

Université de Montréal

# **Identification des résidus essentiels à l'interaction du récepteur CXCR7 avec ses ligands SDF-1 et ITAC**

par

Besma Benredjem

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en biochimie et médecine moléculaire  
option cheminement libre

Août, 2015

© Besma Benredjem, 2015

## Résumé

Les chimiokines sont des petites protéines secrétées dont la fonction principale est la stimulation de la migration de cellules immunitaires vers différents organes et tissus. Elles sont souvent impliquées lors des maladies inflammatoires, auto-immunes et des cancers. Ainsi, les chimiokines et leurs récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont la cible pharmacologique de plusieurs molécules, actuellement testées en essais cliniques.

Nous avons pris comme modèle, lors de notre étude, le récepteur atypique CXCR7. Ce récepteur est dit atypique, car il ne signale pas via la voie classique des protéines G, mais plutôt via la voie de la  $\beta$ -arrestine. CXCR7 est impliqué dans de nombreux cancers, favorise la progression métastatique et est un co-récepteur pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cependant, aucune donnée sur son mode de liaison avec ses ligands CXCL11/ITAC et CXCL12/SDF-1 n'existe à date. Nous pensons que cette information est essentielle pour le développement efficace d'agonistes et d'antagonistes, et nous nous sommes intéressés à identifier les résidus essentiels à la liaison des deux ligands de CXCR7 et à son activation par ces derniers. Pour cela, nous avons créé une série de mutants par substitution ou délétion d'acides aminés de la partie N-terminale, des boucles extracellulaires et des domaines transmembranaires du récepteur. Nous avons testé leur marquage en surface cellulaire par cytométrie en flux, leur liaison des deux ligands par expériences de radio-liaison, et leur capacité à recruter la  $\beta$ -arrestine en réponse aux ligands par essais BRET.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier des résidus importants à l'interaction des systèmes CXCR7/SDF-1 et CXCR7-ITAC et suggèrent des modes de liaison à CXCR7 différents entre ITAC et SDF-1. Tout comme la liaison d'ITAC à son autre récepteur CXCR3, sa liaison à CXCR7 suivrait le mode conventionnel de liaison en deux étapes des récepteurs de chimiokines. Cependant, la liaison de SDF-1 à CXCR7 suivrait un autre mode de liaison, contrairement à sa liaison à son autre récepteur, CXCR4.

**Mots-clés :** CXCR7, RCPG, ACKR, ITAC, SDF-1, CXCR3, CXCR4, interaction ligand/récepteur, résidus chargés, cancer.

## Abstract

Chemokines are small secreted proteins whose major function is to stimulate the migration of immune cells to different organs and tissues. They are often involved in inflammatory and auto-immune diseases as well as cancers. Thus, chemokines and their G proteins Coupled Receptors (GPCR) are the pharmacological target of multiples molecules, currently tested in clinical trials.

The model of our study is the atypical receptor CXCR7. This receptor is called atypical because it doesn't signalize through the classical G protein pathway but rather signalizes through the  $\beta$ -arrestin pathway. CXCR7 is involved in many cancers, promotes metastatic progression and is a co-receptor for human immunodeficiency virus (HIV). However, there are, to date, no data concerning its binding mode to its ligands CXCL11/ITAC and CXCL12/SDF-1. We think that this information is crucial for the efficient development of agonists and antagonists and thus decided to identify the residus that are important for the binding of the two ligands of CXCR7 to the receptor and its subsequent activation. For that, we created a set of mutants by substitution or deletion of amino acids of the N-terminus, extracellular loops and transmembrane domains of the receptor. We then tested their surface expression by antibody staining and flow cytometry, their binding of the two ligands by binding assays and their capability to recruit  $\beta$ -arrestin in response to the ligands by BRET assays.

The results obtained allowed us to identify important residues for the interaction of the systems CXCR7/SDF-1 and CXCR7/ITAC. They also suggest different binding modes of the chemokines ITAC and SDF-1 to CXCR7. Just like the binding of ITAC to its other receptor CXCR3, the binding mode of ITAC to CXCR7 follows the conventional two steps binding model of chemokine receptors. However, the binding of SDF-1 to CXCR7 follows another binding mode than the classical two step model, unlike its binding to its other receptor CXCR4.

**Keywords:** CXCR7, GPCR, ACKR, ITAC, SDF-1, CXCR3, CXCR4, cancer, interaction ligand/receptor, charged residues.

Table des matières	
Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
1. Introduction.....	1
1.1. Les récepteurs couplés aux protéines G .....	1
1.1.1. Généralités .....	1
1.1.2. Classification et nomenclature.....	3
1.2. Les chimiokines et leurs récepteurs .....	4
1.2.1. Généralités .....	4
1.2.2. Structure et nomenclature des chimiokines .....	5
1.2.3. Classification fonctionnelle des chimiokines.....	7
1.2.4. Les récepteurs de chimiokines .....	8
1.3. Modèle de liaison en deux étapes et de signalisation des récepteurs de chimiokines ...	10
1.3.1. Modèle de liaison et d'activation en deux étapes .....	10
1.3.2. Modes de signalisation des récepteurs de chimiokines.....	12
1.4. CXCR7 .....	17
1.4.1. Généralités .....	17
1.4.2. Fonctions .....	18
1.4.3. CXCR7 et maladies .....	18
1.5. Les récepteurs alternatifs des ligands de CXCR7 (SDF-1 et ITAC) : CXCR4 et CXCR3.....	19
1.5.1. Système CXCR4/SDF-1 .....	20
1.5.2. CXCR4 et CXCR7 .....	21
1.5.3. Système CXCR3/ITAC.....	22

1.5.4. CXCR7 et CXCR3 .....	23
1.6. CXCR7 en tant que cible thérapeutique.....	23
2. Objectifs du projet .....	1
3. Matériels et méthodes .....	27
3.1. Réactifs et lignée cellulaire .....	27
3.2. Plasmides et mutagenèse .....	28
3.3. Culture cellulaire et transfection.....	28
3.4. Détection du marquage en surface cellulaire des mutants CXCR7 par cytométrie en flux (FACS) .....	29
3.5. Test de recrutement de $\beta$ -arrestine 2 par essais de BRET .....	30
3.5.1. Protocole expérimental .....	30
3.5.2. Principe du BRET .....	30
3.5.3. Notions de pharmacologie .....	33
3.6. Essais de radio-liaison par compétition .....	35
3.6.1. Protocole expérimental .....	35
3.6.2. Courbes de radio-liaison .....	36
3.7. Analyse statistique .....	39
4. Résultats .....	40
4.1. Mutagenèse et CXCR7 WT .....	40
4.2. Expression en surface des mutants .....	45
4.3. Rôle structurel et fonctionnel des Cystéines du N-terminal .....	49
4.4. Rôle structurel et fonctionnel du domaine N-terminal .....	54
4.4.1. Délétions .....	54
4.4.2. Mutations de résidus chargés de la région proximale du N-terminal .....	56
4.5. Rôle structurel et fonctionnel des boucles extracellulaires (ECL).....	58
4.5.1. Mutations des résidus chargés de la première boucle extracellulaire (ECL1) .....	61
4.5.2. Mutations des résidus chargés de la deuxième boucle extracellulaire (ECL2) .....	63
4.5.3. Rôle de la troisième boucle extracellulaire (ECL3).....	68
4.6. Rôle structurel et fonctionnel des domaines transmembranaires (TM).....	70
5. Discussion.....	75

5.1. Interaction entre le N-terminal de CXCR7 et ses ligands .....	77
5.1.1. Importance différente du N-terminal de CXCR7 pour la liaison de SDF-1 et ITAC .....	77
5.1.2. La troisième cystéine du N-terminal de CXCR7 engage le pont disulfure avec l'ECL3.....	79
5.2. Rôle des boucles extracellulaires .....	80
5.2.1. Le résidu acide de la première boucle aiderait à stabiliser la structure CXCR7 pour son interaction avec ses ligands .....	81
5.2.2. Les résidus chargés de l'ECL2 interviennent dans la liaison de haute affinité des ligands ainsi que l'activation du récepteur CXCR7.....	81
5.2.3. Les résidus chargés de l'ECL3 interviennent dans la liaison aux ligands et l'activation de CXCR7 en réponse à ITAC .....	84
5.3. Rôle des domaines transmembranaires de CXCR7 : .....	86
5. 3.1. Le résidu D90 (2.50) est essentiel pour la liaison d'ITAC à CXCR7 et son activité .....	86
5. 3.2. Le résidu non chargé Q301 (7.39) est essentiel pour l'activation du récepteur en réponse à SDF-1 et ITAC .....	87
5.4. Modes d'interaction entre CXCR7 et SDF-1/ ITAC .....	87
Conclusion .....	96
Perspectives.....	97
Bibliographie.....	98
Annexe 1. Essais de marquage en surface, de liaison de la chimiokine SDF-1 et de recrutement de $\beta$ -arrestine en réponse à ITAC et SDF-1 des mutants de la région N-terminale de CXCR7.....	i
Annexe 2. Marquage en surface des mutants de la région N-terminale de CXCR7.....	ii

## Liste des tableaux

<b>Tableau I. Tableau récapitulatif des mutants de la région N-terminale, des boucles extracellulaires et des domaines transmembranaires de CXCR7.</b> .....	42
<b>Tableau II. Résultats des essais de marquage en surface cellulaire, de recrutement de <math>\beta</math>-arrestine et de liaison des chimiokines ITAC et SDF-1 des mutants du domaine N-terminal de CXCR7.</b> .....	53
<b>Tableau III. Résultats des essais de marquage en surface cellulaire, de recrutement de <math>\beta</math>-arrestine et de liaison des chimiokines ITAC et SDF-1 des mutants des ECL.</b> .....	60
<b>Tableau IV. Résultats des essais de marquage en surface cellulaire, de recrutement de <math>\beta</math>-arrestine et de liaison des chimiokines ITAC et SDF-1 des mutants des domaines TM de CXCR7.</b> .....	74
<b>Tableau V. Résidus importants pour l'interaction de CXCR3 et CXCR4 avec ITAC et SDF-1 et leurs équivalents chez CXCR7.</b> .....	76

## Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique simplifiée de la structure générale d'un récepteur couplé aux protéines G. ....	2
Figure 2. Représentation de la structure 3D d'une chimiokine.....	6
Figure 3. Structure d'un récepteur de chimiokines.....	9
Figure 4. Modèle d'activation en deux étapes du récepteur CXCR4 par SDF-1.....	11
Figure 5. Régulation de l'interaction récepteur-ligand par désensibilisation, internalisation, recyclage ou dégradation du récepteur.....	14
Figure 6. Représentation des interactions intracellulaires entre les CXCR3, CXCR4 et CXCR7.....	25
Figure 7. Essai de recrutement de $\beta$ -arrestine. ....	32
Figure 8. Notion de courbe dose-réponse.....	34
Figure 9. Courbes de radio-liaison par compétition/déplacement. ....	38
Figure 10. Représentation schématique de CXCR7 et des résidus mutés. ....	41
Figure 11. Les récepteurs CXCR7 WT sont exprimés à la surface des cellules HEK293E transfectées, lient SDF-1 et ITAC et recrutent la $\beta$ -arrestine.....	44
Figure 12. Faibles marquages et disproportions de marquage en surface cellulaire, par les anticorps APC 358426 et APC 11G8, de certains mutants de CXCR7. ....	48
Figure 13. Le mutant CCSS2-3 est faiblement marqué en surface et ne recrute pas de $\beta$ -arrestine à 200nM de ligands, contrairement au mutant CCSS1-2.....	50
Figure 14. Le double mutant CCSS2-3 ne lie pas SDF-1 et ITAC et recrute très peu de $\beta$ -arrestine en essai BRET dose-réponse. ....	52
Figure 15. La liaison d'ITAC aux récepteurs est fortement altérée par les délétions $\Delta$ 2-3 et $\Delta$ 2-9, le recrutement de $\beta$ -arrestine en réponse à SDF-1 et ITAC est fortement diminué par la délétion $\Delta$ 2-9.....	55
Figure 16. Les mutants du résidu chargé positivement du N-terminal, K40A et K40R, sont exprimés en surface, lient SDF-1 et ITAC et recrutent normalement la $\beta$ -arrestine à 200nM de ligands .....	57

<b>Figure 17. Les mutants de résidus chargés des boucles extracellulaires sont exprimés en surface et recrutent normalement la <math>\beta</math>-arrestine aux concentrations de 200nM de ligands..</b>	<b>59</b>
<b>Figure 18. Le mutant du résidu acide de l'ECL1 E114Q est exprimé en surface, lie SDF-1 avec une plus faible affinité, et recrute la <math>\beta</math>-arrestine en réponse à SDF-1 et ITAC avec des valeurs de CE50 supérieures à celles du récepteur WT.</b>	<b>62</b>
<b>Figure 19. Identification de mutants de résidus chargés de l'ECL2 importants pour la liaison des ligands et la signalisation du récepteur CXCR7.....</b>	<b>67</b>
<b>Figure 20. Le mutant de l'ECL3 D275A ne lie pas SDF-1 et recrute peu de <math>\beta</math>-arrestine en réponse à SDF-1 et ITAC; le mutant E290Q a une affinité plus faible pour le SDF-1.....</b>	<b>69</b>
<b>Figure 21. Le mutant D90N ne recrute pas de <math>\beta</math>-arrestine en réponse au SDF-1 et le mutant Q301E ne recrute pas de <math>\beta</math>-arrestine en réponse au SDF-1 et ITAC aux concentrations de 200nM de ligands.</b>	<b>71</b>
<b>Figure 22. Le mutant D90N ne lie pas ITAC et ne recrute pas de <math>\beta</math>-arrestine après stimulation par ce dernier; le mutant Q301E lie SDF-1 et ITAC mais ne recrute pas de <math>\beta</math>-arrestine suite à une stimulation par ces deux ligands.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 23. Représentation schématique des résidus importants pour l'activité et la liaison des chimiokines SDF-1 et ITAC au récepteur CXCR7..</b>	<b>91</b>
<b>Figure 24. Modes d'interaction CXCR3/ITAC et CXCR7/ITAC..</b>	<b>93</b>
<b>Figure 25. Modes d'interaction CXCR4/SDF-1 et CXCR7/SDF-1.</b>	<b>94</b>
<b>Figure 26. Comparaison des modes d'interaction CXCR3/CXCR7/ITAC et CXCR4/CXCR7/SDF-1.</b>	<b>95</b>

## Liste des abréviations

A: Alanine

APC: Allophycocianine

$\beta$ -arrestine : Béta-arrestine

BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfert

C/Cys: Cystéine

CE50 : Concentration Efficace Médiane

CI50 : Concentration Inhibitrice Médiane

D/Asp: Acide aspartique

E :

ECL: Extra Cellular loops (Boucles extra cellulaires)

F/Phe: Phenylalanine

Fig: Figure

HEK: Human Embryonic Kidney

ICL: Intra Cellular Loops (Boucles intra cellulaires)

ITAC : Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant

K: Lysine

N/Asn: Asparagine

P/ Pro: Proline

PAO: Phenylarsine Oxide

PBS: Phosphate Buffer Saline

PEI : Polyethyleneimine

Q :

R/Arg: Arginine

RCPG: Récepteur couple aux protéines G

Rluc: Renilla Luciférase

S: Sérine

SDF-1: Stromal cell-derived factor 1

T: Thréonine

TM: Transmembrane domains

W/ Trp: Tryptophan

WT: Wild type

Y: Tyrosine

YFP: Yellow Fluorescent Protein

*If you can't explain it to a six year old, you don't understand it yourself*

*To begin, begin*

*You can't climb the ladder of success with your hands in your pocket*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma famille qui a toujours été présente pour moi, plus particulièrement mes parents, qui m'ont toujours supporté tout au long de ma vie et de mes études et qui m'ont apporté tous les conseils et outils nécessaires à ma réussite. Une pensée particulière à mes petites sœurs qui m'ont également toujours soutenu et débordé d'affection, sans oublier ma chère grand-mère et mes oncles et tantes qui m'ont tant donné depuis mon enfance et m'ont aidé à devenir la personne que je suis aujourd'hui.

Je tiens également à remercier le Dr. Nikolaus Heveker qui m'a accueilli dans son laboratoire dans le cadre de ma maîtrise et m'a encadré de la meilleure façon qu'il soit. Je le remercie pour ses conseils scientifiques, sa présence continue ainsi que sa patience.

Également, je remercie tous les membres du laboratoire : Geneviève St-Onge, Nicolas Montpas, Marilou Lefrançois et François Guitet-Vinet pour leur présence et leur aide tout au long de ma maîtrise.

Enfin, je tiens à remercier ces personnes spéciales qui m'ont accompagné toutes ces années et avec qui j'ai partagé et continuerai de partager d'inoubliables moments : Narimane Boulouf, Yasmine Boudjellal, Amine Zaghmani, Mounia Benbelkacem, Nassim Achour, Yasmine Ahdjoudj, Yacine Boukirat, Walid Bouhadji, et Yasmine Taouint ainsi que tous ceux que je n'ai pas mentionnés.

# 1. Introduction :

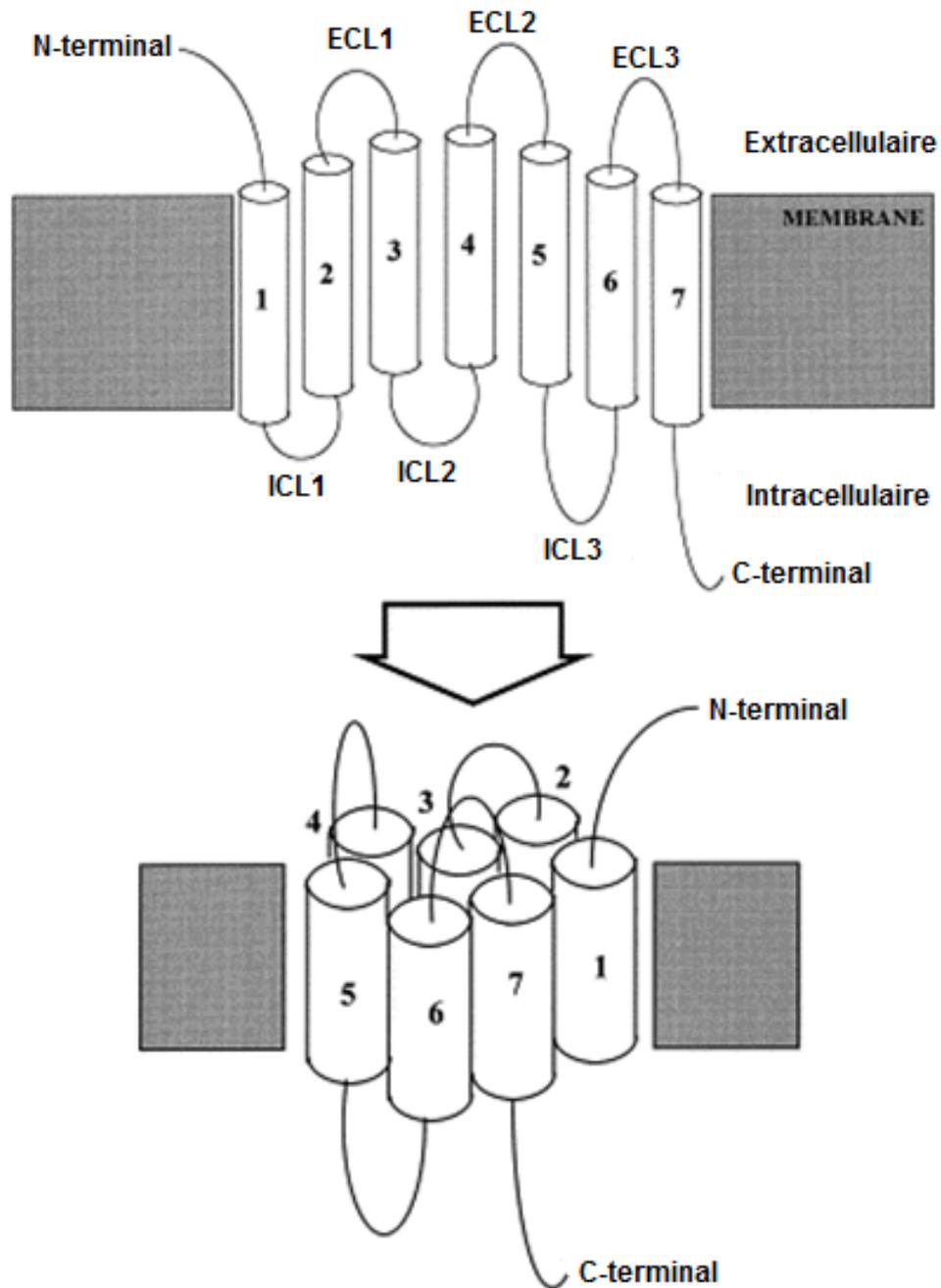
## 1.1 . Les récepteurs couplés aux protéines G :

### 1.1.1. Généralités :

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont l'une des familles les plus importantes de récepteurs membranaires chez les mammifères, comprenant environ 800 membres chez l'humain (Bjarnadottir et al., 2006; Venter et al., 2001). Ils sont caractérisés par la présence de sept hélices  $\alpha$  transmembranaires (dites domaines TM) connectées par des boucles intra- et extracellulaires (dites ICL et ECL respectivement), et possèdent un domaine N-terminal extracellulaire ainsi qu'un domaine C-terminal intracellulaire (Shenoy, 2007). Les récepteurs couplés aux protéines G sont également appelés récepteurs à sept segments transmembranaires ou récepteurs à 7-STM. Une vaste variété de ligands et de stimuli, pouvant aller des petites protéines aux photons, sont capables d'activer les RCPG (Bockaert et al., 1999) faisant qu'ils interviennent dans la plupart des fonctions de l'organisme. Une représentation schématique simplifiée de l'aspect général d'un récepteur couplé aux protéines G est montrée sur la figure 1.

D'un point de vue structural, les hélices transmembranaires des RCPG sont organisées de façon circulaire dans le sens opposé des aiguilles d'une montre entourant une poche de liaison de ligand (Vauquelin et al., 2008) (fig.1). Les RCPG peuvent avoir des ponts disulfures entre les résidus cystéines des boucles extracellulaires, dont un pont entre l'ECL1 et l'ECL2 hautement conservé et important pour la fonction et la stabilité du récepteur (Venkatakrishnan et al., 2013). Ils peuvent également avoir des sites de glycosylation dans le domaine N-terminal ainsi que des sites de phosphorylation dans les domaines C- et N-terminaux et dans les boucles intracellulaires (Vauquelin et al., 2008).

Les RCPG représentent une cible thérapeutique de choix; il est estimé qu'environ 50% de ces récepteurs ont fait l'objet d'essais cliniques (Rovira et al., 2010) et à peu près 30% des petites molécules thérapeutiques approuvées par la *Food and Drug Administration (FDA)* visent les RCPG (Hopkins et al., 2002).



**Figure 1. Représentation schématique simplifiée de la structure générale d'un récepteur couplé aux protéines G.** La figure du haut représente la structure simplifiée d'un RCPG avec ses sept domaines TM, ses boucles intra- et extracellulaires ainsi que ses domaines N-terminal et C-terminal. La figure du bas représente la représentation 3D simplifiée de l'organisation des domaines TM dans le sens opposé des aiguilles d'une montre. Figure tirée et modifiée de (Flower, 1999). L'autorisation d'utiliser la figure a été accordée par Elsevier.

### 1.1.2. Classification et nomenclature:

De récentes études phylogénétiques ont permis de classer les récepteurs couplés aux protéines G en cinq classes suivant le système de classification de GRAFS (l'acronyme désignant les cinq classes) : *Glutamate* (classe C), *Rhodospin* (classe A), *Adhesion* (classe D), *Frizzled* (classe E) et *Secretin* (Classe B) (Schioth et al., 2005). La classe A des RCPG ou classe des récepteurs « rhodopsin-like » est la classe la plus large et la plus étudiée (Vauquelin et al., 2008). Cette classe peut encore être subdivisée en sous-familles et, parmi celles-ci, on retrouve la grande famille des récepteurs de chimiokines. Un intérêt plus particulier sera porté à cette famille de récepteurs car c'est à cette dernière qu'appartient le récepteur d'intérêt de la présente étude, qui est le récepteur de chimiokines CXCR7.

De par leur grande diversité, les récepteurs de classe A n'ont pas beaucoup d'homologies entre eux. Il existe néanmoins des résidus hautement conservés et qui sont essentiels pour la fonction du récepteur. Plus particulièrement, un résidu arginine (R) est conservé chez tous les récepteurs de classe A, ce dernier fait parti du motif Asp/Glu-Arg-Tyr (D/ERY) de la troisième hélice transmembranaire (TM3) (Vauquelin et al., 2008).

Dans le but de pouvoir efficacement comparer les résidus entre les différents membres de la classe A, des systèmes de nomenclature de résidus ont été mis en place. Parmi les plus utilisés, on retrouve la nomenclature de Ballesteros-Weinstein selon laquelle le résidu le plus conservé de chaque domaine transmembranaire se voit attribué le numéro 50, chaque autre résidu est numéroté selon sa position relative à ce résidu. Le numéro du domaine TM dans lequel se situe le résidu s'écrit en premier (Ballesteros et al., 1995). Par exemple: 5.55 indique le résidu localisé cinq acides aminés après le résidu le plus conservé du TM5 (Pro 5.50).

Les différents résidus conservés dans chaque domaine sont : Asn1.50 (N), Asp2.50 (D), Arg 3.50 (R), Trp 4.50 (W), Pro5.50 (P), Pro 6.50 (P) et Pro 7.50 (P).

Cette nomenclature sera utilisée tout le long du mémoire et permettra de comparer des résidus du récepteur CXCR7 à ceux d'autres récepteurs.

## **1.2 . Les chimiokines et leurs récepteurs:**

### **1.2.1. Généralités :**

Les chimiokines sont une famille de petites protéines sécrétées solubles, appelées cytokines, généralement constituées de 67 à 127 acides aminés et qui sont exprimées à différents niveaux anatomiques. Elles sont les ligands des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de classe A (O'Hayre et al., 2010)- tels que mentionné dans la section précédente. Leur fonction principale est la stimulation de la migration de cellules immunitaires vers différents tissus et organes aussi bien au cours de la réponse immunitaire innée qu'adaptative (Schall et al., 2011); ce sont des chimio-attractants. On qualifie de chimiotaxie ce phénomène de migration de cellules vers une direction déterminée: elle se fait suivant un gradient de concentration de chimiokines (Allegretti et al., 2008).

La chimiotaxie est un type de migration essentiel à l'organisme: elle est impliquée dans les premières phases de développement embryonnaire en stimulant la migration des progéniteurs cellulaires; dans les phases tardives en stimulant la migration des cellules neuronales et immunitaires; mais également dans d'autres fonctions biologiques chez l'adulte telles que l'hématopoïèse, l'angiogénèse ou encore la prolifération cellulaire (Schall et al., 2011; Wolf et al., 2008).

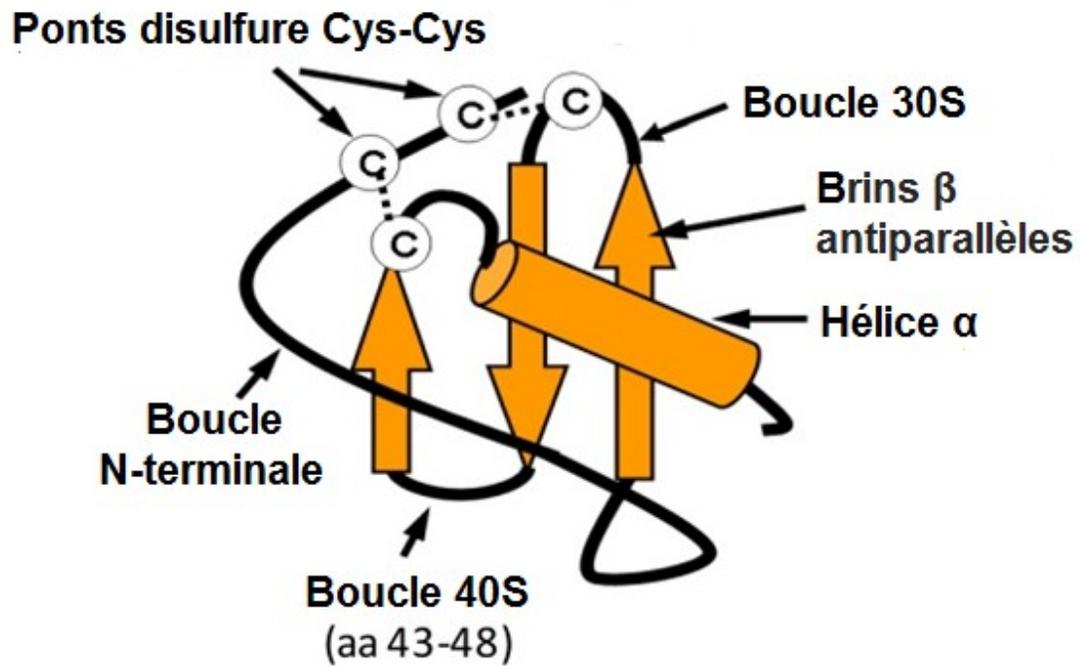
Une sécrétion excessive ou mal régulée des chimiokines est associée à des maladies inflammatoires ou auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose ou le diabète; où sont impliqués les récepteurs de chimiokines CCR1 et CCR2 (Schall et al., 2011). De par leur implication dans de nombreuses maladies et dans le but de mieux comprendre la signalisation qu'elles engendrent, les chimiokines et leurs récepteurs représentent un axe de recherche de plus en plus étudié.

### Notion de promiscuité/redondance du système récepteurs/chimiokines :

Le réseau des chimiokines est très complexe: on connaît actuellement près de 50 gènes codant pour les chimiokines et des gènes codant pour plus de 20 récepteurs de chimiokines. Il est à noter qu'il existe une disparité entre le nombre de chimiokines et le nombre de leurs récepteurs. Cette disparité s'explique par le fait qu'une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs et que, réciproquement, un récepteur peut lier plusieurs chimiokines: on parle de phénomène de promiscuité ligands-récepteurs des chimiokines (Murphy et al., 2000). Ceci a mené à croire qu'il existait une certaine redondance du système récepteur/chimiokine ; voulant dire que ces différentes liaisons récepteurs/chimiokines aboutiraient aux mêmes effets biologiques. Cependant, de plus en plus d'évidences s'opposant à cette notion de redondance, et selon lesquelles la liaison de plusieurs chimiokines à un récepteur ou celle d'une chimiokine à différents récepteurs n'aboutiraient pas forcément à la même réponse fonctionnelle voient le jour (Schall et al., 2011). Le récepteur de la présente étude, CXCR7, et ses ligands sont un exemple de ce phénomène de promiscuité puisqu'il est capable de lier deux chimiokines : CXCL11/ITAC et CXCL12/SDF-1. De plus, ces deux chimiokines peuvent également, à leur tour, se lier à d'autres récepteurs : soit CXCR4 pour SDF-1 et CXCR3 pour ITAC. Cette notion de redondance sera reprise plus tard et discutée dans le cas de notre système CXCR7/SDF-1/ITAC.

### **1.2.2. Structure et nomenclature des chimiokines :**

La structure tridimensionnelle en « clé grecque » d'une chimiokine est représentée sur la figure 2. Il a été montré que la région N-terminale de la chimiokine ainsi que la boucle 30s jouaient un rôle essentiel dans l'activation du récepteur (Govaerts et al., 2001; Nedjai et al., 2012). Des mutations ou délétions de ces parties entraînent souvent une perte d'activité du récepteur, notamment pour la chimiokine SDF-1 (Clark-Lewis et al., 1994; Crump et al., 1997). L'importance de ces régions sera expliquée plus bas.



**Figure 2. Représentation de la structure 3D d'une chimiokine.** Les chimiokines possèdent quatre cystéines conservées qui aident à modeler la structure « en clé grecque » caractéristique des chimiokine: elles comportent une région N-terminale, une région C-terminale ainsi que trois brins  $\beta$  antiparallèles et deux hélices reliées entre elles par les boucles 30s, 40s et 50s (Fernandez et al., 2002). Figure modifiée et tirée de (Kohidai, 2006). L'autorisation d'utiliser la figure a été accordée par Creative Commons.

### Nomenclature des chimiokines :

D'un point de vue structural, les chimiokines ont comme caractéristique la présence de quatre résidus cystéines conservés qui forment deux ponts disulfures (fig.2). Selon le nombre et la position des cystéines conservées en N-terminal, les chimiokines peuvent être classées en quatre sous-groupes: CC, CXC, XC et CX3C. Les deux principaux groupes de chimiokines contiennent deux cystéines adjacentes en N-terminal (CC) ou séparées par un acide aminé (CXC). Les deux groupes minoritaires ont soit une seule cystéine en N-terminal (XC), soit deux cystéines séparées par trois acides aminés (CX3C).

Afin de nommer une chimiokine, la lettre L (pour « ligand ») est ajoutée après le nom de la classe suivie d'un numéro selon l'ordre chronologique de sa découverte comme par exemple : CCL1, CXCL10, CXC3C1 etc... La nomenclature du récepteur correspondant est similaire à celle de sa chimiokine en remplaçant la lettre L par la lettre R (pour « récepteur ») suivi d'un numéro qui n'est pas forcément le même que celui de son ligand (Murphy et al., 2000). Le récepteur d'intérêt de la présente étude, CXCR7, a pour ligands les deux chimiokines CXCL11 et CXCL12, toutes deux appartenant à la classe CXC des chimiokines. Il est à noter qu'en plus de cette nomenclature systématique, les chimiokines ont également une nomenclature historique qui est encore largement utilisée (Allen et al., 2007): ainsi, les chimiokines CXCL11 et CXCL12 sont également connues sous les noms d'ITAC (interferon-inducible T-cell alpha-chemokine) et de SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) respectivement. Afin de pouvoir facilement faire la distinction entre les deux chimiokines, les nomenclatures « ITAC » et « SDF-1 » seront retenues tout le long du mémoire.

