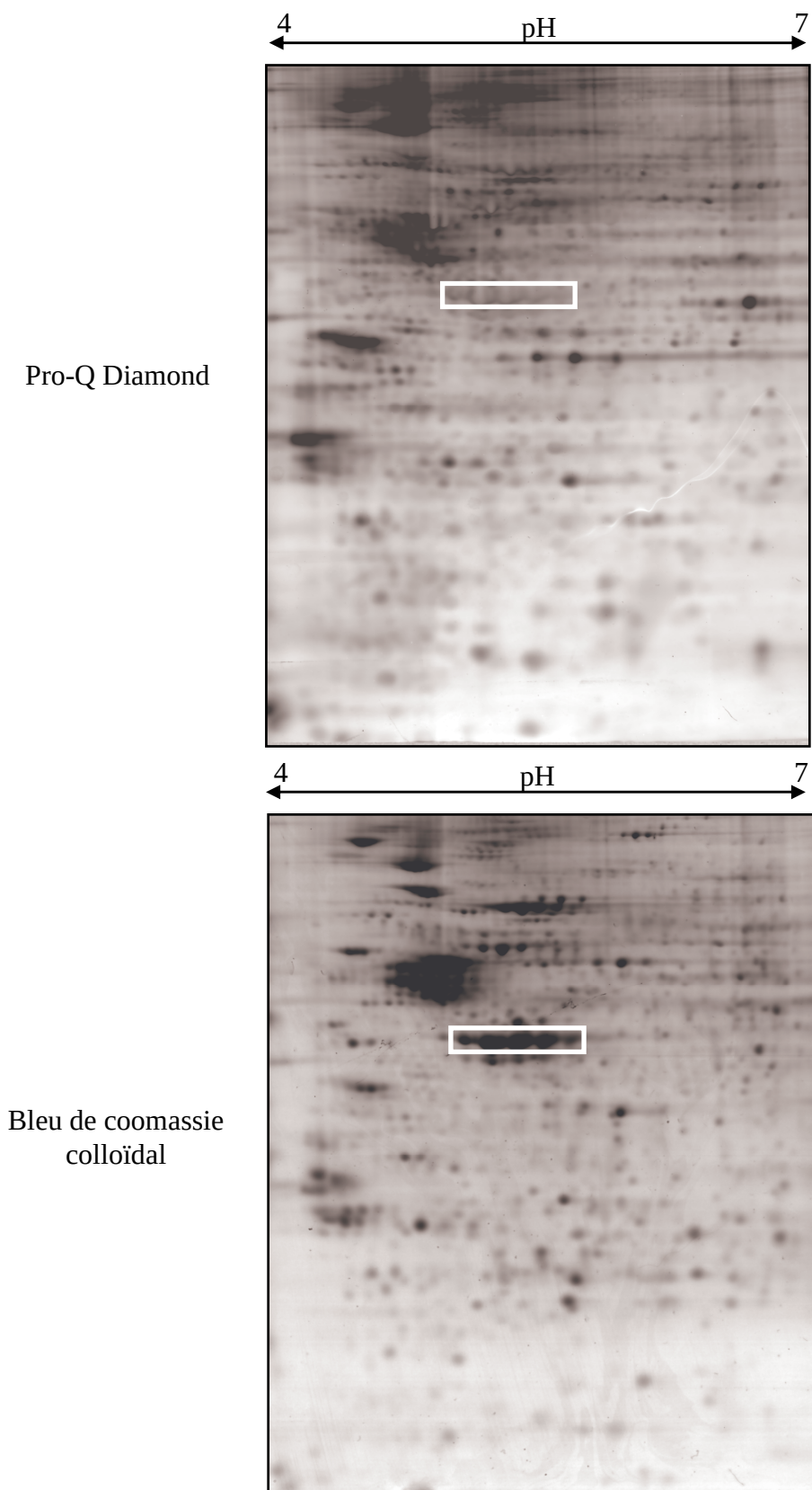


Figure 44 : Spécificité de coloration du Pro-Q Diamond. 600 μ g de protéines sont séparés en première dimension sur une bandelette de type pH 4-7. La seconde dimension consiste en une électrophorèse SDS-PAGE à 12 % de polyacrylamide. Le gel est coloré dans un premier temps au Pro-Q Diamond et les protéines sont révélées par le scanner Typhoon Tryo. Puis le même gel est coloré directement au bleu de coomassie colloïdal et scanné par le GS-800 Calibrated Densitometer. La comparaison des profils protéiques montre que le Pro-Q Diamond n'a pas la même spécificité de coloration que le bleu de coomassie colloïdal. Par exemple, le cadre blanc correspond à plusieurs sous-unités d'actine particulièrement abondantes dans le protéome total. Ces protéines ne sont pas révélées par le Pro-Q Diamond.

basique) et donc la moins exploitable. Ainsi malgré la perte de trois unités de pH, le nombre de spots protéiques analysables diminue assez faiblement.

Nous avons donc considéré que l'utilisation de bandelettes pH 4-7 était un bon compromis entre résolution et nombre de spots analysables. De plus une meilleure résolution en première dimension doit permettre ultérieurement une découpe manuelle des spots plus facile et précise diminuant la probabilité d'analyse d'un mélange de protéines par spectrométrie de masse. Enfin, d'un point de vue de l'étude du phosphoprotéome, l'utilisation de bandelettes à gamme de pH réduit comme pH 4-7 possède plusieurs avantages sur les bandelettes pH 3-10 :

- Elle permet de réaliser une sorte de fractionnement de l'échantillon (en excluant volontairement les protéines de points isoélectriques supérieurs à 7) et réduit donc la complexité de l'échantillon (Righetti et al., 2005). De ce fait la probabilité de détecter des protéines de plus faible abondance, telles que les phosphoprotéines (Reinders et Sickmann, 2005), est augmentée.
- Elle permet de charger une plus grande quantité de protéines ce qui augmente aussi la probabilité de détecter des protéines de faible abondance (Unwin et al., 2005).
- Elle permet d'augmenter la résolution au niveau de la première dimension et donc la probabilité de séparer des protéines qui diffèrent uniquement par leurs points isoélectriques comme c'est le cas pour une protéine à différents degrés de phosphorylation (Mann et Jensen, 2003).

En conclusion, le protocole d'électrophorèse bidimensionnelle utilisé pour l'analyse du phosphoprotéome ne diffère de celui de l'analyse du protéome total (voir paragraphe I-C page 113) que par l'utilisation de bandelette pH 4-7 et par la quantité de protéines déposée : 600 µg au lieu de 300 µg précédemment.

b) Comparaison du phosphoprotéome et du protéome total

i) *Spécificité de la coloration au Pro-Q Diamond*

600 µg de protéines sont séparés par 2-DE. Le gel est d'abord coloré au Pro-Q Diamond, scanné au Typhoon Tryo scanner puis coloré directement au bleu de coomassie colloïdal (voir figure 44). La figure 44 montre que pour le même gel d'électrophorèse deux profils protéiques totalement différents sont révélés selon le colorant utilisé. Par exemple, plusieurs sous-unités

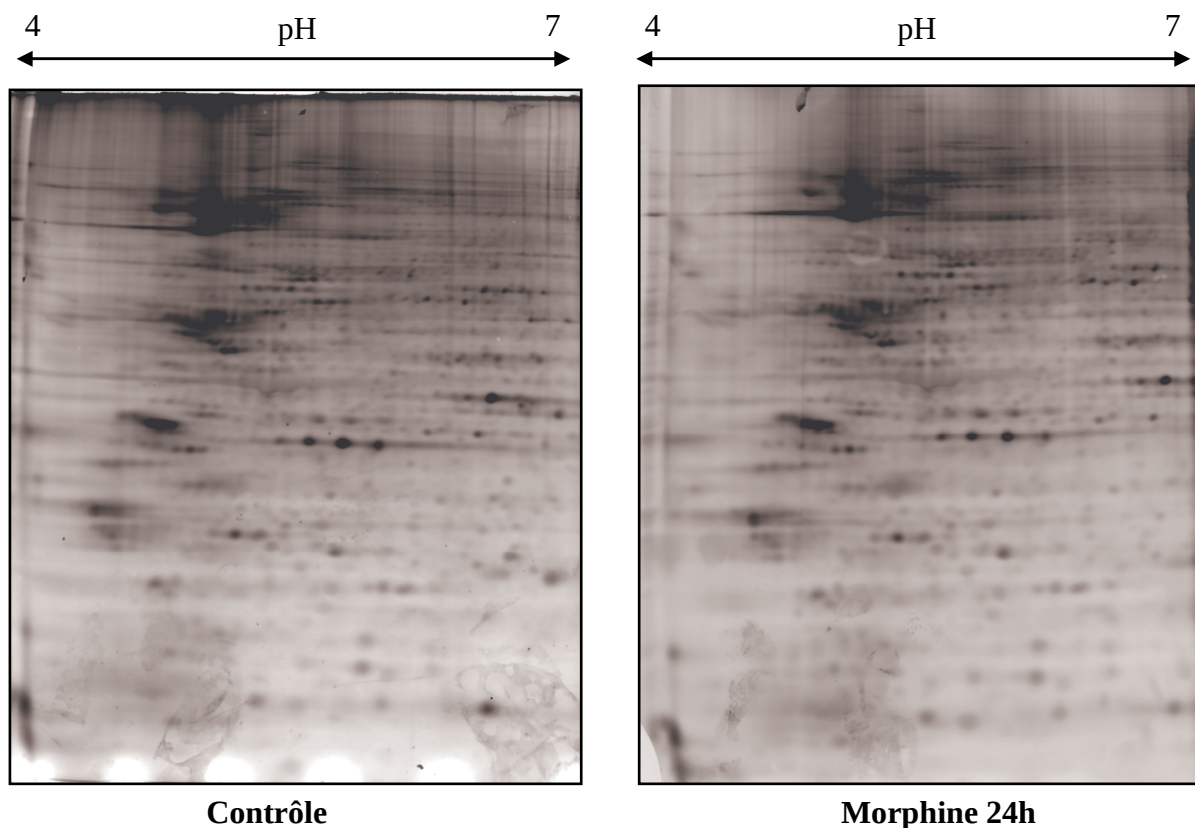


Figure 45: Un traitement chronique à la morphine n'induit pas de modifications reproductibles majeures au niveau du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y révélé dans les conditions mises en œuvre. Des cellules SH-SY5Y sont traitées pendant 24h avec 1 μ M de morphine parallèlement à des cellules contrôles. 600 μ g de protéines sont séparés par électrophorèse bidimensionnelle. Les gels sont colorés au Pro-Q Diamond et les protéines sont révélées par le scanner Typhoon Tryo. Les profils globaux du phosphoprotéome contrôle *versus* morphine sont particulièrement similaires.

d'actine particulièrement abondantes au sein du protéome ne sont pas colorées par le Pro-Q Diamond. Ces résultats montrent que le Pro-Q Diamond ne possède pas la même spécificité de coloration que le bleu de coomassie colloïdal ce qui suggère qu'il révèle spécifiquement les phosphoprotéines (Davis et al., 2006; Hayduk et al., 2004; Steinberg et al., 2003).

ii) *Sensibilité de la coloration au Pro-Q Diamond*

Le nombre de spots révélés par le Pro-Q Diamond après séparation par 2-DE est estimé à environ 800 à l'aide du logiciel d'analyse d'image Image Master 2D Platinum. De façon surprenante, le nombre de spots révélés par la coloration du protéome total est du même ordre de grandeur. Ce résultat est contradictoire non seulement avec le fait qu'un tiers (Raggiaschi et al., 2005) voire la moitié (Reinders et Sickmann, 2005) des protéines sont phosphorylées mais aussi avec d'autres travaux où le nombre de protéines révélées au Pro-Q Diamond est bien inférieur au nombre de protéines révélées par un colorant « total » (Hayduk et al., 2004; Steinberg et al., 2003; Unwin et al., 2005). Cependant dans ces travaux, les colorants utilisés pour révéler le protéome total sont le nitrate d'argent (Unwin et al., 2005) ou le Sypro Ruby (Hayduk et al., 2004; Steinberg et al., 2003) qui sont environ dix fois plus sensibles que le bleu de coomassie colloïdal. Ainsi, nous suggérons que le Pro-Q Diamond révèle quasiment autant de protéines que le bleu de coomassie colloïdal du fait de sa plus grande sensibilité ce qui est en accord avec la littérature (Steinberg et al., 2003; Westermeier et Marouga, 2005).

Nous considérons qu'une analyse différentielle sur les 800 spots détectés par le logiciel d'analyse d'image Image Master 2D Platinum est suffisamment large. Ainsi à l'instar de travaux précédents (Hayduk et al., 2004; Steinberg et al., 2003; Unwin et al., 2005), nous n'effectuerons pas d'étape d'enrichissement des protéines phosphorylées avant leur séparation.

2- **Analyse différentielle du phosphoprotéome après un traitement à la morphine**

a) Conditions opératoires

Comme indiqué au paragraphe II-A (page 114), l'objectif de notre étude est d'identifier les protéines des cellules SH-SY5Y phosphorylées suite à un traitement aigu à la morphine, chronique et enfin suite à un traitement chronique suivi d'un sevrage.

