

DYNAMIQUE DES HÉTÉROMERES OPIOÏDES MU-DELTA EN CONDITIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES : ASPECTS TECHNIQUES

Dominique MASSOTTE

d.massotte@unistra.fr

*Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives INCI UPR3212,
8 Allée du Général Rouvillois, 67000 Strasbourg, France*

doi.org/10.25830/afh.rfh.2020.32.83.94

DYNAMICS OF MU-DELTA HETEROMERS IN PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS : TECHNICAL ASPECTS

ABSTRACT

The opioid system modulates numerous physiological functions with mu opioid receptors mediating opiate analgesic and euphoric properties. Functional crosstalk between mu and delta opioid receptors was postulated through heteromerization of the two receptors. Signaling and trafficking properties of mu-delta heteromers have been extensively studied in transfected cells but little is known about their functional impact in native tissue or about their distribution in the nervous system. Using double knock-in mice co-expressing functional fluorescent mu and delta receptors, we mapped mu-delta neuronal co-localization in the brain in basal and pathological conditions. We review here the technological improvements developed to optimally visualize the two receptors *in vivo*.

KEY WORDS

Opioid system, mu opioid receptor, delta opioid receptor, nervous system, fluorescent knock-in mouse, addiction

RESUME

Le système opioïde module de nombreuses fonctions physiologiques et le récepteur mu est responsable des effets analgésiques et euphorisants des opiacés. Des interactions fonctionnelles entre récepteurs mu et delta par l'intermédiaire d'hétéromères impliquant ces deux récepteurs ont été proposées. Les propriétés de signalisation et de trafic des hétéromères mu-delta ont été étudiées de façon intensive en cellules transfectées mais peu de données sont disponibles concernant leur impact fonctionnel *in vivo* ou leur distribution dans le système nerveux. En utilisant des souris double knock-in co-exprimant des récepteurs mu et delta fluorescents fonctionnels, nous avons cartographié la co-localisation neuronale des deux récepteurs dans le système nerveux en conditions basales et pathologiques. Nous décrivons ici les améliorations techniques développées pour une visualisation optimale des deux récepteurs.

MOTS CLES

Système opioïde, récepteur opioïde mu, récepteur opioïde delta, système nerveux, souris knock-in fluorescentes, addiction

INTRODUCTION

Le système opioïde est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la nociception, les réponses émotionnelles, la récompense aux stimuli naturels ou les fonctions autonomes [1]. Il se compose des trois récepteurs opioïdes mu, delta et kappa appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et de trois familles de peptides endogènes : les enképhalines, la β -endorphine et les dynorphines. Au niveau moléculaire, les récepteurs mu sont aussi la cible privilégiée de ligands opioïdes exogènes, tels que la morphine, caractérisés par des propriétés analgésiques et euphorisantes. Cependant, plusieurs décennies de pharmacologie ont mis au jour la complexité du système opioïde. De façon plus spécifique, l'analyse des effets des opiacés *in vivo* a révélé des interactions fonctionnelles entre le récepteur mu et le récepteur delta. Au niveau moléculaire, bien qu'un récepteur monomérique soit capable d'activer les protéines G [2], il est couramment admis que les récepteurs peuvent s'associer entre eux pour former des oligomères. Ceux-ci sont appelés homomères s'ils impliquent un seul et même type de récepteur ou, hétéromères en cas d'association entre récepteurs différents. Ces hétéromères ont été très étudiés en système d'expression hétérologue [3] mais leurs implications fonctionnelles sont encore très mal connues *in vivo* [4].

Afin de mieux comprendre le rôle physiologique des hétéromères mu-delta, nous nous sommes attachés à cartographier la distribution des neurones co-exprimant ces deux récepteurs en conditions basales dans le système nerveux [5]. En effet, bien que constituant un prérequis essentiel à la formation d'hétéromères, cette information était manquante.