### **1.2.3. Classification fonctionnelle des chimiokines:**

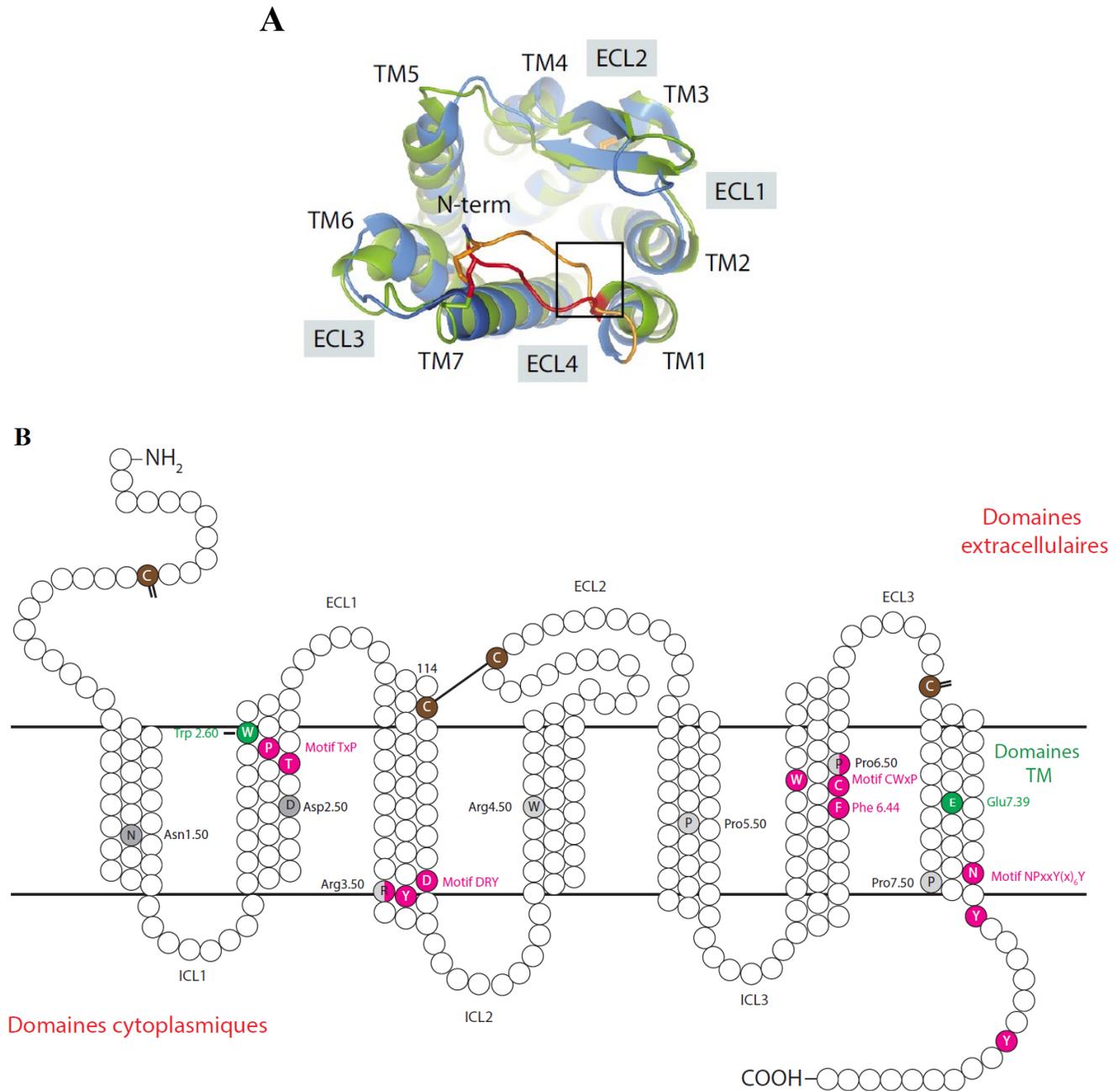
Selon le type de réponse qu'elles enclenchent, les chimiokines peuvent être divisées en deux sous-groupes: le premier sous-groupe est celui des chimiokines inflammatoires, leur expression est inductible et elles ont pour rôle de recruter les leucocytes suite à une réponse inflammatoire ou une blessure (Wolf et al., 2008). C'est à cette catégorie de chimiokine qu'appartient la première chimiokine d'intérêt de l'étude : ITAC.

Le deuxième sous-groupe est celui des chimiokines homéostatiques, dont l'expression est constitutive. Elles dirigent la migration des leucocytes aux organes lymphoïdes secondaires pour leur différenciation et maturation, et sont impliquées dans l'hématopoïèse et la surveillance des tissus périphériques (Wolf et al., 2008). C'est à cette catégorie de chimiokines qu'appartient la deuxième protéine d'intérêt de l'étude : SDF-1 (Teicher et al., 2010) .

#### **1.2.4. Les récepteurs de chimiokines :**

Les récepteurs de chimiokines sont retrouvés à la surface de nombreuses populations de cellules immunitaires (Schall et al., 2011). D'un point de vue structural, ils possèdent trois boucles extracellulaires (ECL) et trois boucles intracellulaires (ICL) et sont caractérisés par la présence de deux ponts disulfures qui aident à stabiliser la structure et la conformation 3D du récepteur (fig.3.B). Le premier pont, commun à tous les RCPG de classe A, se fait entre l'ECL1 et l'ECL2 et joue un rôle important dans la fonction et la stabilité du récepteur (Venkatakrishnan et al., 2013). Le deuxième pont, spécifique aux récepteurs de chimiokines, se fait entre le N-terminal et l'ECL3 du récepteur et aboutit à la formation d'une petite boucle extracellulaire supplémentaire, appelée « ECL4 », connectant le TM1 et TM7 (figure 3.A). Ce pont joue un rôle dans la liaison du ligand, la stabilisation de la structure du récepteur, ainsi que dans sa fonction (Nomiyama et al., 2015; Nygaard et al., 2009; Rana et al., 2010; Szpakowska et al., 2014). Cette notion de pont N-terminal-ECL3 est importante pour la suite du mémoire.

Il existe un certain nombre de résidus et motifs conservés qui interviennent dans l'activation des récepteurs de chimiokines: lorsqu'une chimiokine se lie à son récepteur, il y a un réarrangement des domaines TM qui permet le passage de la conformation inactive à la conformation active du récepteur. On qualifie de « micro-switches » (en français : micro-interrupteurs) les déterminants conservés impliqués dans ces réarrangements moléculaires (Nygaard et al., 2009; Schwartz et al., 2006). L'ensemble des motifs et « micro-switches » conservés chez les récepteurs de chimiokines sont cités dans l'article de Nomiyama et al. (Nomiyama et al., 2015). Parmi ces « micro-switches » se trouvent le motif hautement conservé E/DRY constitué de la séquence DRYLAIV ainsi que le résidu Glu7.39 et qui seront repris plus tard (figure.3.B).



**Figure 3. Structure d'un récepteur de chimiokines.** (A) Comparaison de structures entre les récepteurs de chimiokines CXCR4 (Bleu) et CCR5 (Vert). L'ECL4 est représentée en orange pour CXCR4 et en rouge pour CCR5 (Szpakowska et al., 2014). L'autorisation d'utiliser la figure a été accordée par l'AAAS. (B) Représentation schématique de la structure d'un récepteur de chimiokines classique : les résidus constituant des motifs conservés sont en rose, les résidus les plus conservés de chaque TM sont en gris, les résidus interagissant avec les « micro-switches » sont en vert et les cystéines impliquées dans les ponts disulfures sont en marron (Nomiya et al., 2015).

### Récepteurs de chimiokines atypiques :

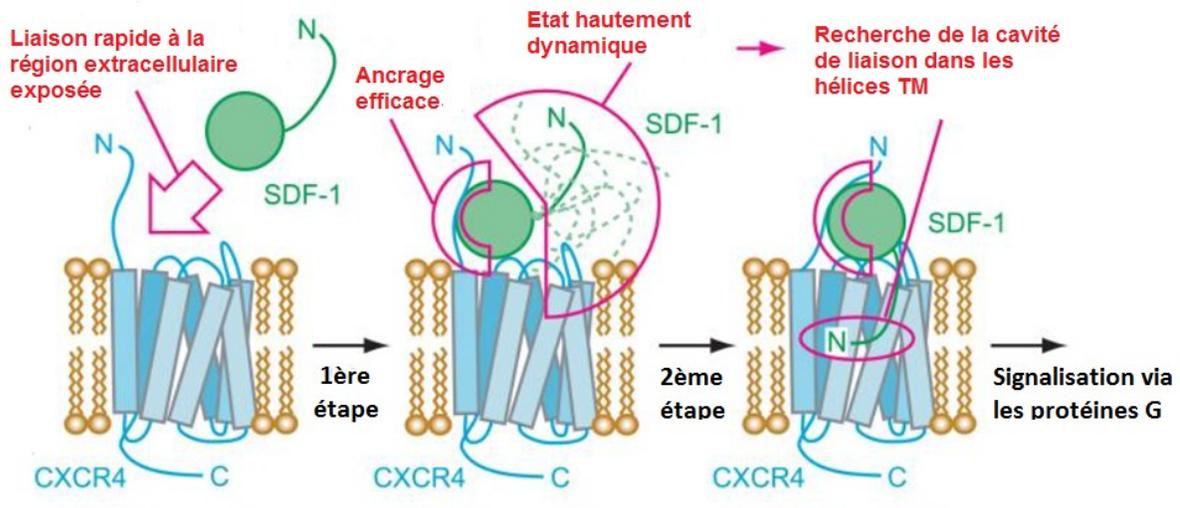
Il a été mentionné précédemment que la fonction principale des chimiokines était la chimiotaxie, il existe cependant des récepteurs de chimiokines qui n'induisent pas de chimiotaxie et qui signalisent autrement que les récepteurs classiques: ces récepteurs sont appelés ACKRs pour *Atypical Chemokine Receptors* et seront revus un peu plus bas. C'est à cette famille de récepteurs qu'appartient le récepteur d'intérêt de l'étude, CXCR7, également appelé ACKR3 (Bachelier et al., 2014).

## **1.3 . Modèle de liaison en deux étapes et de signalisation des récepteurs de chimiokines:**

### **1.3.1. Modèle de liaison et d'activation en deux étapes :**

La reconnaissance de la chimiokine se fait principalement par la partie N- terminale et les boucles extracellulaires de son récepteur suivant un modèle de liaison et d'activation en deux étapes: ce modèle en deux étapes a d'abord été proposé pour le récepteur C5a (Siciliano et al., 1994), et a ensuite été décrit chez de nombreux récepteurs de chimiokines tels que CCR2 (Montecclaro et al., 1997), CCR7 (Ott et al., 2004), CX3CR1 (Chen et al., 2006), CXCR3 (Colvin et al., 2006) ou encore CXCR4 (Brelot et al., 2000; Crump et al., 1997). Le modèle d'activation de ce dernier est représenté sur la figure 4.

Selon ce modèle de liaison en deux étapes, il y aurait d'abord une interaction de haute affinité entre le centre globulaire de la chimiokine– notamment la boucle 30s mentionnée dans la section **1.2.2.** – et les régions N-terminale et ECL2 du récepteur (appelé site I). On qualifie ces régions du récepteur de «sites de reconnaissance de chimiokines » ou SRC; ces sites définissent la spécificité et l'affinité des ligands pour le récepteur. De ce fait, plusieurs ligands d'un même récepteur peuvent avoir des sites de reconnaissance différents (Montecclaro et al., 1996; Nomiya et al., 2015; Rajagopalan et al., 2006). Enfin, la sulfatation des tyrosines du N-terminal des récepteurs est souvent essentielle pour la liaison des ligands (Ludeman et al., 2014; Szpakowska et al., 2012).



**Figure 4. Modèle d'activation en deux étapes du récepteur CXCR4 par SDF-1.** Une première interaction entre les résidus chargés positivement de la chimiokine et les résidus chargés négativement du N-terminal et des boucles du récepteur constitue le site I de liaison. Par la suite, une deuxième interaction entre le N-terminal de la chimiokine et la poche de liaison formée par les domaines TM du récepteur a lieu au niveau d'un site II. Figure modifiée et tirée de (Kofuku et al., 2009). L'autorisation d'utiliser la figure a été accordée par l'ASBMB.

Les interactions au niveau du site I sont d'ordre électrostatique et se font entre les résidus chargés de la chimiokine et les résidus chargés du N-terminal du récepteur. Ainsi, dans le cas de CXCR4 par exemple, des résidus chargés négativement sont essentiels pour la liaison de SDF-1 à son récepteur (Wu et al., 2010). Il est à noter que les chimiokines de CXCR7, ITAC et SDF-1, sont toutes deux positivement chargées (Colvin et al., 2006; Murphy et al., 2007). Cette donnée est importante à garder en tête pour la suite de l'étude.

La deuxième étape de liaison, et qui mène à l'activation du récepteur, consiste en des interactions supposées de basse affinité entre le N-terminal de la chimiokine et une poche de liaison formée de boucles extracellulaires et les parties extracellulaires des domaines TM3,4,5,6 et 7 du récepteur (site II) (Nygaard et al., 2009). Les interactions avec le site II sont importantes pour la stabilisation de la conformation active du récepteur et se font avec des résidus clés des boucles et domaine TM (Clark-Lewis et al., 1995; Siciliano et al., 1994; Wells et al., 1996). Récemment, le premier cristal d'un complexe récepteur/chimiokine a été rapporté par Qin & al (Qin et al., 2015) dans le but d'étudier les structures intervenant dans la liaison du récepteur CXCR4 à la chimiokine virale antagoniste vMIP-II. A partir de ces informations, il a été possible de développer un modèle du mode de liaison de SDF-1 à CXCR4. Il est intéressant de noter que, selon ce modèle, le site II participerait davantage à la liaison du ligand au récepteur qu'anticipé, et que les interactions entre le N-terminal de la chimiokine et la poche de liaison du ligand ne seraient pas d'aussi faible affinité que proposé précédemment. Ce modèle d'activation en deux étapes sera discuté dans le chapitre discussion.

### **1.3.2. Modes de signalisation des récepteurs de chimiokines:**

La liaison d'une chimiokine à son récepteur entraîne des changements conformationnels du récepteur aboutissant par la suite à une signalisation intracellulaire. Ce sont les boucles intracellulaires, les séquences transmembranaires conservées et la partie C-terminale des récepteurs de chimiokine qui sont impliquées dans cette signalisation (Allegretti et al., 2008) ainsi que dans la désensibilisation, l'internalisation, le recyclage et la dégradation du récepteur: ceci se fait par interaction avec des protéines spécifiques (O'Hayre et al., 2010), à savoir les protéines G, les GRKs et les  $\beta$ -arrestines (Kohout et al., 2003).

Selon le mode de signalisation suivi, les récepteurs de chimiokines peuvent être divisés en deux grands groupes : un large groupe de récepteurs chimiotactiques signalisant via les protéines G, et un autre groupe, beaucoup plus restreint, classifié comme « récepteurs de chimiokines atypiques » (ACKR), n'entraînant pas de chimiotaxie et ne signalisant pas via les protéines G (Bachelerie et al., 2014).

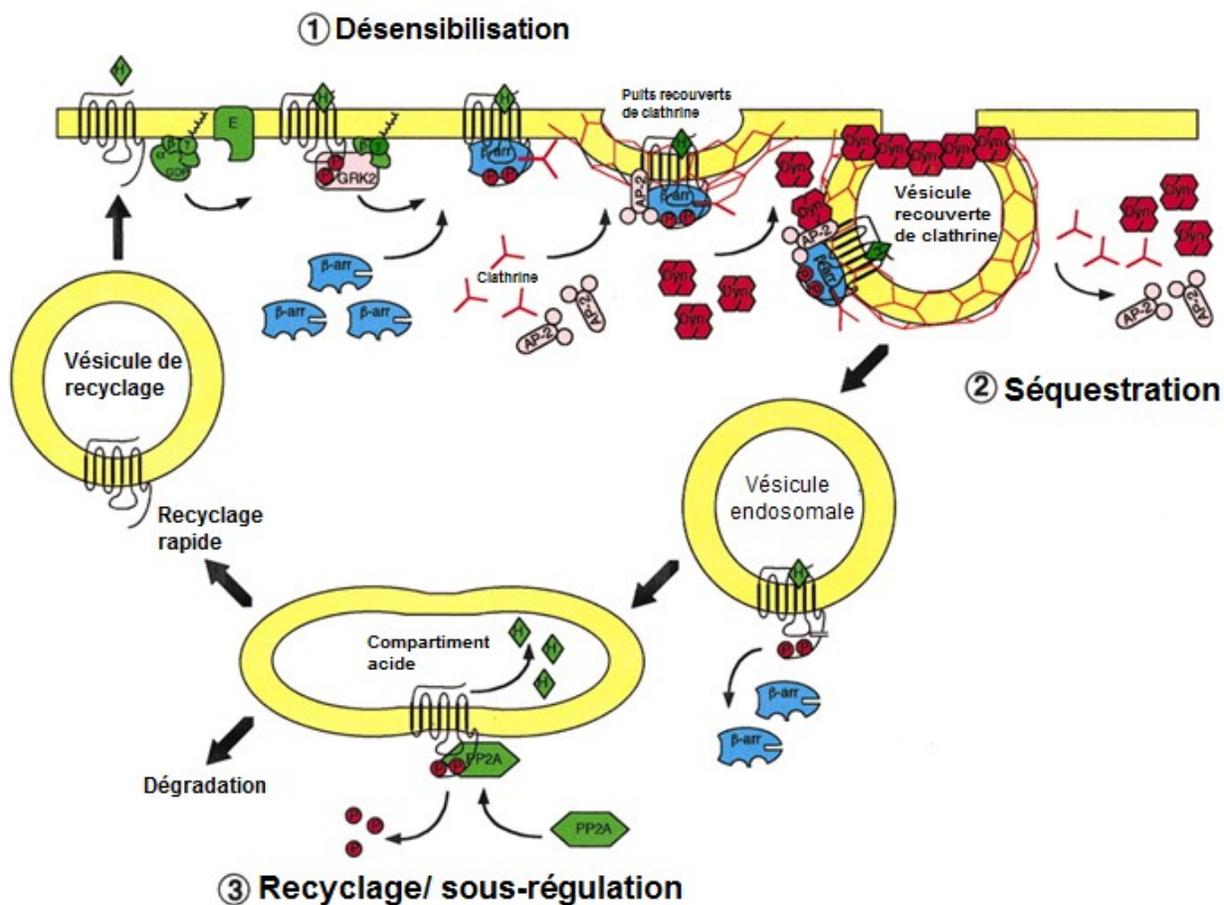
#### **a) Signalisation dépendante des protéines G :**

Les récepteurs couplés aux protéines G sont appelés de cette façon car ils recrutent, après liaison du ligand, une protéine appelée protéine G hétérotrimérique. Cette dernière a pour rôle de transmettre le signal du récepteur à un effecteur intracellulaire qui peut être une enzyme ou un canal ionique.

Les protéines G hétérotrimériques sont formées de trois sous unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Dans sa forme inactive, la sous unité  $\alpha$  est fortement associée à une molécule de GDP. Après liaison du ligand, il y aura un échange GDP-GTP et le complexe  $\alpha$ -GTP pourra alors s'associer à la molécule effectrice et la stimuler. Les sous unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont toujours associées sous forme de complexes  $\beta$ - $\gamma$  (Patel., 2004).

Selon la similarité de séquences des sous unités  $\alpha$ , les protéines G ont été classées en quatre familles : la famille  $G_s$ , la famille  $G_{i/o}$ , la famille  $G_{q/11}$  et la famille  $G_{12/13}$  (Neves et al., 2002). Les RCPG peuvent s'associer à différents types de protéines G dépendamment de leurs localisations et de leurs taux d'expression cellulaire (Oldham et al., 2006). De façon classique, les récepteurs de chimiokines interagissent avec la famille  $G_{\alpha i}$  des protéines G via une de leurs boucles intracellulaires (Horuk, 2001).

En cas d'exposition prolongée ou répétée du récepteur au ligand, il y a phosphorylation du récepteur par des enzymes appelées GRK ou *G Protein Coupled Receptor Kinase*. Quatre types de GRK sont responsables de la phosphorylation de la plupart des RCPG à savoir : GRK2, -3, -5 et 6 (Shukla et al., 2011). Les GRK sont attirées vers la membrane plasmique par les sous unités libres  $\beta$ - $\gamma$  et phosphorylent le récepteur sur des sérines/thréonines entraînant le recrutement d'une protéine cytosolique appelée  $\beta$ -arrestine (1 et 2). Cette dernière se lie au récepteur et le rend incapable d'activer l'échange GDP-GTP au niveau de la protéine G ; le récepteur devient alors désensibilisé (figure.5.1) (Vauquelin et al., 2008).



**Figure 5. Régulation de l'interaction récepteur-ligand par désensibilisation, internalisation, recyclage ou dégradation du récepteur.** Figure prise et modifiée depuis (Luttrell et al., 2002). L'autorisation d'utiliser la figure a été accordée par la « Company of Biologists LTD ».

En outre, la  $\beta$ -arrestine est capable d'entraîner l'endocytose du complexe récepteur-ligand en faisant office de protéine adaptatrice à des vésicules de clathrine (figure 5.2). Le récepteur peut alors soit subir un recyclage (le ligand est alors dégradé et le récepteur déphosphorylé puis renvoyé en surface), soit subir une dégradation par les lysosomes (figure 5.3) (Luttrell et al., 2002).

En plus de son rôle traditionnel de désensibilisation du récepteur, il a été découvert que la  $\beta$ -arrestine peut assurer un ensemble de fonctions distinctes: parmi celles-ci, elle peut engendrer sa propre voie de signalisation (Shukla et al., 2011). Ceci sera discuté dans ce qui suit.

### **b) Signalisation dépendante de la $\beta$ -arrestine :**

Bien que la signalisation via les protéines G soit la règle générale pour les récepteurs de chimiokines, il existe des récepteurs dits atypiques qui n'obéissent pas à cette règle et dont la signalisation est indépendante de ces protéines: ces récepteurs appelés ACKRs (pour *Atypical chemokine receptors*) sont très rares et sont au nombre de quatre chez l'humain, à savoir : ACKR1, ACKR2, ACKR3 et ACKR4 (Bachelier et al., 2014), ces derniers n'ont pas d'activité chimiotactique et sont caractérisés par leur forte capacité à internaliser les ligands menant, le plus souvent, à leur dégradation par les lysosomes (Ulvmar et al., 2011). Les ACKRs ont donc pour rôle principal de dégrader les chimiokines, on les appelle également récepteurs « *decoys* » ou « *scavengers* » (Graham, 2009; Luker et al., 2012; Mantovani et al., 2006; Ulvmar et al., 2011) ; cette fonction permet de créer et de réguler des gradients de concentrations de chimiokines qui sont essentiels au recrutement de leucocytes (Bachelier et al., 2014; Boldajipour et al., 2008; Ulvmar et al., 2011). Le récepteur d'intérêt de l'étude, CXCR7, fait partie de la catégorie des récepteurs atypiques.

Il a été constaté que tous les récepteurs atypiques avaient des substitutions au niveau de la séquence consensus DRYLAIV, à la frontière entre le TM3 et l'ECL2 (voir section 1.2.4.). Cette séquence est hautement conservée chez les récepteurs de chimiokines signalisant via la voie classique des protéines G. Il a alors d'abord été proposé que ces substitutions soient la cause de l'incapacité des récepteurs atypiques à recruter les protéines G (Bachelier et al., 2014). Cependant, des modifications de la séquence DRYLAIV sont également présentes chez

le récepteur CXCR6, dont la signalisation est quand même dépendante des protéines G $\alpha$ i (Chandrasekar et al., 2004); signifiant que le motif DRY n'est pas essentiel pour le recrutement des protéines G, et ne justifie pas le comportement atypique des ACKRs, notamment, celui de CXCR7.

#### CXCR7/ACKR3 :

CXCR7 est aussi connu sous le nom d'ACKR3 (Bachelerie et al., 2014). Il ne recrute pas de protéines G après liaison de ses ligands mais signale plutôt en recrutant la  $\beta$ -arrestine (Kalatskaya et al., 2009). En effet, en plus de jouer un rôle dans la terminaison de la signalisation dépendante des protéines G et l'internalisation des récepteurs (voir **1.3.2.a.**), la  $\beta$ -arrestine peut également engendrer sa propre voie de signalisation (Shukla et al., 2011). Nous verrons plus bas, dans la section **1.4.1**, que CXCR7 a récemment été décrit comme étant capable de recruter des protéines G, dépendamment du type cellulaire.

#### $\beta$ -arrestines :

La  $\beta$ -arrestine (1,2) est une protéine d'échafaudage multifonctionnelle faisant partie de la famille protéique des arrestines. Elle peut engendrer des séries de voies de signalisation intracellulaires en agissant comme protéine adaptatrice ou d'échafaudage à d'autres protéines (Shukla et al., 2011). Ce sont les protéines de la voie ERK/MAP kinase qui sont les mieux étudiées (Shukla et al., 2011; Vauquelin et al., 2008). Lorsque seulement la voie de la  $\beta$ -arrestine est utilisée par un récepteur, on parle de signalisation biaisée (Rajagopal et al., 2010). Il existe différentes modalités de recrutement de  $\beta$ -arrestine qui dépendent en grande partie de la conformation du récepteur engendrée par la liaison du ligand (Shukla et al., 2011). Ainsi, différents modes de liaison de chimiokines à un même récepteur aboutiraient à différentes modalités de recrutement de  $\beta$ -arrestine. Ce point sera repris lors de la discussion.

On possède, à date, très peu d'informations concernant la signalisation de CXCR7 via la  $\beta$ -arrestine. Il a néanmoins été montré que le recrutement de  $\beta$ -arrestine par CXCR7 aboutissait à l'activation de la voie MAPK (mitogen-activated protein kinases) notamment via la voie ERK 1/2 (Rajagopal et al., 2010a). Plus de détails seront donnés plus bas.

## 1.4 . CXCR7 :

### 1.4.1. Généralités

CXCR7, récepteur d'intérêt de la présente étude, autrefois connu sous le nom de RDC1 (*receptor dog cDNA 1*), est un récepteur atypique de chimiokines de classe A, également appelé AKCR3 (voir section 1.3.2.b). Il a longtemps été considéré comme un récepteur orphelin avant que l'on découvre qu'il est un récepteur alternatif des chimiokines ITAC et SDF- qu'il partage avec les récepteurs CXCR3 et CXCR4 respectivement (Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006).

CXCR7 est exprimé au niveau de l'endothélium vasculaire de très nombreux tissus (Berahovich et al., 2014) où il régule les gradients de concentration de chimiokines. Il est également largement exprimé au niveau des cellules mésenchymateuses (Memi et al., 2013), des cellules fœtales rénales (Dai et al., 2011), du système nerveux central adulte (Cruz-Orengo et al., 2011; Sierro et al., 2007) et des cellules cardiaques (Sierro et al., 2007). Son expression au niveau des leucocytes est très controversée (Berahovich et al., 2014; Berahovich et al., 2010) mais des études fonctionnelles suggèrent qu'il serait exprimé au niveau des monocytes, des lymphocytes B (Humpert et al., 2012; Infantino et al., 2006) et des lymphocytes T (Balabanian et al., 2005; Hartmann et al., 2008).

Comme mentionné plus haut, CXCR7 est un récepteur atypique : il a été décrit dans de nombreuses études comme étant incapable d'activer les protéines G contrairement aux RCPG classiques et, par conséquent, de ne pas induire de réponse chimiotactique mais de signaler via une voie dépendante de la  $\beta$ -arrestine (Burns et al., 2006; Kalatskaya et al., 2009; Levoye et al., 2009; Luker, Gupta, Steele, et al., 2009; Rajagopal et al., 2010a; Rajagopal et al., 2010b; Sierro et al., 2007). Il a cependant récemment été rapporté, dans les travaux d'Odemis & al (Odemis et al., 2012), que CXCR7 est capable de recruter des protéines Gai, en réponse au SDF-1, de façon dépendante du type cellulaire. Il a été montré que CXCR7 ne signale que via la voie de la  $\beta$ -arrestine dans les cellules utilisées lors de la présente étude (HEK 293) (Kalatskaya et al., 2009) : c'est donc cette voie qui sera étudiée le long du mémoire.

La structure de CXCR7 est représentée sur la figure 10, de la section 4.1 p.41. Elle est, de façon générale, similaire à celle des récepteurs de chimiokines (voir **1.1.3**), mais quelques particularités distinguent CXCR7 du reste de ces récepteurs. La plus importante étant une altération du motif hautement conservé DRY (DRYLAIV), comme tous les récepteurs atypiques, en motif DRYLSIT (Ulvmar et al., 2011). Une autre particularité intéressante de CXCR7 est la substitution du résidu Glu7.39, conservé chez 54% des récepteurs de chimiokines (notamment CXCR4), en résidu Gln7.39 (Nomiyama et al., 2015). L'importance de ce résidu pour CXCR7 sera discutée plus tard, dans les chapitres résultats et discussion.

### **1.4.2. Fonctions :**

CXCR7 joue un rôle dans l'angiogénèse, l'adhésion, la migration transendothéliale, la prolifération et la survie cellulaire (Miao et al., 2007; Miekus et al., 2010), tels que les progéniteurs de cellules épithéliales. Il joue également un rôle important durant le développement. En effet, des souris déficientes en CXCR7 meurent de façon périnatale avec des problèmes cardiovasculaires (Gerrits et al., 2008; Sierro et al., 2007).

En outre, CXCR7 a la capacité de rapidement internaliser et dégrader de grandes quantités de chimiokines; lui valant le nom de « scavenger » ou « decoy » et lui conférant le rôle important de contrôle des quantités de chimiokines disponibles (Boldajipour et al., 2008; Luker et al., 2012; Naumann et al., 2010). CXCR7 lie d'ailleurs SDF-1 avec une affinité dix fois plus forte que le récepteur CXCR4 (Burns et al., 2006; Naumann et al., 2010). Une perte de CXCR7 résulte en une accumulation extracellulaire de chimiokines et en la formation de gradients discontinus de ces dernières (Boldajipour et al., 2008; Luker et al., 2012). En conséquent, la chimiotaxie guidée par SDF-1 dépendrait indirectement de la présence de CXCR7 dans les tissus et de son activité de maintenance de gradient, bien qu'il ne soit pas directement impliqué dans la chimiotaxie (qui, elle, est médiée par CXCR4). Cette relation CXCR4/CXCR7 sera discutée plus bas.

### **1.4.3. CXCR7 et maladies :**

CXCR7 est fortement exprimé par les cellules cancéreuses et tumorales, et est impliqué dans des manifestations cliniques tels que les rejets de greffes rénaux et les maladies

inflammatoires (Neusser et al., 2010; Watanabe et al., 2010). Il semblerait que, tout comme pour CXCR4, l'hypoxie soit un inducteur de CXCR7 dans les cellules tumorales (Maishi et al., 2012).

La phosphorylation de kinases MAPK, induite par CXCR7, aboutit à des voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire (Rajagopal et al., 2010a). Elle peut donc favoriser la croissance de tumeurs et leur survie par prolifération anarchique des cellules résistantes à l'apoptose, comme dans le cas de glioblastome multiforme par exemple (Dai et al., 2011; Miekus et al., 2010). En plus de cela, CXCR7 est également impliqué dans la migration et l'invasion de cellules tumorales vers différents tissus (Miekus et al., 2010). En effet, les cellules tumorales peuvent prendre avantage de la fonction migratoire des chimiokines pour se propager, notamment via le récepteur CXCR4 (Mishra et al., 2011); et il a été montré que CXCR7 pouvait influencer cette migration tumorale en régulant, entre autres, les quantités de chimiokines migratoires SDF-1 disponibles (Sun et al., 2010). ITAC ne stimule que très peu la migration de cellules tumorales mais semble sensibiliser ces dernières à la présence de SDF-1. En effet, lorsque les cellules sont stimulées par des doses combinées de SDF-1 et ITAC, un plus haut taux de migration et d'activation de la voie MAPK a été observé en comparaison avec des stimulations simples à ITAC ou SDF-1 (Miekus et al., 2010).

## **1.5 . Les récepteurs alternatifs des ligands de CXCR7 (SDF-1 et ITAC) : CXCR4 et CXCR3:**

Le système chimiokine/récepteur est très complexe, entre autres, à cause du phénomène de promiscuité qu'on observe et qui fait la particularité de ce système- comme discuté plus haut. Ainsi, ITAC et SDF-1 sont les ligands de CXCR7, mais ils sont également les ligands des récepteurs CXCR3 et CXCR4. Un intérêt particulier sera alors porté, dans ce qui suit, aux systèmes CXCR4/SDF-1 et CXCR3/ITAC ainsi qu'aux potentiels de « cross-talk » qu'ils peuvent avoir avec le récepteur CXCR7.

### 1.5.1. Système CXCR4/SDF-1 :

Le récepteur CXCR4 est un récepteur de chimiokines hautement conservé dans l'évolution et qui a pour seul ligand spécifique la chimiokine CXCL12/SDF-1 (Caruz et al., 1998). Il est exprimé à la surface des cellules des systèmes nerveux et immunitaire, des cellules hématopoïétiques, ainsi qu'au niveau du cœur, colon, poumon, foie, cellules progéniteurs, cellules endothéliales et épithéliales (Teicher et al., 2010). La liaison du SDF-1 au récepteur CXCR4 déclenche la voie de la  $G\alpha_i$ ; aboutissant à une mobilisation de flux calcique ainsi que la chimiotaxie cellulaire (Holland et al., 2006).

L'interaction CXCR4/SDF-1 est primordiale pour de nombreuses fonctions de l'organisme, notamment, pour la migration de précurseurs de cellules hématopoïétiques (HPC) vers la moelle osseuse. CXCR4 joue un rôle important lors du développement, entre autre, celui du cerveau en modulant la migration neuronale (Schwartz et al., 2006). Ainsi, une délétion du récepteur chez des souris a résulté en la mort des embryons due à des défauts d'hématopoïèse, de migration neuronale et de vascularisation d'organes (Ma et al., 1998; Tachibana et al., 1998).

CXCR4 est l'un des récepteurs les plus étudiés et les plus importants. Il a été impliqué dans plus de 23 types de cancer, tels que le cancer du sein et de la prostate; où il dirige la dissémination métastatique et la migration de cellules tumorales (Sun et al., 2003). CXCR4 peut également médier la prolifération de cellules cancéreuses et l'angiogénèse (Dai et al., 2011). Il est un co-récepteur du VIH et est impliqué dans l'athérosclérose et dans les maladies neurodégénératives et inflammatoires (Alkhatib, 2009; Brauersreuther et al., 2007) (Mines et al., 2007).

Dû à cette implication de CXCR4 dans de nombreuses maladies, le système CXCR4/SDF-1 a été la cible de nombreuses études cliniques. Cependant, la découverte de CXCR7, en tant que récepteur alternatif de SDF-1, a soulevé de nombreuses questions quant à l'implication réelle du système CXCR4/SDF-1 dans ces maladies et l'efficacité des inhibiteurs de ce système (Sun et al., 2010). En effet, comme mentionné précédemment, CXCR7 peut réguler l'activité de CXCR4 : plus de détails sur cette modulation seront donnés dans la prochaine section.

### 1.5.2. CXCR4 et CXCR7 :

CXCR7 peut moduler l'activité du récepteur CXCR4 de deux façons : soit par hétérodimérisation, lorsque les deux récepteurs sont exprimés au niveau de la même cellule; soit en contrôlant la disponibilité du SDF-1, lorsque CXCR7 est exprimé dans des tissus avoisinants les cellules exprimant CXCR4 (Memi et al., 2013).