Le traitement aigu est effectué avec 1 μ M de morphine pendant 5 min. Ce temps de traitement a été choisi puisque récemment Bilecki *et al* ont montré dans les cellules SH-SY5Y que les protéines ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) 1 et 2 sont phosphorylées de façon transitoire après un traitement morphinique de 1 μ M pendant 5 min. Le degré de phosphorylation de

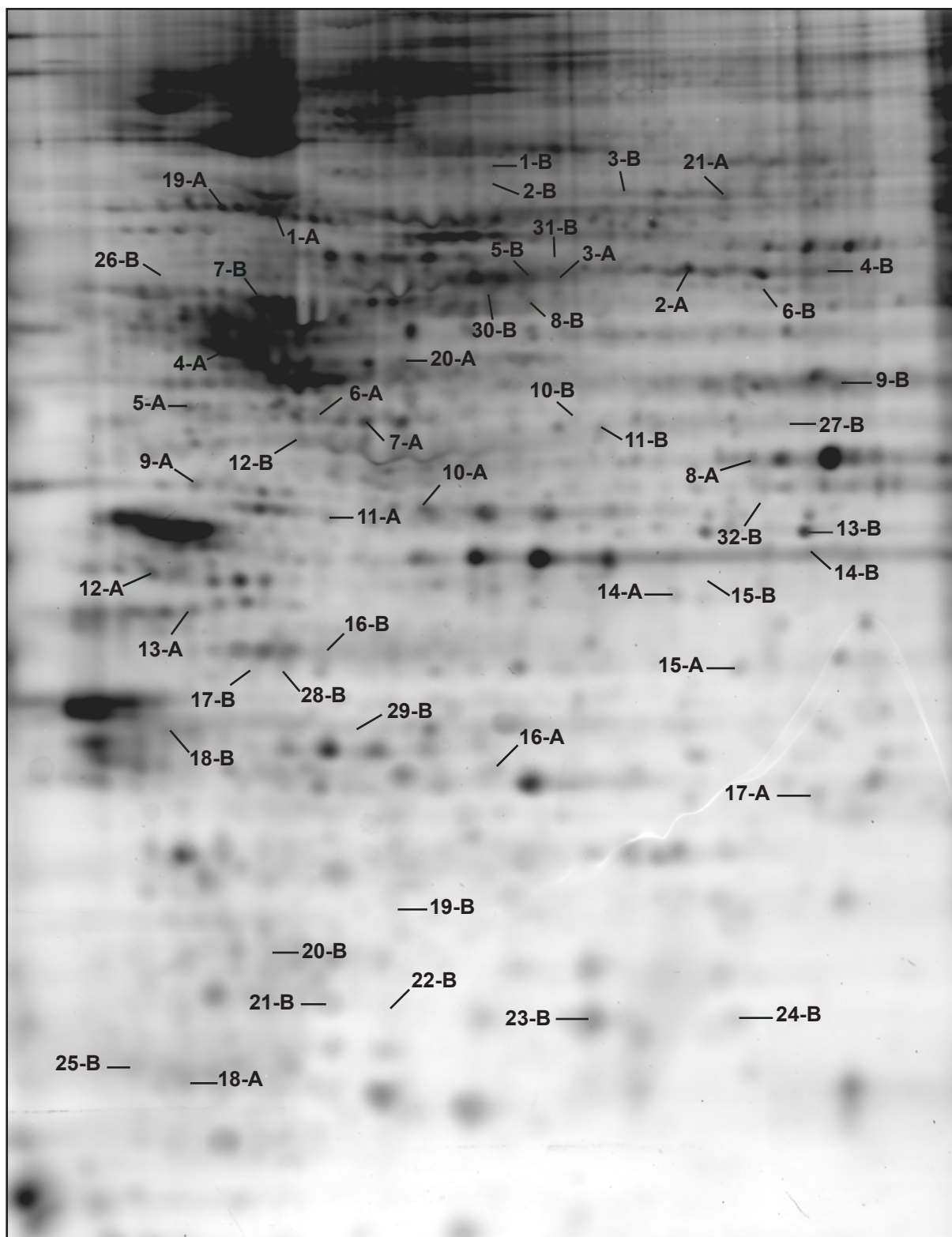


Figure 46 : Localisation des spots d'intérêt sur un gel synthétique. 4 gels d'électrophorèse issus d'échantillons contrôles sont comparés à 4 gels issus d'échantillons traités grâce au logiciel Image Master 2D Platinum. Le test de Student permet de détecter les spots dont l'intensité de coloration est modulée suite à un traitement chronique par la morphine (21 spots-A) ou suite à un traitement chronique suivi d'un sevrage (32 spots-B). Les spots d'intérêt sont soumis à une identification par spectrométrie de masse.

ces protéines retourne ensuite au niveau du contrôle après 10 min de traitement (Bilecki et al., 2005).

Le traitement chronique est quant à lui réalisé avec 1 μ M de morphine pendant 24h. Le sevrage des cellules s'effectue en présence de 1 μ M de naloxone et 5 μ M de forskoline après ce même traitement chronique. Dans ces conditions, l'activité de l'AC révélée par l'accumulation d'AMPC est trois fois supérieure pour des cellules chroniquement traitées à la morphine par rapport à des cellules non traitées (comparer les colonnes 2 et 3 de la figure 37). Ainsi, il est possible qu'un tel traitement potentialise la phosphorylation des protéines en particulier les cibles moléculaires de la PKA.

Chacun de ces trois traitements est réalisé parallèlement à un contrôle et répété quatre fois afin de détecter des modifications significatives (Molloy et al., 2003). Après révélation des phosphoprotéines au Pro-Q Diamond, les spots dont le volume varie de façon significative d'après le test de Student ($p < 0,05$) sont sélectionnés pour une identification par spectrométrie de masse. Les spots d'intérêt sont découpés manuellement sur un gel coloré au bleu de coomassie colloïdal. Ces spots colorés au bleu de coomassie colloïdal sont repérés après une superposition numérique grâce au logiciel Image Master 2D des gels colorés au Pro-Q Diamond et au bleu de coomassie colloïdal.

b) Première expérience : traitement chronique de 24h à 1 μ M de morphine

La figure 45 illustre le profil des phosphoprotéines révélées au Pro-Q Diamond après un traitement chronique à la morphine. Un tel traitement module de façon significative l'intensité de coloration au Pro-Q Diamond de 21 spots (voir figure 46). Parmi ces 21 protéines, l'abondance de 15 d'entre elles augmente dans des proportions allant de 121 % à 170 % tandis que l'abondance de 6 d'entre elles diminue dans des proportions allant de 57 % à 78 %. 18 protéines sur les 21 ont été identifiées (voir tableau 8) par spectrométrie de masse MALDI- TOF et / ou par ESI-MS / MS. Seul le spot 7-A contient un mélange de deux protéines : la β actine et la protéine nudC. Les deux protéines étant connues comme des substrats de phosphorylation d'après la banque de données Swiss-Prot (voir tableau 10), il n'est pas possible de conclure quant à la nature de la véritable protéine modulée par la morphine.

c) Deuxième expérience : traitement chronique à la morphine puis sevrage

Un traitement chronique de 24h à la morphine suivi d'un sevrage en présence de naloxone et de forskoline module de façon significative l'intensité de coloration au Pro-Q Diamond de 32 spots (voir figure 46). Parmi ces 32 protéines, l'abondance de 6 d'entre elles diminue dans des

Tableau 8 : Spots dont l'intensité de coloration au Pro-Q Diamond varie après un traitement de 24h à la morphine des cellules SH-SY5Y. Les critères d'identification sont indiqués dans le chapitre « matériels et méthodes ». (a) numéro principal d'accension Swiss-Prot, (b) seuls les peptides significatifs ($p < 0,05$) selon le logiciel Mascot sont considérés, MW (masse moléculaire), * masse moléculaire de l'isoforme lourde de la dihydropyrimidinase-related protein 3.

Spot	Protéine	Accession # (a)	MW (Da)	Variation (% du contrôle)	MALDI peptides	MALDI % de couverture	MS/MS peptides (b)
1-A	Heat shock cognate 71	P11142	71082	68			11
2-A	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Q14195	61963	121			4
3-A	Hsp60	Q38L19	61346	57			5
4-A	Tubulin beta 2 chain	P07437	50095	156	20	44	
5-A	Pas d'identification			149			
6-A	Thioredoxin domain-containing protein 4 precursor	Q9BS26	47341	122	7	19	
7-A	Beta-actin	P60709	42052	138			5
	nudC	Q9Y266	38276				6
8-A	DnaJ homolog subfamily B member 11	Q9UBS4	40774	78	7	23	
9-A	Arsenical pump-driving ATPase	O43681	39224	130	8	29	
10-A	Thioredoxin-like protein	O76003	37693	137	8	31	
11-A	Pas d'identification			149			
12-A	Small glutamine-rich tetrapeptide repeat-containing protein A	O43765	34270	145	8	29	
13-A	ubiquitin thiolesterase protein OTUB1	Q96FW1	31493	137	10	47	
14-A	Pas d'identification			151			
15-A	Nuclear protein Hcc-1	P82979	23582	78			5
16-A	Phosphoserine phosphatase	P78330	25163	134			6
17-A	5'(3')-deoxyribonucleotidase	Q8TCD5	23596	75	7	38	
18-A	MIR-interacting saposin-like precursor	Q9Y2B0	20981	132	12	70	
19-A	Heat shock cognate 71	P11142	71082	74	15	31	
20-A	SH3-containing GRB2-like protein 1	Q99961	41692	147			2
21-A	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Q14195	74320*	170			9

proportions allant de 46 % à 84 % tandis que l'abondance de 19 d'entre elles augmente dans des proportions allant de 116 % à 285 % (voir tableau 9). Il est à noter qu'un sevrage des cellules SH-SY5Y module l'abondance d'un plus grand nombre de phosphoprotéines et dans de plus grandes proportions que lors d'un traitement chronique. Ce résultat est en accord avec le fait qu'un sevrage entraîne de plus amples perturbations moléculaires au sein d'une cellule par rapport à un traitement chronique (McClung et al., 2005). Bien que la variation du spot 30-B de 116 % soit faible et donc difficilement interprétable d'un point de vue fonctionnel, nous avons procédé à son identification. Ainsi sur les 32 spots d'intérêt, 21 ont été identifiés par spectrométrie de masse (voir tableau 9).

Les spots 7-B, 12-B, 13-B, 18-B et 30-B sont constitués d'un mélange de protéines. Cependant le spot 30-B est constitué de deux sous-unités thêta et epsilon de la T-complex protein 1, seule la première est un substrat de phosphorylation d'après la banque de données Swiss-Prot suggérant que la protéine réellement modifiée par la morphine est la sous-unité thêta (voir tableau 11). De même le spot 12-B est constitué de deux sous-unités d'actine bêta et gamma, seule la première est un substrat de phosphorylation d'après la banque de données Swiss-Prot suggérant que la protéine réellement modifiée par la morphine est l'actine de type bêta (voir tableau 11). Cette même actine bêta est retrouvée dans le spot 10-B mais variant dans le sens inverse. Il est donc possible que cette dichotomie soit le fait d'une variation du degré de phosphorylation de l'actine bêta sous l'effet de la morphine ce qui a déjà été montré au cours d'une autre étude (Kim et al., 2005). Le spot 18-B est aussi un mélange de deux isoformes de la même protéine : 14-3-3 gamma et thêta toutes deux des substrats de phosphorylation (voir tableau 11). Encore une fois, les travaux de Kim *et al* suggèrent qu'un traitement morphinique induit la phosphorylation de ces deux protéines (Kim et al., 2005).

La comparaison des tableaux 8 et 9 montre que seules deux protéines, la tubuline bêta 2 (spots 4-A et 7-B) et l'actine bêta (spots 7-A, 10-B et 12-B), sont identifiées à la suite de la première et de la deuxième expérience.

d) Troisième expérience : traitement aigu de 5 min à 1 μ M de morphine

Un traitement aigu à la morphine module de façon significative l'intensité de coloration au Pro-Q Diamond de 32 spots (résultats non présentés). A l'heure actuelle, ces spots n'ont pas été identifiés mais aucun d'entre eux ne correspond à des spots d'intérêt préalablement détectés lors des deux précédents traitements. Cela suggère que les modulations détectées lors d'un traitement chronique sont spécifiques d'un effet à long terme de la drogue sur les cellules SH-SY5Y. Il est à noter sur les 32 spots d'intérêt détectés, l'abondance de 30 d'entre eux (soit 94 %) diminue après un