Pour pallier l'absence d'anticorps spécifiques du récepteur delta, nous avons utilisé des souris double KI fluorescentes co-exprimant les récepteurs mu et delta respectivement fusionnés à la protéine fluorescente rouge mCherry et à la protéine fluorescente verte eGFP. Ceci permet de visualiser directement *in vivo* les deux récepteurs avec une résolution subcellulaire. En conditions basales, nous avons détecté la co-expression neuronale des récepteurs mu et delta dans un nombre restreint de régions principalement localisées au niveau du cerveau postérieur dans les circuits essentiels à la perception et au traitement des stimuli aversifs [5]. La co-expression neuronale des récepteurs opioïdes mu et delta a pu être associée à leur proximité physique dans plusieurs régions du cerveau [6] dont l'hippocampe [5] et le nucleus accumbens [7], ainsi que dans la moelle épinière [8, 9] et les ganglions

rachidiens [10]. La cartographie des neurones co-exprimant les deux récepteurs constitue donc une première indication des régions et circuits neuronaux où les hétéromères mu-delta pourraient exister et jouer un rôle fonctionnel.

Plus récemment, nous nous sommes attachés à identifier les changements intervenant dans la distribution des neurones co-exprimant les récepteurs mu et delta opioïdes en conditions pathologiques, en particulier les changements induits par une administration répétée de morphine et leur persistance après l'arrêt de l'administration de la drogue [11]. Nous avons observé que la co-expression neuronale des deux récepteurs est dynamique car augmentée dans le cerveau postérieur et dans plusieurs régions du télencéphale où elle était indétectable à l'état basal. Les nouvelles régions identifiées sont situées dans les circuits associés à la récompense, à l'activité motrice, au contrôle viscéral et au traitement émotionnel sous-tendant le sevrage [11]. Après quatre semaines d'abstinence, ces changements sont encore très majoritairement présents, sauf dans les circuits associés à la locomotion, ce qui confirme le caractère dynamique de la co-expression neuronale des deux récepteurs. Nos résultats suggèrent en outre que cette dernière constitue un biomarqueur de l'addiction aux opiacés [11].

D'un point de vue technique, l'identification des neurones co-exprimant les deux récepteurs a nécessité plusieurs améliorations que nous présenterons ici.

MATERIELS ET METHODES

Animaux

Les souris doubles knock-in co-exprimant les récepteurs opioïdes fluorescents mu et delta (mu-mCherry/delta-eGFP) ont été obtenues par croisement des souris simples fluorescentes exprimant la fusion delta-eGFP ou mu-mCherry comme décrit précédemment [5]. Le fond génétique des animaux est 50:50, C57BL6/J:129svPas. Des souris adultes mâles et femelles (8-12 semaines) ont été utilisées.

Les animaux sont hébergés en animalerie en conditions de température ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) et d'humidité ($45 \pm 5 \%$) contrôlées en cycle de 12:12-lumière:obscurité avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Toutes les expériences sont réalisées en

accord avec la législation européenne (directive 2010/63/EU pour la protection des animaux de laboratoire) et ont reçu l'agrément du ministère français (APAFIS 20 1503041113547 APAFIS# 300.02).

Traitement

La morphine 30mg/kg est administrée quotidiennement en injection intrapéritonéale pendant 6 jours. Les animaux en conditions abstinences sont ensuite laissés 4 semaines dans leur cage d'élevage.

Préparation des tissus et immunohistochimie

Les animaux sont injectés en intrapéritonéal avec l'agoniste sélectif delta SNC80 10 mg/kg (Tocris, UK) 1h avant perfusion pour faciliter la détection des somas des neurones delta-eGFP [5]. La préparation des tissus et l'immunohistochimie ont été réalisées comme décrit précédemment [5]. Brièvement, les souris sont anesthésiées à l'aide de kétamine/xylazine (100/10 mg/kg, i.p.) et perfusées en intracardiaque avec 100 ml de 4 % paraformaldéhyde à 4°C en tampon phosphate (PB) 0,1M pH 7,4 à 20 ml/min. Les cerveaux sont ensuite post-fixés pendant 24 h à 4°C en paraformaldéhyde 4 %, cryoprotégés en 30 % saccharose PB 0,1 M pH 7,4, inclus en OCT (Optimal cutting temperature medium, Thermo scientific) congelés et conservés à -80°C. Des sections flottantes de 30 µm sont coupées au cryostat (CM3050 Leica, Allemagne) sont incubées en solution de blocage (PB 0,1 M pH 7,4, 0,5 % Triton X100, 5 % sérum de chèvre) pendant 1 h à température ambiante. Les sections sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C en solution de blocage avec l'anticorps primaire de lapin anti-GFP (Molecular Probes A-6455, dilution 1 :1000). Les sections sont ensuite lavées 3 fois en PB 0,1 M pH 7,4, 0,5% Triton X100 puis incubées 2 h à température ambiante en PB 0,1 M pH 7,4, 0,5 % Triton X100 avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'AlexaFluor 488 (Molecular Probes A-11034, dilution 1 :2000). Les sections sont lavées 3 fois et montées en Mowiol 4-88 (Calbiochem, Allemagne) et 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Roche diagnostic, Allemagne) (0,5 µg/ml).