#### a) Hétérodimérisation :

CXCR7 est retrouvé constitutivement sous forme d'homodimères (Kalatskaya, 2009). Il a néanmoins été montré que le récepteur CXCR7 est capable de dimériser avec le récepteur CXCR4, de la même façon qu'il est capable d'homodimériser, dépendamment des taux d'expression des deux récepteurs (Levoye et al., 2009). Il peut alors réguler les processus et voies de signalisation engendrés par l'interaction CXCR4/SDF-1 (Levoye et al., 2009; Luker, Gupta, & Luker, 2009) (figure 6). En effet, l'expression de CXCR7 induit des changements conformationnels des complexes CXCR4-Gαi qui réduisent, d'environ quatre fois, l'activation de la protéine Gαi par CXCR4 après liaison du SDF-1 (Levoye et al., 2009) ; limitant, voire inhibant, ainsi la signalisation de CXCR4.

#### b) Contrôle de la quantité de SDF-1 :

CXCR7, étant capable de dégrader SDF-1 (Boldajipour et al., 2008; Luker et al., 2012), peut également moduler le système CXCR4/SDF-1 en contrôlant le taux de SDF-1 disponible et en gérant les gradients de concentrations de cette chimiokine (Berahovich et al., 2014). Cette modulation confère à CXCR7 des rôles cruciaux au sein de l'organisme. Ainsi, comme mentionné dans la section 1.4.2. par exemple, CXCR7 joue un rôle important durant le développement. Ceci se fait, en partie, par la création de gradients de concentrations de SDF-1 nécessaires à la migration de cellules germinales primordiales via CXCR4 (Boldajipour et al., 2008; Dambly-Chaudière et al., 2007). De la même manière, il joue également un rôle essentiel dans la reproduction, en influençant la migration vers l'hypothalamus, de neurones sécréteurs de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) (Memi et al., 2013).

Enfin, d'un point de vue pathologique; il a été montré qu'en contrôlant les quantités albuminales de SDF-1, CXCR7 joue un rôle clé pour l'infiltration au cerveau de lymphocytes

T autoréactifs, à travers la barrière hémato-encéphalique, dans les cas de sclérose en plaques, (Cruz-Orengo et al., 2011; Frohman et al., 2006). L'utilisation d'antagonistes de CXCR7 a alors permis d'inhiber l'entrée des leucocytes dans le système nerveux central et a amélioré la guérison des animaux sujets à un modèle de sclérose en plaques. Cette amélioration pourrait s'expliquer par le fait qu'une perte ou une inhibition de CXCR7 mène à des quantités excessives de SDF-1 qui, elles même, mènent à la désensibilisation et la dégradation de CXCR4 (Cruz-Orengo et al., 2011; Marchese et al., 2001) empêchant alors la migration cellulaire.

Ces données montrent la pertinence de cibler le récepteur CXCR7 pour moduler les différentes réponses biologiques engendrées par le système CXCR4/SDF-1 et le traitement de maladies inflammatoires et auto-immunes.

### **1.5.3. Système CXCR3/ITAC:**

Le récepteur CXCR3 est un récepteur de chimiokines exprimé, en grande majorité, à la surface des lymphocytes T et NK matures (Qin et al., 1998), et au niveau de certaines cellules épithéliales (Garcia-Lopez et al., 2001). Il a pour ligands les chimiokines CXCL9/Mig (monokine induced by gamma interferon), CXCL10/IP-10 (interféron gamma-induced protein 10) ainsi que la chimiokine CXCL11/ITAC (qu'il partage avec CXCR7). Ces trois chimiokines sont induites par l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et interviennent dans la voie de réponse immunitaire Th1 (Farber, 1990); entre autre via la chimiokine ITAC, qui dirige la migration des lymphocytes Th1 lors de la réponse immune (Panzer et al., 2007).

L'interaction entre CXCR3 et ses ligands peut résulter en des réponses antagonistes. D'un coté, CXCR3 peut médier la chimiotaxie et la prolifération cellulaire via la voie de la  $G\alpha_i$ . D'un autre coté, CXCR3 peut promouvoir l'inhibition de migration et de prolifération cellulaire, et peut médier la mort cellulaire selon le type cellulaire (Singh et al., 2013). Ce comportement s'explique par l'existence de deux variantes du récepteur CXCR3, à savoir : CXCR3-A et CXCR3-B. Le récepteur CXCR3-A est impliqué dans la prolifération cellulaire; alors que le récepteur CXCR3-B est impliqué dans l'inhibition de la migration cellulaire et dans l'apoptose (Datta et al., 2006; Lasagni et al., 2003).

Le système CXCR3/ligand intervient dans de nombreuses maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde et l'athérosclérose (Kwak et al., 2008; Tsubaki et al., 2005), dans la progression métastatique (Ma et al., 2009), dans les glioblastomes multiformes (Miekus et al., 2010) ainsi que dans l'angiogénèse faisant de ce système une cible d'intérêt pour de nombreuses études et approches thérapeutiques (Melter et al., 2001; Singh et al., 2013). À titre d'exemple: des molécules antagonistes de CXCR3 font actuellement l'objet d'essais cliniques pour résoudre les problèmes de rejets de greffe. En effet, l'inhibition de CXCR3 permettrait de limiter le recrutement de lymphocytes T dans le cas d'allogreffe (Jen et al., 2012; O'Boyle et al., 2010).

#### **1.5.4. CXCR7 et CXCR3 :**

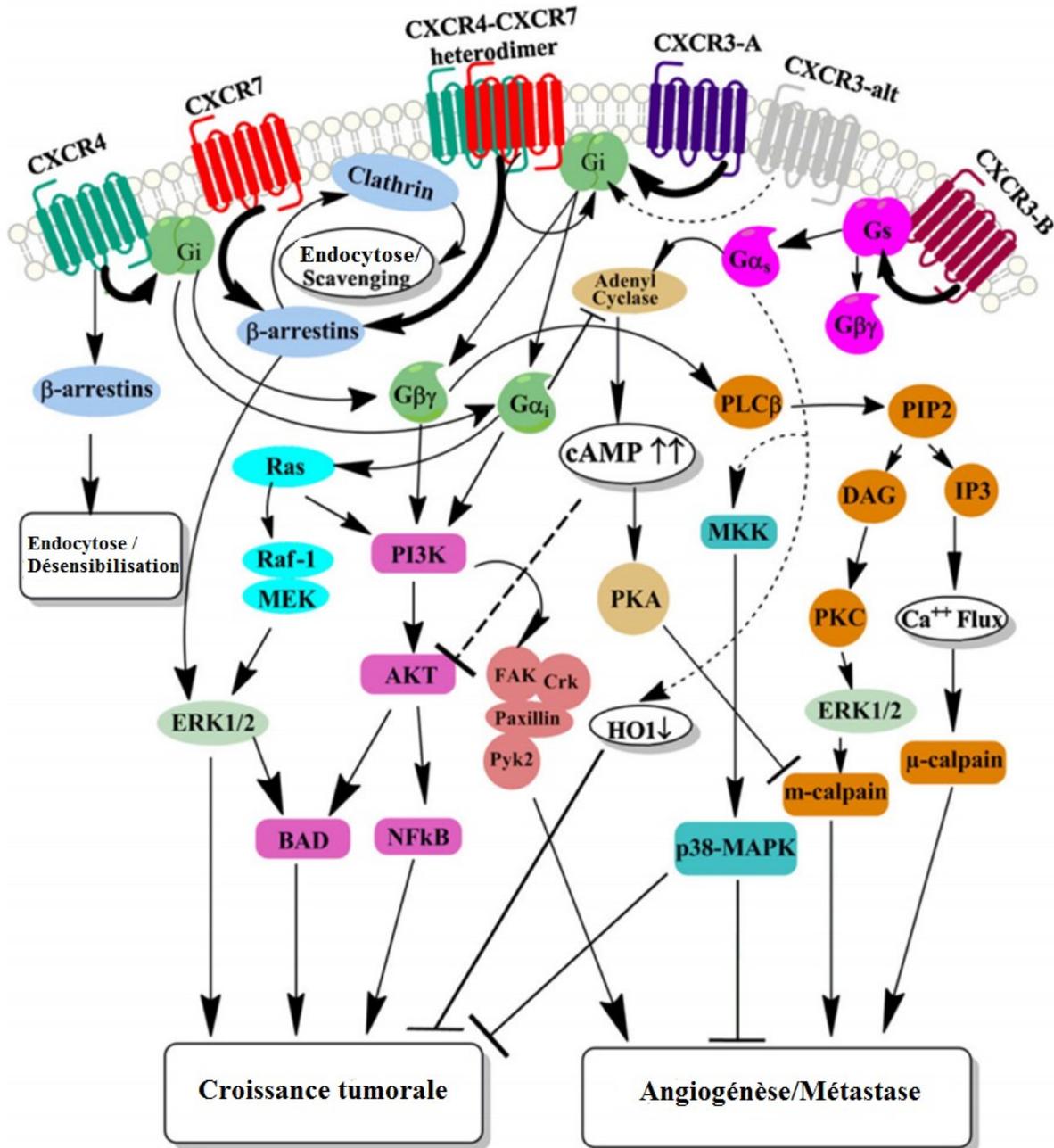
Il a été démontré que la liaison d'ITAC aux récepteurs CXCR3 et CXCR7 modulait la prolifération et la migration de cellules tumorales dans le cas de glioblastome multiforme (Miekus et al., 2010). Comme c'est l'isoforme CXCR3-A qui est impliqué dans la prolifération cellulaire, il a été spéculé qu'il existerait un phénomène de communication ou « cross-talk » entre les récepteurs CXCR7 et CXCR3-A pour l'induction de la prolifération et l'invasion tumorale; ainsi que l'inhibition des effets antagonistes de l'isoforme CXCR3-B (Singh et al., 2013).

### **1.6 . CXCR7 en tant que cible thérapeutique:**

De par sa liaison des chimiokines SDF-1 et ITAC, le récepteur CXCR7 peut, en plus de ses propres voies de signalisation, entretenir des « cross-talk » avec les systèmes CXCR3/ITAC et CXCR4/SDF-1 (figure 6). Il peut également moduler l'action du système CXCR4/SDF-1 (Singh et al., 2013)- comme vu précédemment dans la section 1.5.2. Ceci, en plus du fait qu'il soit fortement exprimé dans de nombreuses maladies telles que les cancers et les maladies inflammatoires, fait du récepteur CXCR7 une cible thérapeutique très importante et à ne surtout pas négliger. Son inhibition permettrait par exemple de contrôler la migration des leucocytes, le homing des cellules souches et des progéniteurs de cellules endothéliales;

ainsi que traiter les maladies où intervient l'angiogénèse (tous médiés par le système CXCR4/SDF-1).

Cependant, malgré le fait que de nombreuses études de structures et de cristaux de CXCR4 aient déjà été réalisées (Crump et al., 1997; Kofuku et al., 2009; Qin et al., 2015; Veldkamp et al., 2008; Wu et al., 2010), aucune étude de structure de CXCR7 n'a été publiée à date. De même, de nombreuses études d'interaction des récepteurs CXCR3 et CXCR4 avec leurs ligands, basées sur des techniques de mutagenèse, ont été réalisées (Brelot et al., 1999; Brelot et al., 2000; Colvin et al., 2006; Nedjai et al., 2012) mais aucune étude d'interaction entre CXCR7 et ses ligands n'a encore été menée. Une telle étude serait cependant requise pour évaluer la possibilité d'inhiber séparément chacun des deux ligands de CXCR7, et ainsi de pouvoir intervenir de façon ciblée dans les interactions du système CXCR7/SDF-1/ITAC. Ceci est d'autant plus d'intérêt que les deux ligands de CXCR7 sont impliqués dans des fonctions fort différentes, contrairement par exemple aux trois ligands de CXCR3. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés, dans notre étude, à déterminer les résidus clés pour les interactions et la réponse signalétique de CXCR7 à ses ligands.



**Figure 6. Représentation des interactions intracellulaires entre les CXCR3, CXCR4 et CXCR7.** Les flèches en gras représentent les voies de signalisations dominantes suite à la liaison de la chimiokine au récepteur. Les pointillés représentent les voies de signalisations qui n'ont pas encore été bien caractérisées. Figure extraite et modifiée de (Singh et al., 2013). L'autorisation d'utiliser la figure a été accordée par Elsevier.

## 2. Objectifs du projet :

L'objectif principal de notre étude est une meilleure compréhension moléculaire du récepteur atypique CXCR7 et d'apporter les premières analyses structure/fonction de ce récepteur. Pour cela, nous avons étudié une série de mutants des parties extracellulaires et transmembranaires du récepteur. De façon plus spécifique, nous avons voulu répondre aux objectifs suivants:

1) Le mode d'interaction de CXCR7 avec ses ligands naturels SDF-1 et ITAC n'est pas connu. Nous voulions donc identifier – suite aux mutations effectuées – les acides aminés essentiels à la liaison des ligands de CXCR7, et à son activation par recrutement de  $\beta$ -arrestine.

2) Comme il a été démontré, pour de nombreux récepteurs, que le phénomène de redondance du système récepteur/chimiokines n'existe pas ; nous nous sommes intéressés à comparer les modes de liaison et de recrutement de  $\beta$ -arrestine entre les ligands de CXCR7 (SDF-1 et ITAC), et à en faire ressortir les différences – si elles devaient exister.

3) Les chimiokines ITAC et SDF-1 sont également les ligands des récepteurs CXCR3 et CXCR4, respectivement. Nous avons donc voulu comparer les interactions entre les récepteurs classiques CXCR3, CXCR4 et leurs ligands, avec celles du récepteur atypique CXCR7. Plus particulièrement, nous voulions savoir si CXCR7 suivait le mode classique de liaison en deux étapes des récepteurs de chimiokines, similairement à CXCR3 et CXCR4 ; ou bien s'il existait un mode de liaison de SDF-1 et ITAC particulier à CXCR7, et qui expliquerait son comportement atypique.

### **3. Matériels et méthodes :**

#### **3.1. Réactifs et lignée cellulaire :**

Les HEK293E (Invitrogen, Carlsbad, CA) sont une lignée cellulaire dérivant de cellules fibroblastiques rénales embryonnaires d'humain (HEK), exprimant le virus d'Epstein-Barr ou EBV (leur valant l'appellation de lignée E) (Yates et al., 1985). Elles ont été utilisées, pour cette étude, car ce sont des cellules faciles à cultiver, facilement transfectables et qui contiennent de très faibles niveaux de récepteurs CXCR7 endogènes.

Les mélanges d'ADN pour les transfections ont été réalisés dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM, 4.5g/L D-Glucose) nu (dépourvu de SVF et de pénicilline/streptomycine) en combinaison avec de la polyéthylèneimine PEI (Polysciences, Warrington, PA).

Les anticorps anti-CXCR7 APC clone 358426 ou clone 11G8 (R&D Systems, US) ont été utilisés pour les essais de marquage en surface cellulaire. Une solution de PBS auquel du sérum de veau fœtal (SVF) a été ajouté à 2%, a été utilisée pour les besoins de l'expérience.

Les essais BRET ont été réalisés dans des plaques blanches 96 puits (PerkinElmer, Waltham, MA) enduites de 0,1% Poly-D-Lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Les tampons BRET contenaient 0,01% de BSA fraction V (WisENT) et 0,5mM de MgCl<sub>2</sub> mélangés dans du tampon phosphate salin PBS (Biobar invitrogen). De la coelenterazine H (Nanolight technology, Pinetop, AZ) a été utilisée pour les besoins de l'expérience.

Les essais de radio-liaison ont été réalisés dans des plaques 96 puits à fonds plats (VWR) et les solutions utilisées comportaient; du tampon de liaison (50mM HEPES, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2% BSA), une solution de PEI (0,33% de polyéthylèneimine dans de l'eau), du tampon de lavage 1 (50mM d'HEPES pH 7.4, 500mM de NaCl et 0,1% de BSA), du tampon de lavage 2 (50mM HEPES pH 7.4 et 0,5% BSA) et une solution à 100μM de phenylarsine oxide (PAO) dilué dans du PBS.

Les ligands utilisés pour les essais de BRET et de radio-liaison étaient : ITAC, SDF-1 (Peprtech, CA) et [<sup>125</sup>I] SDF-1 (PerkinElmer, Waltham, MA).

### **3.2. Plasmides et mutagenèse :**

Les plasmides de  $\beta$ -arrestine2-Rluc sont un généreux cadeau du Dr. Michel Bouvier et ont été décrit précédemment (Kalatskaya et al., 2009).

Tous les récepteurs utilisés, sauvages et mutants, ont été clonés dans le plasmide pCDNA3.1/Zeo (Invitrogen, Carlsbad, CA). Ils ont par, ailleurs, été fusionnés à la « Yellow fluorescent protein » (YFP), au niveau du C-terminal des récepteurs, pour les besoins des essais BRET. Le clonage de CXCR7-YFP a préalablement été décrit (Kalatskaya et al., 2009). Brièvement, la séquence codante de CXCR7 a été amplifiée à l'aide d'amorces, sens et anti-sens, contenant des sites de restrictions HindIII et BamHI. Les produits obtenus ont été digérés puis sous clonés dans les sites HindIII et BamHI du vecteur pGFP-N1-Topaz, (PerkinElmer Life Sciences), codant la protéine YFP.

Les mutants de CXCR7 ont été réalisés à l'aide du QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), le protocole a préalablement été décrit (Montpas et al., 2015). Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage avant d'être utilisées.

Lors de cette étude, on désignera le CXCR7 sauvage par CXCR7 WT (wild type). Celui-ci sera notre récepteur de référence et servira de contrôle positif pour étudier les effets des différentes mutations. Aussi, dans le but d'alléger le texte, la mention « -YFP » ne sera pas ajoutée aux noms des récepteurs.

### **3.3. Culture cellulaire et transfection:**

Les HEK293E ont été cultivées, à l'intérieurs d'incubateurs, à 37°C avec une atmosphère enrichie de 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM (Gibco ®, Grand Island NY) complété avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) (WiEnt, Rocklin, CA), 200µg/mL de G-418 sulfate (WiEnt), 2.5µg/mL de plasmocine (Invitrogen, San Diego, CA) et 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine (Invitrogen). Il a été constaté, lors des essais de culture cellulaire précédemment menés au laboratoire, que les cellules HEK293E sont sensibles aux contaminations par mycoplasmes; leur culture en présence de plasmocine est donc un traitement préventif.

Les transfections ont été réalisées 24h après avoirensemencé, dans des plaques 6 puits, 900 000 cellules/puits dans le cas d'essais de cytométrie en flux et radio-liaison et 750 000 cellules/puits dans le cas d'essais BRET. Une quantité totale de 2µg d'ADN a été transfectée en utilisant la méthode de poly-éthylénimine telle que décrite dans (Boussif et al., 1995).

### **3.4. Détection du marquage en surface cellulaire des mutants**

#### **CXCR7 par cytométrie en flux (FACS) :**

L'expression des récepteurs CXCR7 à la surface des cellules a été vérifiée par technique d'immunofluorescence directe et cytométrie en flux, à l'aide d'un marquage aux anticorps monoclonaux anti-CXCR7 (Clone 358426 ou 11G8) couplés à un fluorochrome Allophycocyanine (APC) (R&D Systems, US). Pour cela, des cellules HEK293E ont été transfectées avec une quantité de 0,5µg de CXCR7 WT, ou 0,5µg de mutants de CXCR7. Elles ont ensuite été détachées des puits, 24h après la transfection, avec du tampon phosphate salin (PBS), puis centrifugées pendant sept minutes à 4°C avec une force centrifuge de 500g. Les culots de cellules ont ensuite été divisés en deux groupes : un groupe qui servira de contrôle non marqué et un groupe qui sera marqué avec l'anticorps désiré. Dans le cas des contrôles non marqués, les culots de cellules ont été incubés, pendant 30min, uniquement dans 50µL de PBS 2% SVF (voir 3.1). Dans le cas des contrôles marqués, les culots ont été incubés avec 50µL de PBS 2% SVF dans lequel l'anticorps désiré a été dilué à un ratio de 1 :10. Après le marquage, un lavage au PBS a été réalisé pour enlever des anticorps non fixés. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant sept minutes à 4°C, 500g puis les culots de cellules ont été fixés au formaldéhyde (Bio-Basic). Finalement, les fluorescences jaunes (émission par la « YFP ») et rouges (émission par l'APC) des cellules ont été détectées à l'aide d'un cytomètre en flux FACS Calibur (Becton-Dickinson); les longueurs d'ondes d'excitation utilisées étaient de 514 nm pour la « YFP » et de 645nm pour l'APC, celles d'émission étaient de 525 nm pour la « YFP » et de 660nm pour l'APC. Les intensités de fluorescences moyennes (MFI) des cellules ont servi à quantifier l'intensité de marquage en surface des récepteurs.

### **3.5. Test de recrutement de $\beta$ -arrestine 2 par essais de BRET :**

#### **3.5.1. Protocole expérimental :**

Le recrutement de  $\beta$ -arrestine 2 par le récepteur CXCR7 en réponse à différentes concentrations stimulantes de ligands a été testé par essais de transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET) tels que décrit par (Achour et al., 2011; Hamdan et al., 2005; Kalatskaya et al., 2009). Brièvement, des cellules HEK ont été transfectées avec 1 $\mu$ g de CXCR7 WT ou 1 $\mu$ g de mutant, 50ng de plasmide de Renilla luciférase (Rluc) fusionnée à la  $\beta$ -arrestine 2 (Perroy et al., 2003) et 0,95 $\mu$ g du plasmide PCDNA3. 24h après la transfection, 200 $\mu$ L de cellules/puits ont été transférées dans des plaques 96puits prétraitées à la Poly-D et 24h plus tard, le milieu de culture a été remplacé par 30  $\mu$ L/puits de tampon BRET (voir 3.1). Les cellules ont par la suite été stimulées, pendant 5minutes, par 10 $\mu$ L/puits de concentrations croissantes de ligands SDF-1 et ITAC (Peprotech, CA) allant de  $10^{-11}$  à  $10^{-6}$  M. Finalement, 10  $\mu$ L/puits de coelenterazine H (Nanolight technology) à 5 $\mu$ M ont été ajoutés et les cellules ont été incubées pendant huit minutes. Les valeurs de luminescence et de fluorescence ont été mesurées par le lecteur Mitras LB940 (Berthold technologies, Germany), à l'aide d'un filtre de 485nm pour la luminescence et 530nm pour la fluorescence; dans le but de calculer les ratios BRET.

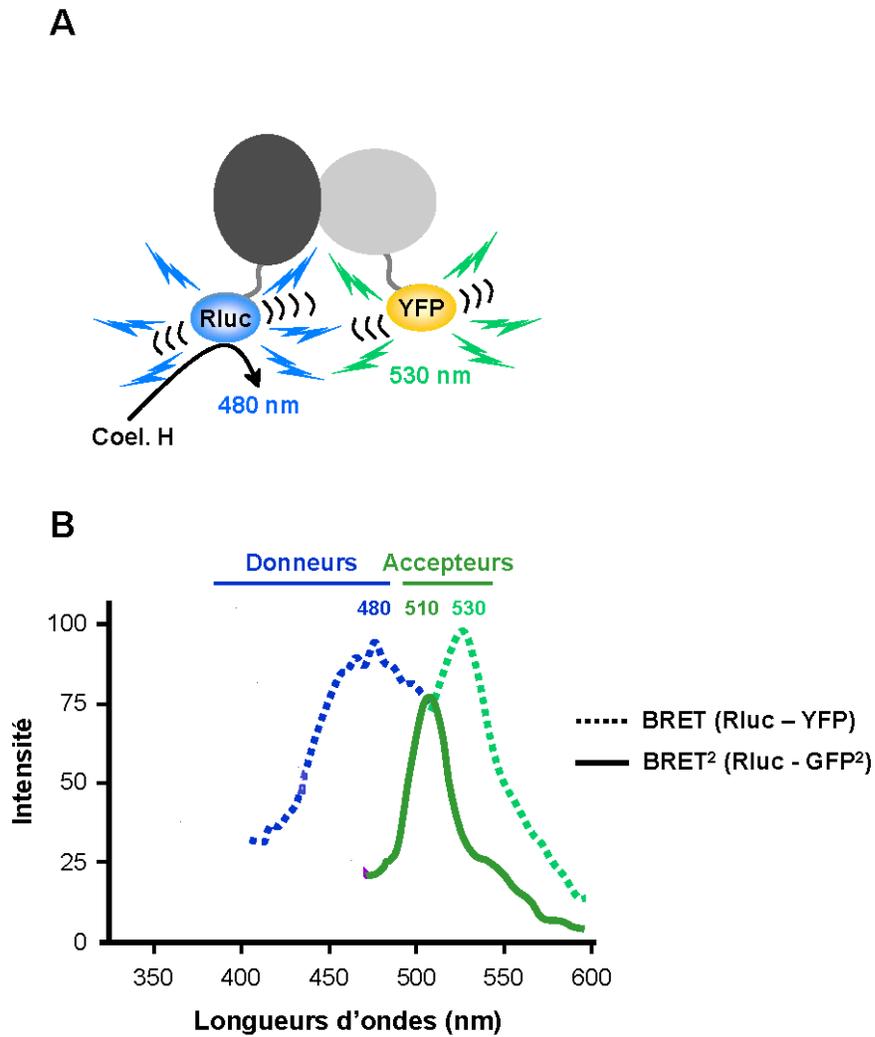
#### **3.5.2. Principe du BRET :**

Le BRET ou *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* est une technique de transfert d'énergie par résonance décrite pour la première fois par Angers & al (Angers et al., 2000). Il peut être utilisé pour étudier l'oligomérisation et les changements de conformation d'un récepteur, mais également pour étudier les interactions protéines-protéines au sein d'une cellule (Gales et al., 2005). Pour qu'il y ait transfert d'énergie, il faut qu'il y ait présence d'un donneur et d'un accepteur d'énergie, que ces derniers se situent à une distance inférieure à 100 Å l'un de l'autre, et qu'il y ait un chevauchement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur (Bouvier, 2001; Gales et al., 2006).

Dans le cas de notre étude, le donneur d'énergie utilisé est l'enzyme *Renilla luciferase* (Rluc). C'est une protéine luminescente provenant de l'animal *Renilla reniformis* chez lequel un phénomène de luminescence naturel a déjà été démontré (Gales et al., 2005). La Rluc catalyse l'oxydation de son substrat la coelentérazine H, menant à l'émission d'une lumière qui sera transférée à l'accepteur d'énergie (fig.7). Cet accepteur est la « YFP » ou *Yellow Fluorescent Protein* à laquelle tous nos récepteurs CXCR7 sont déjà fusionnés (voir section 3.2).

En l'absence de transfert d'énergie, seulement l'émission du donneur pourra être mesurée à 480nm ; en présence d'un transfert d'énergie, par contre, il y aura une fluorescence de l'accepteur qui peut être mesurée à 530nm (fig.7) (Bouvier, 2001). Il est alors possible de déterminer la valeur de ratio BRET en divisant l'émission de l'accepteur à 530 sur celle du donneur à 480nm. L'intensité du signal BRET dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur BRET ainsi que leur orientation l'un par rapport à l'autre (Gales et al., 2006).

Comme nous nous sommes intéressés à étudier le recrutement de la  $\beta$ -arrestine par CXCR7, le donneur d'énergie utilisé, soit la Rluc, a été fusionné avec la  $\beta$ -arrestine et tous les récepteurs CXCR7, WT ou mutants, ont été fusionnés avec la « YFP » au niveau du C-terminal. Ainsi, l'obtention d'un signal BRET traduirait une interaction entre la Rluc et la « YFP », donc entre la  $\beta$ -arrestine et le récepteur, et signifierait qu'il y aurait eu un recrutement de  $\beta$ -arrestine par le récepteur. Cette interaction est schématisée sur la figure 7.



**Figure 7. Essai de recrutement de  $\beta$ -arrestine.** A) Transfert d'énergie entre la Rluc et la « YFP ». B) Courbes d'émission du donneur et de fluorescence de l'accepteur de BRET. Modifiée depuis la figure de (Maurel, 2008). L'autorisation d'utiliser la figure a été accordée par Creative Commons.

### 3.5.3. Notions de pharmacologie :

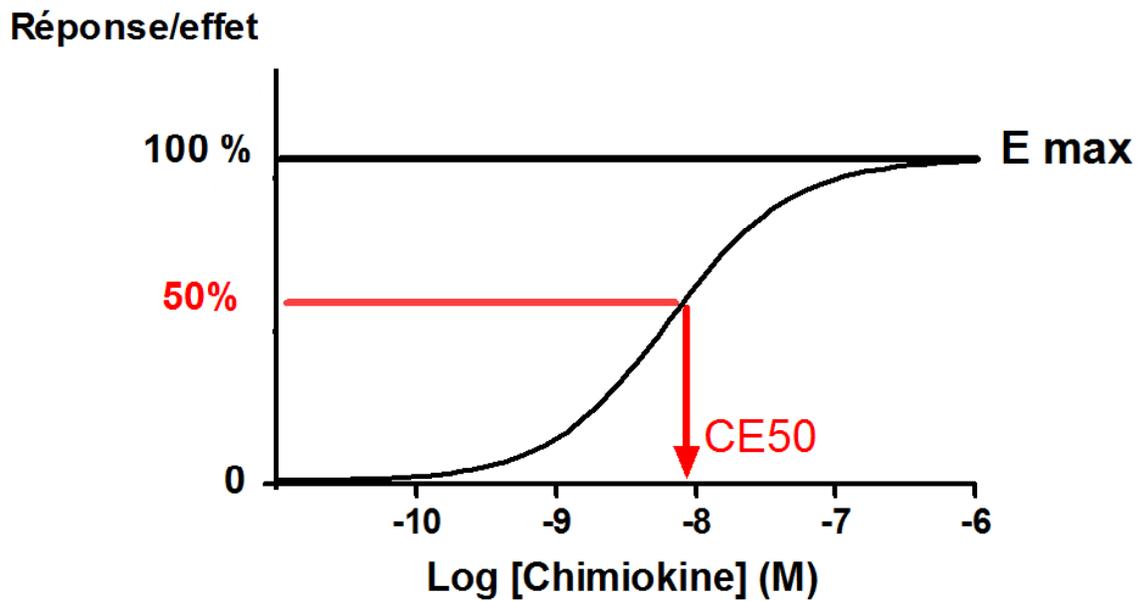
L'utilisation de divers paramètres pharmacologiques a été nécessaire pour l'analyse des résultats de recrutement de  $\beta$ -arrestine. De plus, ces paramètres ont également été utilisés pour l'analyse des résultats des essais de radio-liaison décrits ci-après. C'est pourquoi, nous introduirons brièvement quelques notions pharmacologiques.

La courbe dose-réponse ou dose-effet est une donnée pharmacologique de base. L'effet pharmacologique est mesuré en fonction des doses croissantes, exprimées en échelle logarithmique, de la molécule étudiée, dans notre cas, les chimiokines ITAC et SDF-1. Deux notions importantes peuvent être tirées d'une courbe dose-réponse : l'efficacité de la réponse et la concentration efficace médiane (CE50) (figure 8).

L'efficacité de la réponse représente l'effet maximal qu'un ligand est capable d'engendrer après liaison au récepteur et que l'on désigne par Emax. Elle correspond au plateau obtenu après stimulation avec des concentrations saturantes de ligands (Kenakin, 2010).

La concentration efficace médiane (CE50) représente la quantité de ligand capable d'engendrer la moitié de la réponse maximale. Elle permet de déterminer la puissance du ligand. Plus la CE50 est basse, plus la puissance du ligand est grande, car cela voudrait dire qu'une plus petite concentration de ligand suffirait à atteindre la moitié de la réponse maximale, comparativement à un autre ligand qui serait moins puissant et qui nécessiterait une plus grande concentration, donc un CE50 plus grand (Kenakin, 2010).

## Courbe dose-réponse



**Figure 8. Notion de courbe dose-réponse.** Représentation schématique de la réponse quantitative d'un récepteur après une stimulation par une chimiokine. Les concentrations de chimiokines sont représentées en échelle logarithmique. La puissance de la réponse est déterminée par la dose de chimiokine nécessaire pour produire la moitié de la réponse (CE50) alors que l'efficacité représente la valeur de réponse maximale engendrée.

## 3.6. Essais de radio-liaison par compétition :

### 3.6.1. Protocole expérimental :

La capacité du récepteur CXCR7 WT et des mutants de lier SDF-1 et ITAC, a été testée par essai de radio-liaison par compétition. Cela consiste à mesurer la liaison spécifique, à l'équilibre, d'une concentration constante de ligand radio-marqué en présence de concentrations croissantes de ligand non-radiomarqué. Dans notre cas, une concentration de 50 pM de SDF-1 radio-marqué à l'Iode-125 ( $[^{125}\text{I}]$  SDF-1) (PerkinElmer, Waltham, MA), ainsi que des concentrations croissantes de SDF-1 et ITAC non-radiomarqués allant de  $10^{-11}$  à  $10^{-6}\text{M}$ , ont été utilisées.

Brièvement, des cellules HEK ont été transfectées avec 2 $\mu\text{g}$  de CXCR7 WT, ou 2 $\mu\text{g}$  de mutant. 24h après la transfection, les cellules ont été lavées avec du PBS puis ont été traitées avec 100 $\mu\text{M}$  de phenylarsine oxide (PAO), pendant cinq minutes à 37°C. Le PAO étant un inhibiteur de protéines tyrosine phosphatases qui permet d'éviter l'endocytose de récepteurs et donc, la perte des compétiteurs non radio-marqués qui se seraient fixés aux récepteurs. Après le traitement au PAO, les cellules ont été détachées avec du PBS, centrifugées pendant sept minutes à 500g, puis les culots de cellules obtenus ont été suspendus dans 300 $\mu\text{L}$  de tampon de liaison (voir section 3.1). Des quantités de 10 $\mu\text{L}$  de cellules/puits ont ensuite été transférées dans une plaque quatre-vingt seize puits, puis incubées pendant 30min à 37°C, avec 20 $\mu\text{L}$  de 50pM de  $[^{125}\text{I}]$  SDF-1 et 10 $\mu\text{L}$  de concentrations croissantes de SDF-1 ou ITAC non radio-marqué, allant de  $10^{-11}$  à  $10^{-6}\text{M}$ . Les contenus des puits ont ensuite été transférés sur des membranes de borosilicate (Molecular Devices Corporation), préalablement traitées, pendant quinze minutes, avec une solution de PEI et lavées, pendant quinze minutes, avec une solution de tampon de lavage 2 (voir section 3.1). Lors du transfert sur la membrane, chaque puits a été lavé avec une solution de lavage 1 (voir section 3.1), en utilisant un Combi Cell Harvester (Molecular Devices Corporation). Chaque morceau de membrane sur lequel a été transféré le contenu d'un puits, a ensuite été placé dans un tube de polypropylène 12X75mm. Enfin, la radioactivité émise a été mesurée, en CPM (*counts per minute*), à l'aide d'un compteur gamma (CobraII Auto-Gamma, model E5002, Packard).