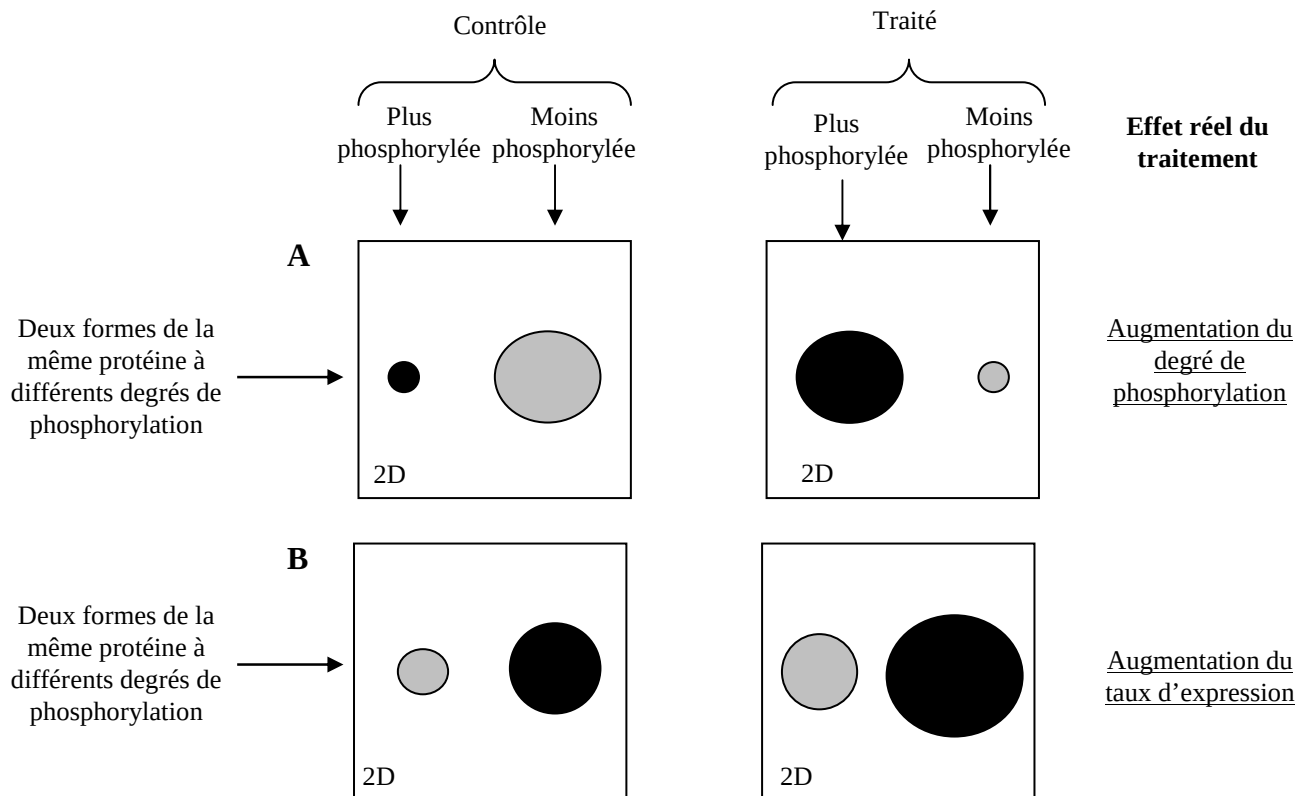


Figure 47: Schéma illustrant la difficulté d'interprétation des données d'intensité de coloration. Dans le premier cas (A), l'expérimentateur détecte (gris) une diminution de l'intensité de coloration au Pro-Q Diamond qui correspond en réalité à une augmentation du degré de phosphorylation d'une protéine lors du traitement. Dans le second cas (B), l'expérimentateur détecte (gris) une augmentation de l'intensité de coloration qui correspond en réalité à une augmentation du taux d'expression de la protéine. En noir (variation non détectée ou faux négatif), en gris (variation détectée).

traitement aigu à la morphine. L'identification de ces spots n'ayant pas encore été réalisée, il est encore trop tôt pour interpréter un tel résultat.

3- Discussion

a) Interprétation du sens de variation de l'intensité des spots après un traitement

La question qui se pose est de savoir comment interpréter une augmentation ou une diminution de l'abondance d'un spot après coloration au Pro-Q Diamond.

D'abord, une modification ne signifie pas forcément que le degré de phosphorylation de la protéine identifiée a été modifié. En effet, il est possible que la modulation observée soit uniquement le fait d'une variation de l'expression de la protéine constitutivement phosphorylée dans les cellules SH-SY5Y.

Ensuite, si l'intensité d'un spot diminue cela ne signifie pas forcément que la protéine identifiée a été déphosphorylée. En effet, il est possible qu'un autre spot correspondant à la même protéine augmente parallèlement sans avoir été détecté par le test statistique. Ainsi, une diminution de l'intensité d'un spot peut refléter également l'augmentation de l'abondance d'une autre forme de la protéine et donc une augmentation du degré de phosphorylation (voir figure 47-A). Le raisonnement réciproque peut également être réalisé. La figure 47-B, quant à elle, représente une situation où la détection d'une augmentation de l'intensité d'un spot révélé au Pro-Q Diamond correspond à une augmentation du taux d'expression de la protéine. Afin de mettre en évidence une variation du degré de phosphorylation d'une protéine il est nécessaire de réaliser des travaux supplémentaires combinant par exemple l'immunoprécipitation et le western blot. Pour l'ensemble de ces raisons, il est difficile d'interpréter le sens de variation des protéines identifiées.

b) Validation de la stratégie de protéomique différentielle mise en œuvre

i) *Comparaison avec les précédents travaux*

A l'heure actuelle seuls les travaux de Kim *et al* (Kim et al., 2005) ont cherché à identifier de façon globale les modifications générées par la morphine sur le phosphoprotéome. Plus précisément, ces travaux ont porté sur les phosphorylations induites sur les tyrosines au niveau des protéines du cortex frontal de rats rendus physiquement dépendants à la morphine.

En ce qui concerne nos travaux, la comparaison des profils contrôle *versus* traitement (voir figure 45) montre qu'un traitement chronique à la morphine n'induit pas de modifications majeures au niveau des phosphoprotéines révélées par le Pro-Q Diamond dans les conditions mises en œuvre.

Ce résultat est en contradiction avec les travaux de Kim *et al* qui montrent au contraire qu'un traitement chronique à la morphine conduit à l'apparition de nombreuses protéines phosphorylées (révélées par un western blot anti-phosphotyrosine) dans le cortex frontal de rat. Plusieurs explications peuvent rendre compte de cette contradiction. La première provient du matériel biologique étudié : cerveau *versus* cellules en culture. Il est possible qu'au sein d'un système intégré comme le cerveau, la morphine conduise à des adaptations moléculaires, parfois indirectes, plus importantes que dans un modèle cellulaire. Une seconde explication serait que la combinaison électrophorèse bidimensionnelle puis coloration au Pro-Q Diamond révèle en majorité les protéines les plus abondantes, probablement les moins susceptibles d'être la cible d'un traitement à la morphine.

En ce qui concerne la nature des protéines, nos travaux ont identifié cinq protéines identiques ou très proches (isoformes) de celles publiées par Kim *et al* : l'actine, les protéines 14-3-3 gamma et thêta, la dihydropyrimidinase related protein, la tubuline et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Cette similitude suggère que certaines adaptations moléculaires à la morphine au niveau du phosphoprotéome de cerveau peuvent être reproduites dans les cellules SH-SY5Y et identifiées par la stratégie que nous avons mise en œuvre. Par conséquent, il est possible que les nouvelles adaptations que nous avons décrites existent dans des régions du cerveau impliquées dans la dépendance à la morphine. Les autres protéines que nous avons identifiées n'ont jamais été décrites en tant que cibles phosphorylées suite à un traitement par la morphine.

ii) *Les protéines identifiées sont-elles phosphorylées ?*

Afin de répondre à cette question, l'interrogation des banques de données protéiques a été réalisée en incluant la phosphorylation comme une modification variable. Cette interrogation n'a pas permis d'identifier des peptides phosphorylés. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'un faible rendement d'ionisation et les effets de suppression (voir paragraphe IV-B-3-a-ii page 81) rendent les phosphopeptides difficilement détectables par des approches classiques de spectrométrie de masse (Raggiaschi *et al.*, 2005; Reinders et Sickmann, 2005).

Par conséquent, nous avons cherché à savoir dans un second temps si les protéines identifiées étaient des substrats de protéines kinases. Pour cela, nous nous sommes appuyés d'abord sur les informations fournies par Swiss-Prot, puis celles de la littérature. En cas de recherche infructueuse, des sites consensus de phosphorylation ont été recherchés sur la séquence des protéines par l'intermédiaire du serveur NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) (voir tableaux 10 et 11). Cette recherche montre que les deux tiers (26 / 39) des protéines identifiées sont des substrats phosphorylables d'après la base de données Swiss-Prot et / ou la littérature. En ce

Tableau 9 (1^{ère} partie) : Spots dont l'intensité de coloration au Pro-Q Diamond varie après un traitement de 24h à la morphine suivi d'un sevrage des cellules SH-SY5Y. Les critères d'identification sont indiqués dans le chapitre « matériels et méthodes ». (a) numéro principal d'accension Swiss-Prot, (b) seuls les peptides significatifs ($p < 0,05$) selon le logiciel Mascot sont considérés, MW (masse moléculaire).

Spot	Protéine	Accession # (a)	MW (Da)	Variation (% du contrôle)	MALDI peptides	MALDI % de couverture	MS/MS peptides (b)
1-B	Pas d'identification			70			
2-B	Pas d'identification			84			
3-B	Stress-70 protein	P38646	73920	148			7
4-B	Pas d'identification			287			
5-B	T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	60089	71			5
6-B	Pas d'identification			125			
7-B	vimentin	P08670	53545	127	40	72	
	tubulin beta-2	P07437	50095		17	36	
8-B	protein disulfide-isomerase A3	P30101	57146	71	20	43	
9-B	Proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	43970	150			5
10-B	beta actine	P60709	42052	70			3
11-B	Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier	Q705K4	51492	164			3
12-B	actine beta	P60709	42052	132	18	39	
	actine gamma	P63261	42108		16	34	
13-B	Transaldolase	P37837	37688	142			10
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	36070				2
14-B	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	36070	215			2
15-B	Pas d'identification			139			
16-B	Pas d'identification			46			
17-B	Tubulin-specific chaperone B	Q99426	27594	194			3
18-B	14-3-3 gamma	P61981	28325	73			10
	14-3-3 theta	P27348	28032				4
19-B	Peroxiredoxin-2	P32119	21918	225			3
20-B	Pas d'identification			285			
21-B	RM12=39S ribosomal protein L12	P52815	21563	58			3
22-B	Pas d'identification			76			

Tableau 9 (suite).

Spot	Protéine	Accession # (a)	MW (Da)	Variation (% du contrôle)	MALDI peptides	MALDI % de couverture	MS/MS peptides (b)
23-B	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	P33316	26975	78	9	42	
24-B	ADP-ribosylation factor 4	P18085	20481	80			2
25-B	Pas d'identification			161			
26-B	Pas d'identification			147			
27-B	Beta-centractin	P42025	42381	211			4
28-B	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q15691	30020	128	10	53	
29-B	Tumor protein D54	O43399	24896	82			3
30-B	T-complex protein 1 subunit theta (τ) et epsilon (ϵ)	P50990 (τ) P48643 (ϵ)	60022 60089	116			6 5
31-B	Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein K	P61978	51230	75			8
32-B	Pas d'identification			153			

qui concerne les 13 autres protéines, NetPhosK 1.0 prédit plusieurs sites de phosphorylation, celui possédant le meilleur score étant indiqué dans les tableaux 10 et 11.

c) Fonction des protéines identifiées

Nous avons classé les protéines selon leur fonction cellulaire annotée dans la base de données Swiss-Prot (voir tableau 10 et 11). Parmi elles, la bêta centractine (27-B) et la tubuline spécifique chaperonne B (17-B) ont été classées à la fois dans deux catégories. L'arsenical pump-driving ATPase (9-A) et la Tumor protein D54 (29-B) n'ont pas été classées. Le rôle que pourrait jouer certaines de ces fonctions cellulaires dans les effets de la morphine est discuté ci après :

- **classe P** : protéines participant d'une façon ou d'une autre à la modification des protéines (repliement, oxydation / réduction, dégradation, etc.)

17 protéines sur les 39 identifiées ont été classées dans cette catégorie (1-A, 3-A, 6-A, 8-A, 10-A, 12-A, 13-A, 19-A, 3-B, 5-B, 8-B, 17-B, 19-B, 21-B, 24-B, 30-B, 31-B). Un traitement chronique à la morphine module en particulier des protéines chaperonnes comme Hsc 71 (1-A et 19-A), Hsp 60 (3-A) ou la Small glutamine-rich tetracopeptide repeat-containing protein A (12-A). Cet effet de la morphine sur de nombreuses protéines chaperonnes comme les « heat shock » est en accord avec des travaux issus de la génomique réalisés sur des régions du cerveau (Ammon et al., 2003). Les sens de variation de ces chaperonnes sont parfois opposés, cependant un tel résultat est difficile à interpréter à ce stade pour deux raisons : i) comme expliqué dans le paragraphe II-C-3-a (page 125) une variation dans un sens peut correspondre aussi bien à une phosphorylation, déphosphorylation ou différence d'expression de la protéine (voir figure 47) ii) la phosphorylation est une modification post-traductionnelle pouvant aussi bien augmenter que diminuer l'activité d'une protéine en fonction de la nature de celle-ci.

Après un sevrage, des chaperonnes ont été également retrouvées, Stress-70 protein (3-B), T-complex protein 1 (5-B) etc., mais ne sont pas les mêmes que celles identifiées suite au traitement chronique. Il n'est pas possible de savoir si ces changements sont dus aux nouveaux effets induits par le sevrage ou s'ils étaient présents mais n'ont pas été détectés dans l'expérience précédente (faux négatifs).

Tableau 10 : Informations concernant la phosphorylation et la fonction cellulaire des protéines identifiées suite à un traitement chronique à la morphine. Pour chaque protéine identifiée, il est indiqué si elle possède un site de phosphorylation selon la base de données Swiss-Prot ou la littérature. Si la recherche est infructueuse, la séquence protéique a été soumise à NetPhosK 1.0. Dans ce cas, il est indiqué le site de phosphorylation le plus probable sur la séquence protéique (acide aminé, protéine kinase correspondante, score (maximum = 1)). (a) pour la signification des classes P, C, M, V, T, se reporter au texte. (b) la description des fonctions est basée sur les annotations de la banque de données Swiss-Prot, S (sérine), T (thréonine), PKA (Protein Kinase A), PKB (Protein Kinase B), PKC (Protein Kinase C).