Pour la visualisation de la fusion mu-mCherry à la membrane plasmique, les cerveaux sont post-fixés pendant 4 heures en paraformaldéhyde 4 % puis des sections de 30 µm sont réalisées au vibratome (Leica V100). L'immunohistochimie est réalisée comme décrit pour la détection de la GFP en utilisant l'anticorps primaire de lapin

anti-dsred (Clontech 632496, dilution 1 :1000) et l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'AlexaFluor 594 (Molecular Probes A-11012, dilution 1 :2000). Si l'amplification de la GFP doit être réalisée en parallèle pour une visualisation simultanée des récepteurs opioïdes mu et delta, la GFP est détectée à l'aide de l'anticorps primaire de poulet anti-GFP (Aves GFP-1020, dilution 1 :1000) et l'anticorps secondaire de chèvre anti-poulet couplé à l'AlexaFluor 488 (Molecular Probes A-11039, dilution 1 :2000). Les sections sont montées en ProLong Gold antifade.

Acquisition d'images

L'acquisition des images est réalisée à l'aide du scanner de lames NanoZoomer S60 et du module de fluorescence L11600-21 (Hamamatsu Photonics, Japon). La source de lumière LX2000 (Hamamatsu Photonics, Japon) consiste en une lampe à mercure sous pression ultra-haute couplée à une fibre optique. Les acquisitions sont réalisées en épifluorescence avec un objectif à sec 20 X (NA 0.75) et la résolution 40 X est obtenue avec un convertisseur de lentille. La colocalisation neuronale est confirmée par microscopie confocale (SP5RS, Leica) à l'aide d'un objectif 63x (NA: 1.4) à huile. Les images sont acquises avec le programme LCS (Leica) en mode séquentiel (longueur d'onde d'excitation: 405, 488 ou 568 nm) pour éviter une interaction potentielle au niveau des longueurs d'onde d'émission.

RESULTATS ET DISCUSSION

La détection de la co-expression neuronale des récepteurs mu et delta est dépendante de la visualisation simultanée des deux signaux fluorescents mais aussi de la capacité à les associer à des structures neuronales identifiables. Ainsi que publié précédemment, les versions fluorescentes des récepteurs mu et delta sont détectées dans toutes les régions du cerveau identifiées comme exprimant les versions sauvages des deux récepteurs [5]. Cependant le niveau d'expression des récepteurs se situe entre 10 et 60 fmol/mg de protéines dans de nombreuses régions du cerveau, et les régions où l'expression est la plus faible peuvent par conséquent ne pas être détectées. La visualisation de la construction mu-mCherry est aisée compte tenu de l'accumulation au niveau intracellulaire de la fluorescence rouge concentrée dans des vésicules ; même dans les neurones avec un faible

niveau d'expression du récepteur. Elle ne nécessite donc pas d'amplification. Aucune différence n'a été observée au niveau de la détection du signal fluorescent entre coupes flottantes réalisées au vibratome ou au cryostat. Dans les deux cas, l'épaisseur de 30 μm permet une pénétration uniforme des anticorps dans toute l'épaisseur du tissu. La détection du récepteur opioïde mu à la surface des neurones a, quant à elle, nécessité plusieurs optimisations [5]. Le temps de post-fixation s'est avéré crucial pour cette étape. Différents temps ont été testés (1h, 2h, 4h, 8h, 16h et 24h) avec un résultat optimal pour 4h de post-fixation. Dans ces conditions, la distribution subcellulaire de la fusion mu-Cherry est similaire à celle du récepteur opioïde mu sauvage détecté avec un anticorps spécifique (**Figure 1**). Par ailleurs, la détection de la protéine mCherry n'a pu être réalisée avec les anticorps monoclonaux disponibles commercialement et n'a été possible qu'avec un anticorps polyclonal de lapin. Ceci est vraisemblablement dû à des contraintes conformationnelles induites par la fusion du récepteur opioïde mu à l'extrémité N-terminale de la protéine fluorescente. Finalement, le choix du milieu de montage s'est également avéré critique pour la visualisation du signal membranaire. Ce dernier est en effet détecté lors du montage en milieu ProLong mais pas d'autres milieux tels que le Mowiol 4-88.