Il est à noter que, dans le cas de notre étude, deux types de compétitions ont été réalisées : une compétition homologue et une compétition hétérologue. On parle de compétition homologue lorsque le ligand radio-marqué et non radio-marqué est le même; dans notre cas, lorsqu'on compétitionne le SDF-1 radio-marqué avec le SDF-1 non radio-marqué. On parle de compétition hétérologue lorsque le ligand radio-marqué et non radio-marqué diffèrent; dans notre cas, lorsqu'on compétitionne SDF-1 radio-marqué avec ITAC.

### **3.6.2. Courbes de radio-liaison :**

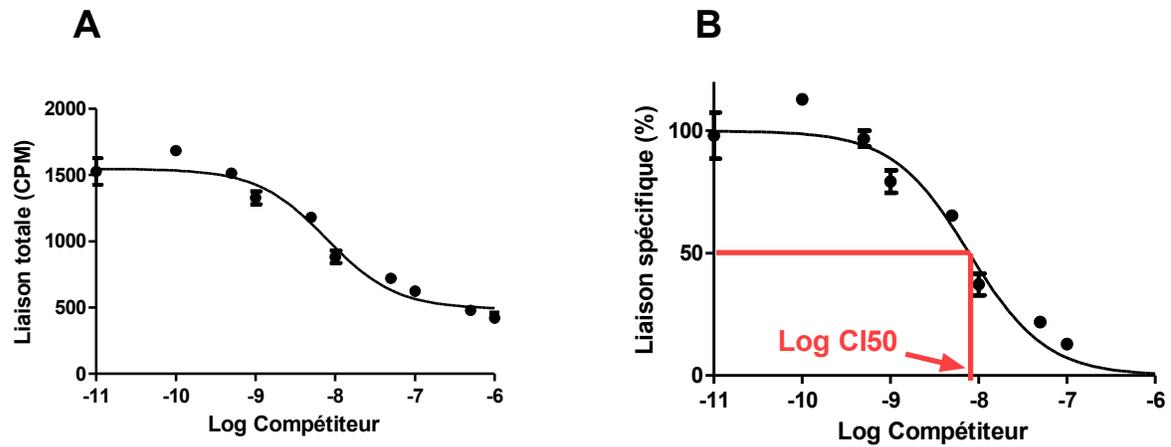
Les essais de radio-liaison par compétition se traduisent par des courbes dose-réponse (voir section 3.5.3) sigmoïdales inversées telles que représentées dans la figure 9.

Afin d'obtenir uniquement la liaison spécifique, on soustrait, de la liaison totale exprimée en comptes par minute (CPM) (fig9.A.), la liaison non spécifique. Celle-ci est obtenue en présence d'un grand excès de ligand non radio-marqué, le radio-ligand ne se liera plus qu'aux sites non spécifiques puisque le ligand non radio-marqué se sera lié à tous les récepteurs disponibles et donc aura occupé tous les sites spécifiques. Dans notre cas, cet excès de ligand non radio-marqué correspond à la concentration  $10^{-6}$  M; on fixe alors à 0% la liaison du radio-ligand en présence de cette concentration. On fixe à 100% la liaison en présence des concentrations minimales de ligand non radio-marqué de  $10^{-11}$  M (fig.9.B).

Les essais de radio-liaison permettent de déterminer l'affinité d'un ligand pour son récepteur, qui représente la capacité de liaison d'un ligand à son récepteur. La force d'interaction entre le ligand et le récepteur peut dépendre de plusieurs facteurs telles que les ponts hydrogène, les forces de Van der Waals ainsi que les interactions électrostatiques, hydrophobes qui existent entre les deux. Elle ne donne cependant pas de données quantitatives ou fonctionnelles concernant l'interaction du ligand avec son récepteur mais permet plutôt de comparer l'intensité des différentes interactions des ligands avec le même récepteur (Kenakin, 2010).

Dans le cas de notre étude, l'affinité des chimiokines ITAC et SDF-1 pour CXCR7 seront comparées pour les différents mutants. Pour cela, on s'intéresse aux valeurs des CI50 ou *Concentrations Inhibitrices Médiannes*, qui correspondent aux concentrations de compétiteur non radio-marqué nécessaires pour déplacer/compétitionner 50% du radio-ligand (fig.9.B). Plus cette valeur est basse, plus l'affinité du ligand non radio-marqué est élevée

pour le récepteur et inversement, plus cette valeur est élevée, plus l'affinité du ligand non radio-marqué pour le récepteur est basse comparativement au ligand radio-marqué. Il est cependant à noter que la compétition hétérologue entre le SDF-1 radio-marqué et ITAC ne reflète pas l'affinité réelle du ligand ITAC pour le récepteur CXCR7 puisque la compétition ne se fait pas en homologue avec de l'ITAC radio-marqué.



**Figure 9. Courbes de radio-liaison par compétition/déplacement.** (A) Représentation de la liaison totale, exprimée en comptes par minutes (CPM), en fonction du logarithme de la concentration du ligand compétiteur non radio-marqué. (B) Représentation de la liaison spécifique, exprimée en pourcentage, en fonction du logarithme de la concentration du ligand compétiteur non radio-marqué, il s'agit de la représentation graphique la plus courante. Le log CI50 est déterminé pour des liaisons spécifiques de 50%.

### **3.7. Analyse des données:**

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Prism 5.0 (Graphpad software, San Diego, CA). Les données sont exprimées avec un écart type  $\pm$ SEM d'au moins 3 expériences réalisées séparément.

Un profil représentatif de l'intensité de fluorescences, du récepteur CXCR7 WT et de quelques mutants, mesurées par cytométrie en flux, a été réalisé avec le logiciel FlowJo.

Les essais de radio-liaison et de recrutement de  $\beta$ -arrestine ont été analysés par régression non linéaire et les données ont été ajustées sous formes de courbes sigmoïdales dose-réponse dans le but de déterminer les valeurs de CE50 et CI50.

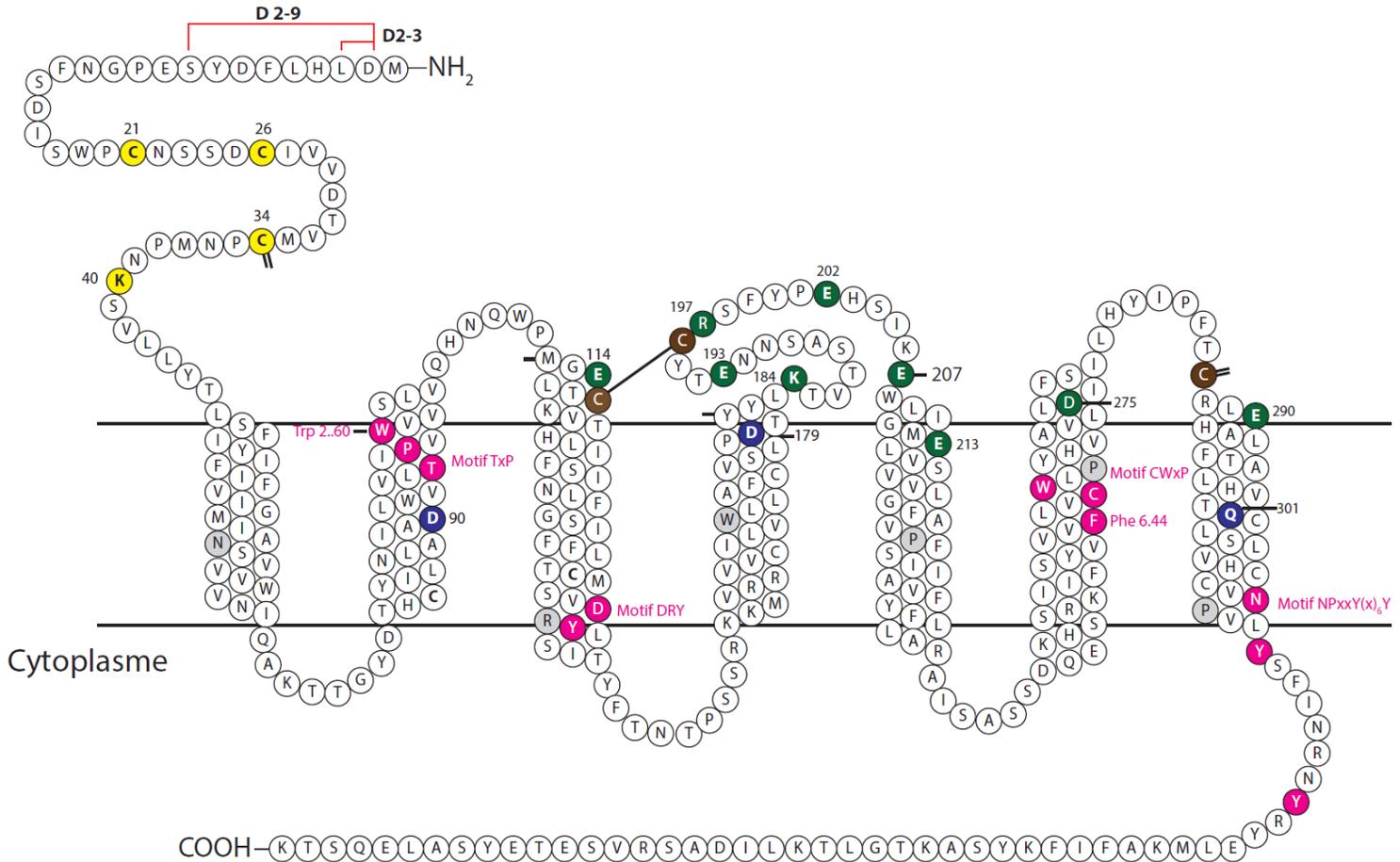
Enfin, les différences significatives entre les résultats d'essais comparant les récepteurs stimulés et non stimulés, ont été analysées par la méthode 1-way ANOVA avec le test Dunnett.

## **4. Résultats et interprétations :**

### **4.1. Mutagénèse et CXCR7 WT :**

Dans le but d'étudier le mode d'interaction du récepteur CXCR7 avec ses ligands ITAC et SDF-1, nous avons produit une série de mutants qui permettent d'adresser le rôle: i) de la partie extracellulaire NH<sub>2</sub> -terminale (N-terminal), par délétions de différentes longueurs ( $\Delta$ 2-3 et  $\Delta$ 2-9) et par substitutions de résidus chargés en alanine; ii) des boucles extracellulaires (ECL) et des segments transmembranaires (TM), en mutant les résidus chargés en leurs contreparties neutres ou en résidus de charges opposées. Les positions de ces différentes mutations et délétions sont représentées sur la figure 10. En plus des mutations de résidus chargés, des mutations de cystéines, en positions 21, 26 et 34, en sérine ont été réalisées dans le but de déterminer la position de la cystéine intervenant dans le pont disulfure liant la région N-terminale à la troisième boucle extracellulaire (ECL3) (voir section **1.2.4**). L'ensemble de ces mutations sont résumées dans le tableau I, p.42.

Les effets des différentes mutations et délétions sur le récepteur ont été testés via des essais de marquage en surface par cytométrie en flux, de recrutement de  $\beta$ -arrestine par BRET et des essais d'interaction avec les ligands par expériences de radio-liaison.



**Figure 10. Représentation schématique de CXCR7 et des résidus mutés.** Les limites de délétions du N-terminal sont indiquées par les traits rouges. Les mutations au niveau du N-terminal sont indiquées en jaune, celles au niveau des ECL en vert et celles au niveau des domaines TM en bleu. Le numéro du résidu correspondant à la mutation est indiqué à côté de ce dernier. Les cystéines intervenant dans un pont disulfure sont représentées en marron et le pont en trait plein. Les motifs et résidus conservés chez les récepteurs de chimiokines sont indiqués en rose et ceux conservés pour chaque domaine TM sont indiqués en gris.

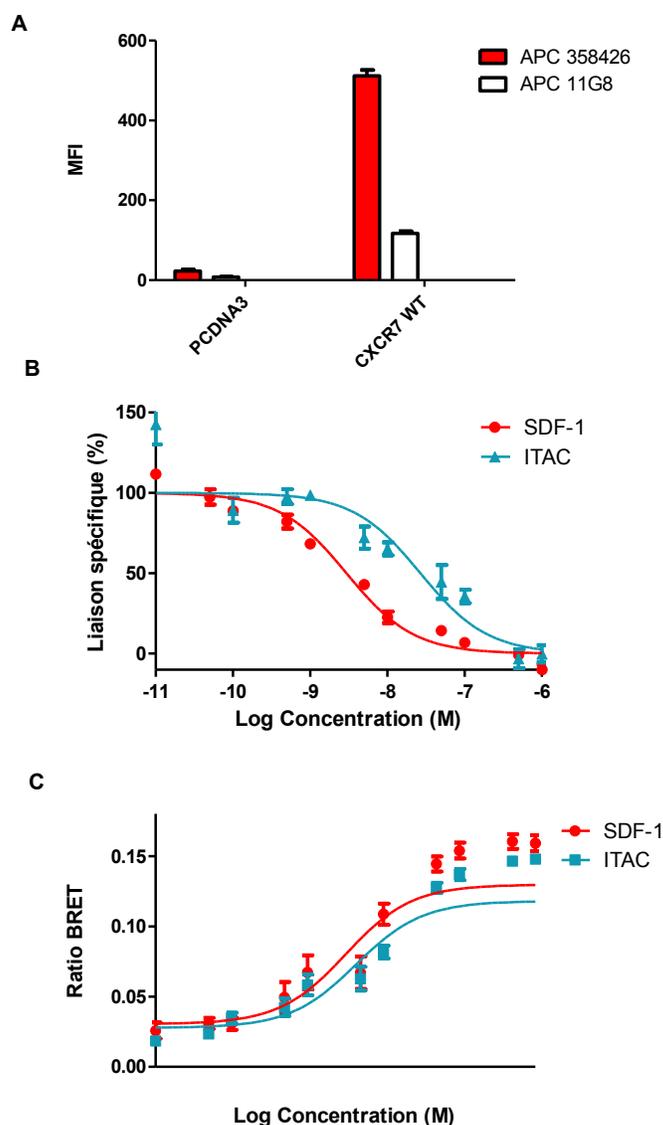
**Tableau I. Tableau récapitulatif des mutants de la région N-terminale, des boucles extracellulaires et des domaines transmembranaires de CXCR7.**

Localisation		Mutations	Description de la mutation
Région N-terminale		K40A	Substitution du résidu basique lysine K40 par une alanine A
		K40R	Substitution du résidu basique lysine K40 par une arginine R
		CCSS1-2	Substitution de la première et deuxième cystéine du N-terminal C21 et C26 par des sérines S
		CCSS2-3	Substitution de la deuxième et troisième cystéine du N-terminal C26 et C34 par des sérines S
		Δ 2-3	Délétion du deuxième et troisième acide aminé du N-terminal
		Δ 2-9	Délétion du deuxième au neuvième acide aminé du N-terminal
Boucles Extracellulaires	ECL1	E114Q	Substitution de l'acide glutamique E114 par un glutamate Q
	ECL2	D179N	Substitution de l'acide aspartique D179 par une asparagine N
		K184A	Substitution du résidu basique lysine K184 par une alanine A
		E193Q	Substitution de l'acide glutamique E193 par un glutamate Q
		R197A	Substitution du résidu basique arginine R197 par une alanine A
		E202Q	Substitution de l'acide glutamique E202 par un glutamate Q
		K206D	Substitution du résidu basique lysine K206 par un acide aspartique D
		E207Q	Substitution de l'acide glutamique E207 par un glutamate Q
		E213Q	Substitution de l'acide glutamique E213 par un glutamate Q
	ECL3	D275A	Substitution de l'acide aspartique D275 par une alanine A
		E290Q	Substitution de l'acide glutamique E290 par un glutamate Q
Domaines Trans- membranaires	D90N	Substitution de l'acide aspartique D90 par une asparagine N	
	Q301E	Substitution de l'acide aminé glutamate Q301 par l'acide glutamique E	

Lors de cette étude, le récepteur CXCR7 WT a été pris comme modèle de référence. Ainsi, les taux de marquage en surface des mutants seront exprimés en pourcentage des moyennes de fluorescences (MFI) des anticorps APC 358426 et APC 11G8 du CXCR7 WT. Nous comparerons également les valeurs des CE50 et CI50 des essais de BRET et de radio-liaison des mutants à celles du récepteur WT.

Les résultats de marquage cellulaire, de radio-liaison ainsi que de recrutement de  $\beta$ -arrestine du récepteur CXCR7 WT sont montrés sur la figure 11. Le récepteur CXCR7 WT produit est correctement exprimé en surface cellulaire, il est néanmoins à noter que le marquage à l'APC 11G8 est beaucoup moins intense que celui à l'APC 358426 avec des MFI de 117 et 511 respectivement. CXCR7 WT lie SDF-1 et ITAC avec des CI50 respectifs de 2,9nM et 26,8nM, ce qui est cohérent avec les données de littérature stipulant que CXCR7 aurait une affinité de liaison environ dix fois supérieure pour SDF-1 que pour ITAC (Burns et al., 2006). Enfin, CXCR7 recrute la  $\beta$ -arrestine avec des CE50 pratiquement similaires en réponse à une stimulation par SDF-1 ou par ITAC soit de 3,2nM et 4,4nM respectivement.

Le récepteur CXCR7 WT produit dans notre modèle est parfaitement fonctionnel et peut donc être utilisé comme contrôle positif pour les besoins de nos expériences.



**Figure 11. Les récepteurs CXCR7 WT sont exprimés à la surface des cellules HEK293E transfectées, lient SDF-1 et ITAC et recrutent la  $\beta$ -arrestine.** (A) Des cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Leur marquage en surface a été estimé par cytométrie en flux après marquage aux anticorps APC 358426 et APC 11G8. (B) La capacité de liaison de CXCR7 WT aux ligands est déterminée par déplacement de [ $^{125}$ I] SDF-1 par des concentrations croissantes de SDF-1 et ITAC dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g de CXCR7 WT. (C) Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E transfectées avec 1 $\mu$ g de CXCR7 WT, 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par différentes concentrations croissantes de ligands. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

## 4.2. Expression en surface des mutants :

Les essais de BRET et de radio-liaison nécessitant la présence d'un récepteur en surface cellulaire pour l'interaction avec son ligand, il était essentiel de vérifier l'expression en surface des mutants produits. Celle-ci a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide de cellules HEK transfectées avec 0,5µg de CXCR7 WT ou de mutants et incubées avec des anticorps spécifiques anti-CXCR7 couplés à un fluorochrome allophycocyanine ou APC (les clones 358426 et 11G8 de l'anticorps ont été utilisés). Si le récepteur est exprimé en surface, il y aura fixation de l'anticorps, marquage de la cellule et détection d'une fluorescence par le cytomètre. Si, au contraire, le récepteur est peu ou pas du tout exprimé à la surface de la cellule, le marquage sera très faible ou inexistant et il y aura peu ou pas de fluorescence détectée par le cytomètre. Il est cependant à noter qu'un récepteur correctement exprimé en surface peut avoir un faible marquage dû à une altération de l'épitope de l'anticorps; ce point sera discuté ci-après.

Comme mentionné précédemment, dans la section 4.1, les marquages en surface des mutants ont été normalisés par rapport à ceux du récepteur CXCR7 WT. Pour ce faire, les fluorescences moyennes (MFI) des mutants, calculées par le cytomètre, ont été exprimées en pourcentage de fluorescence moyenne du récepteur CXCR7 WT. Les résultats de marquage en surface des mutants par les deux clones de l'anticorps sont montrés sur la figure 12 : les mutants ont été divisés en trois groupes selon leur localisation soit la partie N-terminale, les boucles extracellulaires et les segments transmembranaires du récepteur.

Pour la majorité des mutants de CXCR7 produits, le marquage en surface était supérieur à 70% suggérant que le repliement global du récepteur et son cheminement en surface n'étaient pas trop affectés. Cependant, certaines mutations ont altéré le marquage des récepteurs et donc potentiellement leur expression en surface.

Ainsi, on remarque au niveau de la région N-terminale un très faible marquage cellulaire pour les deux délétions  $\Delta 2-3$  et  $\Delta 2-9$ , mais de façon un peu moins prononcée lorsqu'on marque à l'anticorps APC 11G8 (figure 12.A). En effet, un marquage en surface de seulement 5-10% a pu être détecté pour l'anticorps APC 358426 contre 35% pour l'anticorps APC 11G8. On remarque également un très faible marquage en surface du double mutant CC26/34SS soit environ 35% comparativement au récepteur WT.

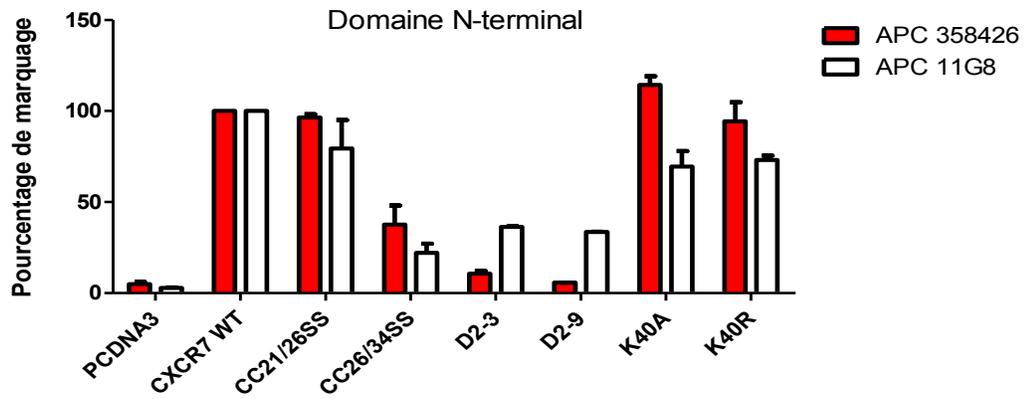
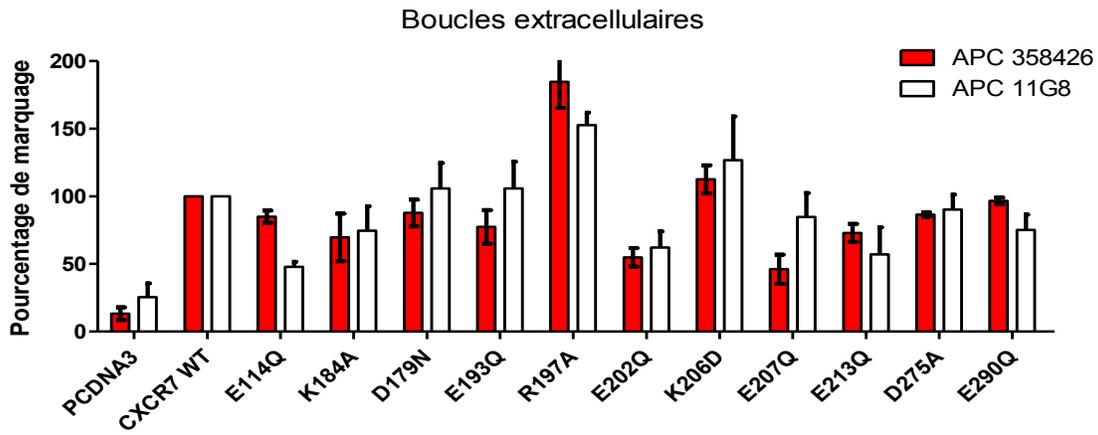
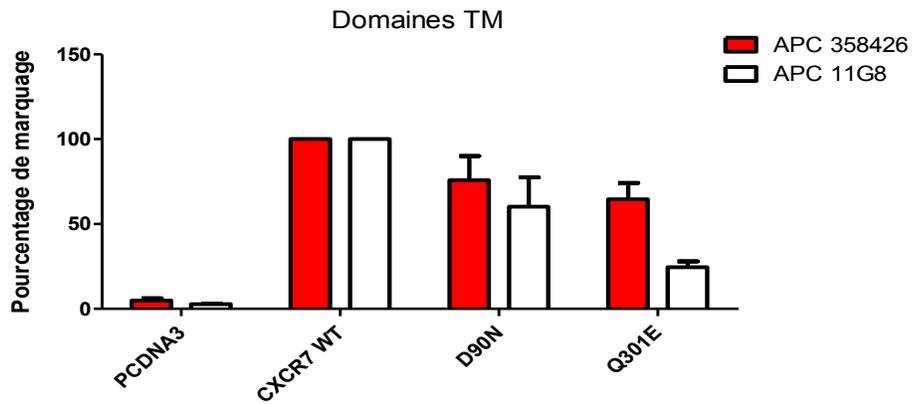
Deux hypothèses s'offrent à nous quant à l'explication du faible marquage en surface de ces mutants. Soit les délétions des régions de la partie N-terminale du récepteur ont affecté le transport ou la stabilité du récepteur en surface, et donc le faible marquage refléterait une faible expression en surface des récepteurs. Soit il s'agit d'un problème d'anticorps : les épitopes des anticorps APC 358426 et 11G8 auraient été altérés par les mutations résultant en une faible fixation de ces derniers (les épitopes de ces anticorps ne sont pas connus). Les résultats de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de radio-liaison aideront à trancher.

Du côté des boucles extracellulaires (figure 12.B) : le mutant E202Q est marqué à des niveaux de 54% lorsque l'on marque au clone APC 358426; soit pratiquement la moitié du marquage en surface du récepteur WT. Les mutants R197A et K206D semblent être surexprimés comparativement au récepteur WT puisque les pourcentages de marquage sont autour de 184% et 112% respectivement lorsqu'on marque à l'APC 358426 et de 152% et 126% respectivement lorsqu'on marque à l'APC 11G8.

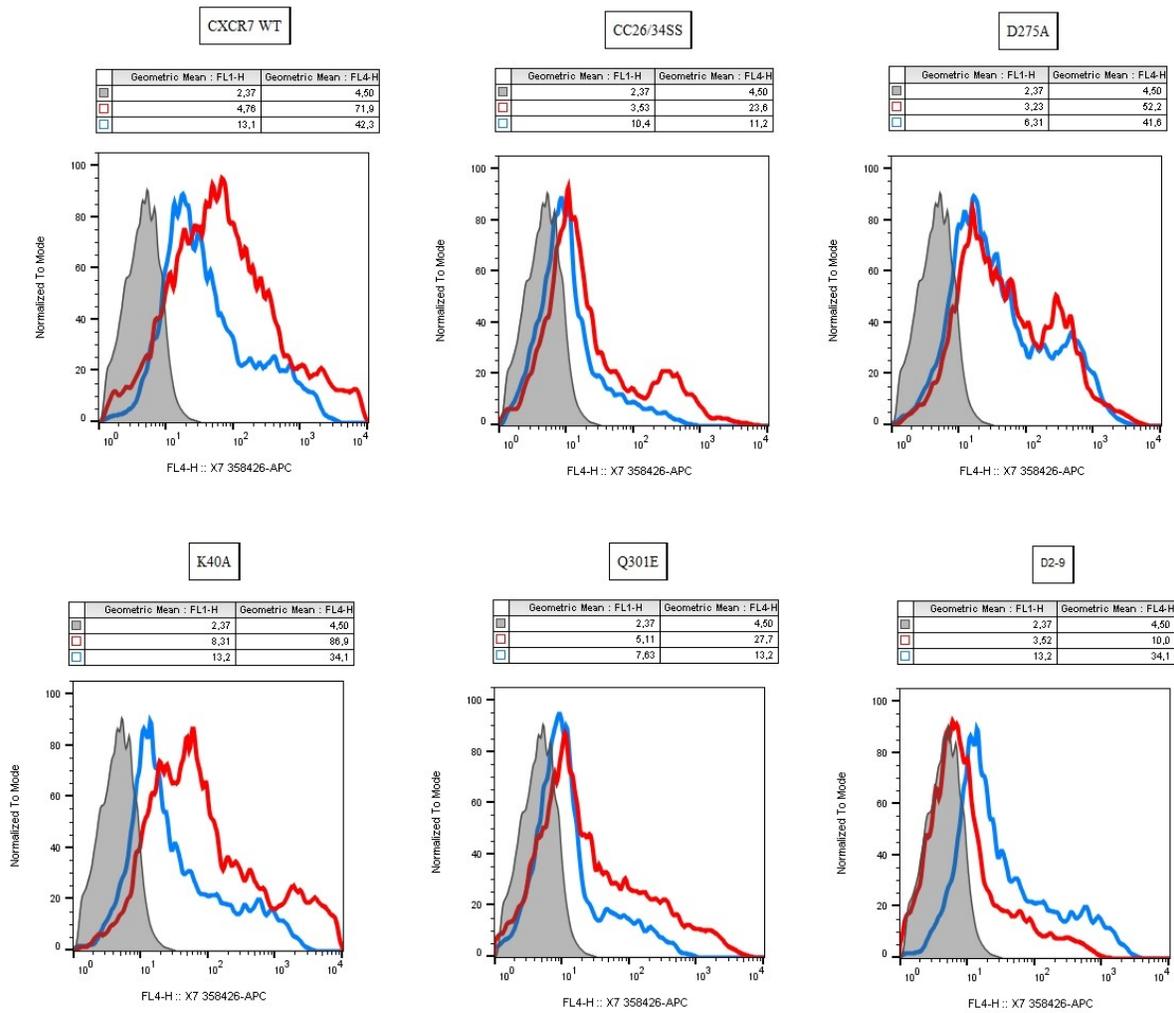
Il est intéressant de noter que certaines mutations ont différemment affecté le marquage en surface du récepteur selon l'anticorps utilisé ; la mutation du résidu K40 du domaine N-terminal a ainsi entraîné un marquage en surface de 69% avec l'anticorps APC 11G8 et de 114% avec l'anticorps APC 358426. De même, le mutant E114Q de l'ECL1 a un marquage en surface de 85% lorsqu'on marque avec le clone APC 358426 et qui baisse à 48% lorsqu'on marque avec le clone APC 11G8. Le mutant E207Q de l'ECL2, quant à lui, est marqué à 46% avec l'anticorps APC 358426 contre 85% avec l'anticorps APC 11G8. Enfin, le mutant Q301E de la septième hélice transmembranaire (TM7) est marqué à 25% avec le clone APC 11G8 mais à 65% lorsqu'on marque avec le clone APC 358426. Ces résultats de disproportion de marquage en surface seront discutés dans le chapitre discussion.

Des histogrammes représentatifs de l'intensité de fluorescence du récepteur CXCR7 ont été réalisés pour le récepteur CXCR7 WT, un mutant bien marqué (D275A), un mutant faiblement marqué (CC26/34SS) et quelques mutants où on remarque la disproportion de marquage (K40A, Q301E et D2-9) suite à des marquages par l'APC 358426 ou l'APC 11G8.

Afin de faciliter la compréhension des résultats qui suivent et pour une meilleure vue d'ensemble, les résultats de marquages cellulaires seront repris pour chaque partie traitée en compagnie des résultats de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de radio-liaison.

**A****B****C**

D



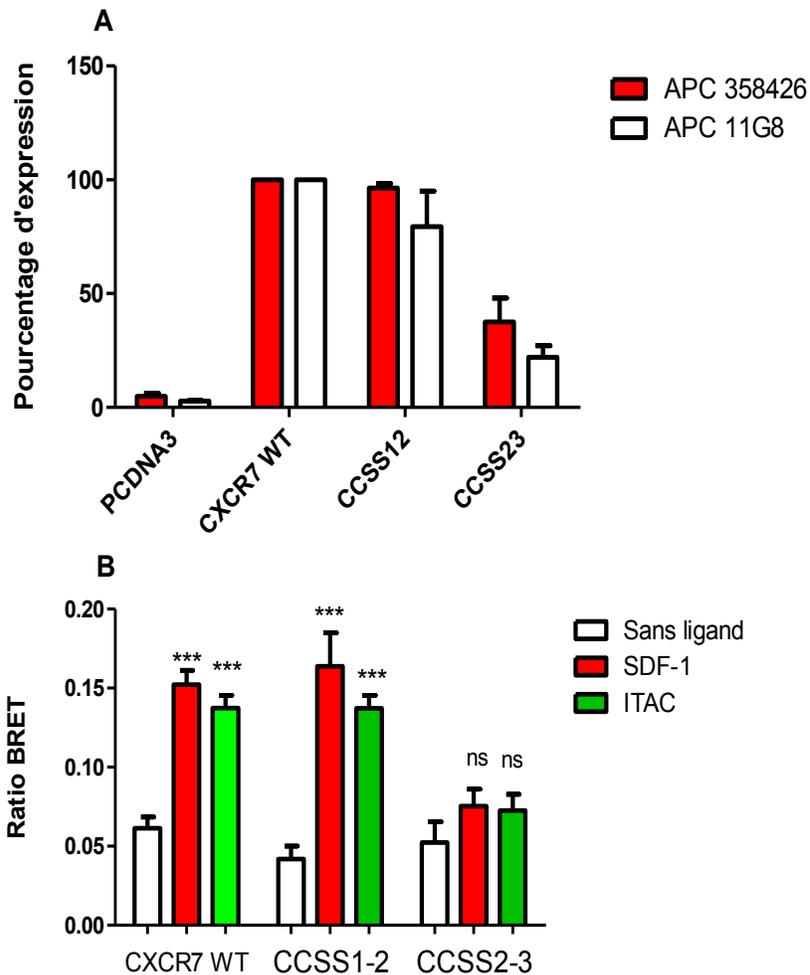
**Figure 12. Faibles marquages et disproportions de marquage en surface cellulaire, par les anticorps APC 358426 et APC 11G8, de certains mutants de CXCR7.** Des cellules HEK ont été transfectées avec 0,5µg de CXCR7 WT ou 0,5µg de mutants, et incubées avec des anticorps anti- CXCR7 APC 358426 et 11G8. Les intensités de fluorescences ont été détectées par FACS et sont exprimées en pourcentage de l'intensité de fluorescence du récepteur CXCR7 WT. Les mutants ont été regroupés selon les domaines du récepteur : région N-terminale (A), boucles extracellulaires ECL (B) et domaines transmembranaires TM (C). Les résultats représentent la moyenne ±SEM d'au moins trois expériences indépendantes. D) Des histogrammes représentatifs de l'intensité de fluorescences du récepteur CXCR7 WT et des mutants CC26/34SS, D275A, K40A, Q301E et D2-9 suite à un marquage par l'APC 358426 (rouge) ou APC 11G8 (bleu) ont été obtenus par cytométrie en flux et analysés avec le logiciel d'analyse FlowJo. L'isotype contrôle (IgG2) est représenté en gris.

### 4. 3. Rôle structurel et fonctionnel des cystéines du N-terminal :

Les récepteurs de chimiokines ont comme particularité la présence d'un pont disulfure entre la troisième boucle extracellulaire (ECL3) et le domaine N-terminal : ce pont est très important pour la liaison des chimiokines au récepteur ainsi que pour la fonction et la structure de ce dernier (Nomiyama et al., 2015; Rana et al., 2010; Szpakowska et al., 2014; Venkatakrisnan et al., 2013). Nous avons donc muté les cystéines de la région N-terminale afin de découvrir laquelle des trois cystéines engage un pont disulfure avec l'ECL3 et si ce pont est tout aussi important pour la fonction du récepteur CXCR7. De ces mutations résultent les doubles mutants CC21/26SS et CC26/34SS qui seront appelés respectivement CCSS1-2 et CCSS2-3 dans le présent mémoire.