Spot	Protéine	Phosphorylation	classe (a)	fonction (b)
1-A	Heat shock cognate 71	Swiss-Prot	P	Chaperonne
2-A	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Swiss-Prot	V	Régulerait la fonction vésiculaire dans le cone de croissance axonal
3-A	Hsp60	Asquith KL <i>et al</i> , J Cell Sci 2004 117 (Pt 16) :3645-57	P	Chaperonne
4-A	Tubulin beta 2 chain	Swiss-Prot	C	Constituant majeur des microtubules
6-A	Thioredoxin domain-containing protein 4 precursor	S15 PKA 0,85	P	Contrôle le repliement oxydatif des protéines dans le reticulum endoplasmique
7-A	Beta-actin nudC	Swiss-Prot Swiss-Prot	C	Constituant des microfilaments Intervient dans la génèse et la migration neuronale
8-A	DnaJ homolog subfamily B member 11	S132 PKA 0,8	P	Co-chaperonne du reticulum endoplasmique
9-A	Arsenical pump-driving ATPase	S67 PKA 0,7	?	Catalyse le transport d'arsenite de façon dépendante de l'ATP
10-A	Thioredoxin-like protein 2	T243 PKC 0,84	P	Interviendrait dans la régulation fonctionnelle du système thioredoxine
12-A	Small glutamine-rich tetrapeptide repeat-containing protein A	Swiss-Prot	P	Co-chaperonne qui interagit avec HSC70 et HSP70 et régule leur activité ATPase
13-A	ubiquitin thiolesterase protein OTUB1	Juris SJ <i>et al</i> , FEBS Lett. 2006 580(1):179-83.	P	Hydrolase qui coupe <i>in vitro</i> la liaison entre l'ubiquitine et une protéine et jouerait donc un rôle important dans le turnover des protéines en inhibant leur dégradation
15-A	Nuclear protein Hcc-1	Swiss-Prot	T	Interviendrait dans le contrôle de la transcription
16-A	Phosphoserine phosphatase	Swiss-Prot	M	Catalyse la dernière étape de la biosynthèse de sérine
17-A	5'(3')-deoxyribonucleotidase	S182 PKB 0,82	M	Déphosphoryle les phosphates en 5' et 3' des désoxyribonucléotides
18-A	MIR-interacting saposin-like precursor	S55 PKC 0,9	C	Régulateur positif de la croissance des neurites
19-A	Heat shock cognate 71	Swiss-Prot	P	Chaperonne
20-A	SH3-containing GRB2-like protein 1	T43 PKC 0,88	V	Interviendrait dans le recyclage des vésicules synaptiques
21-A	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Swiss-Prot	V	Régulerait la fonction vésiculaire dans le cone de croissance axonal

- **classe C** : protéines associées au cytosquelette
 9 protéines sur les 39 identifiées ont été classées dans cette catégorie (4-A, 7-A, 18-A, 7-B, 10-B, 12-B, 17-B, 27-B et 28-B). La phosphorylation de l'actine et de la tubuline pourrait être impliquée dans la dynamique des microfilaments et des microtubules cellulaires (Kim et al., 2005). Il est donc possible que ces modifications ainsi que celles des autres protéines du cytosquelette participent aux changements de morphologie cellulaire associés à un traitement morphinique. En ce qui concerne le sens de variation et les différences d'identités des protéines retrouvées après un traitement chronique suivi ou non d'un sevrage, les mêmes remarques que celles du paragraphe précédent peuvent être formulées.

- **classe M** : protéines du métabolisme
 6 protéines sur les 39 identifiées ont été classées dans cette catégorie (16-A, 17-A, 11-B, 13-B, 14-B et 23-B). L'administration de drogue induit des modifications au niveau du métabolisme cellulaire. Par exemple certaines régions du cerveau augmentent leur consommation en glucose suite à une prise de drogue (Samaha et Robinson, 2005). Des adaptations similaires peuvent être suggérées au niveau des voies métaboliques dans lesquelles ces 6 protéines interviennent.

- **classe V** : protéines impliquées dans le trafic vésiculaire
 4 protéines sur les 39 identifiées ont été classées dans cette catégorie (2-A, 20-A, 21-A et 27-B). Ces protéines pourraient être impliquées dans les modifications induites par la morphine au niveau du trafic vésiculaire comme la libération présynaptique de neurotransmetteurs.

- **classe S** : protéine de signalisation
 Seule la protéine adaptatrice 14-3-3 a été classée dans cette catégorie (18-B). Les travaux de Garzon *et al* ont montré que lors d'un traitement à la morphine, la protéine RGS9-2 interagit avec la protéine 14-3-3 dans la PAG (Garzon et al., 2005). Une modification de l'état de phosphorylation de cette protéine pourrait être impliquée dans cette interaction ou dans d'autres encore inconnues.

- **classe D** : protéine impliquée dans le cycle, la croissance cellulaire
 Une seule protéine sur les 39 identifiées a été classée dans cette catégorie : la Prolifération-associated protein 2G4 (9-B).

➤ **classe T** : protéine impliquée dans la transcription

Une seule protéine sur les 39 identifiées a été classée dans cette catégorie : la nuclear protein Hcc-1 (15-A).

d) Comparaison des résultats avec ceux issus de l'analyse du protéome total

Sur les 53 spots d'intérêt détectés au Pro-Q Diamond, 39 ont été identifiés soit 73 %. L'analyse différentielle réalisée après coloration des protéines au bleu de coomassie colloïdal a été suivie par l'identification de 52 spots sur les 55 spots d'intérêt détectés soit 94 % de réussite. Cette différence de réussite (73 % contre 94 %) peut s'expliquer par une faible abondance de certaines phosphoprotéines au sein du protéome et par conséquent une plus grande difficulté pour les identifier sans ambiguïté.

4 protéines ont été identifiées à la fois au cours de l'analyse du protéome total et du phosphoprotéome après un traitement chronique à la morphine : la Heat Shock Cognate 71 (spot 8, 1-A et 19-A), l'arsenical pump-driving ATPase (spot 37 et 9-A), la nuclear protein Hcc-1 (spot 47 et 15-A), la dihydropyrimidinase related protein 3 ou DRP-3 (spot 13, 2-A et 21-A). 2 isoformes de cette dernière protéine (une forme légère 2-A et une forme lourde 21-A) ont été détectées. Le spot 13 dont l'intensité diminue après 72h de traitement morphinique lors de l'analyse du protéome total correspond à une forme moins acide de l'isoforme légère (2-A) dont l'intensité augmente. Même si le temps de traitement à la morphine n'est pas le même (72h *versus* 24h), ce décalage de point isoélectrique suggère que le degré de phosphorylation de DRP-3 augmente après un traitement chronique par la drogue.

Le raisonnement inverse peut être réalisé pour la protéine Hsc 71. En effet, le spot 8 dont l'intensité augmente après 72h de traitement morphinique lors de l'analyse du protéome total correspond à une forme moins acide que les spots 1-A et 19-A dont les intensités diminuent. Même si encore une fois le temps de traitement à la morphine n'est pas le même (72h *versus* 24h), ce shift suggère que le degré de phosphorylation de Hsc 71 diminue après un traitement chronique par la drogue.

En ce qui concerne les deux autres protéines communes identifiées, aucun décalage du point isoélectrique n'est observé entre le spot détecté au bleu de coomassie colloïdal et au Pro-Q Diamond. De plus les intensités de coloration au bleu de coomassie colloïdal et au Pro-Q Diamond varient dans le même sens : augmentation pour l'arsenical pump-driving ATPase (spot 37 et 9-A) et diminution pour la nuclear protein Hcc-1 (spot 47 et 15-A). Ces résultats suggèrent pour ces

Tableau 11 (1^{ère} partie): Informations concernant la phosphorylation et la fonction cellulaire des protéines identifiées suite à un traitement chronique à la morphine suivi d'un sevrage. Pour chaque protéine identifiée, il est indiqué si elle possède un site de phosphorylation selon la base de données Swiss-Prot ou la littérature. Si la recherche est infructueuse, la séquence protéique a été soumise à NetPhosK 1.0. Dans ce cas, il est indiqué le site de phosphorylation le plus probable sur la séquence protéique (acide aminé, protéine kinase correspondante, score (maximum = 1)). (a) pour la signification des classes P, C, M, V, S, D, se reporter au texte. (b) la description des fonctions est basée sur les annotations de la banque de données Swiss-Prot, S (sérine), T (thréonine), PKA (Protein Kinase A), PKC (Protein Kinase C).

Spot	Protéine	Phosphorylation	classe (a)	fonction (b)
3-B	Stress-70 protein	Bhat GJ <i>et al</i> , J Biol Chem. 2004 279(47):48915-22.	P	Probable chaperonne
5-B	T-complex protein 1 subunit epsilon	T366 PKC 0,9	P	Chaperonne
7-B	vimentin tubulin beta-2	Swiss-Prot Swiss-Prot	C	Filaments intermédiaires de classe III Constituants des microtubules
8-B	protein disulfide-isomerase A3	Sakai J <i>et al</i> , Proteomics. 2003 3(7):1318-24.	P	Catalyse le réarrangement des ponts disulfures des protéines
9-B	Prolifération-associated protein 2G4	Swiss-Prot	D	Interviendrait dans la régulation de la croissance cellulaire et dans la signalisation du récepteur tyrosine-kinase ERBB3
10-B	beta actine	Swiss-Prot	C	Constituant des microfilaments
11-B	Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier	T47 PKC 0,77	M	Transporteur mitochondrial de glutamate et d'aspartate dépendant du calcium
12-B	actine beta actine gamma	Swiss-Prot (beta) Swiss-Prot	C	Constituant des microfilaments
13-B	Transaldolase Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Swiss-Prot Swiss-Prot	M	Impliquée dans la voie des pentoses phosphates Enzyme de la glycolyse
14-B	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Swiss-Prot	M	Enzyme de la glycolyse
17-B	Tubulin-specific chaperone B	Swiss-Prot	C/P	Interagit avec des intermédiaires de repliement de la tubuline alpha
18-B	14-3-3 gamma 14-3-3 theta	Swiss-Prot (gamma) Van Der Hoeven PC <i>et al</i> , Biochem J. 2000 345 Pt 2:297-306.	S	Protéine adaptatrice impliquée dans de nombreuses voies de signalisation
19-B	Peroxiredoxin-2	S111 PKA 0,78	P	Jouerait un rôle important dans l'élimination des peroxydes générés par le métabolisme

Tableau 11 (suite).

Spot	Protéine	Phosphorylation	classe (a)	fonction (b)
21-B	RM12=39S ribosomal protein L12	S40 PKC 0,86	P	Constituant des ribosomes
23-B	Deoxyuridine 5'- triphosphate nucleotidohydrolase	Swiss-Prot	M	Impliqué dans le métabolisme des nucléotides
24-B	ADP-ribosylation factor 4	S146 PKC 0,81	P	Protéine liant le GTP et activatrice de la toxine cholérique. Interviendrait dans le trafic de protéines au niveau de l'appareil de Golgi
27-B	Beta-centractin	T70 PKC 0,87	C/V	Sous-unité d'un complexe intervenant dans la mobilité <i>via</i> les microtubules de vésicules cellulaires
28-B	Microtubule- associated protein RP/EB family member 1	Swiss-Prot	C	Interviendrait dans la polymérisation des microtubules
29-B	Tumor protein D54	Swiss-Prot	?	?
30-B	T-complex protein 1 subunit theta (τ) et epsilon (ϵ)	Swiss-Prot (τ)	P	Chaperonne
31-B	Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein K	Swiss-Prot	P	Une des principales protéines liant les ARN pré messagers, interviendrait dans le métabolisme de certains ARN

protéines que les variations d'intensité de coloration au ProQ-Diamond correspondent à des variations du taux d'expression de la protéine sous l'effet de la drogue.

4- Conclusion

La coloration au Pro-Q Diamond du phosphoprotéome des DRM après séparation par SDS-PAGE ne révélait qu'un nombre restreint de protéines par rapport à celui détecté au bleu de coomassie colloïdal. Au contraire, l'approche bidimensionnelle présentée dans ce chapitre a permis de détecter au moins autant de spots après coloration au Pro-Q Diamond qu'après coloration au bleu de coomassie colloïdal. Ce résultat reflète probablement le fait qu'une séparation bidimensionnelle est particulièrement utile pour séparer la fraction protéique phosphorylée de celle non phosphorylée afin de détecter ultérieurement le phosphoprotéome.

La stratégie de détection du phosphoprotéome mise en œuvre a permis de révéler un effet de la morphine sur une centaine de phosphoprotéines. L'interprétation fonctionnelle de ces données est compliquée d'abord puisqu'elles doivent être validées et précisées (modification de l'expression ou du degré de phosphorylation, intensité de la variation) et ensuite puisque ces protéines interviennent dans un grand nombre de fonctions cellulaires.

Enfin, il est à noter que l'extrapolation des données *in cellulo* vers l'animal est délicate. Cependant, le fait que cinq protéines identifiées ont déjà été décrites comme étant modulées par la morphine chez le rat suggère la validité de notre modèle cellulaire pour étudier les effets de la drogue. Le même constat avait déjà été établi suite à l'étude des effets de la morphine sur le protéome total des cellules SH-SY5Y (voir paragraphe I-C page 113). Ainsi, les résultats présentés dans ce chapitre fournissent une base de travail pour l'étude des modifications moléculaires induites par la morphine dans le cerveau de rongeurs.