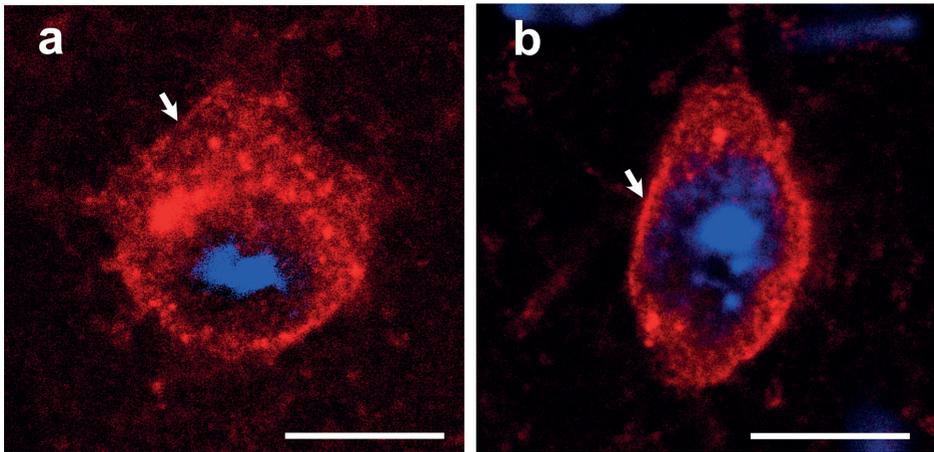


Figure 1 : Visualisation de la fusion mu-mCherry à la membrane plasmique. Images confocales représentatives de la détection de la fusion mu-mCherry à l'aide de l'anticorps dirigé contre la protéine fluorescente (a) ou de la détection du récepteur opioïde mu sauvage à l'aide d'un anticorps spécifique (b). La flèche indique la présence du récepteur à la membrane plasmique. Le noyau est identifié grâce au DAPI (bleu) Barre d'échelle 10 μm .

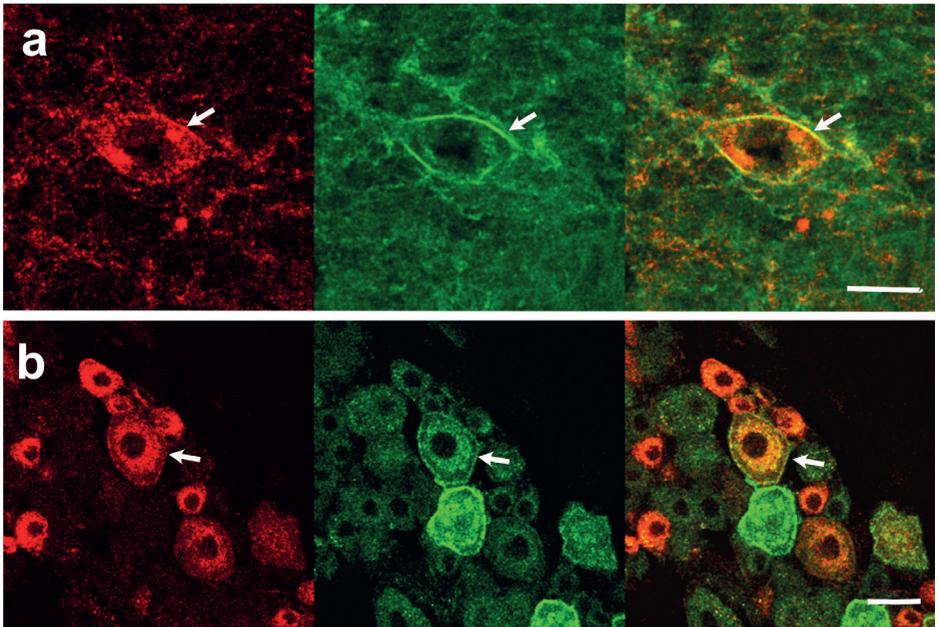


Figure 2 : Co-expression neuronale des récepteurs opioïdes mu et delta dans le cerveau et le système nerveux périphérique en condition basale. Images confocales représentatives montrant la présence de mu-mCherry et delta-eGFP à la membrane plasmique dans l'hippocampe (a) et les ganglions rachidiens (b). Les flèches indiquent la présence des deux récepteurs à la membrane plasmique. Barre d'échelle 10 μ m.