Après avoir réalisé les essais de cytométrie en flux (figure 13.A), nous avons mené des essais de screening BRET. Les récepteurs ont alors été stimulés par une concentration unique de 200nM de SDF-1 ou d'ITAC et leur capacité à recruter la  $\beta$ -arrestine a été testée (figure 13.B). 200nM est une concentration de ligand pour laquelle la réponse d'un récepteur devrait être proche de la réponse maximale : un récepteur fonctionnel devrait être capable de recruter la  $\beta$ -arrestine après stimulation par une telle concentration; par contre, un récepteur inactif ou mal fonctionnel recrutera très peu ou pas de  $\beta$ -arrestine.

Alors que le mutant CCSS1-2 semble efficacement recruter la  $\beta$ -arrestine en présence de concentrations de SDF-1 et ITAC de 200nM, on ne remarque pratiquement pas de recrutement de cette dernière par le mutant CCSS2-3. En effet, contrairement au mutant CCSS1-2, les différences de ratio BRET sont statistiquement non significatives entre le mutant CCSS2-3 stimulé par SDF-1 et ITAC, et le mutant non stimulé (figure 13.B). Ces observations corrélaient avec le fait que le marquage en surface du mutant CCSS1-2 soit de 96% de celui du récepteur WT; alors que le récepteur CCSS 2-3 est marqué à seulement 37% en surface cellulaire (fig.13.A).



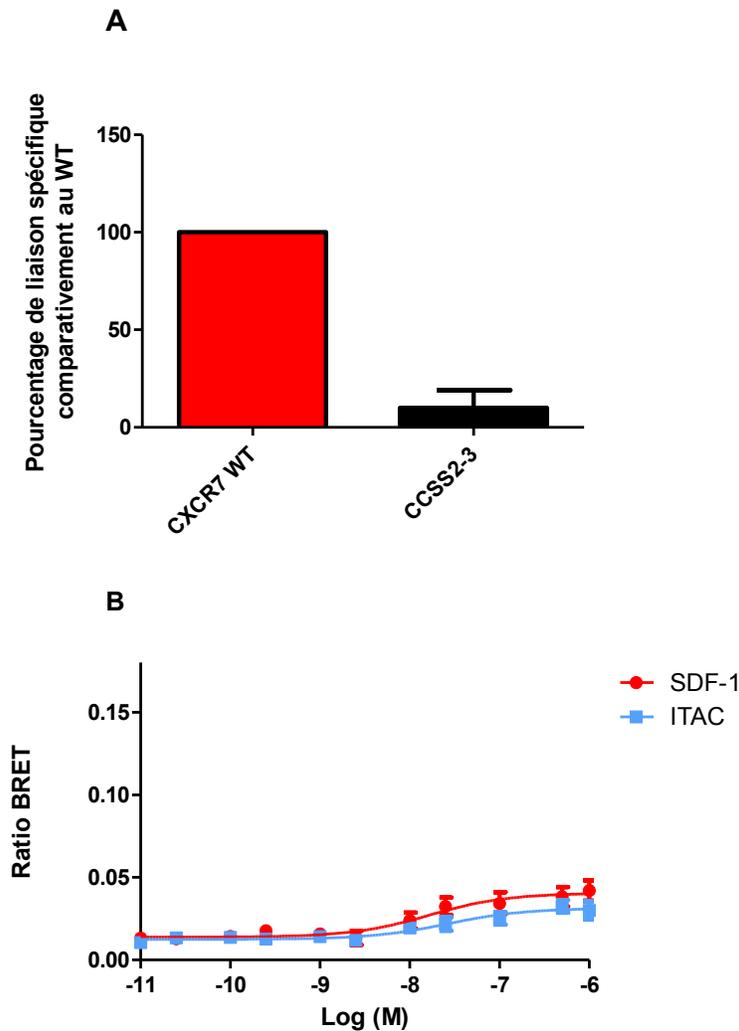
**Figure 13. Le mutant CCSSS2-3 est faiblement marqué en surface et ne recrute pas de  $\beta$ -arrestine à 200nM de ligands, contrairement au mutant CCSS1-2.** (A) Des cellules HEK ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT, CCSS1-2 ou CCSS2-3 et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Leur marquage en surface par les anticorps APC 358426 et APC 11G8 a été estimé par cytométrie en flux. Les intensités de fluorescences sont exprimées en pourcentage de l'intensité de fluorescence du récepteur CXCR7 WT. (B) Essais de recrutement de  $\beta$ -arrestine après stimulation par des concentrations de ligands de 200nM de cellules HEK transfectées avec 1 $\mu$ g de CXCR7 WT, CCSS1-2 ou CCSS2-3 et 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les résultats de screening BRET ont été analysées par la méthode 1-way ANOVA avec le test Dunnett comparant les récepteurs stimulés vs les récepteurs non stimulés : \*\*\* :  $p < 0.0001$ , ns : non significatif.

Suite aux résultats du screening BRET, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au mutant CCSS2-3 et avons réalisé des essais de recrutement de  $\beta$ -arrestine en dose-réponse; c'est-à-dire par des stimulations de concentrations croissantes de SDF-1 et d'ITAC. Des expériences de radio-liaison ont également été réalisées. Les courbes dose-réponse permettent de confirmer les résultats du screening BRET sur une plus grande échelle de concentrations et les expériences de radio-liaison permettent de savoir si les anomalies d'activités des récepteurs seraient dues à des anomalies de liaison des chimiokines à ces derniers. De façon générale, la même logique et démarche ont été utilisées pour le reste de l'étude.

Les courbes dose-réponse du double mutant CCSS2-3 confirment que celui-ci recrute très peu de  $\beta$ -arrestine que ça soit après une stimulation par SDF-1 ou par ITAC avec des BRET net maximaux d'environ 0,04 et 0,03 respectivement (figure 14.B). De plus, les CE50 sont de 16,5 nM et 26,4 nM en réponse à SDF-1 et ITAC respectivement, soit plus de cinq et six fois supérieures à celles du récepteur WT (voir tableau II, p.53). Ce très faible recrutement de  $\beta$ -arrestine corrèle avec sa quasi-incapacité à lier SDF-1 et ITAC (figure 14.A). En effet, les liaisons spécifiques du mutant CCSS2-3 étaient trop petites pour pouvoir déterminer des CI50 : la liaison spécifique en absence de ligand était d'environ 200 CPM contre plus de 2000 CPM pour le récepteur WT (données pré-normalisation), soit 10% de la liaison du récepteur WT. Ceci suggère une quasi-absence de liaison des chimiokines au récepteur.

L'ensemble de ces résultats corrèle avec le faible marquage en surface du double mutant CCSS2-3 et suggère que la mutation a résulté en une très faible expression en surface du récepteur, expliquant les faibles réponses de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de radio-liaison.

Le mutant CCSS1-2, quant à lui, lie correctement SDF-1 et ITAC avec des liaisons spécifiques d'en moyenne 1600 CPM (résultats pré-normalisation), et des CI50 légèrement supérieures à celles du récepteur WT (voir tableau II, p.53).



**Figure 14. Le double mutant CCSS2-3 ne lie pas SDF-1 et ITAC et recrute très peu de  $\beta$ -arrestine en essai BRET dose-réponse.** (A) Les liaisons non spécifiques de [ $^{125}$ I] SDF-1 du mutant CCSS2-3 – correspondant à la liaison en présence d'un excès de ligand non radio-marqué ( $10^{-6}$ M)- ont été soustraites pour chaque point. Les liaisons spécifiques ont été déterminées en pourcentage de liaison du récepteur WT en absence de ligand non radio-marqué, dans des cellules HEK293E transfectées avec  $2\mu\text{g}$  CCSS2-3. (B) Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec  $1\mu\text{g}$  de CCSS2-3,  $50\text{ng}$  de  $\beta$ -arrestine-Rluc et  $0,95\mu\text{g}$  de PCDNA3 et stimulées par différentes concentrations croissantes de ligands. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

**Tableau II. Résultats des essais de marquage en surface cellulaire, de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de liaison des chimiokines ITAC et SDF-1 des mutants du domaine N-terminal de CXCR7.** ND : non déterminé, NA : non applicable, SEM : standard error of the mean.

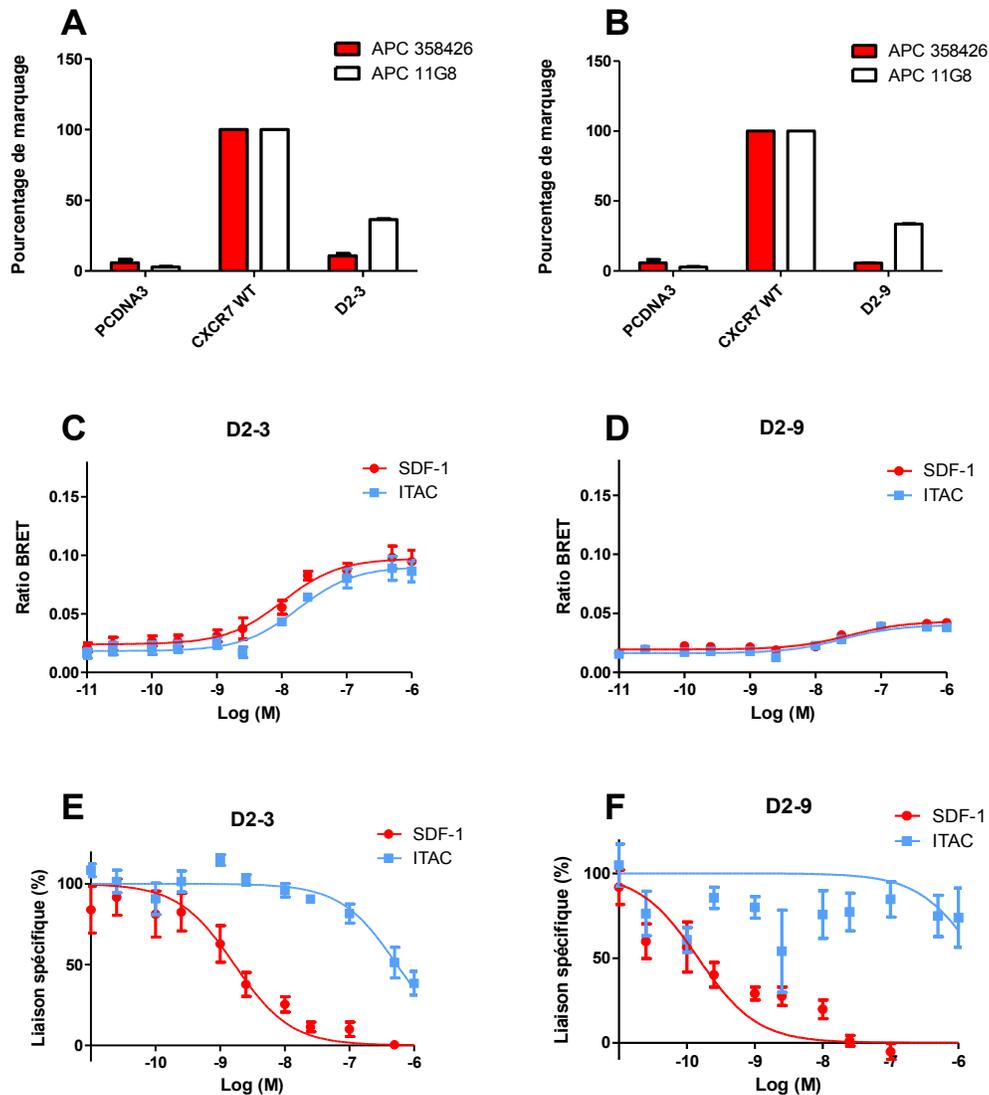
Mutation	Récepteur	% de marquage du WT		CE50 de recrutement de $\beta$ -arrestine (nM)		Log CE50 (M) $\pm$ Log SEM		CI50 (nM)		Log CI50 (M) $\pm$ Log SEM	
		APC 358426	APC 11G8	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC
WT	CXCR7	100	100	3.2	4.4	-8.5 $\pm$ 0.2	-8.4 $\pm$ 0.2	2.9	26.8	-8.5 $\pm$ 0.05	-7.6 $\pm$ 0.1
Résidus chargés	K 40A	114 $\pm$ 4,6	69,3 $\pm$ 8,7	ND	ND	ND	ND	10.5	37.3	-7.9 $\pm$ 0.1	-7.4 $\pm$ 0.1
	K40R	94 $\pm$ 10,4	73,2 $\pm$ 2,4	ND	ND	ND	ND	ND	45.7	ND	-7.3 $\pm$ 0.1
Cystéines	CCSS1-2	96 $\pm$ 1,9	79,4 $\pm$ 15,7	ND	ND	ND	ND	13.4	86.6	-7.8 $\pm$ 0.1	-7.1 $\pm$ 0.1
	CCSS2-3	37 $\pm$ 10,5	22,1 $\pm$ 5,0	16.5	26.4	-7.8 $\pm$ 0.3	-7.6 $\pm$ 0.3	NA	NA	NA	NA
Délétions	$\Delta$ 2-3	10,7 $\pm$ 1,5	36,4 $\pm$ 0,4	10.3	17.9	-8.0 $\pm$ 0.1	-7.7 $\pm$ 0.1	1.6	540.1	-8.8 $\pm$ 0.1	-6.3 $\pm$ 0.1
	$\Delta$ 2-9	7,5 $\pm$ 0,1	33,5 $\pm$ 0,2	33	26	-7.5 $\pm$ 0.2	-7.6 $\pm$ 0.2	0.15	1956	-9.8 $\pm$ 0.1	-5.7 $\pm$ 0.2

## 4. 4. Rôle structurel et fonctionnel du domaine N-terminal:

### 4.4.1. Délétions :

Les essais de BRET en dose-réponse montrent que, malgré un très faible marquage en surface, le mutant  $\Delta 2-3$  semble répondre correctement aux stimulations par SDF-1 et ITAC (figure 15.C). En effet, le mutant est capable de recruter la  $\beta$ -arrestine, quoi qu'avec des valeurs de CE50 trois et quatre fois supérieures à celles du récepteur WT pour SDF-1 et ITAC respectivement (tableau II). Les tests de radio-liaison indiquent également que le mutant lie efficacement le SDF-1, avec une CI50 plus ou moins similaire à celle du récepteur WT (tableau II). Cependant, le mutant lie l'ITAC avec une CI50 plus de vingt fois supérieure à celle du récepteur WT (540,1nM contre 26,8nM), suggérant une perte d'affinité pour l'ITAC. La délétion aurait donc altéré la liaison de l'ITAC mais pas celle du SDF-1 au récepteur.

Les courbes dose-réponse du mutant  $\Delta 2-9$ , par contre, montrent que ce dernier recrute très peu de  $\beta$ -arrestine que ça soit après stimulation par SDF-1 ou par ITAC (figure 15); les valeurs de CE50 sont plus de dix et six fois supérieures à celles du WT, suite à des stimulations par SDF-1 et ITAC respectivement (tableau II). On remarque également une forte baisse d'efficacité de la réponse comparativement au récepteur WT et au mutant  $\Delta 2-3$  (fig.15). Les essais de radio-liaison montrent, encore une fois, que le mutant lie le SDF-1, quoi qu'avec une CI50 inférieure à celle du récepteur WT, mais ne semble pas lier d'ITAC (CI50=1956nM soit plus de 70 fois la valeur de la CI50 du récepteur WT).



**Figure 15.** La liaison d'ITAC aux récepteurs est fortement altérée par les délétions  $\Delta$  2-3 et  $\Delta$  2-9, le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à SDF-1 et ITAC est fortement diminué par la délétion  $\Delta$  2-9. (A) et (B): des cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT,  $\Delta$  2-3 ou  $\Delta$  2-9 et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Leur marquage en surface par les anticorps APC 358426 et APC 11G8 a été estimé par cytométrie en flux. (C) et (D): la capacité de liaison des ligands aux mutants est déterminée par déplacement de [<sup>125</sup>I] SDF-1 par des concentrations croissantes de SDF-1 et ITAC dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g de  $\Delta$  2-3 ou  $\Delta$  2-9. (E) et (F) : le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec 1 $\mu$ g de  $\Delta$  2-3 ou  $\Delta$  2-9, 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par différentes concentrations croissantes de ligands. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

#### **4.4.2. Mutations de résidus chargés de la région proximale du N-terminal:**

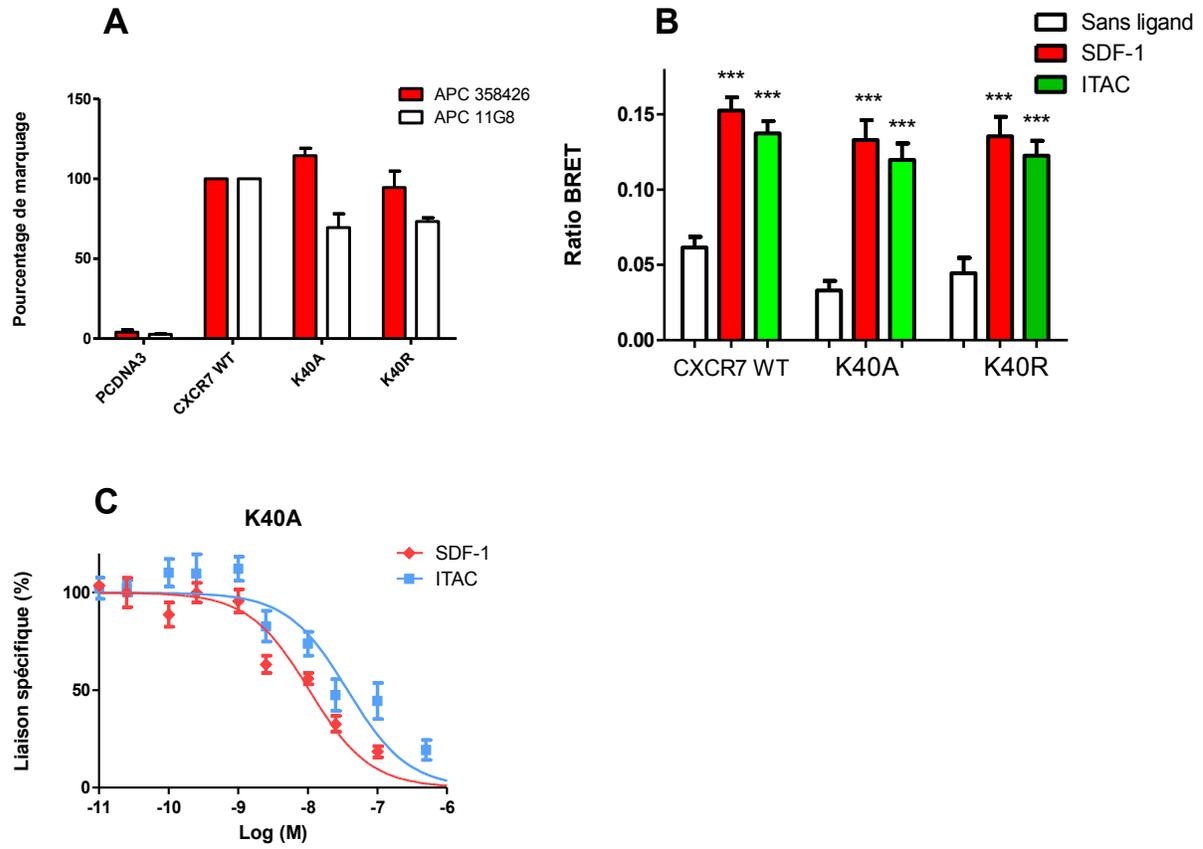
Il a été démontré chez de nombreux récepteurs que ce sont les acides aminés chargés de la région N-terminale du récepteur qui interagissent avec les résidus chargés de la chimiokine via des interactions ioniques, lors de la première étape d'activation du récepteur (Brelot et al., 2000; Petit et al., 2008; Qin et al., 2015; Shimaoka et al., 2004; Wu et al., 2010). C'est pourquoi, nous avons muté les acides aminés chargés du N-terminal afin d'observer les répercussions sur le fonctionnement du récepteur et son interaction avec ses ligands. Ici, nous présenterons seulement les résultats d'acides aminés chargés positivement de la région proximale du N-terminal, car un autre projet du laboratoire traite de l'étude des mutations des acides aminés acides chargés négativement du N-terminal (voir annexe 1).

Seulement le résidu lysine K40 était chargé positivement. Deux mutants ont été générés : pour le premier mutant, la lysine K a été mutée en arginine R afin de préserver la charge positive et de voir si la lysine en elle-même est importante ; pour le deuxième mutant, la lysine a été mutée en un résidu non chargé alanine A, afin de voir si la charge positive est importante.

La mutation de la lysine en arginine R (K40R) ou en sa contrepartie non chargée (K40A) n'a affecté ni le recrutement de  $\beta$ -arrestine par le récepteur ni sa liaison des chimiokines (fig.16). Ceci suggère que le résidu basique K40 ne joue pas de rôle important dans la fonction de CXCR7 ou son interaction avec ses ligands.

Comme les résultats obtenus pour les deux mutants étaient similaires, seulement les résultats de radio-liaison du mutant K40A sont montrés sur la figure 16.

Les résultats des mutations des résidus acides du N-terminal seront discutés dans le chapitre discussion.



**Figure 16. Les mutants du résidu chargé positivement du N-terminal, K40A et K40R, sont exprimés en surface, lient SDF-1 et ITAC et recrutent normalement la  $\beta$ -arrestine à 200nM de ligands.** (A) Des cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT-YFP, K40 A ou K40R et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Leur marquage en surface par les anticorps APC 358426 et APC 11G8 a été estimé par cytométrie en flux. (B) Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec 1 $\mu$ g de K40 A ou K40R, 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par une concentration de 200nM de SDF-1 et ITAC. (C) La capacité de liaison des ligands aux mutants est déterminée par déplacement de [ $^{125}$ I] SDF-1 par des concentrations croissantes de SDF-1 et ITAC dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g de K40A. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les résultats de screening BRET ont été analysées par la méthode 1-way ANOVA avec le test Dunnett comparant les récepteurs stimulés vs les récepteurs non stimulés : \*\*\* :  $p < 0.0001$ .

## 4. 5. Rôle structurel et fonctionnel des boucles extracellulaires

### (ECL):

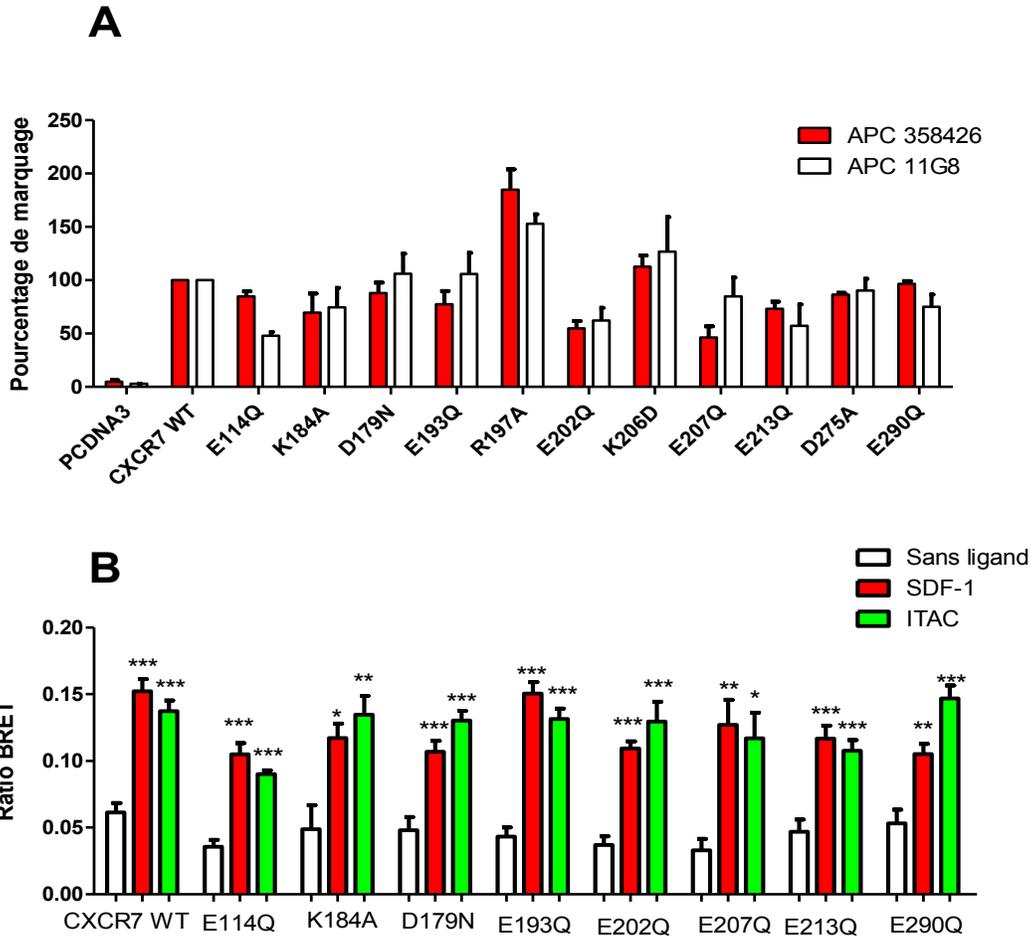
Les boucles extracellulaires des récepteurs de chimiokines jouent un rôle important dans la conformation du récepteur, la reconnaissance et la liaison du ligand, ainsi que dans l'activation du récepteur (Peeters et al., 2011). Nous nous sommes intéressés à voir s'il en était de même pour les boucles extracellulaires de CXCR7.

Comme discuté dans la section précédente, les résidus chargés sont généralement importants pour l'interaction du récepteur avec ses ligands; des mutations de ces résidus ont donc été réalisées. Les mutants sont indiqués sur la figure 10, p.41 ainsi que sur le tableau I p.42. Les chimiokines ITAC et SDF-1 étant toutes deux chargées positivement (Colvin et al., 2006; Murphy et al., 2007), on s'attendrait à ce que ce soient les mutations de résidus acides (donc chargées négativement) de CXCR7 qui aient le plus d'effets sur son interaction avec ses ligands.

Les mutants ont été sujets à des essais de screening BRET à des concentrations de 200nM de ligands; les résultats sont présentés sur la figure 17 assortis des résultats de marquage cellulaire.

Bien que le marquage en surface du mutant E202Q ait été diminué comparativement au récepteur WT -comme vu dans la section 4.2-, cela ne semble néanmoins pas affecter sa capacité à recruter la  $\beta$ -arrestine puisque les différences de ratio BRET suite à des stimulations par SDF-1 et ITAC sont statistiquement significatives entre le mutant stimulé et le mutant non stimulé. De même, les substitutions des autres acides aminés chargés des boucles extracellulaires de CXCR7 ne semblent pas empêcher le récepteur de produire une réponse après stimulations par les ligands et de recruter la  $\beta$ -arrestine

Trois mutants de l'ECL2, soient le R197A, le K206D et le D275A, ne figurent pas dans les screening BRET. Ces mutants ont été générés en dernier et leurs capacités à recruter la  $\beta$ -arrestine a directement été testée par des essais BRET en dose-réponse.



**Figure 17. Les mutants de résidus chargés des boucles extracellulaires sont exprimés en surface et recrutent normalement la  $\beta$ -arrestine aux concentrations de 200nM de ligands.**

(A) Des cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT ou 0,5 $\mu$ g des mutants (E114Q, D179N, K184A, R197A, E202Q, K206D, E207Q, E213Q, D275A ou E290Q) et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Leur marquage en surface par les anticorps APC 358426 et APC 11G8 a été estimé par cytométrie en flux. (B) Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec 1 $\mu$ g de mutants (E114Q, D179N, K184A, R197A, E202Q, K206D, E207Q, E213Q, D275A ou E290Q), 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par une concentration de 200nM de SDF-1 et ITAC (B). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les résultats de screening BRET ont été analysées par la méthode 1-way ANOVA avec le test Dunnett comparant les récepteurs stimulés vs les récepteurs non stimulés. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , ns : non significatif.

**Tableau III. Résultats des essais de marquage en surface cellulaire, de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de liaison des chimiokines ITAC et SDF-1 des mutants des ECL.**

ND : non déterminé, NA : non applicable, SEM : standard error of the mean.

Mutation	Récepteur	% de marquage du WT		CE50 de recrutement de $\beta$ -arrestine		Log CE50 (M) $\pm$ Log SEM		CI50 (nM)		Log CI50 (M) $\pm$ Log SEM	
		APC 358426	APC 11G8	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC
WT	CXCR7	100	100	3.2	4.4	-8.5 $\pm$ 0.2	-8.4 $\pm$ 0.2	2.9	26.8	-8.5 $\pm$ 0.05	-7.6 $\pm$ 0.1
Résidus chargés ECL	E114Q	84.9 $\pm$ 4.5	47.9 $\pm$ 3.8	12.6	30.5	-7.9 $\pm$ 0.2	-7.5 $\pm$ 0.2	13.5	17.7	-7.9 $\pm$ 0.08	-7.7 $\pm$ 0.07
	D179N	87.7 $\pm$ 9.9	8.3 $\pm$ 29.6	15.4	24.8	-7.8 $\pm$ 0.1	-7.6 $\pm$ 0.1	NA	NA	NA	NA
	K184A	69.7 $\pm$ 17.6	74.5 $\pm$ 18.1	10.2	9.8	-8.0 $\pm$ 0.2	-8.0 $\pm$ 0.2	7.5	42.7	-8.1 $\pm$ 0.07	-7.4 $\pm$ 0.1
	E193Q	77.3 $\pm$ 12.4	106 $\pm$ 19.7	6.0	6.2	-8.2 $\pm$ 0.1	-8.2 $\pm$ 0.1	13.7	39.0	-7.9 $\pm$ 0.08	-7.4 $\pm$ 0.07
	R197A	184.7 $\pm$ 33	152.7 $\pm$ 16	29.9	48	-7.5 $\pm$ 0.2	-7.3 $\pm$ 0.2	14.6	78.5	-7.8 $\pm$ 0.06	-7.1 $\pm$ 0.06
	E202Q	54.9 $\pm$ 6.9	62.1 $\pm$ 11.9	15.6	12.9	-7.8 $\pm$ 0.1	-7.8 $\pm$ 0.1	12.0	111	-7.9 $\pm$ 0.06	-6.9 $\pm$ 0.08
	K206D	112.6 $\pm$ 18	126.7 $\pm$ 56	3.9	14.1	-8.4 $\pm$ 0.1	-7.8 $\pm$ 0.1	56.3	20.5	-7.2 $\pm$ 0.07	-7.7 $\pm$ 0.1
	E207Q	46.1 $\pm$ 10.8	84.7 $\pm$ 17.6	6.7	17.6	-8.2 $\pm$ 0.2	-7.7 $\pm$ 0.15	9.3	63.3	-8.0 $\pm$ 0.07	-7.2 $\pm$ 0.1
	E213Q	72.9 $\pm$ 6.7	57.1 $\pm$ 19.9	7.2	11.9	-8.1 $\pm$ 0.1	-7.9 $\pm$ 0.1	5.4	91.7	-8.3 $\pm$ 0.07	-7.0 $\pm$ 0.1
	D275A	86.5 $\pm$ 3	90.2 $\pm$ 19	9.0	44.3	-8.0 $\pm$ 0.2	-7.3 $\pm$ 0.5	NA	NA	NA	NA
E290Q	96.6 $\pm$ 2.4	75.1 $\pm$ 11.3	2.8	5.8	-8.5 $\pm$ 0.1	-8.2 $\pm$ 0.2	16.2	21.4	-7.7 $\pm$ 0.05	-7.8 $\pm$ 0.1	

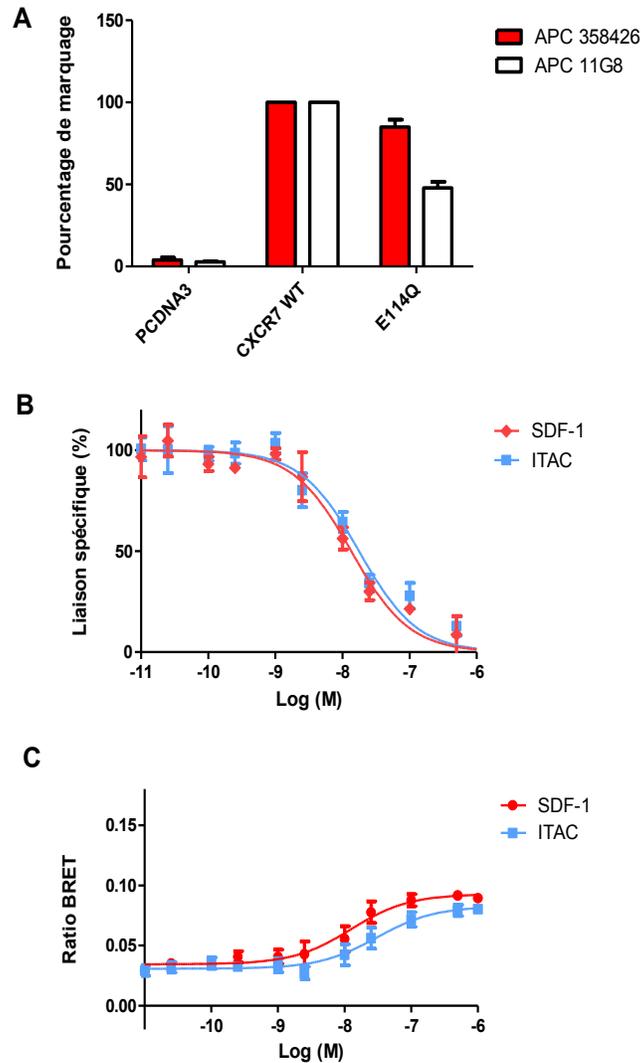
Le tableau ci-dessus (tableau III) résume les résultats de marquage en surface, de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de déplacement du SDF-1 radio-marqué des mutants des boucles extracellulaires.

#### **4.5.1. Mutations des résidus chargés de la première boucle extracellulaire (ECL1) :**

Les résultats de marquage en surface cellulaire, d'essais de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de liaison des ligands du seul mutant de résidu acide de l'ECL1 sont présentés sur la figure 18.

Le mutant E114Q est capable de recruter la  $\beta$ -arrestine mais avec une valeur de CE50 plus de sept fois supérieure à celle du CXCR7 WT en réponse à une stimulation par ITAC et plus de quatre fois supérieure en réponse à une stimulation par SDF-1 (fig.18.C et tableau III). Il lie également efficacement ses ligands mais lie SDF-1 avec une plus faible affinité que le récepteur WT (fig.18.B et tableau III).

Dans l'ensemble, le résidu E114 ne semble pas être essentiel pour la liaison d'ITAC à CXCR7 mais il affecte le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à la chimiokine, suggérant qu'il jouerait un rôle conformationnel pour assurer une activation maximale du récepteur en réponse à ITAC. La mutation de ce résidu a affecté l'affinité du SDF-1 pour le récepteur ainsi que le recrutement subséquent de  $\beta$ -arrestine en réponse à la chimiokine, suggérant un rôle du résidu acide dans la stabilisation de la liaison du SDF-1 pour une liaison de haute affinité et une activation optimale du récepteur.