. Conclusion et perspectives

A. Conclusion

L'objectif de mon projet de thèse était d'identifier des adaptations moléculaires induites par un traitement à la morphine dans des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y surexprimant le récepteur MOP. Pour cela une approche globale de type protéomique différentielle combinant la séparation des protéines par électrophorèse, la révélation spécifique du protéome et du phosphoprotéome, l'analyse d'image et enfin l'identification des protéines par spectrométrie de masse a été mise en œuvre.

1- Analyse différentielle du protéome après coloration au bleu de coomassie colloïdal

Dans un premier temps, l'analyse différentielle a été réalisée au niveau d'un sous protéome membranaire enrichi en protéines de signalisation : les DRM. Cette étude a permis de montrer qu'un traitement chronique à la morphine des cellules SH-SY5Y conduit à une downrégulation des protéines $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\beta_1$, $G\beta_2$ et prohibitine dans les DRM. La downrégulation des protéines G dans les DRM reflète leur diminution globale au sein du protéome des cellules SH-SY5Y après un traitement chronique à la morphine. D'un point de vue fonctionnel, nous avons établi qu'il existe une étroite corrélation entre la downrégulation de la protéine $G\beta$ et la sensibilisation de l'AC, phénomène impliqué dans les effets à long terme de la morphine chez l'animal. De plus, la downrégulation de la protéine $G\beta$ est associée à celle de la protéine $G\gamma_2$. Nous avons montré que la diminution de l'abondance du dimère $G\beta\gamma_2$ après un traitement chronique à la morphine résulte de sa dégradation par le protéasome. Ainsi, nous avons proposé un nouveau mécanisme moléculaire impliqué dans le phénomène de sensibilisation de l'AC dans lequel la dégradation du dimère $G\beta\gamma_2$ par le protéasome conduirait à une levée de l'inhibition tonique de l'AC. Un mécanisme de régulation de l'activité de l'AC par une inhibition tonique des protéines G a d'ailleurs déjà été mis en évidence dans d'autres contextes biologiques (Pineda et al., 2004; Rau et al., 2003).

Au delà de ce mécanisme moléculaire, nos travaux suggèrent pour la première fois que la voie de dégradation du protéasome est impliquée dans les adaptations moléculaires à un traitement chronique à la morphine. Bien que nouveau dans ce contexte, l'implication du protéasome dans la dépendance aux drogues est appuyée par de nombreux travaux montrant que la voie ubiquitine protéasome joue un rôle essentiel dans la plasticité synaptique (Bingol et Schuman, 2006; DiAntonio et Hicke, 2004; Ehlers, 2003; Yi et Ehlers, 2005).

Dans un second temps nous avons cherché à identifier des adaptations moléculaires à un traitement chronique à la morphine au sein de l'ensemble du protéome des cellules SH-SY5Y.

Ainsi, nous avons procédé à la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle. Cette analyse à plus grande échelle a permis d'identifier des protéines du métabolisme, de signalisation, du cytosquelette, de la régulation transcriptionnelle / traductionnelle ou encore du trafic vésiculaire qui pourraient être impliquées dans les adaptations cellulaires à la morphine. Ces adaptations restent encore à valider par western blot au sein des cellules SH-SY5Y mais également dans des régions du cerveau impliquées dans la dépendance.

Il est important de noter que nous avons été confrontés à la difficulté d'interpréter ces derniers résultats d'un point de vue fonctionnel. Il s'agit là d'un problème courant et commun aux études à grandes échelles telles que la protéomique ou la génomique. En ce qui concerne les données issues de cette deuxième partie de mon travail de thèse, il est d'abord apparu difficile d'extrapoler des modifications moléculaires observées au niveau d'un modèle cellulaire à des phénomènes décrits *in vivo*. L'interprétation des résultats n'a pas été un inconvénient lors de l'analyse des DRM puisque ces microdomaines étant impliqués dans la signalisation, les modifications décrites pouvaient être plus facilement corrélées à des adaptations cellulaires à la drogue comme la sensibilisation de l'AC. Ensuite à la vue de nos résultats, il ressort que les protéines affectées par un traitement à la morphine dans les cellules SH-SY5Y varient dans des proportions relativement faibles. Il est alors plus difficile d'interpréter la signification et l'impact fonctionnel de tels changements même si de faibles variations peuvent avoir des conséquences au niveau cellulaire (la protéine G β diminue d'environ 30 %). Les résultats expérimentaux de ma thèse montrent l'intérêt du fractionnement cellulaire dans l'analyse protéomique. Limiter l'étude à un domaine (DRM) ou un compartiment fonctionnel (noyau mitochondrie etc.) permet de détecter des modifications moléculaires plus subtiles tout en appréhendant plus aisément le rôle de ces modifications.

2- Analyse du phosphoprotéome par coloration au Pro-Q Diamond

Dans la seconde partie de mon travail de thèse, j'ai initié une analyse différentielle du phosphoprotéome des cellules SH-SY5Y suite à un traitement à la morphine. Il s'agit ici d'une forme de fractionnement cellulaire puisque les phosphoprotéines ne représentent qu'une fraction du protéome total. Nous nous sommes de plus focalisés sur les protéines dont le point isoélectrique était compris entre 4 et 7.

Pour révéler spécifiquement les protéines phosphorylées, nous avons utilisé le colorant fluorescent Pro-Q Diamond. Nos résultats confirment que le Pro-Q Diamond est un outil efficace pour la détection spécifique des phosphoprotéines. Cependant, l'analyse différentielle du phosphoprotéome après un traitement à la morphine n'a pas permis de révéler d'importantes

variations du degré de phosphorylation des protéines. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de dire si ce résultat correspond à une réalité biologique ou à un problème d'ordre pratique. Malgré tout certaines protéines dont l'état de phosphorylation est connu pour être modulé par la morphine ont pu être identifiées (dihydropyrimidinase-related protein, protéine 14-3-3 etc.). Pour les autres protéines, la variation de leur niveau de phosphorylation après un traitement à la morphine devra être validée par des approches biochimiques combinant l'immunoprécipitation et le western blot.

B. Perspectives

1- In cellulo

Au niveau des cellules SH-SY5Y, des travaux sont en cours afin de décortiquer le mécanisme moléculaire conduisant à la dégradation du dimère $G\beta\gamma_2$ lors d'un traitement chronique à la morphine. Il s'agit dans un premier temps de mettre en évidence l'éventuelle ubiquitinylation de la protéine $G\gamma_2$ lors d'un traitement à la morphine, par exemple après immunoprécipitation de $G\gamma_2$ suivi d'un western blot anti-ubiquitine. Les premiers résultats obtenus par Lionel Moulédous semblent indiquer que la protéine $G\gamma_2$ est effectivement ubiquitinylée lors d'un traitement par la drogue. Ensuite, l'objectif est d'identifier l'ubiquitine ligase qui catalyse l'étape de liaison de l'ubiquitine à la protéine $G\gamma_2$. L'attention sera d'abord portée sur les ubiquitine ligases de la voie « N-end rule » puisqu'il a été montré que la protéine $G\gamma_2$ est un substrat de cette voie de dégradation (Hamilton et al., 2003). L'invalidation fonctionnelle de ces ubiquitine ligases peut être envisagée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (Baker et Varshavsky, 1991) ou par ARN interférence. Enfin, il s'agira de savoir si l'inhibition de l'ubiquitinylation de la protéine $G\gamma_2$ corrèle avec une diminution de l'intensité de la sensibilisation de l'AC révélée lors d'un sevrage.

La présence du récepteur MOP et de ses protéines G associées dans la fraction DRM est une indication du rôle potentiel de la micro-compartmentation membranaire dans l'organisation des voies de signalisation opioïde et la régulation de l'AC. Récemment, Zhao *et al* ont montré qu'un traitement chronique à la morphine de cellules de type HEK exprimant le récepteur MOP, suivi d'un traitement par un chélateur de cholestérol inhibe le phénomène de sensibilisation de l'AC lors du sevrage (Zhao et al., 2006). Selon les auteurs de ces travaux, la localisation du récepteur MOP dans les DRM est nécessaire à la révélation du phénomène de sensibilisation de l'AC. Ainsi à l'instar d'autres RCPG (Ostrom et Insel, 2004), la signalisation du récepteur MOP pourrait être confinée dans les DRM. De plus des travaux récents effectués dans l'équipe ont montré qu'une déplétion en cholestérol des cellules SH-SY5Y entraînait une sensibilisation de l'AC. Par conséquent, le confinement de l'AC dans les DRM pourrait être important pour sa régulation,

indépendamment du récepteur (Cooper, 2005). Ces mécanismes méritent également d'être étudiés plus précisément.

2- *In vivo*

La découverte que le protéasome est impliqué dans les adaptations moléculaires à un traitement chronique à la morphine dans les cellules SH-SY5Y ouvre un nouveau champ d'investigations sur la dépendance à la morphine jusqu'alors inexploré. Ainsi, une suite logique de mon travail de thèse consiste à étudier le rôle de la voie ubiquitine-protéasome dans les adaptations moléculaires et comportementales à la suite d'un traitement chronique à la morphine *in vivo*.

a) Rôle du protéasome dans les comportements associés à la dépendance à la morphine

Afin d'examiner le rôle éventuel du protéasome dans la dépendance à la morphine, il s'agit dans un premier temps d'établir si la dégradation de protéines par le protéasome est nécessaire à la formation ou à l'expression de comportements associés à la dépendance. Pour cela un inhibiteur spécifique et irréversible du protéasome comme la lactacystine pourra être injecté *in situ* dans des régions du cerveau impliquées dans la dépendance (VTA, noyau accumbens, cortex préfrontal etc.) préalablement à une administration de morphine ou à la précipitation d'un sevrage. La préférence de place conditionnée ainsi que l'intensité des symptômes somatiques du sevrage pourront alors être mesurées et comparées à des animaux contrôles.

Afin de cibler plus spécifiquement une voie de dégradation, les mêmes tests comportementaux pourront être mis en œuvre chez des souris transgéniques knock-out pour les gènes codant des ubiquitine ligases de la voie « N-end rule » (ex : UBR1 et UBR2). De telles lignées ont déjà été construites dans l'équipe d'Alexander Varshavski (Caltech).

b) Rôle du protéasome dans les adaptations moléculaires à la morphine

L'un des enjeux de la recherche sur la dépendance aux drogues est de déterminer les corrélats moléculaires de ses manifestations cellulaires et comportementales. Une combinaison d'approches de type protéomique différentielle et d'immunorévélations pourra être mise en œuvre dans des régions spécifiques du cerveau issues d'animaux naïfs ou traités à la morphine en présence ou non d'inhibiteurs de protéasome. Les substrats de la voie ubiquitine-protéasome pourraient être aussi purifiés par colonne d'affinité de type GST fusionnée à la protéine S5a, une sous-unité du protéasome possédant une forte affinité pour les protéines polyubiquitinylées (Ehlers, 2003).

L'objectif est ainsi d'identifier des protéines ubiquitinylées et / ou dégradées par le protéasome suite à l'induction de la préférence de place ou du sevrage d'un animal.

L'ensemble de ces travaux pourrait éclaircir le rôle de la voie ubiquitine-protéasome dans le développement et l'expression des comportements liés à la dépendance. De plus, il permettrait d'identifier de nouvelles cibles moléculaires associées à un traitement à la morphine. Plus généralement cette recherche s'inscrit également dans la compréhension du rôle de la voie ubiquitine-protéasome dans les mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique et donc l'apprentissage et la mémoire.

. Références bibliographiques

- Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C and Chidiac P (2006) RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cell Signal* **18**(5):579-591.
- Aebersold R and Goodlett DR (2001) Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* **101**(2):269-295.
- Alfonso P, Nunez A, Madoz-Gurpide J, Lombardia L, Sanchez L and Casal JI (2005) Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* **5**(10):2602-2611.
- Alvarez R and Daniels DV (1992) A separation method for the assay of adenylylcyclase, intracellular cyclic AMP, and cyclic-AMP phosphodiesterase using tritium-labeled substrates. *Anal Biochem* **203**(1):76-82.
- Ammon S, Mayer P, Riechert U, Tischmeyer H and Holtt V (2003) Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Brain Res Mol Brain Res* **112**(1-2):113-125.
- Apweiler R, Bairoch A and Wu CH (2004) Protein sequence databases. *Curr Opin Chem Biol* **8**(1):76-80.
- Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B and Aitken RJ (2004) Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci* 2004 Jul 15;117(Pt 16):3645-57
- Ault DT and Werling LL (2000) SH-SY5Y cells as a model for sigma receptor regulation of potassium-stimulated dopamine release. *Brain Res* **877**(2):354-360.
- Baenziger JE, Morris ML, Darsaut TE and Ryan SE (2000) Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **275**(2):777-784.
- Bagley EE, Gerke MB, Vaughan CW, Hack SP and Christie MJ (2005) GABA transporter currents activated by protein kinase A excite midbrain neurons during opioid withdrawal. *Neuron* **45**(3):433-445.
- Bailey CP and Connor M (2005) Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol* **5**(1):60-68.
- Baker RT and Varshavsky A (1991) Inhibition of the N-end rule pathway in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(4):1090-1094.
- Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC, Zachariou V and Nestler EJ (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17):11435-11440.
- Bear MF and Malenka RC (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* **4**(3):389-399.