En l'absence de quantités intracellulaires importantes de récepteur delta, la fluorescence verte qui lui est associée est souvent faible et nécessite dès lors d'être amplifiée avec des anticorps spécifiques de la GFP. Une détection similaire est obtenue avec les anticorps primaires polyclonaux générés chez le lapin ou le poulet. L'utilisation de ces derniers permet une amplification simultanée du signal de la mCherry pour la détection des deux récepteurs à la membrane plasmique (**Figure 2**). Par ailleurs, l'administration systémique par injection intrapéritonéale de l'agoniste delta SNC80, 60 minutes avant la perfusion, entraîne l'internalisation des récepteurs qui sont dirigés dans le compartiment lysosomal. La détection des somas en est ainsi facilitée car la fluorescence est alors concentrée dans des vésicules intracellulaires de façon similaire à ce qui est observé avec la fusion mu-mCherry (**Figure 3**). L'amplification du signal fluorescent combiné avec le traitement par l'agoniste améliore donc la sensibilité de notre approche et augmente de façon significative la détection des neurones exprimant le récepteur opioïde delta.

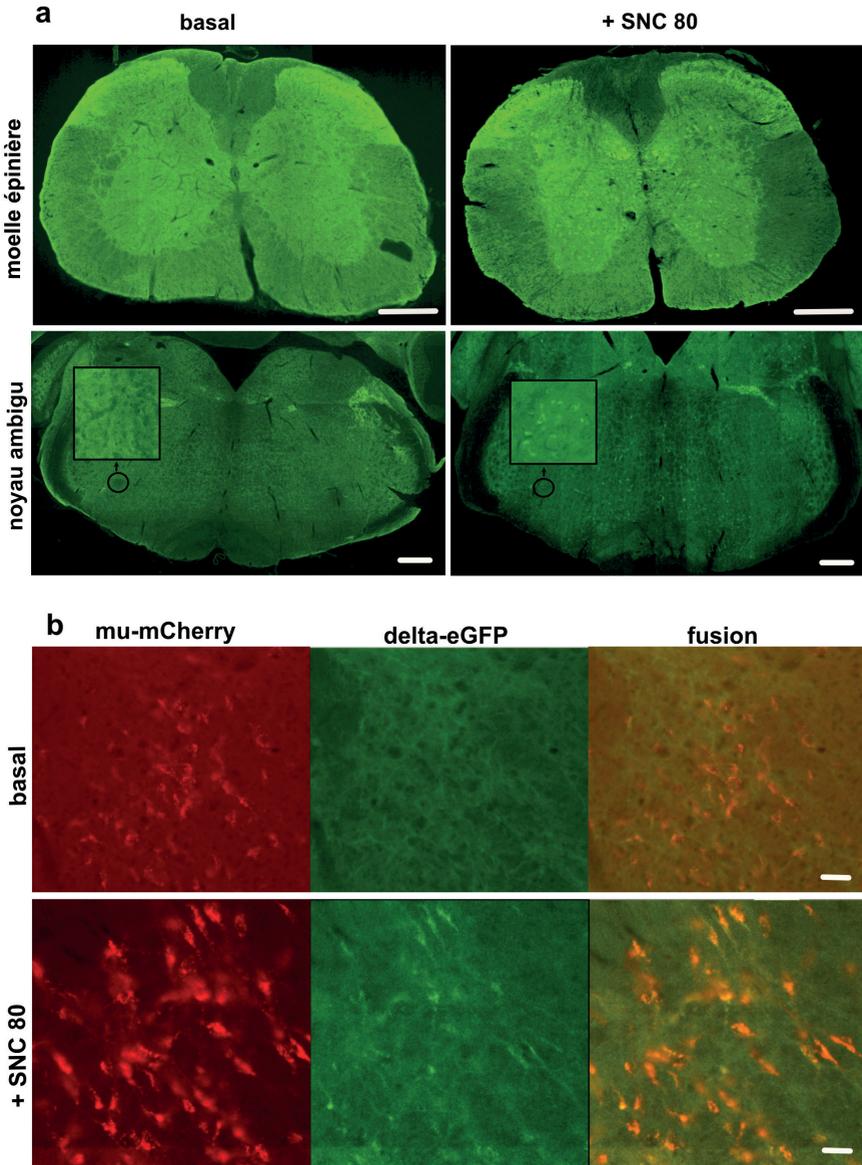


Figure 3 : Visualisation des neurones exprimant la fusion delta-eGFP dans le système nerveux. Images en épifluorescence (a) montrant la détection de la fusion delta-eGFP en l'absence ou après prétraitement par l'agoniste delta SNC 80 et (b) montrant la détection de la co-expression neuronale de mu-mCherry et delta-eGFP en l'absence ou après prétraitement par l'agoniste delta SNC 80. Barre d'échelle 500 μ m (a) et 20 μ m (b).

Un autre élément important à considérer est l'existence de grains de lipofuscine qui s'accumulent dans le cytoplasme et se concentrent autour du noyau [12]. Ce pigment lipophile est particulièrement abondant dans le cerveau postérieur et chez l'animal âgé. L'autofluorescence de la lipofuscine est détectable entre 480 et 660 nm [13]. L'excitation dans l'ultra-violet à une longueur d'onde inférieure à 380 nm permet de la distinguer, notamment en microscopie confocale, des vésicules d'internalisation contenant les fusions fluorescentes des récepteurs qui, elles, ne sont détectées qu'en réponse à une excitation dans le spectre visible.

CONCLUSION

Les optimisations réalisées dans la détection des récepteurs fluorescents nous ont permis d'améliorer leur cartographie dans le système nerveux. Néanmoins, la proportion de neurones mu-mCherry/delta-eGFP détectée représente vraisemblablement une estimation basse de la population des neurones co-exprimant les deux récepteurs car liée au seuil de détection des signaux fluorescents.