**Figure 18. Le mutant du résidu acide de l'ECL1 E114Q est exprimé en surface, lie SDF-1 avec une plus faible affinité, et recrute la  $\beta$ -arrestine en réponse à SDF-1 et ITAC avec des valeurs de CE50 supérieures à celles du récepteur WT.** (A) Des cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT ou E114Q et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Leur marquage en surface par les anticorps APC 358426 et APC 11G8 a été estimé par cytométrie en flux. (B) La capacité de liaison des ligands aux mutants est déterminée par déplacement de [ $^{125}$ I] SDF-1 par des concentrations croissantes de SDF-1 et ITAC dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g de mutant E114Q. (C) Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec 1 $\mu$ g de mutant E114Q, 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par différentes concentrations croissantes de ligands. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

#### **4.5.2. Mutations des résidus chargés de la deuxième boucle extracellulaire (ECL2) :**

La seconde boucle extracellulaire est importante pour la structure du récepteur de par le pont disulfure qu'elle engage avec le TM3 (Shi et al., 2002). Il a également été montré qu'elle joue un rôle dans la signalisation du récepteur ainsi que dans la reconnaissance et la liaison des ligands à ce dernier (Peeters et al., 2011). Les résultats de marquage en surface, d'essais de recrutement de  $\beta$ -arrestine ainsi que de liaison des ligands des mutants de la deuxième boucle extracellulaire sont présentés sur la figure 19.

Le mutant D179N recrute la  $\beta$ -arrestine avec des valeurs de CE50 plus de cinq fois supérieures à celles du récepteur WT en réponse aux deux chimiokines (fig.19.c et tableau III p.60). De plus, tout comme le double mutant CCSS2-3, les liaisons spécifiques du mutant D179N sont très faibles rendant la détermination de CI50 impossible (fig.19.b). Cependant, comme le marquage en surface du D179N est comparable à celui du récepteur WT (fig.19.a), ces faibles liaisons spécifiques ne sont pas dues à une faible expression en surface du mutant. Deux explications sont alors possibles : soit l'affinité pour les chimiokines est très fortement diminuée, soit il s'agit d'un problème de liaison de la chimiokine [ $^{125}$ I] SDF-1. En effet, le processus de radio-iodation d'un peptide, c'est-à-dire l'incorporation de la molécule de radio-iodure à ce dernier, peut résulter en l'oxydation de résidus clés pouvant détruire l'activité biologique du ligand et affecter son affinité de liaison au récepteur (Gaginella, 1995). Cependant, le fait que la molécule de SDF-1 radio-marquée n'ait pas eu de problème à lier les autres mutants testés rejette cette explication et nous pousse plutôt à penser que le mutant D179N ne lie pas le [ $^{125}$ I] SDF-1 aux concentrations utilisées (50pM). Comme la compétition se fait en hétérologue, les compétitions ITAC contre [ $^{125}$ I] SDF-1 ne peut pas nous fournir des informations sur la liaison d'ITAC au récepteur (puisque le mutant ne lie pas SDF-1); une compétition en homologue ITAC contre ITAC radio-marqué serait nécessaire. Nous ne pouvons donc pas tirer des conclusions réelles sur l'implication du résidu D179 dans la liaison d'ITAC à CXCR7 ; mais nous pouvons tout de même conclure que le résidu D179 joue un rôle essentiel dans la liaison du SDF-1.

Le mutant R197A recrute la  $\beta$ -arrestine avec des valeurs de CE50 plus de dix fois supérieures à celles du récepteur CXCR7 WT en réponse aux deux ligands (fig.19.l et tableau III, p.60), suggérant que la mutation a affecté la signalisation du récepteur. Il lie ITAC et SDF-1 avec des valeurs de CI50 pratiquement trois et cinq fois plus élevées que celles du WT respectivement (fig.19.k et tableau III). Ces résultats suggèrent donc que le résidu R197 jouerait un rôle important dans la signalisation du récepteur et participerait à la liaison des chimiokines au récepteur.

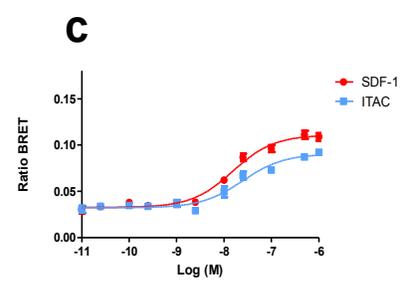
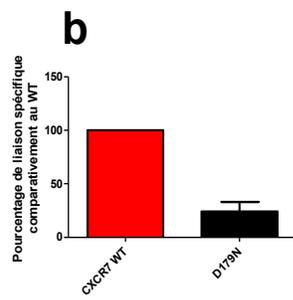
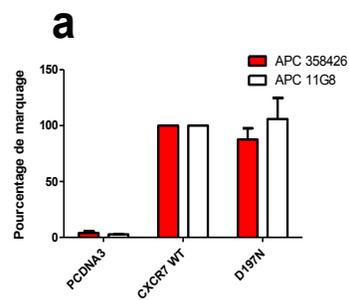
Le mutant E202Q recrute la  $\beta$ -arrestine avec des valeurs de CE50 trois et cinq fois supérieures à celles du récepteur WT en réponse à ITAC et SDF-1 respectivement (fig.19.o et tableau III, p.60). De plus le mutant lie les chimiokines avec des valeurs de CI50 plus de quatre fois supérieures à celles du récepteur WT (fig.19.n et tableau III). Ceci suggérerait que le résidu acide E202 interviendrait dans la liaison des ligands au récepteur en aidant à assurer une liaison de haute affinité.

Le mutant K206D lie le SDF-1 avec une valeur de CI50 pratiquement 20 fois supérieure à celle du récepteur WT (fig.19.q et tableau III, p.60). Il recrute correctement la  $\beta$ -arrestine avec des valeurs de CE50 similaires à celles du récepteur WT dans le cas d'une stimulation par SDF-1, et légèrement supérieures à celles du WT dans le cas d'une stimulation par ITAC (fig.19.r et tableau III, p.60). Le résidu basique K206 serait donc un résidu important pour la liaison du SDF-1 mais ne semble pas essentiel pour la signalisation du récepteur.

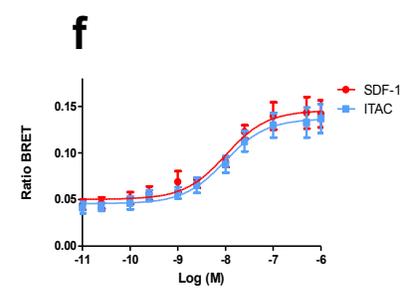
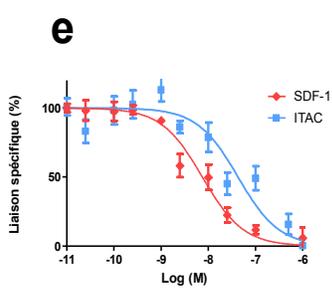
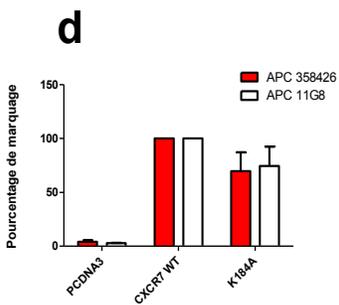
Enfin, les mutants de résidus acides E207Q (figures 19.u et 19.t) et E213Q (figures 19.w et 19.x) semblent lier l'ITAC avec une plus faible affinité que celle du récepteur WT et recrutent la  $\beta$ -arrestine avec des valeurs de CE50 quatre fois plus importantes que celles du récepteur WT (tableau III, p.60). Ceci suggère que les résidus acides E207 et E213 interviendraient dans l'interaction d'ITAC avec le récepteur CXCR7, et de façon moins importante pour celle de SDF-1.

Les autres mutants de l'ECL2, à savoir le K184A, E193Q et le E213Q, recrutent la  $\beta$ -arrestine et lient les chimiokines SDF-1 et ITAC de façon comparable au récepteur WT.

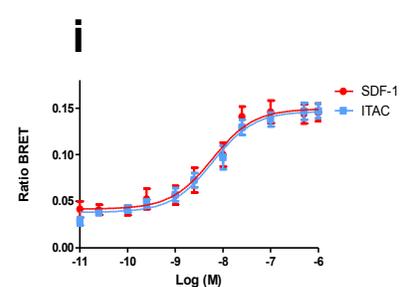
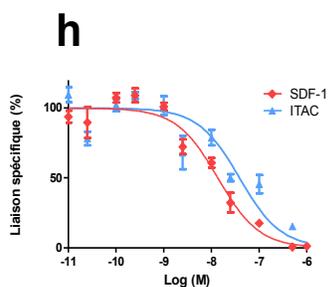
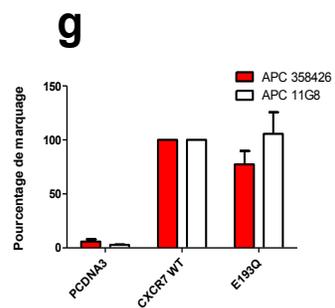
## D179N



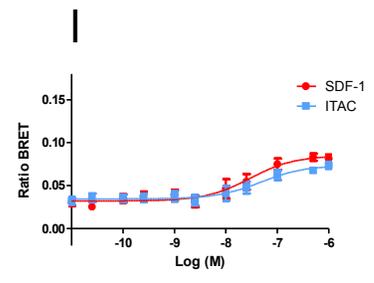
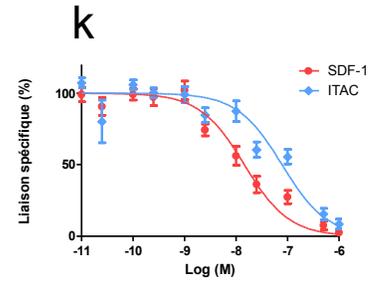
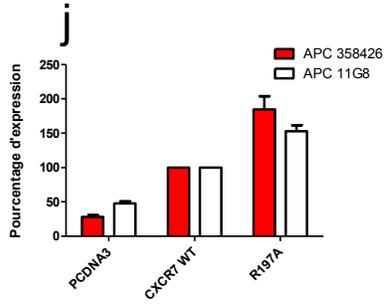
## K184A



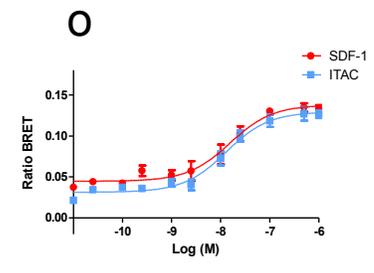
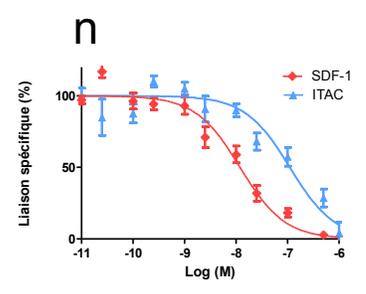
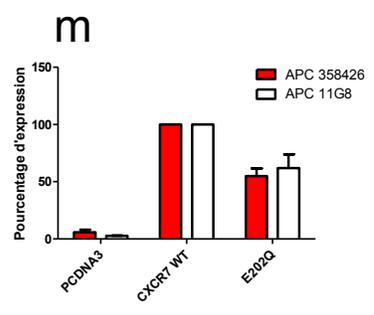
## E193Q



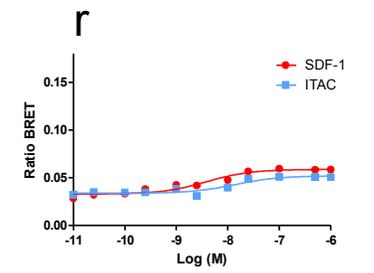
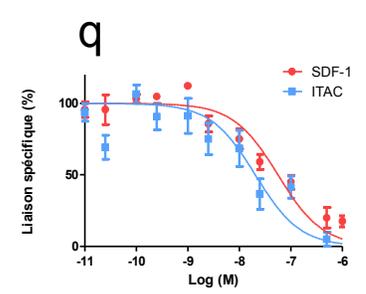
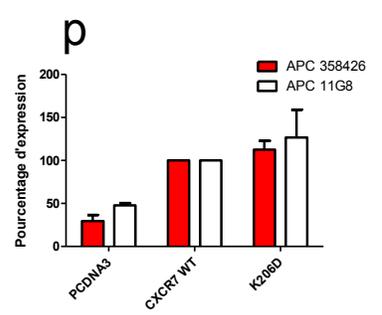
## R197A

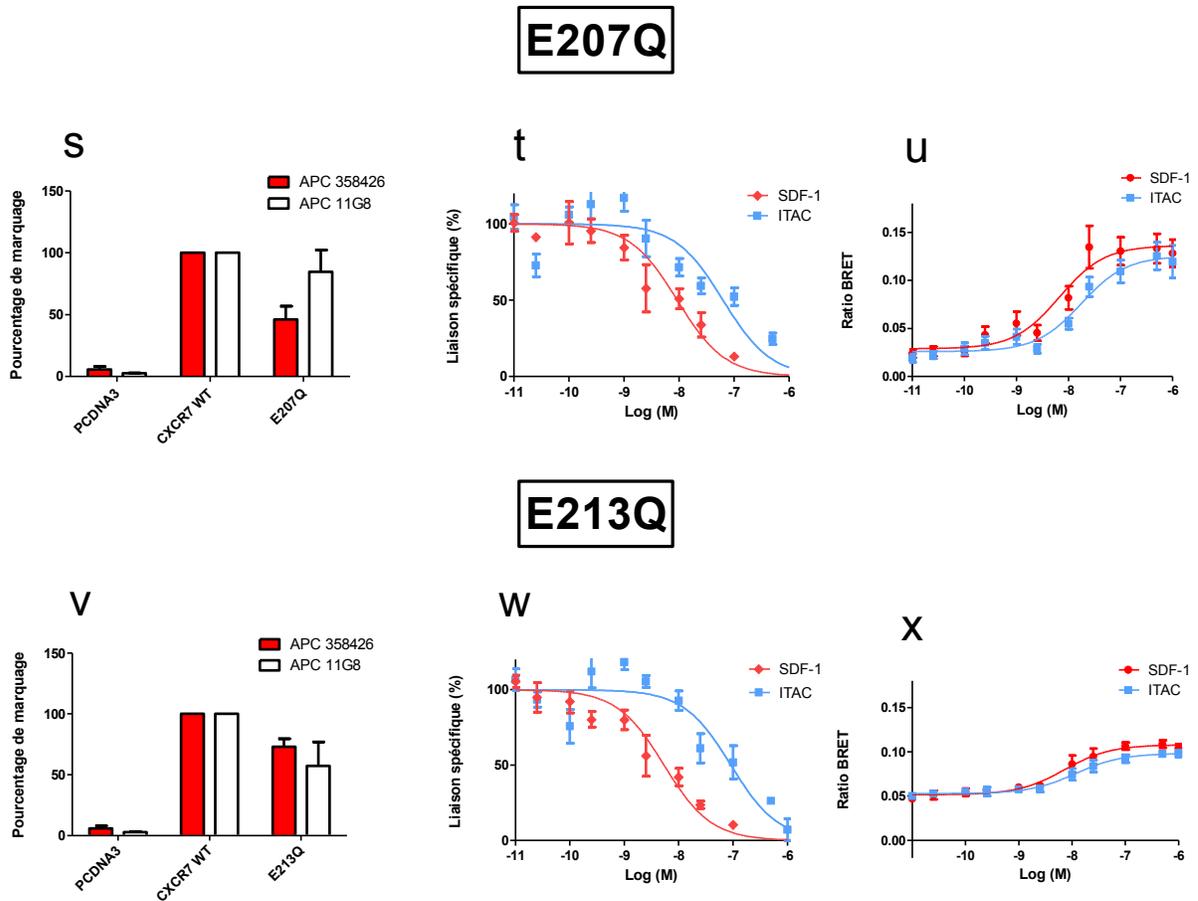


## E202Q



## K206D





**Figure 19. Identification de mutants de résidus chargés de l'ECL2 importants pour la liaison des ligands et la signalisation du récepteur CXCR7.** Le marquage en surface de mutants, par les anticorps APC 358426 et APC 11G8, a été estimé par cytométrie en flux chez des cellules HEK293E transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT ou de mutants D179N (a), K184A (d), E193Q (g), R197A (j), E202Q (m), K206D (n), E207Q (s), E213Q (v) et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Les liaisons spécifiques du mutant D179N (b) ont été déterminées en pourcentages de liaison du récepteur WT en absence de ligand non radio-marqué, dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g de mutant. La capacité de liaison des ligands aux mutants est déterminée par déplacement de [<sup>125</sup>I] SDF-1 par des concentrations croissantes de SDF-1 et ITAC dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g du mutant K184A (e), E193Q (h), R197A (k), E202Q (n), K206D (q), E207Q (t) ou E213Q (w). Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec 1 $\mu$ g de mutant D179N (c), K184A (f), E193Q (i), R197A (l), E202Q (o), K206D (r), E207Q (u) ou E213Q (x), 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par différentes concentrations croissantes de ligands. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

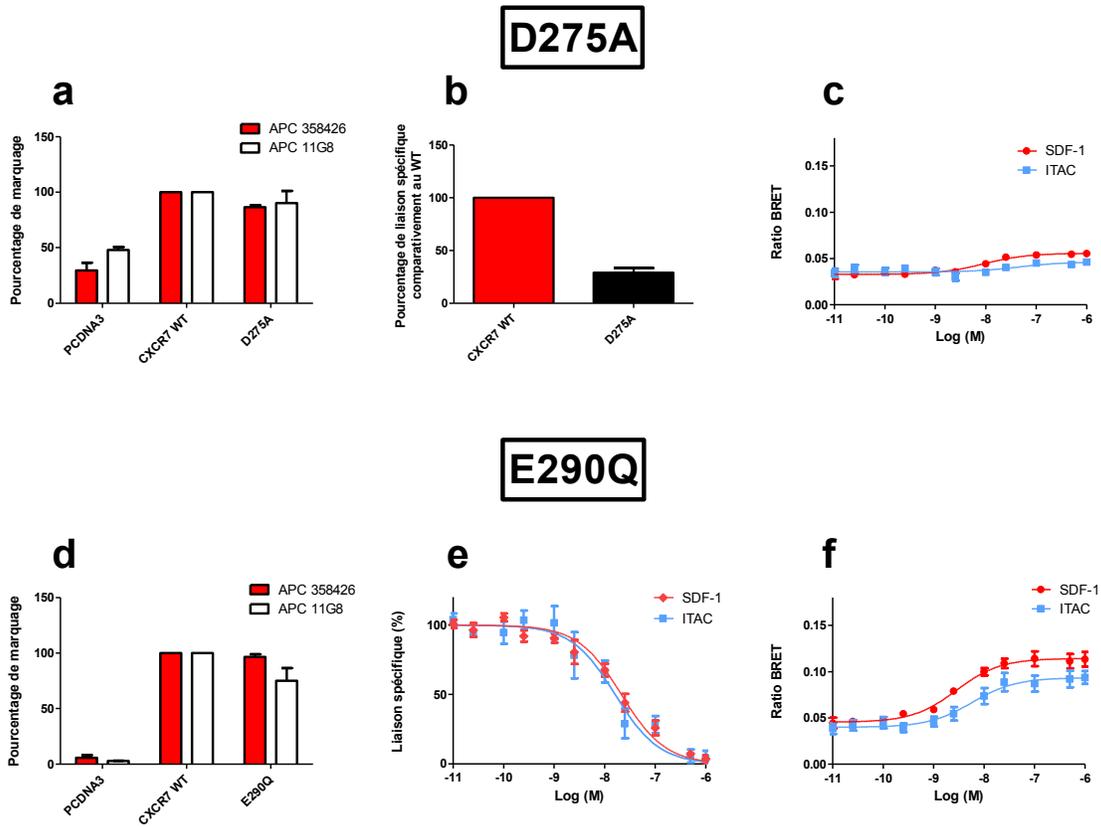
### 4.5.3. Rôle de la troisième boucle extracellulaire (ECL3):

Il a été montré que la troisième boucle extracellulaire est importante pour la signalisation des RCPG (Klco et al., 2006; Lawson et al., 2004) et qu'elle peut faire partie de la poche de liaison des ligands avec les domaines TM6 et TM7 (Izhak et al., 2009; Nygaard et al., 2009; Peeters et al., 2011).

Les résultats des essais de marquage en surface, de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de liaison des chimiokines des mutants D275A et E290Q de l'ECL3 sont présentés sur la figure 20.

Les liaisons spécifiques du mutant D275A étaient trop basses pour calculer des CI50 (fig.20.b et tableau III, p.60). Tout comme le cas du mutant D179N de l'ECL2, le marquage en surface du mutant D275A (fig20.a) reflète une expression normale en surface du récepteur, ce qui laisse penser que le mutant ne lie pas le SDF-1 radio-marqué aux quantités utilisées. Encore une fois, une compétition homologue ITAC radio-marqué contre ITAC non radio-marqué serait nécessaire afin de tester la liaison de l'ITAC au récepteur. Le mutant D275A recrute la  $\beta$ -arrestine avec des valeurs de CE50 trois et dix fois supérieures à celles du récepteur WT en réponse à SDF-1 et ITAC respectivement (fig.20.c et tableau III). On remarque également une forte diminution de l'efficacité du signal BRET et ce de façon plus prononcée en réponse à ITAC. Le résidu D275 semble donc être un résidu essentiel pour la liaison de SDF-1 et important pour l'activation du récepteur en réponse à ITAC.

Le mutant E290Q lie SDF-1 avec une valeur de CI50 plus de cinq fois supérieure à celle du récepteur WT (figure 20.e) suggérant une baisse d'affinité, mais recrute la  $\beta$ -arrestine avec des valeurs de CE50 similaires à celle du WT (figure 20.f et tableau III, p.60). La mutation ne semble pas affecter la liaison ou l'activité d'ITAC.



**Figure 20.** Le mutant de l'ECL3 D275A ne lie pas SDF-1 et recrute peu de  $\beta$ -arrestine en réponse à SDF-1 et ITAC; le mutant E290Q a une affinité plus faible pour le SDF-1. Le marquage en surface de mutants, par les anticorps APC 358426 et APC 11G8, a été estimé par cytométrie en flux chez des cellules HEK293E transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT ou de mutants D275A (a), E290Q (d) et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Les liaisons spécifiques du mutant D275A (b) ont été déterminées, en pourcentage de liaison du récepteur WT, en absence de ligand non radio-marqué dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g de mutant. La capacité de liaison des ligands au mutant E290Q (e) a été déterminée par déplacement de [<sup>125</sup>I] SDF-1 par des concentrations croissantes de SDF-1 et ITAC dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g de mutant. Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec 1 $\mu$ g de mutant D275A (c) ou E290Q (f), 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par différentes concentrations croissantes de ligands. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

#### **4.4. Rôle structurel et fonctionnel des domaines transmembranaires (TM):**

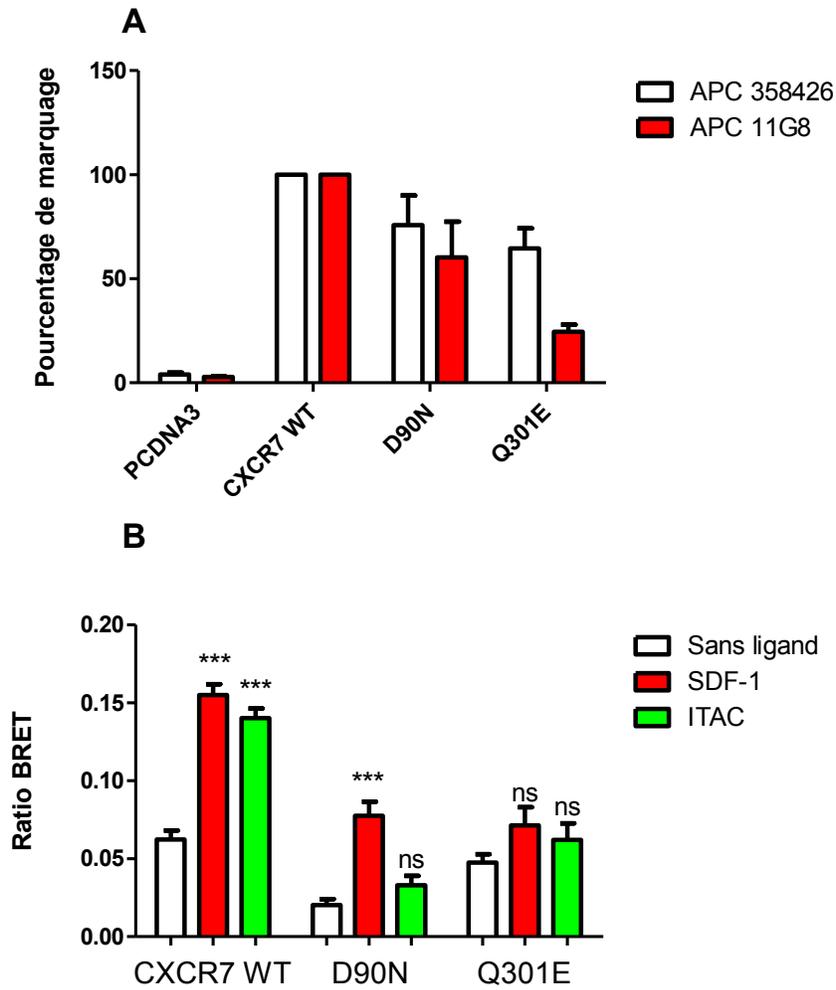
Comme vu dans l'introduction, la région transmembranaire (TM) est une partie très importante du récepteur car elle fixe les ligands dans leur poche de liaison et permet la transduction du signal à la région intracellulaire via des changements de conformation (Nygaard et al., 2009; Venkatakrisnan et al., 2013). Nous avons donc effectué des mutations au niveau de deux résidus des domaines TM de CXCR7 afin d'en observer les conséquences sur la liaison de ses ligands ainsi que sa signalisation en réponse à ces derniers.

Le premier résidu muté est un résidu conservé du TM2 chez la plupart des RCPG : le 2.50 correspondant au D90 chez CXCR7. Le second résidu muté est le résidu 7.39, mentionné dans l'introduction, qui est important pour la liaison du SDF-1 à CXCR4 et la signalisation conséquent du récepteur; il correspond à l'acide aminé Q301 chez CXCR7.

Des tests de screening BRET ont été réalisés et les résultats sont représentés sur la figure 21 en compagnie des résultats de marquage en surface.

Les résultats de screening BRET laissent suggérer que le mutant D90N est capable de recruter la  $\beta$ -arrestine suite à une stimulation par SDF-1 bien qu'avec des ratios BRET inférieurs à ceux du récepteur CXCR7 WT, et ne semble pratiquement pas recruter de  $\beta$ -arrestine après stimulation par ITAC (figure 21.B). En effet, contrairement à une stimulation par SDF-1, les différences de ratio BRET suite à une stimulation par ITAC du mutant D90N sont statistiquement non significatives entre le mutant stimulé et le mutant non stimulé.

Le mutant Q301E, quant à lui, ne semble pas recruter la  $\beta$ -arrestine que ça soit après une stimulation par SDF-1 ou par ITAC (figure 21.B). En effet, les différences de ratio BRET suite à des stimulations par SDF-1 et ITAC sont statistiquement non significatives entre le mutant Q301E stimulé et le mutant non stimulé. Il y aurait donc eu une perte de réponse du mutant Q301E pour des concentrations de 200nM de ligand. Le marquage en surface du mutant (figure 21.A) suggère une expression normale du récepteur en surface et ne justifie donc pas l'incapacité à recruter la  $\beta$ -arrestine.

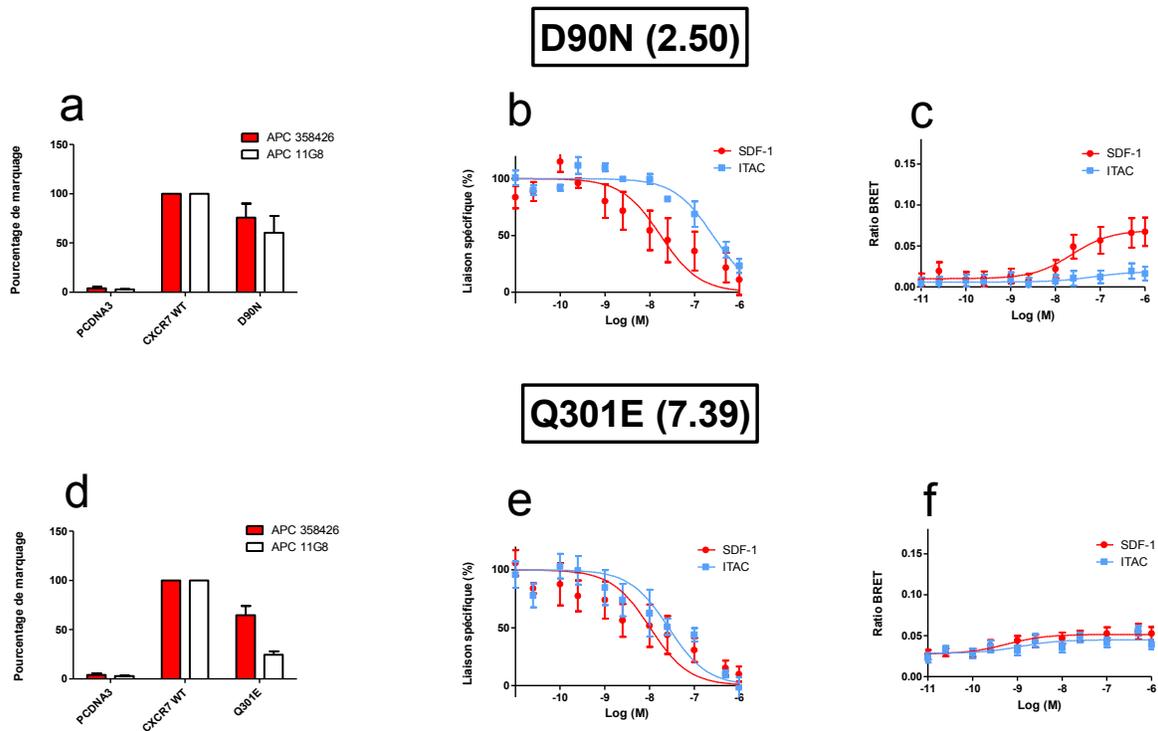


**Figure 21. Le mutant D90N ne recrute pas de  $\beta$ -arrestine en réponse au SDF-1 et le mutant Q301E ne recrute pas de  $\beta$ -arrestine en réponse au SDF-1 et ITAC aux concentrations de 200nM de ligands.** (A) Des cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT ou de mutants D90N ou Q301E et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Leur marquage en surface par les anticorps APC 358426 et APC 11G8 a été estimé par cytométrie en flux. (B) Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec 1 $\mu$ g de CXCR7 WT ou 1 $\mu$ g des mutants de résidus chargés, 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par une concentration de 200nM de SDF-1 et ITAC. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les résultats de screening BRET ont été analysées par la méthode 1-way ANOVA avec le test Dunnett comparant les récepteurs stimulés vs les récepteurs non stimulés : \*\*\* :  $p < 0.0001$ , ns : non significatif.

Dans le but de confirmer les résultats de screening BRET, nous avons réalisé des essais de recrutement de  $\beta$ -arrestine en dose-réponse ainsi que des expériences de radio-liaison. Les résultats pour les mutants de résidus chargés D90N et Q301E sont représentés sur la figure 22.

Les courbes BRET dose-réponse confirment que le mutant D90N (figure 22.c) répond à une stimulation par SDF-1 avec des valeurs de CE50 plus de sept fois supérieures à celles du récepteur WT, mais ne répond pas à une stimulation par ITAC (voir tableau IV, p.74). Les résultats de radio-liaison montrent que le mutant lie SDF-1 et ITAC avec des valeurs de CI50 plus de cinq fois supérieures à celles du récepteur WT dans le cas de SDF-1 et presque dix fois supérieures à celle du récepteur WT dans le cas d'ITAC (fig.22.b et tableau IV). Ceci suggérerait que la mutation D90N a fortement altéré, voire aboli, la liaison d'ITAC au récepteur et a aboli la réponse du récepteur à la chimiokine. La mutation n'a toute fois pas aboli la réponse à SDF-1 et a moins affecté sa liaison au récepteur que celle d'ITAC.

Du côté du mutant Q301E, les courbes BRET dose-réponse confirment que celui-ci ne recrute que très faiblement la  $\beta$ -arrestine que ce soit suite une stimulation par ITAC ou à une stimulation par SDF-1 (fig.22.f). Pourtant, les essais de radio-liaison montrent que le Q301E lie ITAC avec des valeurs de CI50 plus ou moins similaires à celles du récepteur WT et lie SDF-1 avec des IC50 trois fois supérieures à celles du WT dans le cas du SDF-1 (tableau IV). La mutation Q301E a donc aboli la réponse du récepteur à ses ligands ITAC et SDF-1 sans affecter sa capacité à lier les chimiokines.



**Figure 22.** Le mutant D90N ne lie pas ITAC et ne recrute pas de  $\beta$ -arrestine après stimulation par ce dernier; le mutant Q301E lie SDF-1 et ITAC mais ne recrute pas de  $\beta$ -arrestine suite à une stimulation par ces deux ligands. Des cellules HEK293E ont été transfectées avec 0,5 $\mu$ g de CXCR7 WT ou de mutants D90N (A), Q301E (B) et 1,95 $\mu$ g de PCDNA3. Leur marquage en surface par les anticorps APC 358426 et APC 11G8 a été estimé par cytométrie en flux. La capacité de liaison des ligands aux mutants est déterminée par déplacement de [ $^{125}$ I] SDF-1 par des concentrations croissantes de SDF-1 et ITAC dans des cellules HEK293E transfectées avec 2 $\mu$ g du mutant D90N (A) ou Q301E (B). Le recrutement de  $\beta$ -arrestine a été testé par essais BRET chez des cellules HEK293E2 transfectées avec 1 $\mu$ g de mutant D90N (A) ou Q301E (B), 50ng de  $\beta$ -arrestine-Rluc et 0,95 $\mu$ g de PCDNA3 et stimulées par différentes concentrations croissantes de ligands. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes.

**Tableau IV. Résultats des essais de marquage en surface cellulaire, de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de liaison des chimiokines ITAC et SDF-1 des mutants des domaines TM de CXCR7.** ND : non déterminé, NA : non applicable, SEM : standard error of the mean.