- Becamel C, Alonso G, Galeotti N, Demey E, Jouin P, Ullmer C, Dumuis A, Bockaert J and Marin P (2002) Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT(2C) receptors: a proteomic approach. *Embo J* **21**(10):2332-2342.
- Berggren KN, Schulenberg B, Lopez MF, Steinberg TH, Bogdanova A, Smejkal G, Wang A and Patton WF (2002) An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* **2**(5):486-498.
- Bhat GJ, Samikkannu T, Thomas JJ and Thekkumkara TJ (2004) alpha-thrombin rapidly induces tyrosine phosphorylation of a novel, 74-78-kDa stress response protein(s) in lung fibroblast cells. *J Biol Chem* **279**(47):48915-22.
- Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ and Greengard P (2001) Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* **410**(6826):376-380.
- Bie B and Pan ZZ (2005) Increased glutamate synaptic transmission in the nucleus raphe magnus neurons from morphine-tolerant rats. *Mol Pain* **1**(1):7.
- Bilecki W, Zapart G, Ligeza A, Wawrzczak-Bargiela A, Urbanski MJ and Przewlocki R (2005) Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell Mol Life Sci* **62**(19-20):2369-2375.
- Bingol B and Schuman EM (2006) Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature* **441**(7097):1144-1148.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R and Postel W (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**(4):317-339.
- Blumer JB, Cismowski MJ, Sato M and Lanier SM (2005) AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends Pharmacol Sci* **26**(9):470-476.
- Bockaert J, Claeyssen S, Becamel C, Pinloche S and Dumuis A (2002) G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. *Int Rev Cytol* **212**:63-132.
- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A and Marin P (2004) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* **103**(3):203-221.
- Bockaert J, Marin P, Dumuis A and Fagni L (2003) The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett* **546**(1):65-72.
- Bockaert J and Pin JP (1998) Utiliser un récepteur couplé aux protéines G. Un succès évolutif. *C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie* **321**:529-551.
- Bockaert J and Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**(7):1723-1729.
- Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ and Caron MG (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* **408**(6813):720-723.

- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG and Lin FT (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* **286**(5449):2495-2498.
- Bonci A and Williams JT (1997) Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* **17**(2):796-803.
- Bose R, Molina H, Patterson AS, Bitok JK, Periaswamy B, Bader JS, Pandey A and Cole PA (2006) Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(26):9773-9778.
- Botion LM, Brasier AR, Tian B, Udipi V and Green A (2001) Inhibition of proteasome activity blocks the ability of TNF alpha to down-regulate G(i) proteins and stimulate lipolysis. *Endocrinology* **142**(12):5069-5075.
- Brown DA and Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**(3):533-544.
- Brownstein MJ (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(12):5391-5393.
- Bundey RA and Insel PA (2004) Discrete intracellular signaling domains of soluble adenylyl cyclase: camps of cAMP? *Sci STKE* **2004**(231):pe19.
- Bunemann M, Frank M and Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26):16077-16082.
- Burbaum J and Tobal GM (2002) Proteomics in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **6**(4):427-433.
- Busconi L, Guan J and Denker BM (2000) Degradation of heterotrimeric Galpha(o) subunits via the proteasome pathway is induced by the hsp90-specific compound geldanamycin. *J Biol Chem* **275**(3):1565-1569.
- Butour JL, Corbani M and Meunier JC (2004) Agonist-independent localization of the NOP receptor in detergent-resistant membrane rafts. *Biochem Biophys Res Commun* **325**(3):915-921.
- Carlezon WA, Jr., Boundy VA, Haile CN, Lane SB, Kalb RG, Neve RL and Nestler EJ (1997) Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer. *Science* **277**(5327):812-814.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS and Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* **28**(8):436-445.
- Carlezon WA, Jr. and Nestler EJ (2002) Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci* **25**(12):610-615.
- Chakrabarti S and Gintzler AR (2003) Phosphorylation of G(beta) is augmented by chronic morphine and enhances G(betagamma) stimulation of adenylyl cyclase activity. *Brain Res Mol Brain Res* **119**(2):144-151.

- Chakrabarti S, Oppermann M and Gintzler AR (2001) Chronic morphine induces the concomitant phosphorylation and altered association of multiple signaling proteins: a novel mechanism for modulating cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7):4209-4214.
- Chakrabarti S, Regec A and Gintzler AR (2005a) Biochemical demonstration of mu-opioid receptor association with G α : enhancement following morphine exposure. *Brain Res Mol Brain Res* **135**(1-2):217-224.
- Chakrabarti S, Regec A and Gintzler AR (2005b) Chronic morphine acts via a protein kinase C γ -G β -adenylyl cyclase complex to augment phosphorylation of G β and G $\beta\gamma$ stimulatory adenylyl cyclase signaling. *Brain Res Mol Brain Res*.
- Chaturvedi K, Bandari P, Chinen N and Howells RD (2001) Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of mu and delta opioid receptors. *J Biol Chem* **276**(15):12345-12355.
- Chen CA and Manning DR (2000) Regulation of G α i palmitoylation by activation of the 5-hydroxytryptamine-1A receptor. *J Biol Chem* **275**(31):23516-23522.
- Chen CA and Manning DR (2001) Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* **20**(13):1643-1652.
- Chen R, Pan S, Brentnall TA and Aebersold R (2005) Proteomic profiling of pancreatic cancer for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* **4**(4):523-533.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA and Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* **44**(1):8-12.
- Chen Z, Southwick K and Thulin CD (2004) Initial analysis of the phosphoproteome of Chinese hamster ovary cells using electrophoresis. *J Biomol Tech* **15**(4):249-256.
- Cheng D, Hoogenraad CC, Rush J, Ramm E, Schlager MA, Duong DM, Xu P, Wijayawardana SR, Hanfelt J, Nakagawa T, Sheng M and Peng J (2006) Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics* **5**(6):1158-1170.
- Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Rouquie D, Fuchs A, Kieffer S, Rossignol M, Lunardi J, Garin J and Rabilloud T (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**(11):1901-1909.
- Choudhary J and Grant SG (2004) Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nat Neurosci* **7**(5):440-445.
- Christie MJ, Williams JT, Osborne PB and Bellchambers CE (1997) Where is the locus in opioid withdrawal? *Trends Pharmacol Sci* **18**(4):134-140.
- Clapham DE (1994) Direct G protein activation of ion channels? *Annu Rev Neurosci* **17**:441-464.
- Clapham DE and Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:167-203.

- Cooper DM (2005) Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6):1319-1322.
- Cox BM and Weinstock M (1964) Quantitative Studies of the Antagonism by Nalorphine of Some of the Actions of Morphine-Like Analgesic Drugs. *Br J Pharmacol Chemother* **22**:289-300.
- Crain SM and Shen KF (1995) Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23):10540-10544.
- Crain SM and Shen KF (1996) Modulatory effects of Gs-coupled excitatory opioid receptor functions on opioid analgesia, tolerance, and dependence. *Neurochem Res* **21**(11):1347-1351.
- Cvejic S and Devi LA (1997) Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* **272**(43):26959-26964.
- Daniels DJ, Lenard NR, Etienne CL, Law PY, Roerig SC and Portoghese PS (2005) Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(52):19208-19213.
- Davis MA, Hinerfeld D, Joseph S, Hui YH, Huang NH, Leszyk J, Rutherford-Bethard J and Tam SW (2006) Proteomic Analysis of Rat Liver Phosphoproteins after Treatment with Protein Kinase Inhibitor H89 (N-(2-[p-Bromocinnamylamino]-ethyl)-5-isoquinolinesulfonamide). *J Pharmacol Exp Ther* **318**(2):589-595.
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E and Farquhar MG (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:235-271.
- Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP and Aston-Jones G (2000) Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* **403**(6768):430-434.
- Dessy C, Kelly RA, Balligand JL and Feron O (2000) Dynamin mediates caveolar sequestration of muscarinic cholinergic receptors and alteration in NO signaling. *Embo J* **19**(16):4272-4280.
- DiAntonio A and Hicke L (2004) Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu Rev Neurosci* **27**:223-246.
- Dong Y, Green T, Saal D, Marie H, Neve R, Nestler EJ and Malenka RC (2006) CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nat Neurosci* **9**(4):475-477.
- Douglass AD and Vale RD (2005) Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* **121**(6):937-950.
- Duggan B and Williamson K (2004) Molecular markers for predicting recurrence, progression and outcomes of bladder cancer (do the poster boys need new posters?). *Curr Opin Urol* **14**(5):277-286.

- Eckert GP, Igbavboa U, Muller WE and Wood WG (2003) Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with or without detergent reveal different lipid and protein domains. *Brain Res* **962**(1-2):144-150.
- Ehlers MD (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* **6**(3):231-242.
- Englbrecht CC and Facius A (2005) Bioinformatics challenges in proteomics. *Comb Chem High Throughput Screen* **8**(8):705-715.
- Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K and Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* **258**(5090):1952-1955.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF and Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**(4926):64-71.
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* **5**(7):565-575.
- Finn AK and Whistler JL (2001) Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron* **32**(5):829-839.
- Fischer T, De Vries L, Meerloo T and Farquhar MG (2003) Promotion of G alpha i3 subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14):8270-8275.
- Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M and Harmar AJ (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* **57**(2):279-288.
- Foster LJ, De Hoog CL and Mann M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10):5813-5818.
- Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A and Palczewski K (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**(6919):127-128.
- Frank M, Thumer L, Lohse MJ and Bunemann M (2005) G Protein activation without subunit dissociation depends on a G{alpha}(i)-specific region. *J Biol Chem* **280**(26):24584-24590.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG and Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**(6):1256-1272.
- Froment C, Uttenweiler-Joseph S, Bousquet-Dubouch MP, Matondo M, Borges JP, Esmenjaud C, Lacroix C, Monsarrat B and Burlet-Schiltz O (2005) A quantitative proteomic approach using two-dimensional gel electrophoresis and isotope-coded affinity tag labeling for studying human 20S proteasome heterogeneity. *Proteomics* **5**(9):2351-2363.
- Garzon J, Castro M and Sanchez-Blazquez P (1998) Influence of Gz and Gi2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to mu receptors. *Eur J Neurosci* **10**(8):2557-2564.

- Garzon J, Rodriguez-Munoz M, Lopez-Fando A and Sanchez-Blazquez P (2005) Activation of mu-opioid receptors transfers control of Galpha subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2: role in receptor desensitization. *J Biol Chem* **280**(10):8951-8960.
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**(1):90-113.
- Ghosh M, Peterson YK, Lanier SM and Smrcka AV (2003) Receptor- and nucleotide exchange-independent mechanisms for promoting G protein subunit dissociation. *J Biol Chem* **278**(37):34747-34750.
- Gilman AG and Goodman LS (1985) The Pharmacological Basis of Therapeutics. Edited by MacMillan New-York (seventh edition): 491-531.
- Godovac-Zimmermann J and Brown LR (2001) Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom Rev* **20**(1):1-57.
- Goldman D, Oroszi G and Ducci F (2005) The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat Rev Genet* **6**(7):521-532.
- Gomes I, Gupta A, Filipovska J, Szeto HH, Pintar JE and Devi LA (2004) A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14):5135-5139.
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V and Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**(22):RC110.
- Goodall AR, Danks K, Walker JH, Ball SG and Vaughan PF (1997) Occurrence of two types of secretory vesicles in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J Neurochem* **68**(4):1542-1552.
- Gorg A, Weiss W and Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**(12):3665-3685.
- Gronborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M, Jensen ON and Pandey A (2002) A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics* **1**(7):517-527.
- Guitart X, Thompson MA, Mirante CK, Greenberg ME and Nestler EJ (1992) Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* **58**(3):1168-1171.
- Haberstock-Debic H, Kim KA, Yu YJ and von Zastrow M (2005) Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J Neurosci* **25**(34):7847-7857.
- Hamilton MH, Cook LA, McRackan TR, Schey KL and Hildebrandt JD (2003) Gamma 2 subunit of G protein heterotrimer is an N-end rule ubiquitylation substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9):5081-5086.

- Han MH, Bolanos CA, Green TA, Olson VG, Neve RL, Liu RJ, Aghajanian GK and Nestler EJ (2006) Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceruleus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors. *J Neurosci* **26**(17):4624-4629.
- Hansen JL and Sheikh SP (2004) Functional consequences of 7TM receptor dimerization. *Eur J Pharm Sci* **23**(4-5):301-317.
- Harris GC and Aston-Jones G (1994) Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome. *Nature* **371**(6493):155-157.
- Harrison LM, Kastin AJ and Zadina JE (1998) Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides* **19**(9):1603-1630.
- Hart C, Schulenberg B, Steinberg TH, Leung WY and Patton WF (2003) Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using Pro-Q Emerald 488 dye, a fluorescent periodate Schiff-base stain. *Electrophoresis* **24**(4):588-598.
- Hayduk EJ, Choe LH and Lee KH (2004) A two-dimensional electrophoresis map of Chinese hamster ovary cell proteins based on fluorescence staining. *Electrophoresis* **25**(15):2545-2556.
- Herbert BR, Harry JL, Packer NH, Gooley AA, Pedersen SK and Williams KL (2001) What place for polyacrylamide in proteomics? *Trends Biotechnol* **19**(10 Suppl):S3-9.
- Hlavackova V, Goudet C, Kniazeff J, Zikova A, Maurel D, Vol C, Trojanova J, Prezeau L, Pin JP and Blahos J (2005) Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR. *Embo J* **24**(3):499-509.
- Hnasko TS, Sotak BN and Palmiter RD (2005) Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature* **438**(7069):854-857.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**(5536):577-580.
- Hurley JH (1999) Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **274**(12):7599-7602.
- Hyman SE, Malenka RC and Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu Rev Neurosci* **29**:565-598.
- Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Yano R, Sora I and Niki H (2002) Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neurosci Res* **44**(2):121-131.
- Ingram SL and Williams JT (1994) Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron* **13**(1):179-186.
- Jage J (2005) Opioid tolerance and dependence -- do they matter? *Eur J Pain* **9**(2):157-162.
- Jin LT and Choi JK (2004) Usefulness of visible dyes for the staining of protein or DNA in electrophoresis. *Electrophoresis* **25**(15):2429-2438.