Par ailleurs, notre approche a mis en évidence que la co-expression neuronale des récepteurs opioïdes mu et delta est dynamique et constitue un marqueur de l'état pathologique. Associée à l'existence de la proximité physique entre les deux récepteurs, la co-expression neuronale indique donc la présence d'hétéromères mu-delta dans le système nerveux et suggère qu'ils constituent une cible thérapeutique innovante.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés avec le soutien financier de la Fondation pour la Recherche Médicale (DPA20140129364), du CNRS et de l'Université de Strasbourg.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FENG Y., et al.: Current research on opioid receptor function. *Curr Drug Targets*, 2012,**13** (2): 230-246
2. AL-HASANI R. & BRUCHAS M.R.: Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*, 2011,**115** (6): 1363-1381
3. FUJITA W., GOMES I. & DEVI L.A.: Revolution in GPCR Signaling: Opioid receptor heteromers as novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol*, 2014,**171** (18): 4155-4176
4. UGUR M., DEROUICHE L. & MASSOTTE D.: Heteromerization Modulates mu Opioid Receptor Functional Properties *in vivo*. *Front Pharmacol*, 2018,**9** 1240
5. ERBS E., et al. :A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct*, 2015,**220** (2): 677-702
6. GUPTA A., et al.: Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal*, 2010,**3** (131): ra54
7. KABLI N., et al.: Antidepressant-like and anxiolytic-like effects following activation of the mu-delta opioid receptor heteromer in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry*, 2013,**19** (9): 968-994
8. GOMES I., et al.: A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004,**101** (14): 5135-5139
9. HE S.Q., et al.: Facilitation of mu-opioid receptor activity by preventing delta-opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron*, 2011,**69** (1): 120-131
10. XIE W.Y., et al.: Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *J Neurosci*, 2009,**29** (11): 3551-3564
11. PIERRE F., et al.: Morphine-dependent and abstinent mice are characterized by a broader distribution of the neurons co-expressing mu and delta opioid receptors. *Neuropharmacology*, 2019,**152** 30-41
12. DI GUARDO G.: Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *Eur J Histochem*, 2015,**59** (1): 2485
13. MOCHIZUKI Y., et al.: The difference in autofluorescence features of lipofuscin between brain and adrenal. *Zoolog Sci*, 1995,**12** (3): 283-288