Mutation	Récepteur	% de marquage du WT		CE50 de recrutement de $\beta$ -arrestine (nM)		Log CE50 (M) $\pm$ Log SEM		CI50 (nM)		Log CI50 (M) $\pm$ Log SEM	
		APC 358426	APC 11G8	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC
WT	CXCR7	100	100	3.2	4.4	-8.5 $\pm$ 0.2	-8.4 $\pm$ 0.2	2.9	26.8	-8.5 $\pm$ 0.05	-7.6 $\pm$ 0.1
Résidus chargés Domaines TM	D90N	75.8 $\pm$ 14.3	60.4 $\pm$ 17.1	23.2	NA	-7.6 $\pm$ 0.3	NA	17.4	256.9	-7.8 $\pm$ 0.1	-6.6 $\pm$ 0.07
	Q30IE	64.6 $\pm$ 9.6	24.5 $\pm$ 3.4	NA	NA	NA	NA	10.3	26.7	-8.0 $\pm$ 0.1	-7.6 $\pm$ 0.1

## 5. Discussion :

Il a été démontré pour de nombreux récepteurs que, suivant le modèle de liaison en deux étapes des récepteurs de chimiokines, la reconnaissance de la chimiokine se fait principalement par la partie N-terminale et les boucles extracellulaires de son récepteur, (Allegretti et al., 2008; Nomiya et al., 2015; Peeters et al., 2011; Szpakowska et al., 2012). Ainsi, la région N-terminale du récepteur (site I) lierait fortement la chimiokine lui permettant par la suite d'interagir avec une poche formée par les boucles extracellulaires et les segments transmembranaires du récepteur (site II) (Crump et al., 1997; Siciliano et al., 1994). Des études structurales, basées sur des cristaux récents du récepteur CXCR4, liant des molécules antagonistes ou des chimiokines virales, ont permis d'obtenir plus d'informations sur la validité du modèle de liaison en deux étapes et des résidus impliqués (Qin et al., 2015; Wu et al., 2010) : de façon intéressante, le cristal réalisé par Qin & al (Qin et al., 2015) a montré que le site II d'interaction interviendrait de façon beaucoup plus importante dans la reconnaissance et la liaison de la chimiokine que le laisserait penser le modèle initial de liaison en deux étapes. Ceci sera discuté ci-après.

Dans le but d'étudier le mode d'interaction du récepteur atypique CXCR7 avec ses ligands ITAC et SDF-1, des mutations -de résidus du domaine N-terminal, des boucles extracellulaires et de certains résidus des segments transmembranaires du récepteur- ont été réalisées. L'importance des résidus mutés d'intérêt sera discutée en les comparant avec leurs équivalents chez d'autres récepteurs de chimiokines, particulièrement les récepteurs alternatifs d'ITAC et SDF-1 : CXCR3 et CXCR4. Le tableau V résume les résidus importants pour la liaison et la signalisation des récepteurs CXCR3 et CXCR4; leurs résidus correspondants dans CXCR7 sont indiqués par une flèche.

Globalement, il était surprenant de constater que parmi le grand nombre de mutants construits et testés, et qui incluaient ceux connus pour être essentiels dans le contexte de CXCR3 ou de CXCR4, seul un petit nombre des mutations montrait une liaison et/ou signalisation fortement affectée et ceci davantage en réponse à ITAC qu'en réponse à SDF-1. Ceci pourrait indiquer un mode de liaison différent – surtout de SDF-1 – à CXCR7. Nous discuterons ultérieurement les mutants de façon groupés.

**Tableau V. Liste des résidus importants pour l'interaction de CXCR3/ITAC et CXCR4/SDF-1, et des résidus correspondants chez CXCR7.** Les résidus importants pour la liaison et l'activation du récepteur sont surlignés en vert, ceux cruciaux pour l'activation du récepteur sont surlignés en bleu. Les résidus de CXCR7 sont indiqués par une flèche (Brelot et al., 1999; Brelot et al., 2000; Colvin et al., 2006; Nedjai et al., 2012; Nomiya et al., 2015; Qin et al., 2015; Tian et al., 2005; Wu et al., 2010; Zhou et al., 2000).

Récepteur	Liaison		Signalisation
	Site I (N-terminal+ECL2)	Site II (ECL+TM)	
CXCR3	<p><b><u>N-terminal :</u></b> Y27 Y29 Résidus acides ne sont pas importants pour la liaison d'ITAC</p> <p><b><u>ECL2 :</u></b> R197 → S190 R212 → K206</p>	<p><b><u>ECL1:</u></b> <b>D112</b> → S103</p> <p><b><u>ECL3 :</u></b> <b>D278</b> → D275 <b>D297</b> → F294</p>	<p><b><u>ECL1:</u></b> <b>D112</b> → S103</p> <p><b><u>ECL2 :</u></b> <b>R216</b> → E213</p> <p><b><u>ECL3 :</u></b> <b>D278</b> → D275 D282 → I279 E293 → E290 *D282 et E293 ont diminué la réponse à ITAC mais ne l'ont pas complètement aboli <b>D297</b> → F294</p>
CXCR4	<p>D10 → D16 E14 E15 Y21</p>	<p><b><u>ECL2 :</u></b> <b>D187</b> → R197</p> <p><b><u>ECL3:</u></b> E275 → R288 D262 (6.58) → D275 E277 → E290</p> <p><b><u>Extrémités TM-ECL :</u></b> <b>D97</b> (2.63) → S103 D171 (4.60) → D179 <b>E288</b> (7.39) → Q301</p>	<p><b><u>ECL2 :</u></b> <b>D187</b> → R197</p> <p><b><u>Extrémités TM-ECL :</u></b> <b>D97</b> (2.63) → S103 <b>E288</b> (7.39) → Q301 <b>Y116 (3.32)</b> → F124</p>

## **5.1. Interaction entre le N-terminal de CXCR7 et ses ligands :**

### **5.1.1. Importance différente du N-terminal de CXCR7 pour la liaison de SDF-1 et ITAC :**

- Délétions de segments du N-terminal :

Des délétions de résidus N-terminaux ont été réalisées dans le but de tester l'importance de la région N-terminale chez CXCR7. Si l'on se fie au modèle de liaison en deux étapes des récepteurs de chimiokines, ces délétions devraient compromettre la liaison des chimiokines SDF-1 et ITAC au récepteur et donc leur activité.

Curieusement, la délétion du deuxième et troisième acide aminé du N-terminal ( $\Delta 2-3$ ) n'a pas fortement altéré la capacité de recruter la  $\beta$ -arrestine du récepteur ou la liaison du SDF-1; elle a cependant très fortement diminué l'affinité de liaison d'ITAC au mutant. La délétion du deuxième au neuvième acide aminé du N-terminal ( $\Delta 2-9$ ), quant à elle, a fortement altéré la capacité du récepteur de recruter la  $\beta$ -arrestine que ça soit après une stimulation par SDF-1 ou par ITAC; elle a également aboli sa liaison d'ITAC sans affecter celle du SDF-1 (il semblerait même que l'affinité du SDF-1 pour le récepteur ait augmentée). Ces résultats suggèrent que les acides aminés délétés sont essentiels pour la liaison de l'ITAC au récepteur CXCR7 mais pas pour celle du SDF-1. Comme la délétion  $\Delta 2-9$  a affecté la signalisation en présence de SDF-1, on pourrait suggérer que cette région -bien qu'apparemment non essentielle à l'interaction initiale avec le récepteur- pourrait être importante pour une conformation optimale du récepteur pour sa signalisation en réponse au SDF-1. Des mutations ponctuelles de certains résidus de cette région, à savoir D2N, D7N et Y8F, ont été réalisées dans le cadre d'un projet connexe au sein du laboratoire; les résultats obtenus concordent avec le fait que la délétion affecte seulement la liaison d'ITAC au récepteur mais non celle du SDF-1. En effet, les CE50 correspondantes aux recrutements de  $\beta$ -arrestine suite à des stimulations par ITAC ont fortement augmenté, jusqu'à huit fois, comparativement à celles de CXCR7 WT (voir annexe1), alors que les CE50 résultant d'une stimulation par SDF-1 sont comparables à celles du récepteur WT. Ces résultats sont fort inattendus car ils vont à l'encontre des données, publiées sur l'interaction du récepteur CXCR4 et SDF-1, où des délétions du N-terminal ont résulté en une très forte diminution de liaison du SDF-1 et à une absence de signalisation

(Brelot et al., 2000). Un autre résultat inattendu était celui de la mutation de la tyrosine de CXCR7. En effet, la sulfatation des tyrosines du N-terminal est souvent requise pour la liaison des chimiokines au récepteur (voir section 1.3.1). Les récepteurs CXCR3 et CXCR4 n'échappent pas à cette règle : le récepteur CXCR3 nécessitant la sulfatation des tyrosines 27 et 29 pour la liaison de ses ligands et son activation (Colvin et al., 2006), et le récepteur CXCR4 nécessitant la sulfatation de la tyrosine 21 pour la liaison de SDF-1, mais non pour la signalisation du récepteur (Farzan et al., 2002; Veldkamp et al., 2008). Il est donc surprenant que la mutation de la seule tyrosine du N-terminal de CXCR7 (Y8) n'ait pas aboli sa signalisation en réponse à l'ITAC ou la liaison du SDF-1. Cela signifie que, contrairement à la majorité des récepteurs de chimiokines, la sulfatation des tyrosines de CXCR7 ne serait pas essentielle pour son activation.

- Mutations des résidus chargés du N-terminal :

Nous nous sommes par la suite intéressés aux résidus chargés du N-terminal, car ce sont les acides aminés chargés du récepteur qui engagent des liaisons électrostatiques avec les résidus chargés des chimiokines (Scholten et al., 2012). Nous avons donc muté les acides aminés chargés en leurs contreparties non chargées ou en alanine afin d'observer les répercussions sur le fonctionnement du récepteur et son interaction avec ses ligands.

La mutation du résidu basique K40 n'a affecté ni la fonction du récepteur ni sa liaison des ligands, suggérant que ce dernier n'est pas essentiel à l'interaction de CXCR7 avec ses chimiokines. Des mutations des résidus acides de la région N-terminale, réalisées par un autre membre du laboratoire, ont par contre altéré de façon significative le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à l'ITAC particulièrement pour les résidus D2, D7, E10, D16 et D30 (voir annexe 1). En effet, les CE50 correspondantes aux recrutements de  $\beta$ -arrestine ont fortement augmenté, jusqu'à plus de dix fois dans certains cas, comparativement à celles de CXCR7 WT; suggérant un rôle des résidus acides du N-terminale dans l'activation du récepteur en réponse à ITAC, mais pas en réponse au SDF-1. Ces résultats corrélerent avec ceux des délétions des segments du N-terminal suite auxquelles la liaison d'ITAC au récepteur a été fortement affectée, mais pas celle du SDF-1. Ils sont encore une fois fort inattendus: en effet, contrairement à CXCR7, les mutations des résidus acides du N-terminal du récepteur CXCR3 n'ont pas eu de répercussions sur l'interaction d'ITAC avec le récepteur (Colvin et al., 2006); d'un autre côté, les résidus acides du N-terminale de CXCR4 étaient essentiels pour la liaison

de SDF-1 (Brelot et al., 2000), ce qui n'est pas le cas de CXCR7. Ceci suggère que CXCR7 n'interagirait pas avec les chimiokines ITAC et SDF-1 de la même façon que les récepteurs CXCR3 et CXCR4 respectivement.

Succinctement, l'ensemble des résultats de mutations et délétions du N-terminal de CXCR7 suggère que la chimiokine ITAC nécessite la région N-terminale du récepteur, particulièrement les résidus acides, pour sa liaison et son activité, mais ce ne serait pas le cas du SDF-1. Ceci pousse à croire que la liaison d'ITAC à CXCR7 suivrait le modèle d'interaction classique des récepteurs de chimiokines avec une étape initiale de liaison de la chimiokine au N-terminale du récepteur; en revanche, la liaison du SDF-1 à CXCR7 ne suivrait pas ce modèle et dépendrait davantage d'autres parties du récepteur (ce qui expliquerait l'augmentation de l'affinité du SDF-1 pour le mutant  $\Delta 2-9$ : la délétion de la région du N-terminale procure d'avantage d'espace au SDF-1 pour librement interagir avec les autres domaines de CXCR7). Ceci est particulièrement intéressant, car le modèle d'activation de CXCR4 en réponse au SDF-1 suit le modèle classique en deux étapes des récepteurs de chimiokines (Brelot et al., 2000; Qin et al., 2015; Wu et al., 2010); ce qui parle en faveur de notre interprétation précédente stipulant que les deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 ne lieraient pas le SDF-1 de la même façon.

### **5.1.2. La troisième cystéine du N-terminal de CXCR7 engage le pont disulfure avec l'ECL3:**

Finalement, nous nous sommes intéressés au domaine N-terminal d'un point de vue structural en étudiant le pont cystéine qu'il forme avec l'ECL3. En effet, chez les récepteurs de chimiokine, une cystéine de la troisième boucle extracellulaire (ECL3) engage un pont disulfure avec une cystéine du N-terminal (Nomiyama et al., 2015; Rana et al., 2010; Venkatakrishnan et al., 2013). Ce pont joue un rôle important dans la structure du récepteur et la stabilisation de la conformation active de ce dernier (Szpakowska et al., 2014). Ainsi, des altérations de ce pont, par mutations d'une des deux cystéines, ont affecté la liaison aux ligands ainsi que la signalisation des récepteurs CCR2, CCR5, CXCR1, CXCR2 et CXCR4 (Rana et al., 2010; Szpakowska et al., 2012).

Contrairement à CXCR4, qui ne comporte qu'une seule cystéine dans son domaine N-terminal, CXCR7 en possède trois similairement à CXCR3. Comme nous n'avons pas

d'informations concernant la cystéine du N-terminal de CXCR7 engageant le pont disulfure avec la cystéine C287 de l'ECL3, nous nous sommes intéressés à déterminer la position de cette cystéine et à voir si ce pont est tout aussi important pour CXCR7. Pour ce faire, nous avons muté les cystéines de la région N-terminale en sérines de façon à ce que le pont disulfure, s'il devait exister, soit rompu.

Les résultats de marquage en surface, de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de radio-liaison obtenus pour les doubles mutations des cystéines CCSS1-2 et CCSS2-3, nous permettent de conclure que le pont disulfure se fait avec la troisième cystéine du N-terminal (C34). En effet, alors que la double mutation CCSS1-2 n'a pas fortement affecté ni la liaison des chimiokines ni le recrutement de  $\beta$ -arrestine par le récepteur, la mutation CCSS2-3 a abouti à une faible expression en surface du récepteur corrélant avec une très faible liaison des chimiokines et un très faible, voire inexistant, recrutement de  $\beta$ -arrestine. Le pont C34-C287 est, par conséquent, essentiel pour la structure du récepteur et son cheminement en surface et donc essentiel pour l'interaction du récepteur avec ses ligands; confirmant l'importance du pont N-terminal-ECL3 pour CXCR7.

La structure de cristal réalisée par Wu & al (Wu et al., 2010) a permis de montrer que l'importance du pont disulfure est due au fait qu'il crée une constriction du N-terminal et de l'ECL3, ce qui permet de modeler l'accès à la poche de liaison du ligand. Cette constriction se ferait correctement dans le cas du mutant CCSS1-2, mais ne se ferait pas dans le cas du mutant CCSS2-3, expliquant les résultats de radio-liaison et de recrutement de  $\beta$ -arrestine obtenus pour CXCR7.

## **5.2. Rôle des boucles extracellulaires :**

Nous avons effectué des mutations de résidus chargés des trois boucles de CXCR7. L'ECL1 contient l'acide aminé acide E114 et le résidu basique K118, seulement le résidu E114 a été muté et le résidu K118 reste à étudier. L'ECL2, quant à elle, contient huit résidus chargés au total dont cinq acides et trois basiques, l'ensemble de ces résidus ont été mutés. Enfin, l'ECL3 contient trois résidus chargés dont deux acides et un basique, deux de ces résidus ont été mutés et le résidu basique R288 reste à étudier.

### **5.2.1. Le résidu acide de la première boucle aiderait à stabiliser la structure de CXCR7 pour son interaction avec ses ligands:**

La première boucle extracellulaire étant généralement très petite chez la plupart des RCPG de classe A, elle n'est pas directement impliquée dans la liaison des ligands mais aiderait plutôt à maintenir une structure du récepteur optimale pour son activation et pourrait influencer la forme de la poche de liaison (Peeters et al., 2011). Il a par ailleurs été montré que des résidus chargés de l'ECL1 étaient importants pour l'activation du récepteur de vasopressine (Han et al., 1999), et essentiels pour une liaison de haute affinité du récepteur CCR2 à ses chimiokines (Hawtin et al., 2006). De façon intéressante, des mutations du seul résidu acide de l'ECL1 de CXCR3 ont fortement altéré la liaison de ses chimiokines et son activation par ces dernières (Colvin et al., 2006). Il a alors été suggéré que des interactions entre l'ECL1 et le N-terminal étaient nécessaires pour une liaison stable des chimiokines au récepteur CXCR3.

Seulement un seul acide aminé acide se trouvait au niveau de l'ECL1 de CXCR7 : E114. La mutation de ce résidu n'a pas empêché la liaison des chimiokines au récepteur mais a néanmoins affecté l'affinité de SDF-1 pour le récepteur ainsi que le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à ITAC et SDF-1, particulièrement en réponse à ITAC. Ces résultats nous permettent de suggérer que le résidu acide E114 de CXCR7 jouerait un rôle dans la stabilisation d'une conformation active optimale pour l'activation du récepteur en réponse à ses ligands et pour son interaction de haute affinité avec SDF-1.

Le résidu basique K118 de l'ECL1 de CXCR7, dont l'équivalent K137 chez le récepteur CCR7 est important pour la liaison des ligands et l'activation du récepteur (Ott et al., 2004), reste à muter et à étudier.

### **5.2.2. Les résidus chargés de l'ECL2 interviennent dans la liaison de haute affinité des ligands ainsi que l'activation du récepteur CXCR7:**

La deuxième boucle extracellulaire est la plus longue et la plus divergente des boucles des récepteurs de chimiokines. Elle joue une multitude de rôles : intervenant dans la structure et la signalisation du récepteur ainsi que dans la sélectivité, la reconnaissance et la liaison des ligands aux récepteurs (Peeters et al., 2011). Elle est donc une boucle très intéressante à

étudier; des mutations de résidus chargés de cette dernière ont été réalisées. Seuls les mutants d'intérêt D179N, R197A, K206D, E202Q, E207Q et E213Q seront discutés.

Le résidu acide 4.60 est un résidu conservé chez CXCR3, CXCR4 et CXCR7. Ce résidu est particulièrement important pour CXCR4 (D171 chez CXCR4) : une étude de mutagenèse a montré le rôle essentiel du résidu 4.60 pour la liaison de SDF-1 à ce dernier (Tian et al., 2005) ; de plus, l'étude de structure faite par Wu et al a montré qu'il était un résidu clé pour la liaison de l'antagoniste AMD3100 et d'autres petites molécules au récepteur (Wu et al., 2010). Ce résidu n'est cependant pas important pour la liaison d'ITAC au récepteur CXCR3 (Scholten et al., 2014). La mutation du résidu 4.60 de CXCR7 (D179) a aboli la liaison de SDF-1 au récepteur et a affecté le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à SDF-1 et ITAC, comme le reflète les augmentations des valeurs de CE50. Ces résultats suggèrent que, tout comme pour CXCR4, le résidu D179 serait essentiel pour la liaison du SDF-1 à CXCR7. L'obtention d'une réponse BRET, malgré l'absence de liaison du SDF-1, peut s'expliquer par le fait que le mutant ne lie plus le [<sup>125</sup>I] SDF-1 aux concentrations utilisées (50pM)- dû à une forte perte d'affinité pour SDF-1- mais est capable de répondre à des stimulations de concentrations élevées de chimiokine. Cette explication corrèle avec les augmentations de CE50 aboutissant à un décalage de la courbe dose-réponse vers la droite (donc vers des hautes concentrations de ligands), comparativement au récepteur WT. Ce décalage peut être mieux apprécié dans le papier récent de Montpas et al (Montpas et al., 2015) dans lequel la réponse du mutant D179N à une stimulation par SDF-1 a également été testée par BRET. Il serait intéressant de faire un test de saturation - c'est-à-dire déterminer la liaison spécifique des chimiokines au récepteur pour des concentrations croissantes de SDF-1 radio-marqué- et de voir à quelle concentration de [<sup>125</sup>I] SDF-1 une liaison du radio-ligand est visible. Des tests de compétition ITAC vs [<sup>125</sup>I] ITAC devront être effectués afin d'étudier les conséquences de la mutation du résidu D179 sur la liaison d'ITAC au récepteur; le décalage vers la droite de la courbe dose-réponse des essais BRET nous permet tout de même de penser que le D179 serait important pour la liaison d'ITAC au récepteur et son activation conséquente.

Des études de mutagenèse réalisées sur CXCR4 ont montré que le résidu 4.78 (D187 chez CXCR4) est un résidu clé pour la liaison du SDF-1 et primordial pour la signalisation qu'il engendre ; il a alors été proposé que ce résidu fasse partie du site II, suivant le modèle d'activation en deux étapes des récepteurs de chimiokines (Brelot et al., 1999; Brelot et al.,

2000). Des études structurales basées sur des cristaux récents par Wu et al (Wu et al., 2010) et Qin et al (Qin et al., 2015) ont confirmé l'importance de ce résidu dans l'interaction entre le SDF-1 et CXCR4. La mutation du résidu 4.78 de CXCR7 (R197) a augmenté de plus de dix fois les valeurs de CE50 de recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à des stimulations par SDF-1 et ITAC, sans grandement altérer la liaison des ligands. Le résidu 4.78 jouerait donc un rôle essentiel pour la signalisation de CXCR7 en réponse à ses deux ligands mais non dans leur liaison au récepteur ; ceci suggère, à nouveau, que le récepteur ne lierait pas SDF-1 de la même manière que CXCR4.

La mutation du résidu basique K206 de CXCR7 a augmenté de plus de 20 fois les valeurs de CI50 pour le SDF-1 et a légèrement affecté le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à ITAC. L'acide aminé K206 interviendrait donc dans la liaison de haute affinité du SDF-1 à CXCR7 mais ne semble pas essentiel pour la signalisation du récepteur. Des essais de recrutement de  $\beta$ -arrestine réalisés par Montpas et al (Montpas et al., 2015) sur le même mutant de CXCR7 (K206D) confirment une signalisation normale du récepteur en réponse à SDF-1. La mutation de l'équivalent de ce résidu chez CXCR3 (R212) a montré que ce dernier était crucial pour la liaison d'ITAC (Colvin et al., 2006) ; or la mutation K206D n'a pas affecté la liaison d'ITAC à CXCR7, suggérant une fois encore que CXCR7 ne lierait pas ITAC de la même manière que CXCR3. Le résidu K206 n'est pas conservé chez CXCR4, qui possède un résidu D193 à la place: un résidu clé pour la liaison de la protéine Gp120 du VIH et de l'antagoniste peptidique CVX15 avec le récepteur (Brelot et al., 1999; Lin et al., 2003; Wu et al., 2010). Par ailleurs, des substitutions de résidus chargés de l'ECL2 du récepteur CCR5 ont également eu des effets majeurs sur la liaison de certains de ses ligands et parmi ces résidus, le K191, l'équivalent du K206 chez CCR5, a été trouvé important pour la liaison des chimiokines mais pas pour la signalisation engendrée, tout comme le cas du SDF-1 avec CXCR7 (Navenot et al., 2001).

Enfin, les mutations de résidus acides E202, E207 et E213 ont résulté en des affinités plus faibles d'ITAC pour le récepteur CXCR7, et ont affecté le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à la chimiokine. Seule la mutation du résidu E202 a eu des conséquences notables sur la liaison et l'activité de SDF-1. Ceci suggère un rôle des résidus acides E202, E207 et E213 de l'ECL2 dans la stabilisation de liaison d'ITAC au récepteur CXCR7 et un rôle du résidu E202 dans celle de SDF-1 à CXCR7. Il est à noter que le résidu E213 n'est pas conservé chez

CXCR3 qui a un résidu R216 à la place, ce dernier joue un rôle majeur dans la signalisation de CXCR3 en réponse à ITAC (Colvin et al., 2006) et a été décrit, contrairement au récepteur CXCR7, comme étant un résidu clé du site II de liaison d'ITAC à CXCR3 (suivant le modèle de liaison en deux étapes des récepteurs de chimiokines).

En résumé, les résidus chargés de la deuxième boucle extracellulaire de CXCR7 –en particulier les résidus acides- jouent un rôle important pour la liaison de haute affinité de ses ligands, et le résidu basique R197 joue un rôle crucial pour l'activation du récepteur en réponse à SDF-1 et ITAC.

### **5.2.3. Les résidus chargés de l'ECL3 interviennent dans la liaison des ligands et dans l'activation de CXCR7 en réponse à ITAC :**

La troisième boucle extracellulaire est une petite boucle chez les récepteurs de chimiokines qui intervient dans la signalisation des récepteurs et qui fait également partie du site de liaison du ligand avec les domaines TM6 et TM7 (Peeters et al., 2011). Des mutations de résidus chargés D275 et E290 de cette boucle ont été réalisées.

Similairement au mutant D179N, la mutation du résidu acide D275 (6.58) a aboli la liaison du SDF-1 au récepteur CXCR7 ; des tests de compétition ITAC vs [<sup>125</sup>I] ITAC devront être effectués afin d'étudier les conséquences de la mutation de ce résidu sur la liaison de l'ITAC à CXCR7. Une forte augmentation des valeurs de CE50 de recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à ITAC a été observée, mais les valeurs de CE50 en réponse à SDF-1 ont très faiblement changé. Une diminution de l'efficacité de la réponse BRET a été observée pour les deux ligands. Ce même phénomène, de diminution de l'efficacité de réponse BRET mais non de la puissance de la réponse en réponse à SDF-1 (et donc pas d'altération des valeurs de CE50), a également été rapporté pour le même mutant chez Montpas et al (Montpas et al., 2015). Une interprétation possible est que la diminution d'efficacité de réponse BRET serait due à une diminution de liaison de la chimiokine et donc des récepteurs activés (l'efficacité maximale n'est alors pas atteinte); appuyant le rôle du résidu D275 dans la liaison du SDF-1 au récepteur et suggérant un rôle du D275 également dans la liaison d'ITAC. Le fait que les valeurs de CE50 en réponse à SDF-1 ne soient pas fortement affectées prouve que le résidu n'est pas important pour la signalisation du récepteur en réponse à SDF-1. Le résidu D275 semble donc être un résidu essentiel pour la liaison de SDF-1 – et potentiellement pour

celle d'ITAC – et important pour l'activation de CXCR7 en réponse à ITAC. Similairement à ces résultats, l'équivalent du résidu D275 chez CXCR3, le D278, est important pour l'activation et la liaison d'ITAC à CXCR3 (Colvin et al., 2006). De même, son équivalent chez CXCR4, le D262, est important pour la liaison et l'affinité de SDF-1 pour CXCR4 (Zhou et al., 2000). Le modèle d'interaction CXCR4/SDF-1 déduit du cristal récepteur/chimiokine virale créé par Qin et al (Qin et al., 2015) confirme et explique l'importance du résidu 6.58 ; il y aurait engagement de liaisons hydrogènes entre le N-terminal de la chimiokine et le résidu 6.58 du récepteur. Nos résultats, obtenus suite à la mutation du résidu 6.58 de CXCR7, appuient les observations de Qin &al. (Qin et al., 2015) sur l'intervention beaucoup plus importante du site II (boucles et domaines TM), dans la liaison des ligands à leur récepteur, que le laisserait penser le modèle de liaison en deux étapes des récepteurs de chimiokines. L'ensemble de ces données suggèrent que, bien que le récepteur CXCR7 ne semble pas interagir avec ITAC et SDF-1 de la même manière que le font CXCR3 et CXCR4, il existerait néanmoins des sites d'interactions communs à ces trois récepteurs, dont le résidu D275 ferait partie. En outre, des mutations de l'équivalent de ce résidu dans la troisième boucle extracellulaire de CX3CR1, soit le D254, ont aboli la capacité du récepteur à lier son ligand CX3CL1 (Chen et al., 2006); ce qui suggérerait une importance de ce résidu, dans la liaison des ligands, qui s'étend au-delà des nos trois récepteurs d'intérêt.

La mutation du résidu acide E290 a résulté en une légère perte d'affinité pour SDF-1 mais n'a pas affecté la signalisation de CXCR7 en réponse à la chimiokine. De même, la liaison d'ITAC et le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à la chimiokine sont comparables au récepteur WT. L'équivalent de ce résidu chez CXCR4, le résidu E277, était également important pour l'affinité du SDF-1 pour le récepteur (Zhou et al., 2000). L'équivalent du résidu E290 chez CXCR3, soit le résidu E293, joue un rôle important dans l'activation du récepteur (Colvin et al., 2006; Nedjai et al., 2012), contrairement à CXCR7.

En résumé, les résultats obtenus avec les mutations des résidus chargés de l'ECL2 et de l'ECL3 de CXCR7 confirment les rôles présumés essentiels de la deuxième et troisième boucles extracellulaires pour l'interaction du récepteur avec ses ligands et pour son activation (Colvin et al., 2006; Xanthou et al., 2003). Une modélisation 3D du récepteur CXCR3 par Nedjai et al (Nedjai et al., 2012) a suggéré que des résidus de ces boucles forment des ponts salins intramoléculaires qui stabiliseraient la structure de CXCR3 et guideraient l'entrée du

ligand dans la poche de liaison. Des modélisations 3D de CXCR7 permettraient de savoir quels résidus de ses boucles extracellulaires forment ces ponts intramoléculaires.

### **5.3. Rôle des domaines transmembranaires de CXCR7 :**

La région transmembranaire (TM) est une partie très importante du récepteur car elle interagit avec les ligands dans leur poche de liaison et permet la transduction du signal à la région intracellulaire via des changements de conformation médiés par les « micro-switches » (voir section 1.2.3. de l'introduction) (Allegretti et al., 2008; Venkatakrishnan et al., 2013). Il était donc intéressant d'effectuer des mutations au niveau des hélices TM et d'en observer les conséquences sur la liaison ou l'activité des chimiokines.

#### **5.3.1. Le résidu D90 (2.50) est essentiel pour la liaison d'ITAC à CXCR7 et son activité :**

Le résidu 2.50 (D90 chez CXCR7) est un résidu conservé du TM2 chez la plupart des RCPG et fait partie d'un réseau consensus de 24 contacts inter-TM, où il fait des contacts avec les TM1 et TM7. Ce réseau joue un rôle primordial pour la fonction du récepteur (Venkatakrishnan et al., 2013).

La mutation du résidu acide D90 empêche le recrutement de  $\beta$ -arrestine par le récepteur après stimulation par ITAC mais, bien qu'il affecte fortement ce dernier, n'abolit pas le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à une stimulation par SDF-1. La mutation a également entraîné une baisse d'affinité des ligands, mais qui est largement supérieure dans le cas d'ITAC. Il y aurait donc une importance différente de ce résidu pour les deux chimiokines SDF-1 et ITAC. D'une part, il serait crucial pour la liaison d'ITAC et l'activation subséquente du récepteur. D'autre part, il ne serait pas aussi crucial pour la liaison du SDF-1 à CXCR7, mais jouerait un rôle dans la signalisation qu'il engendre. Il y a donc discordance entre les deux ligands. Ces observations pourraient être compatibles avec la notion de différentes modalités de recrutement de  $\beta$ -arrestine engendrées par des conformations différentes du récepteur CXCR7, suite à la liaison du SDF-1 ou d'ITAC à ce dernier (Shukla et al., 2011) ; le résidu D90 serait peut être essentiel pour une conformation active optimale du récepteur en réponse à ITAC, et le serait moins en réponse au SDF-1 - ceci reste toute fois à confirmer.

### **5.3.2. Le résidu non chargé Q301 (7.39) est essentiel pour l'activation du récepteur CXCR7 en réponse à SDF-1 et ITAC :**

Le résidu 7.39 (Q301 chez CXCR7) fait partie d'un ensemble de résidus, équivalents sur le plan topologique, des domaines TM3, TM6 et TM7 et qui font des contacts consensus avec les ligands pour pratiquement tous les RCPG de classe A (Venkatakrisnan et al., 2013).

La mutation du résidu Q301, en acide glutamique E, n'a pas affecté la capacité du récepteur à lier les chimiokines SDF-1 et ITAC mais a complètement aboli le recrutement de  $\beta$ -arrestine en réponse à ces ligands. Le résidu Q301 serait donc crucial pour l'activation de CXCR7 en réponse à SDF-1 et ITAC mais sans jouer de rôle dans la liaison de ces dernières.

Il est intéressant de noter que le résidu 7.39 est un résidu conservé chez la plupart des RCPG comme étant un résidu acide chargé (E), notamment chez CXCR4, sauf dans le cas des récepteurs CXCR3 et CXCR7. On retrouve un résidu S304 en position 7.39 dans le cas de CXCR3, et des expériences de mutagenèse ont montré qu'une substitution de ce résidu n'altère pas la liaison d'ITAC, tout comme pour CXCR7, mais entraîne une forte diminution de l'affinité de liaison de certaines molécules antagonistes (Scholten et al., 2014). Par contre, l'équivalent du résidu 7.39 chez le récepteur CXCR4 (E288) est très important voire essentiel pour la liaison du SDF-1 au récepteur et son activation; il a été proposé que ce résidu fasse parti du site II de liaison (Brelot et al., 2000; Qin et al., 2015). De même, l'équivalent du résidu 7.39 chez le récepteur CXCR6 (E274) est essentiel pour la liaison de son ligand CXCL16 (Petit et al., 2008). Il est donc étonnant que la mutation du glutamate 7.39 de CXCR7 (Q301) en acide glutamique E (résidu en position 7.39 présent chez les autres récepteurs), ait aboli la signalisation du récepteur mais non la liaison de ses ligands. Ceci prouve la grande diversité des possibilités d'interaction du système récepteurs/chimiokines et suggère l'existence d'un mode d'activation particulier de CXCR7.

### **5.4. Épitopes des anticorps APC 358426 et APC 11G8 :**

Il est à noter que les deux délétions des résidus du N-terminal  $-\Delta 2-3$  et  $\Delta 2-9-$  ont grandement diminué le marquage en surface des récepteurs, particulièrement dans le cas de l'anticorps APC 358426 (fig.15 A et B). Or, des délétions similaires du N-terminal de CXCR4

ont été réalisées par BreLOT et al (BreLOT et al., 2000) et les mutants obtenus s'exprimaient correctement en surface. On aurait pu donc croire que les résidus délétés interviennent dans le bon repliement de CXCR7 et son cheminement en surface, mais les résultats de radio-liaison et de recrutement de  $\beta$ -arrestine du mutant  $\Delta$ 2-3 suggèrent une activité normale du récepteur et donc une structure normale. De même, la délétion  $\Delta$ 2-9 n'a pas affecté la liaison du SDF-1 au mutant comparativement au récepteur WT, suggérant la présence d'un nombre normal de récepteurs en surface. Le très bas marquage en surface cellulaire de ces mutants serait donc dû à un problème d'anticorps; l'épitope de l'anticorps APC 358426 se trouve peut être au niveau de la région délétée. Le marquage en surface des mutations ponctuelles D7N et Y8F a également fortement été diminué (voir annexe 2), or les résultats de recrutement de  $\beta$ -arrestine et de liaison de SDF-1 étaient comparables au récepteur WT; appuyant l'hypothèse d'un problème d'épitope d'anticorps. L'ensemble de ces résultats nous permet de suggérer que l'épitope du clone APC 358426 couvrirait les premiers résidus de la région proximale du N-terminale de CXCR7. De plus, les résultats de disproportion de marquage en surface du mutant E207Q, où le marquage à l'APC 11G8 était supérieur à celui de l'APC 358426 (fig.12B), nous permet de penser que le résidu E207 participe également à l'épitope de l'anticorps APC 358426.