- Johansson BB, Minsaa L and Aragay AM (2005) Proteasome involvement in the degradation of the G(q) family of Galpha subunits. *Febs J* **272**(20):5365-5377.
- Jordan BA and Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**(6737):697-700.
- Juris SJ, Shah K, Shokat K, Dixon JE and Vacratsis PO Identification of otubain 1 as a novel substrate for the Yersinia protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry. *FEBS Lett* Jan 9;**580**(1):179-83.
- Kalume DE, Molina H and Pandey A (2003) Tackling the phosphoproteome: tools and strategies. *Curr Opin Chem Biol* **7**(1):64-69.
- Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM (2000) Principles of Neural Science, Edited by McGraw-Hill New-York (fourth edition):472-491.
- Kanninen K, Goldsteins G, Auriola S, Alafuzoff I and Koistinaho J (2004) Glycosylation changes in Alzheimer's disease as revealed by a proteomic approach. *Neurosci Lett* **367**(2):235-240.
- Karas M, Gluckmann M and Schafer J (2000) Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* **35**(1):1-12.
- Karas M and Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**(20):2299-2301.
- Karnik SS, Gogonea C, Patil S, Saad Y and Takezako T (2003) Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol Metab* **14**(9):431-437.
- Kelley AE (2004) Memory and addiction; shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* **44**(1):161-179.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C and Hirth CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24):12048-12052.
- Kim SY, Chudapongse N, Lee SM, Levin MC, Oh JT, Park HJ and Ho IK (2004) Proteomic analysis of phosphotyrosyl proteins in the rat brain: effect of butorphanol dependence. *J Neurosci Res* **77**(6):867-877.
- Kim SY, Chudapongse N, Lee SM, Levin MC, Oh JT, Park HJ and Ho IK (2005) Proteomic analysis of phosphotyrosyl proteins in morphine-dependent rat brains. *Brain Res Mol Brain Res* **133**(1):58-70.
- Klein S, Reuveni H and Levitzki A (2000) Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7):3219-3223.
- Kleuss C and Krause E (2003) Galpha(s) is palmitoylated at the N-terminal glycine. *Embo J* **22**(4):826-832.
- Kroeger KM, Pflieger KD and Eidne KA (2003) G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol* **24**(4):254-278.

- Krumins AM and Gilman AG (2006) Targeted knockdown of G protein subunits selectively prevents receptor-mediated modulation of effectors and reveals complex changes in non-targeted signaling proteins. *J Biol Chem* **281**(15):10250-10262.
- Lagane B, Gaibelet G, Meilhoc E, Masson JM, Cezanne L and Lopez A (2000) Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**(43):33197-33200.
- Landry Y, Niederhoffer N, Sick E and Gies JP (2006) Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem* **13**(1):51-63.
- Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK and Nestler EJ (1997) CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci* **17**(20):7890-7901.
- Lanier SM (2004) AGS proteins, GPR motifs and the signals processed by heterotrimeric G proteins. *Biol Cell* **96**(5):369-372.
- Law PY, Erickson-Herbrandson LJ, Zha QQ, Solberg J, Chu J, Sarre A and Loh HH (2005) Heterodimerization of mu- and delta-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. *J Biol Chem* **280**(12):11152-11164.
- Law PY, Wong YH and Loh HH (1999) Mutational analysis of the structure and function of opioid receptors. *Biopolymers* **51**(6):440-455.
- Law PY, Wong YH and Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:389-430.
- Lee YI, Kim SY, Cho CH, Seo M, Cho DH, Kwak SJ and Juhnn YS (2003) Coordinate expression of the alpha and beta subunits of heterotrimeric G proteins involves regulation of protein degradation in CHO cells. *FEBS Lett* **555**(2):329-334.
- Leitner A and Lindner W (2004) Current chemical tagging strategies for proteome analysis by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **813**(1-2):1-26.
- Li KW, Jimenez CR, van der Schors RC, Hornshaw MP, Schoffemeer AN and Smit AB (2006) Intermittent administration of morphine alters protein expression in rat nucleus accumbens. *Proteomics* **6**(6):2003-2008.
- Li N, Mak A, Richards DP, Naber C, Keller BO, Li L and Shaw AR (2003) Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation. *Proteomics* **3**(4):536-548.
- Liao D, Lin H, Law PY and Loh HH (2005) Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(5):1725-1730.
- Lin J and Shaw AS (2005) Getting downstream without a Raft. *Cell* **121**(6):815-816.

- Liu Y, Liu H, Han B and Zhang JT (2006) Identification of 14-3-3sigma as a contributor to drug resistance in human breast cancer cells using functional proteomic analysis. *Cancer Res* **66**(6):3248-3255.
- Macdonald JL and Pike LJ (2005) A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res* **46**(5):1061-1067.
- Mackintosh JA, Choi HY, Bae SH, Veal DA, Bell PJ, Ferrari BC, Van Dyk DD, Verrills NM, Paik YK and Karuso P (2003) A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3**(12):2273-2288.
- Madura K and Varshavsky A (1994) Degradation of G alpha by the N-end rule pathway. *Science* **265**(5177):1454-1458.
- Magistretti PJ (1992) *Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Frison-Roche et Slatkine.
- Maldonado R (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* **21**(1):91-104.
- Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J and Schutz G (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* **273**(5275):657-659.
- Maldonado R, Stinus L, Gold LH and Koob GF (1992) Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* **261**(2):669-677.
- Malenka RC and Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**(1):5-21.
- Mann M and Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**(3):255-261.
- Mansour A, Fox CA, Akil H and Watson SJ (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* **18**(1):22-29.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H and Watson SJ (1987) Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* **7**(8):2445-2464.
- Marie N, Lecoq I, Jauzac P and Allouche S (2003) Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists. *J Biol Chem* **278**(25):22795-22804.
- Marotti LA, Jr., Newitt R, Wang Y, Aebersold R and Dohlman HG (2002) Direct identification of a G protein ubiquitination site by mass spectrometry. *Biochemistry* **41**(16):5067-5074.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE and Gilbert PE (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* **197**(3):517-532.

- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP and Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **383**(6603):819-823.
- McClung CA and Nestler EJ (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci* **6**(11):1208-1215.
- McClung CA, Nestler EJ and Zachariou V (2005) Regulation of gene expression by chronic morphine and morphine withdrawal in the locus ceruleus and ventral tegmental area. *J Neurosci* **25**(25):6005-6015.
- McCurdy CR and Scully SS (2005) Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sci* **78**(5):476-484.
- Metzger TG and Ferguson DM (1995) On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett* **375**(1-2):1-4.
- Meunier JC (1992) Opioid receptors, tolerance and dependence. *Therapie* **47**(6):495-502.
- Meunier JC (1997) Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol* **340**(1):1-15.
- Milligan G and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**:S46-55.
- Minami M, Onogi T, Nakagawa T, Katao Y, Aoki Y, Katsumata S and Satoh M (1995) DAMGO, a mu-opioid receptor selective ligand, distinguishes between mu- and kappa-opioid receptors at a different region from that for the distinction between mu- and delta-opioid receptors. *FEBS Lett* **364**(1):23-27.
- Moffett S, Brown DA and Linder ME (2000) Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem* **275**(3):2191-2198.
- Mollereau C and Mouldous L (2000) Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* **21**(7):907-917.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G and Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* **341**(1):33-38.
- Mollereau C, Roumy M and Zajac JM (2005) Opioid-modulating peptides: mechanisms of action. *Curr Top Med Chem* **5**(3):341-355.
- Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC and Parmentier M (1996) Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16):8666-8670.
- Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT and VanBogelen RA (2003) Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics* **3**(10):1912-1919.

- Monteoliva L and Albar JP (2004) Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**(3):220-239.
- Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Uo T, Ho JT, McBee JK, Conrads TP and Veenstra TD (2002) Proteomic analysis in the neurosciences. *Mol Cell Proteomics* **1**(8):553-560.
- Mouledous L, Hunt S, Harcourt R, Harry J, Williams KL and Gutstein HB (2003) Navigated laser capture microdissection as an alternative to direct histological staining for proteomic analysis of brain samples. *Proteomics* **3**(5):610-615.
- Mouledous L, Neasta J, Uttenweiler-Joseph S, Stella A, Matondo M, Corbani M, Monsarrat B and Meunier JC (2005) Long-term morphine treatment enhances proteasome-dependent degradation of G beta in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: correlation with onset of adenylate cyclase sensitization. *Mol Pharmacol* **68**(2):467-476.
- Mouledous L, Topham CM, Mazarguil H and Meunier JC (2000) Direct identification of a peptide binding region in the opioid receptor-like 1 receptor by photoaffinity labeling with [Bpa(10),Tyr(14)]nociceptin. *J Biol Chem* **275**(38):29268-29274.
- Mukherji M (2005) Phosphoproteomics in analyzing signaling pathways. *Expert Rev Proteomics* **2**(1):117-128.
- Muller JM, Lolait SJ, Yu VC, Sadee W and Waschek JA (1989) Functional vasoactive intestinal polypeptide (VIP) receptors in human neuroblastoma subclones that contain VIP precursor mRNA and release VIP-like substances. *J Biol Chem* **264**(7):3647-3650.
- Munro S (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**(4):377-388.
- Nair KS, Balasubramanian N and Slepak VZ (2002) Signal-Dependent Translocation of Transducin, RGS9-1-Gbeta5L Complex, and Arrestin to Detergent-Resistant Membrane Rafts in Photoreceptors. *Curr Biol* **12**(5):421-425.
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A and Chandu D (2006) The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* **31**(1):137-155.
- Natochin M, Lester B, Peterson YK, Bernard ML, Lanier SM and Artemyev NO (2000) AGS3 inhibits GDP dissociation from galpha subunits of the Gi family and rhodopsin-dependent activation of transducin. *J Biol Chem* **275**(52):40981-40985.
- Nestler EJ (1997) Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol* **7**(5):713-719.
- Nestler EJ (2000) Genes and addiction. *Nat Genet* **26**(3):277-281.
- Nestler EJ (2001a) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* **2**(2):119-128.
- Nestler EJ (2001b) Psychogenomics: opportunities for understanding addiction. *J Neurosci* **21**(21):8324-8327.
- Nestler EJ (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* **25**(4):210-218.

- Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* **8**(11):1445-1449.
- Nestler EJ and Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* **278**(5335):58-63.
- Nestler EJ, Alreja M and Aghajanian GK (1999) Molecular control of locus coeruleus neurotransmission. *Biol Psychiatry* **46**(9):1131-1139.
- Nestler EJ, Barrot M and Self DW (2001a) DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20):11042-11046.
- Nestler EJ, Hyman SE and Malenka RC (2001b) Molecular Pharmacology : a foundation for clinical neuroscience. Edited by McGraw-Hill New-York.
- Obin M, Lee BY, Meinke G, Bohm A, Lee RH, Gaudet R, Hopp JA, Arshavsky VY, Willardson BM and Taylor A (2002) Ubiquitylation of the transducin betagamma subunit complex. Regulation by phosducin. *J Biol Chem* **277**(46):44566-44575.
- Ogasawara J, Sakurai T, Rahman N, Kizaki T, Hitomi Y, Ohno H and Izawa T (2004) Acute exercise alters Galphai2 protein expressions through the ubiquitin-proteasome proteolysis pathway in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **323**(3):1109-1115.
- Olson VG, Zabetian CP, Bolanos CA, Edwards S, Barrot M, Eisch AJ, Hughes T, Self DW, Neve RL and Nestler EJ (2005) Regulation of drug reward by cAMP response element-binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J Neurosci* **25**(23):5553-5562.
- Ong SE, Foster LJ and Mann M (2003) Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* **29**(2):124-130.
- Onogi T, Minami M, Katao Y, Nakagawa T, Aoki Y, Toya T, Katsumata S and Satoh M (1995) DAMGO, a mu-opioid receptor selective agonist, distinguishes between mu- and delta-opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett* **357**(1):93-97.
- Ostrom RS, Bunday RA and Insel PA (2004) Nitric oxide inhibition of adenylyl cyclase type 6 activity is dependent upon lipid rafts and caveolin signaling complexes. *J Biol Chem* **279**(19):19846-19853.
- Ostrom RS, Gregorian C, Drenan RM, Xiang Y, Regan JW and Insel PA (2001) Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **276**(45):42063-42069.
- Ostrom RS and Insel PA (2004) The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* **143**(2):235-245.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480):739-745.
- Pandey A and Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**(6788):837-846.

- Pasternak GW (1988) The Opiate Receptors. *Edited by Gavril W Pasternak* New-York.
- Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L and Scholich K (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* **269**(1-2):13-25.
- Pert CB and Snyder SH (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**(77):1011-1014.
- Peterson YK, Bernard ML, Ma H, Hazard S, 3rd, Graber SG and Lanier SM (2000) Stabilization of the GDP-bound conformation of G α by a peptide derived from the G-protein regulatory motif of AGS3. *J Biol Chem* **275**(43):33193-33196.
- Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**(4):655-667.
- Pike LJ (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**(Pt 2):281-292.
- Pike LJ, Han X and Gross RW (2005) Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. *J Biol Chem* **280**(29):26796-26804.
- Pineda VV, Athos JI, Wang H, Celver J, Ippolito D, Boulay G, Birnbaumer L and Storm DR (2004) Removal of G(α 1) Constraints on Adenylyl Cyclase in the Hippocampus Enhances LTP and Impairs Memory Formation. *Neuron* **41**(1):153-163.
- Poeaknapo C, Schmidt J, Brandsch M, Drager B and Zenk MH (2004) Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(39):14091-14096.
- Prokai L, Zharikova AD and Stevens SM, Jr. (2005) Effect of chronic morphine exposure on the synaptic plasma-membrane subproteome of rats: a quantitative protein profiling study based on isotope-coded affinity tags and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **40**(2):169-175.
- Pugsley MK (2002) The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system. *Pharmacol Ther* **93**(1):51-75.
- Punch LJ, Self DW, Nestler EJ and Taylor JR (1997) Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors on microinfusion of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus coeruleus or periaqueductal gray. *J Neurosci* **17**(21):8520-8527.
- Qi M and Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**(Pt 16):3569-3572.
- Rabilloud T (2000) Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal Chem* **72**(1):48A-55A.
- Raggiaschi R, Gotta S and Terstappen GC (2005) Phosphoproteome analysis. *Biosci Rep* **25**(1-2):33-44.
- Raman B, Cheung A and Marten MR (2002) Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis software packages, Z3 and Melanie. *Electrophoresis* **23**(14):2194-2202.

- Rasmussen K (1995) The role of the locus coeruleus and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and AMPA receptors in opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **13**(4):295-300.
- Rau T, Nose M, Remmers U, Weil J, Weissmuller A, Davia K, Harding S, Peppel K, Koch WJ and Eschenhagen T (2003) Overexpression of wild-type Galpha(i)-2 suppresses beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Faseb J* **17**(3):523-525.
- Ray O and Ksir C (2002) *Drugs, Society, and Human Behavior*. Edited by McGraw-Hill New-York (ninth edition) 376-411.
- Reinders J and Sickmann A (2005) State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics* **5**(16):4052-4061.
- Righetti PG, Castagna A, Antonioli P and Boschetti E (2005) Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis* **26**(2):297-319.
- Robinson TE and Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**:33-46.
- Robishaw JD and Berlot CH (2004) Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Curr Opin Cell Biol* **16**(2):206-209.
- Rosenberger CM, Brumell JH and Finlay BB (2000) Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol* **10**(22):R823-825.
- Rosengren AT, Salmi JM, Aittokallio T, Westerholm J, Lahesmaa R, Nyman TA and Nevalainen OS (2003) Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. *Proteomics* **3**(10):1936-1946.
- Rossetti ZL, Longu G, Mercurio G and Gessa GL (1993) Extraneuronal noradrenaline in the prefrontal cortex of morphine-dependent rats: tolerance and withdrawal mechanisms. *Brain Res* **609**(1-2):316-320.
- Saal D, Dong Y, Bonci A and Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* **37**(4):577-582.
- Sakai J, Ishikawa H, Kojima S, Satoh H, Yamamoto S and Kanaoka M (2003) Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* **3**(7):1318-24.
- Samaha AN and Robinson TE (2005) Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends Pharmacol Sci* **26**(2):82-87.
- Sato M, Blumer JB, Simon V and Lanier SM (2006) Accessory proteins for G proteins: partners in signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:151-187.
- Satoh M and Minami M (1995) Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther* **68**(3):343-364.
- Schioth HB and Fredriksson R (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* **142**(1-2):94-101.

- Schneider T, Igelmund P and Hescheler (1997) G protein interaction with K^+ and Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol Sci* **18**:8-11.
- Schrimpf SP, Meskenaite V, Brunner E, Rutishauser D, Walther P, Eng J, Aebersold R and Sonderegger P (2005) Proteomic analysis of synaptosomes using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Proteomics* **5**(10):2531-2541.
- Schulenberg B, Aggeler R, Beechem JM, Capaldi RA and Patton WF (2003) Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *J Biol Chem* **278**(29):27251-27255.
- Sechi S and Oda Y (2003) Quantitative proteomics using mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* **7**(1):70-77.
- Seno K, Kishimoto M, Abe M, Higuchi Y, Mieda M, Owada Y, Yoshiyama W, Liu H and Hayashi F (2001) Light- and guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate-sensitive localization of a G protein and its effector on detergent-resistant membrane rafts in rod photoreceptor outer segments. *J Biol Chem* **276**(24):20813-20816.
- Sharp BM (2006) Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun* **20**(1):9-14.
- Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Wallace T, Gilden L, Zachariou V, Impey S, Duman RS, Storm D and Nestler EJ (2002) Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *J Neurosci* **22**(9):3663-3672.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O and Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**(5):850-858.
- Shi Y, Xiang R, Horvath C and Wilkins JA (2004) The role of liquid chromatography in proteomics. *J Chromatogr A* **1053**(1-2):27-36.
- Simon EJ, Hiller JM and Edelman I (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(7):1947-1949.
- Sim-Selley LJ, Selley DE, Vogt LJ, Childers SR and Martin TJ (2000) Chronic heroin self-administration desensitizes mu opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. *J Neurosci* **20**(12):4555-4562.
- Singer SJ and Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**(23):720-731.
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE and Sigler PB (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* **379**(6563):369-374.
- Spiga S, Puddu MC, Pisano M and Diana M (2005) Morphine withdrawal-induced morphological changes in the nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* **22**(9):2332-2340.
- Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, Leung WY, Goodman T, Schulenberg B, Hendrickson J, Beechem JM, Haugland RP and Patton WF (2003) Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics* **3**(7):1128-1144.

- Steinberg TH, Jones LJ, Haugland RP and Singer VL (1996) SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem* **239**(2):223-237.
- Steiner D, Saya D, Schallmack E, Simonds WF and Vogel Z (2006) Adenylyl cyclase type-VIII activity is regulated by G(betagamma) subunits. *Cell Signal*. 2006 Jan;18(1):62-8.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**:509-547.
- Sunahara RK and Taussig R (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**(3):168-184.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* **14**(3):311-317.
- Szucs M, Boda K and Gintzler AR (2004) Dual effects of DAMGO [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin and CTAP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂) on adenylyl cyclase activity: implications for mu-opioid receptor G_s coupling. *J Pharmacol Exp Ther* **310**(1):256-262.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y and Yoshida T (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2**(8): 151-153.
- Terenius L (1973) Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **33**(5):377-384.
- Terrillon S and Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**(1):30-34.
- Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG and Sprang SR (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α _s.GTP γ S. *Science* **278**(5345):1907-1916.
- Trujillo KA (2000) Are NMDA receptors involved in opiate-induced neural and behavioral plasticity? A review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* **151**(2-3):121-141.
- Trujillo KA and Akil H (1991) Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* **251**(4989):85-87.
- Ulery PG, Rudenko G and Nestler EJ (2006) Regulation of DeltaFosB stability by phosphorylation. *J Neurosci* **26**(19):5131-5142.
- Unwin RD, Sternberg DW, Lu Y, Pierce A, Gilliland DG and Whetton AD (2005) Global effects of BCR/ABL and TEL/PDGFR β expression on the proteome and phosphoproteome: identification of the Rho pathway as a target of BCR/ABL. *J Biol Chem* **280**(8):6316-6326.
- Van den Bergh G and Arckens L (2004) Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol* **15**(1):38-43.

- Van Der Hoeven PC, Van Der Wal JC, Ruurs P, Van Dijk MC and Van Blitterswijk J (2000) 14-3-3 isotypes facilitate coupling of protein kinase C-zeta to Raf-1: negative regulation by 14-3-3 phosphorylation. *Biochem J* **345** Pt 2:297-306.
- Varga EV, Yamamura HI, Rubenzik MK, Stropova D, Navratilova E and Roeske WR (2003) Molecular mechanisms of excitatory signaling upon chronic opioid agonist treatment. *Life Sci* **74**(2-3):299-311.
- Veatch RM, Adler TK and Way EL (1964) The Importance of Steric Configuration in Certain Morphinine-Mimetic Actions of Synthetic Analgetics. *J Pharmacol Exp Ther* **145**:11-19.
- Vetulani J (2001) Drug addiction. Part I. Psychoactive substances in the past and presence. *Pol J Pharmacol* **53**(3):201-214.
- Vogt M (1954) The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J Physiol* **123**(3):451-481.
- Volpicelli LA, Easterling KW, Kimmel HL and Holtzman SG (1999) Sensitization to daily morphine injections in rats with unilateral lesions of the substantia nigra. *Pharmacol Biochem Behav* **64**(3):487-493.
- von Haller PD, Donohoe S, Goodlett DR, Aebersold R and Watts JD (2001) Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics* **1**(8):1010-1021.
- Waldhoer M, Bartlett SE and Whistler JL (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* **73**:953-990.
- Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma SK, Kostenis E, Portoghesi PS and Whistler JL (2005) A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(25):9050-9055.
- Wall DB, Berger SJ, Finch JW, Cohen SA, Richardson K, Chapman R, Drabble D, Brown J and Gostick D (2002) Continuous sample deposition from reversed-phase liquid chromatography to tracks on a matrix-assisted laser desorption/ionization precoated target for the analysis of protein digests. *Electrophoresis* **23**(18):3193-3204.
- Wang D, Sun X, Bohn LM and Sadee W (2005a) Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol* **67**(6):2173-2184.
- Wang HY, Friedman E, Olmstead MC and Burns LH (2005b) Ultra-low-dose naloxone suppresses opioid tolerance, dependence and associated changes in mu opioid receptor-G protein coupling and Gbetagamma signaling. *Neuroscience* **135**(1):247-261.
- Wang M, Xiao GG, Li N, Xie Y, Loo JA and Nel AE (2005c) Use of a fluorescent phosphoprotein dye to characterize oxidative stress-induced signaling pathway components in macrophage and epithelial cultures exposed to diesel exhaust particle chemicals. *Electrophoresis* **26**(11):2092-2108.
- Wang WW, Shahrestanifar M, Jin J and Howells RD (1995) Studies on mu and delta opioid receptor selectivity utilizing chimeric and site-mutagenized receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26):12436-12440.

- Wang Y, Marotti LA, Jr., Lee MJ and Dohlman HG (2005d) Differential regulation of G protein alpha subunit trafficking by mono- and polyubiquitination. *J Biol Chem* **280**(1):284-291.
- Wang ZJ and Wang LX (2006) Phosphorylation: A molecular switch in opioid tolerance. *Life Sci*.
- Way EL, Loh HH and Shen FH (1969) Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther* **167**(1):1-8.
- Wedegaertner PB and Bourne HR (1994) Activation and depalmitoylation of Gs alpha. *Cell* **77**(7):1063-1070.
- Wess J (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *Faseb J* **11**(5):346-354.
- Wess J (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* **80**(3):231-264.
- Westemeier R and Marouga R (2005) Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep* **25**(1-2):19-32.
- Wheelock AM, Morin D, Bartosiewicz M and Buckpitt AR (2006) Use of a fluorescent internal protein standard to achieve quantitative two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **6**(5):1385-1398.
- Whistler JL, Chuang HH, Chu P, Jan LY and von Zastrow M (1999) Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* **23**(4):737-746.
- Williams JT, Christie MJ and Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* **81**(1):299-343.
- Williams K, Wu T, Colangelo C and Nairn AC (2004) Recent advances in neuroproteomics and potential application to studies of drug addiction. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**:148-166.
- Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE and Yates JR, 3rd (2003) A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol* **21**(5):532-538.
- Xu NJ, Yu YX, Zhu JM, Liu H, Shen L, Zeng R, Zhang X and Pei G (2004) Inhibition of SNAP-25 phosphorylation at Ser187 is involved in chronic morphine-induced down-regulation of SNARE complex formation. *J Biol Chem* **279**(39):40601-40608.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T and Bell GI (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14):6736-6740.
- Yi JJ and Ehlers MD (2005) Ubiquitin and protein turnover in synapse function. *Neuron* **47**(5):629-632.
- Yu VC, Eiger S, Duan DS, Lamah J and Sadee W (1990) Regulation of cyclic AMP by the mu-opioid receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **55**(4):1390-1396.

- Zacharias DA, Violin JD, Newton AC and Tsien RY (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**(5569):913-916.
- Zachariou V, Bolanos CA, Selley DE, Theobald D, Cassidy MP, Kelz MB, Shaw-Lutchman T, Berton O, Sim-Selley LJ, Dileone RJ, Kumar A and Nestler EJ (2006) An essential role for DeltaFosB in the nucleus accumbens in morphine action. *Nat Neurosci* **9**(2):205-211.
- Zachariou V, Georgescu D, Sanchez N, Rahman Z, DiLeone R, Berton O, Neve RL, Sim-Selley LJ, Selley DE, Gold SJ and Nestler EJ (2003) Essential role for RGS9 in opiate action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23):13656-13661.
- Zaveri N (2003) Peptide and nonpeptide ligands for the nociceptin/orphanin FQ receptor ORL1: research tools and potential therapeutic agents. *Life Sci* **73**(6):663-678.
- Zhang G, Liu Y, Ruoho AE and Hurley JH (1997) Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* **386**(6622):247-253.
- Zhang G, Spellman DS, Skolnik EY and Neubert TA (2006) Quantitative phosphotyrosine proteomics of EphB2 signaling by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteome Res* **5**(3):581-588.
- Zhao H, Loh HH and Law PY (2006) Adenylyl cyclase superactivation induced by long-term treatment with opioid agonist is dependent on receptor localized within lipid rafts and is independent of receptor internalization. *Mol Pharmacol* **69**(4):1421-1432.
- Zheng B, Ma YC, Ostrom RS, Lavoie C, Gill GN, Insel PA, Huang XY and Farquhar MG (2001) RGS-PX1, a GAP for Galphas and sorting nexin in vesicular trafficking. *Science* **294**(5548):1939-1942.