Les résultats de disproportion de marquage des mutants K40A, E114Q et Q301E, pour lesquels une baisse de marquage par le clone APC 11G8 mais non par le clone APC 358426 est constatée (fig.12), s'expliqueraient par une altération de l'épitope du clone 11G8. Ceci nous permet de conclure que les résidus K40 et E114 de CXCR7 participent à l'épitope de l'anticorps 11G8. Le cas du résidu Q301 est un peu particulier puisqu'il fait parti d'un domaine TM. Deux possibilités sont alors envisageables : soit il serait situé plus à l'extrémité du TM7 le rendant accessible à l'anticorps (comme aucune étude de structure de CXCR7 n'a été menée à ce jour, nous ne savons pas avec précision la position réelle de ce résidu); soit il ne serait pas accessible à l'anticorps mais affecterait la conformation de l'ECL3 de façon indirecte et donc, dans ce cas, il influencerait sur l'épitope sans en faire directement partie.

## 5.5. Modes d'interaction entre CXCR7 et SDF-1/ ITAC:

Nous allons à présent faire une synthèse des modes de liaison de SDF-1 et ITAC au récepteur CXCR7. Les résidus importants à l'interaction de CXCR7 avec ses chimiokines sont représentés sur la figure 23.

Le mode de liaison d'ITAC à CXCR7 semble suivre le modèle de liaison en deux étapes des récepteurs de chimiokines. La région N-terminale, principalement la région chargée négativement formée par les résidus acides, serait essentielle pour la liaison de la chimiokine et constituerait le site I d'interaction du récepteur avec ITAC. Les résidus acides E202, E207 et E213 de l'ECL2 seraient importants pour assurer la liaison de haute affinité d'ITAC et ferait donc également partie du site I de liaison avec le N-terminal. Les résidus D179N de l'ECL2, D275 de l'ECL3 et D90 du TM2 sont importants aussi bien pour la liaison que pour l'activité de la chimiokine et feraient partie de la poche de liaison du ligand (site II d'interaction). Enfin, les résidus R197 de l'ECL2 et Q301 du TM7 semblent essentiels pour la signalisation engendrée par la chimiokine sans en affecter la liaison; suggérant qu'après stabilisation de la chimiokine ITAC au niveau de la poche de liaison, elle entreprendrait des interactions avec ces deux résidus aboutissant à l'activation du récepteur. Le résidu acide E114 de l'ECL1 aide à maintenir une conformation propice à une activation optimale du récepteur.

Le SDF-1, quant à lui, ne suivrait pas ce modèle de liaison en deux étapes. En effet, il ne nécessite pas la région N-terminale pour sa liaison au récepteur et semblerait plutôt dépendre davantage des boucles extracellulaires et des domaines TM pour son interaction avec CXCR7. Ainsi, les résidus acides E114 de l'ECL1, E202 de l'ECL2 et E290 de l'ECL3 aident à maintenir une liaison stable du SDF-1 au récepteur. Les résidus K206 (ECL2) et D275 (ECL3) sont très importants pour la liaison du SDF-1. Le résidu D179 semble important aussi bien pour la liaison que pour l'activité de la chimiokine. Enfin, comme pour ITAC, les résidus R197 de l'ECL2 et Q301 du domaine TM7 semblent cruciaux pour l'activation du récepteur en réponse à la chimiokine sans jouer de rôle dans sa liaison au récepteur. Le résidu D90 du TM2 semble important pour une réponse optimale du récepteur via les contacts inter-TM qu'il engage.

Succinctement, il existe une discordance entre l'interaction des deux ligands avec le récepteur : les modes de liaison de SDF-1 et ITAC à CXCR7 seraient différents l'un de l'autre. En effet, la partie N-terminale semble être essentielle pour l'interaction avec ITAC et non pour SDF-1 ; le résidu D90 semble être essentiel pour la liaison d'ITAC et l'activation subséquente du récepteur mais non pour celle de SDF-1. Cette discordance entre les deux ligands est une nouvelle donnée s'opposant à la vieille assumption du phénomène de redondance du système récepteur/chimiokine (voir section **1.2.1**). En effet, les chimiokines SDF-1 et ITAC ne se lient pas de la même façon et ne recrutant pas la  $\beta$ -arrestine de la même manière, prouvent qu'elles sont capables d'activer le récepteur de manière différente l'une de l'autre.

L'ensemble de ces données suggèrent que les deux ligands SDF-1 et ITAC interagissent de façon allostérique avec le récepteur CXCR7. Éventuellement, la compétition hétérologue qu'on observe pour les essais de radio-liaison refléterait une compétition allostérique entre les deux chimiokines. ITAC se fixerait à un site orthostérique « classique » impliquant le N-terminal, les boucles extracellulaires et le domaine TM. SDF-1, quant à lui, se fixerait à un site allostérique distinct, impliquant les boucles extracellulaires, particulièrement l'ECL2, et les domaines TM. Le rôle de l'ECL2 dans la modulation allostérique des ligands a également été rapporté auparavant pour d'autres récepteurs (Narlawar et al., 2010; Peeters et al., 2011). Un comportement d'allostérie semblable a été observé dans le cas du récepteur CXCR3, pour lequel il a été démontré qu'il ne liait pas ses chimiokines IP-10 et ITAC à partir des mêmes sites : la reconnaissance de la chimiokine IP-10 nécessite la présence des résidus D112 (extrémité TM2), D195 et E196 (deux résidus de l'ECL2) alors que celle d'ITAC est indépendante de ces derniers. De même, les deux chimiokines avaient des efficacités et des puissances de réponses distinctes dans de nombreux essais fonctionnels suggérant qu'elles interagissent avec CXCR3 différemment et qu'elles stabilisent des conformations différentes du récepteur (Nedjai et al., 2012).



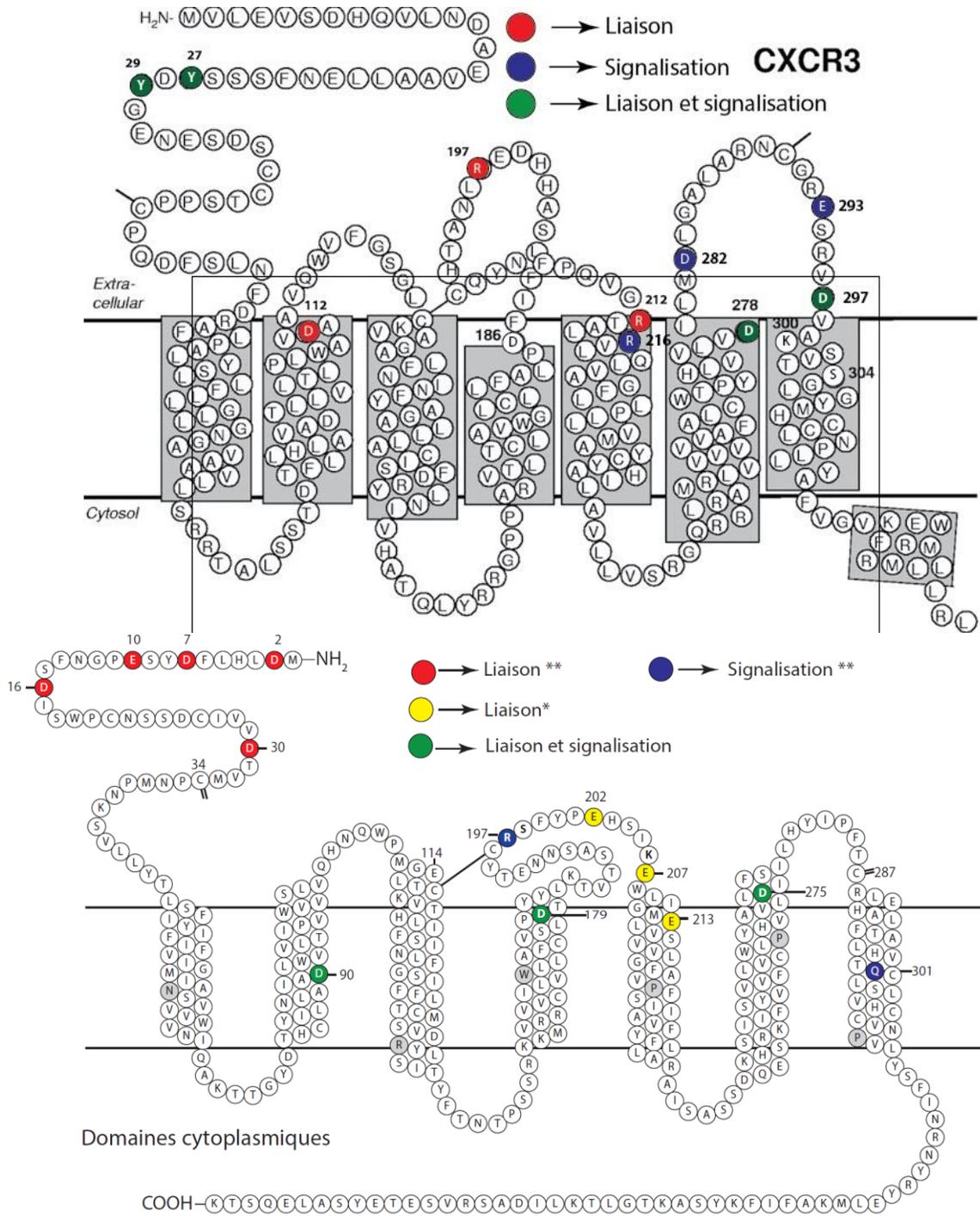
## **5.6. Comparaison du système CXCR7/SDF-1/ITAC avec CXCR3/ITAC et CXCR4/SDF-1:**

Il a été vu, lors de la discussion des résultats de mutations de CXCR7, qu'il existait des différences d'importance de certains résidus clés entre les récepteurs CXCR3, CXCR4 et CXCR7. Pour finir, il serait donc intéressant de faire une comparaison synthétique du mode d'interaction du récepteur CXCR7 et ses ligands avec celui des systèmes CXCR3/ITAC et CXCR4/SDF-1. Des schémas illustrant ces comparaisons sont représentés sur les figures 24, 25 et 26.

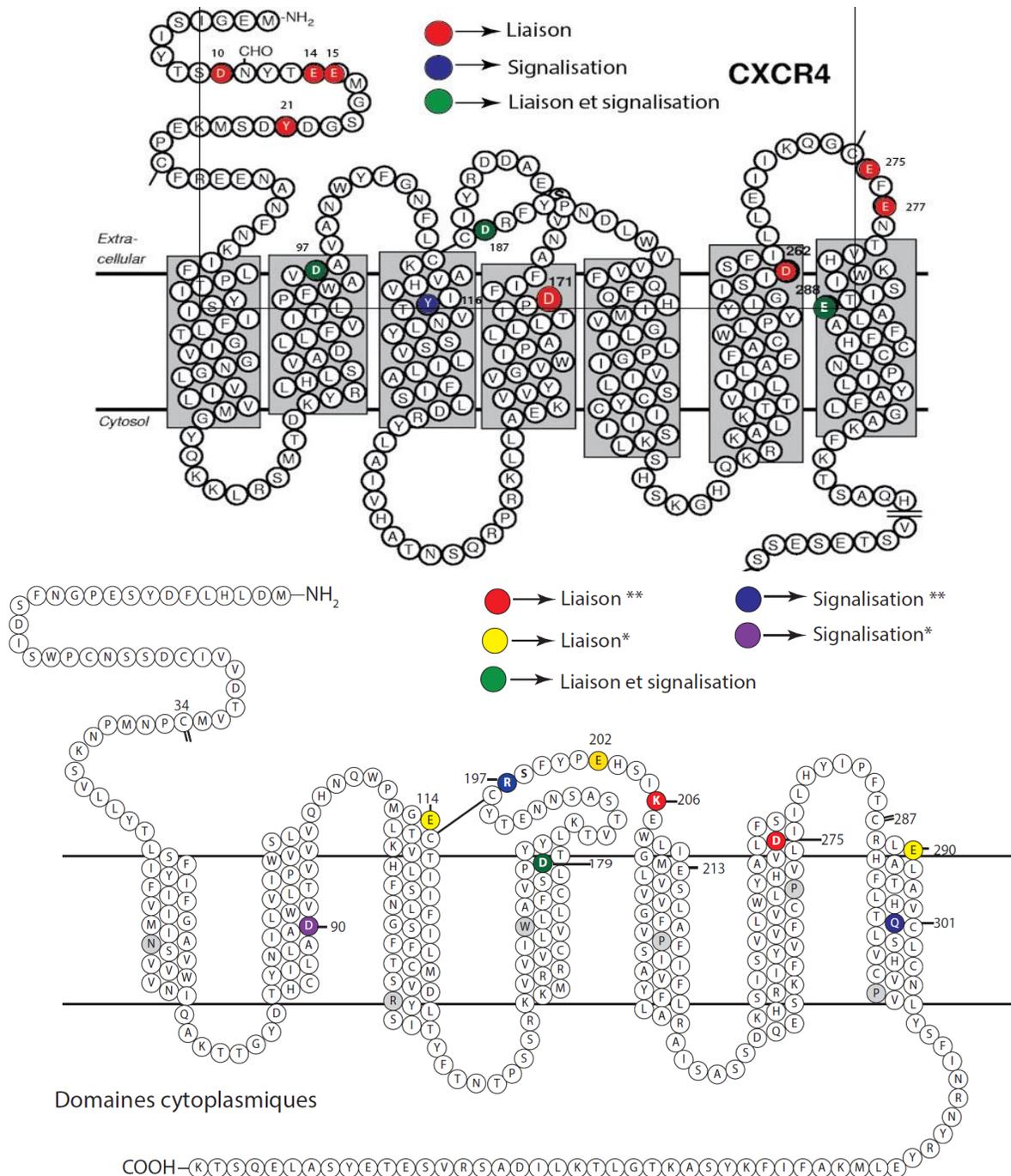
De manière générale, dans le cas d'ITAC, il semblerait que, tout comme pour le récepteur CXCR3, l'interaction de CXCR7 avec cette chimiokine suivrait le modèle conventionnel d'activation en deux étapes. Cependant, sa liaison de haute affinité nécessitait la présence de résidus acides du N-terminal et de l'ECL2 pour le récepteur CXCR7; mais était indépendante des résidus acides du N-terminal de CXCR3 et nécessitait plutôt la présence de tyrosines du N-terminal et de résidus basiques de l'ECL2. De plus, des résidus cruciaux pour la liaison ou la fonction d'une chimiokine pour un récepteur ne l'étaient pas forcément pour l'autre (figures 24 et 26). Ainsi, le résidu basique R212 de CXCR3 est essentiel pour la liaison d'ITAC au récepteur mais son équivalent chez CXCR7 (K206) ne l'est pas ; les résidus R216 et E293 sont importants pour l'activation de CXCR3 en réponse à ITAC mais leurs analogues chez CXCR7 E213 et E290 n'influencent pas celle de CXCR7.

Dans le cas du SDF-1, il semblerait que l'interaction de CXCR7 avec cette dernière ne suive pas le modèle conventionnel de liaison en deux étapes, contrairement au récepteur CXCR4. En effet, alors que le SDF-1 nécessite la phosphorylation de la Tyr21 et la présence de résidus acides du N-terminal de CXCR4 pour l'étape initiale de liaison au récepteur, il ne nécessiterait pas du tout la phosphorylation de tyrosines ou la présence de résidus chargés du N-terminal dans le cas de CXCR7. De plus, des résidus clés des boucles importants pour la liaison de SDF-1 à CXCR4 tels que 4.78 et 7.39 ne l'étaient pas pour CXCR7 (R197 et Q301 respectivement) (figures 25 et 26).

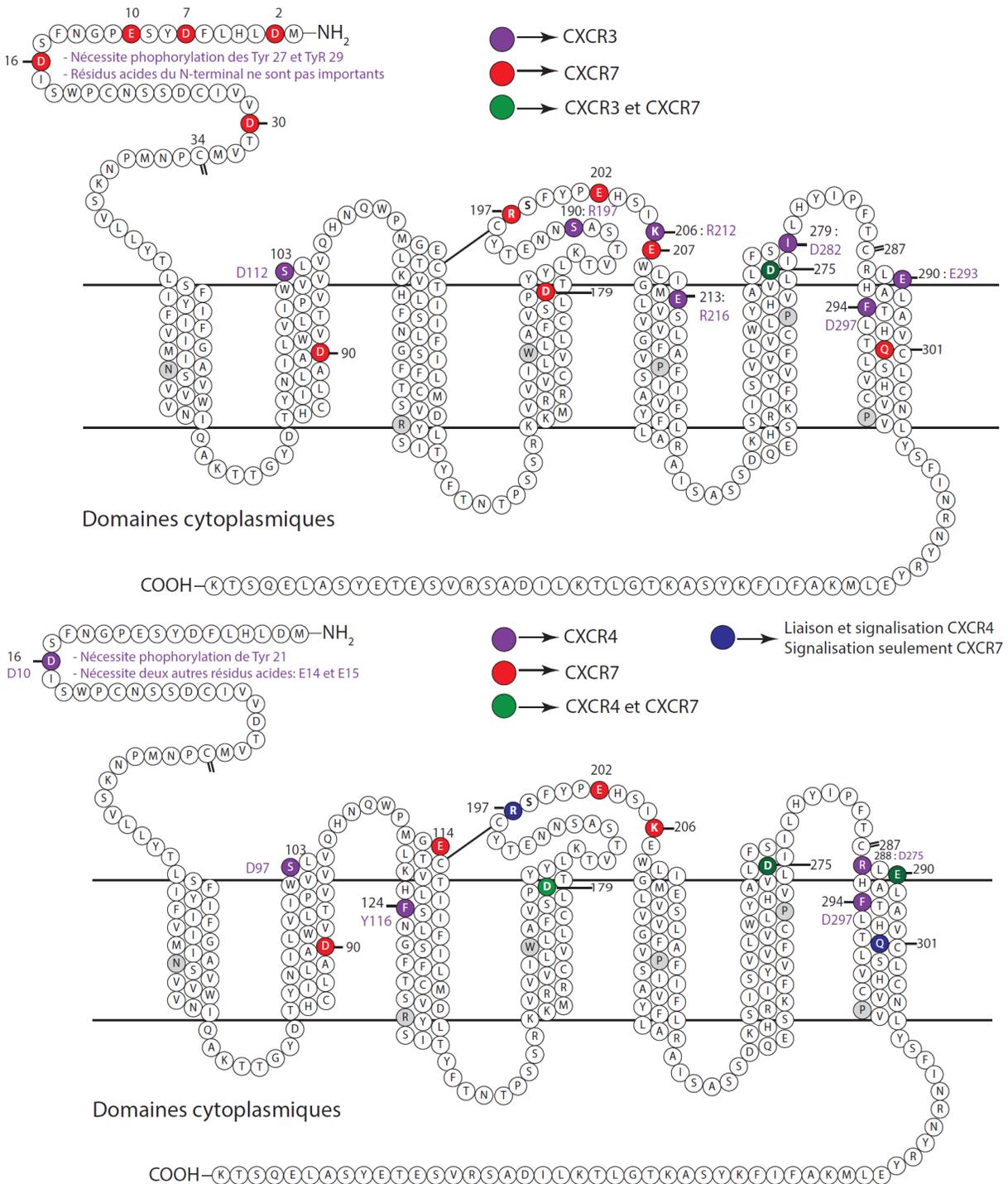
Il est toute fois à noter qu'il existe néanmoins certains sites d'interaction communs aux récepteurs CXCR3, CXCR4 et CXCR7: le résidu conservé 6.58 (D275 chez CXCR7), par exemple, est essentiel à la liaison des chimiokines pour les trois récepteurs (fig.26).



**Figure 24. Modes d'interaction CXCR3/ITAC et CXCR7/ITAC.** En haut, la structure de CXCR3, avec les résidus clés à l'interaction du récepteur avec ITAC (Colvin et al., 2006; Nedjai et al., 2012), est représentée (tirée et modifiée depuis (Hatse et al., 2007)). L'autorisation de reproduire la figure a été accordée par l'ASM. En bas, la structure de CXCR7, avec les résidus importants à l'interaction du récepteur avec ITAC, est représentée. \* et \*\* indiquent l'importance des résidus; \*\* représentant une grande importance du résidu.



**Figure 25. Modes d'interaction CXCR4/SDF-1 et CXCR7/SDF-1.** En haut, la structure de CXCR4 (tirée et modifiée depuis (Hatse et al., 2007)) avec les résidus clés à l'interaction du récepteur avec SDF-1 est représentée (Brelot et al., 1999; Brelot et al., 2000; Nomiya et al., 2015; Qin et al., 2015; Tian et al., 2005; Wu et al., 2010; Zhou et al., 2000). L'autorisation de reproduire la figure a été accordée par l'ASM. En bas, la structure de CXCR7 avec les résidus clés à l'interaction du récepteur avec SDF-1 est représentée. \* et \*\* indiquent l'importance des résidus; \*\* représentant une grande importance du résidu



**Figure 26. Comparaison des modes d'interaction CXCR3/CXCR7/ITAC et CXCR4/CXCR7/SDF-1.** Les équivalents des résidus importants pour l'interaction de CXCR3 avec ITAC (figure du haut) et CXCR4 avec SDF-1 (figure du bas) sont représentés et comparés avec les résidus importants pour l'interaction de CXCR7 avec ces chimiokines (Brelot et al., 1999; Brelot et al., 2000; Colvin et al., 2006; Nedjai et al., 2012; Nomiya et al., 2015; Qin et al., 2015; Tian et al., 2005; Wu et al., 2010; Zhou et al., 2000).

## Conclusion

En conclusion, nous nous sommes intéressés à identifier les acides aminés essentiels à la liaison des ligands naturels SDF-1 et ITAC à CXCR7, et à savoir s'il existait des différences de mode de liaison entre les ligands. Pour cela, nous avons effectué des mutations des parties extracellulaires et des domaines transmembranaires membranaires de CXCR7. Les différences majeures d'interaction entre les deux ligands ont mené à croire que les deux chimiokines SDF-1 et ITAC interagissent de façon allostérique avec le récepteur, et qu'elles stabilisent des conformations du récepteur pouvant mener à des modalités de recrutement de  $\beta$ -arrestine différentes. Ces observations nous permettent d'apporter de nouvelles preuves s'opposant au phénomène présumé de redondance du système récepteur/chimiokine.

Nous nous sommes également intéressés à comparer le mode d'interaction du récepteur CXCR7 et ses ligands avec celui des systèmes CXCR4/SDF-1 et CXCR3/ITAC. CXCR7 semble interagir avec ses ligands de façon différente de celle de CXCR3 et CXCR4. La liaison d'ITAC à CXCR7 suivrait le modèle conventionnel d'activation en deux étapes, similairement à CXCR3, mais impliquerait des résidus différents de ceux de CXCR3; le cas de l'interaction du récepteur CXCR7 avec la chimiokine SDF-1 serait plus complexe, et contrairement au récepteur CXCR4, ce dernier ne suivrait pas le modèle conventionnel de liaison en deux étapes. Comme le modèle de liaison des chimiokines en deux étapes a été décrit pour des récepteurs signalisant via les protéines G, il est possible que les récepteurs atypiques, tels que CXCR7, suivent un modèle d'activation différent de celui des récepteurs classiques. Les connaissances à ce sujet étant limitées, cette question reste en suspens et nécessiterait des études plus approfondies pour y répondre.

## Perspectives

Les résultats présentés ici suggèrent un mode de liaison allostérique des deux chimiokines SDF-1 et ITAC au récepteur CXCR7. Il reste néanmoins quelques expériences à compléter. Tout d'abord, des essais de radio-liaison sur les mutants des résidus acides du N-terminal en présence d'ITAC confirmeraient le rôle supposé primordial de cette région pour l'interaction d'ITAC avec le récepteur. Il serait également intéressant d'effectuer des essais de saturation pour les mutants D179N et D275A afin de pouvoir déterminer la quantité de [<sup>125</sup>I] SDF-1 nécessaire pour une liaison au récepteur. Enfin, deux mutations de résidus chargés des boucles de CXCR7 restent à effectuer et à étudier : soit les mutations du résidu basique K118 de l'ECL1 et R288 de l'ECL3 (résidu important pour liaison du SDF-1 à CXCR4 (Zhou et al., 2000)). La confirmation de l'existence d'un phénomène d'allostérie pour la liaison de SDF-1 et ITAC et l'identification des résidus clés à l'interaction de chaque chimiokine, sont fortement intéressants d'un point de vue thérapeutique. En effet, cela permettrait de synthétiser des molécules pour bloquer l'activation d'une voie de signalisation indésirable d'un ligand tout en laissant intact d'autres voies de signalisation du récepteur.

Les données des résidus cruciaux pour l'interaction des récepteurs CXCR3 et CXCR4 avec ITAC et SDF-1 respectivement ont permis d'identifier des résidus correspondants non chargés chez CXCR7 : les sérines S103 et S190 (Brelot et al., 2000; Colvin et al., 2006; Nedjai et al., 2012) et les phénylalanines F124 et F294 (Nedjai et al., 2012; Qin et al., 2015) (voir tableau V, p.76). Il serait intéressant de muter ces résidus et d'en étudier les effets sur l'interaction de CXCR7 avec ses ligands. Il se pourrait que pour CXCR7, les résidus chargés ne soient pas les seuls résidus importants à l'interaction et la réponse aux ligands, tout comme le cas du résidu Q301.

Enfin, suite aux résultats de marquage en surfaces des délétions du N-terminal, nous pensons avoir identifié l'épitope des anticorps anti-CXCR7 APC 358426 et APC 11G8. Un marquage des mutants à l'aide d'autres anticorps permettrait de confirmer cela. Comme les épitopes de ces anticorps ne sont pas connus, cette donnée apporterait de nouvelles informations qui seront utiles pour les marquages en surface des récepteurs CXCR7.

## Bibliographie

- Achour, L., Kamal, M., Jockers, R., & Marullo, S. (2011). Using quantitative BRET to assess G protein-coupled receptor homo- and heterodimerization. *Methods Mol Biol*, 756, 183-200. doi: 10.1007/978-1-61779-160-4\_9
- Alkhatib, G. (2009). The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS*, 4(2), 96-103. doi: 10.1097/COH.0b013e328324bbec
- Allegretti, M., Bertini, R., Bizzarri, C., Beccari, A., Mantovani, A., & Locati, M. (2008). Allosteric inhibitors of chemoattractant receptors: opportunities and pitfalls. *Trends Pharmacol Sci*, 29(6), 280-286. doi: 10.1016/j.tips.2008.03.005
- Allen, S. J., Crown, S. E., & Handel, T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, 25, 787-820. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529
- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairret, S., Chelsky, D., Dennis, M., & Bouvier, M. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3684-3689. doi: 10.1073/pnas.060590697
- Bachelier, F., Graham, G. J., Locati, M., Mantovani, A., Murphy, P. M., Nibbs, R., . . . Thelen, M. (2014). New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat Immunol*, 15(3), 207-208. doi: 10.1038/ni.2812
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moepps, B., . . . Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 280(42), 35760-35766. doi: 10.1074/jbc.M508234200
- Ballesteros, J., & Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-protein coupled receptors. *Methods Neurosci.*, 25, 366-428.
- Berahovich, R. D., Zabel, B. A., Lewen, S., Walters, M. J., Ebsworth, K., Wang, Y., . . . Schall, T. J. (2014). Endothelial expression of CXCR7 and the regulation of systemic CXCL12 levels. *Immunology*, 141(1), 111-122. doi: 10.1111/imm.12176
- Berahovich, R. D., Zabel, B. A., Penfold, M. E., Lewen, S., Wang, Y., Miao, Z., . . . Schall, T. J. (2010). CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes. *J Immunol*, 185(9), 5130-5139. doi: 10.4049/jimmunol.1001660
- Bjarnadottir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88(3), 263-273. doi: 10.1016/j.ygeno.2006.04.001
- Bockaert, J., & Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, 18(7), 1723-1729. doi: 10.1093/emboj/18.7.1723

- Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., . . . Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*, *132*(3), 463-473. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.034
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(16), 7297-7301.
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci*, *2*(4), 274-286. doi: 10.1038/35067575
- Braunersreuther, V., Mach, F., & Steffens, S. (2007). The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, *97*(5), 714-721.
- Brelot, A., Heveker, N., Adema, K., Hosie, M. J., Willett, B., & Alizon, M. (1999). Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses. *J Virol*, *73*(4), 2576-2586.
- Brelot, A., Heveker, N., Montes, M., & Alizon, M. (2000). Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem*, *275*(31), 23736-23744. doi: 10.1074/jbc.M000776200
- Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., . . . Schall, T. J. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, *203*(9), 2201-2213. doi: 10.1084/jem.20052144
- Caruz, A., Samsom, M., Alonso, J. M., Alcami, J., Baleux, F., Virelizier, J. L., . . . Arenzana-Seisdedos, F. (1998). Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett*, *426*(2), 271-278.
- Chandrasekar, B., Bysani, S., & Mummidi, S. (2004). CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*, *279*(5), 3188-3196. doi: 10.1074/jbc.M311660200
- Chen, Y., Green, S. R., Almazan, F., & Quehenberger, O. (2006). The amino terminus and the third extracellular loop of CX3CR1 contain determinants critical for distinct receptor functions. *Mol Pharmacol*, *69*(3), 857-865. doi: 10.1124/mol.105.015909
- Clark-Lewis, I., Dewald, B., Loetscher, M., Moser, B., & Baggiolini, M. (1994). Structural requirements for interleukin-8 function identified by design of analogs and CXC chemokine hybrids. *J Biol Chem*, *269*(23), 16075-16081.
- Clark-Lewis, I., Kim, K. S., Rajarathnam, K., Gong, J. H., Dewald, B., Moser, B., . . . Sykes, B. D. (1995). Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol*, *57*(5), 703-711.
- Colvin, R. A., Campanella, G. S., Manice, L. A., & Luster, A. D. (2006). CXCR3 requires tyrosine sulfation for ligand binding and a second extracellular loop arginine residue for ligand-induced chemotaxis. *Mol Cell Biol*, *26*(15), 5838-5849. doi: 10.1128/MCB.00556-06
- Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., . . . Clark-Lewis, I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J*, *16*(23), 6996-7007. doi: 10.1093/emboj/16.23.6996
- Cruz-Orengo, L., Holman, D. W., Dorsey, D., Zhou, L., Zhang, P., Wright, M., . . . Klein, R. S. (2011). CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling

- abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med*, 208(2), 327-339. doi: 10.1084/jem.20102010
- Dai, X., Tan, Y., Cai, S., Xiong, X., Wang, L., Ye, Q., . . . Cai, L. (2011). The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*, 15(6), 1299-1309. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01301.x
- Dambly-Chaudiere, C., Cubedo, N., & Ghysen, A. (2007). Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol*, 7, 23. doi: 10.1186/1471-213X-7-23
- Datta, D., Flaxenburg, J. A., Laxmanan, S., Geehan, C., Grimm, M., Waaga-Gasser, A. M., . . . Pal, S. (2006). Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res*, 66(19), 9509-9518. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4345
- Farber, J. M. (1990). A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(14), 5238-5242.
- Farzan, M., Babcock, G. J., Vasilieva, N., Wright, P. L., Kiprilov, E., Mirzabekov, T., & Choe, H. (2002). The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry. *J Biol Chem*, 277(33), 29484-29489. doi: 10.1074/jbc.M203361200
- Fernandez, E. J., & Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 469-499. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838
- Flower, D. R. (1999). Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta*, 1422(3), 207-234.
- Frohman, E. M., Racke, M. K., & Raine, C. S. (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*, 354(9), 942-955. doi: 10.1056/NEJMra052130
- Gaginella, T. S. (1995). *Handbook of Methods in Gastrointestinal Pharmacology*. Taylor & Francis.
- Gales, C., Rebois, R. V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T. E., & Bouvier, M. (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2(3), 177-184. doi: 10.1038/nmeth743
- Gales, C., Van Durm, J. J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., . . . Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 13(9), 778-786. doi: 10.1038/nsmb1134
- Garcia-Lopez, M. A., Sanchez-Madrid, F., Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M., Acevedo, A., Garcia, M. I., . . . Marazuela, M. (2001). CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest*, 81(3), 409-418.
- Gerrits, H., van Ingen Schenau, D. S., Bakker, N. E., van Disseldorp, A. J., Strik, A., Hermens, L. S., . . . Gossen, J. A. (2008). Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis*, 46(5), 235-245. doi: 10.1002/dvg.20387
- Govaerts, C., Blanpain, C., Deupi, X., Ballet, S., Ballesteros, J. A., Wodak, S. J., . . . Parmentier, M. (2001). The TXP motif in the second transmembrane helix of CCR5. A

- structural determinant of chemokine-induced activation. *J Biol Chem*, 276(16), 13217-13225. doi: 10.1074/jbc.M011670200
- Graham, G. J. (2009). D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur J Immunol*, 39(2), 342-351. doi: 10.1002/eji.200838858
- Hamdan, F. F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., & Bouvier, M. (2005). High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen*, 10(5), 463-475. doi: 10.1177/1087057105275344
- Han, K. H., Green, S. R., Tangirala, R. K., Tanaka, S., & Quehenberger, O. (1999). Role of the first extracellular loop in the functional activation of CCR2. The first extracellular loop contains distinct domains necessary for both agonist binding and transmembrane signaling. *J Biol Chem*, 274(45), 32055-32062.
- Hartmann, T. N., Grabovsky, V., Pasvolsky, R., Shulman, Z., Buss, E. C., Spiegel, A., . . . Alon, R. (2008). A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol*, 84(4), 1130-1140. doi: 10.1189/jlb.0208088
- Hatse, S., Huskens, D., Princen, K., Vermeire, K., Bridger, G. J., De Clercq, E., . . . Schols, D. (2007). Modest human immunodeficiency virus coreceptor function of CXCR3 is strongly enhanced by mimicking the CXCR4 ligand binding pocket in the CXCR3 receptor. *J Virol*, 81(7), 3632-3639. doi: 10.1128/JVI.01941-06
- Hawtin, S. R., Simms, J., Conner, M., Lawson, Z., Parslow, R. A., Trim, J., . . . Wheatley, M. (2006). Charged extracellular residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, are required for ligand binding, receptor activation, and cell-surface expression. *J Biol Chem*, 281(50), 38478-38488. doi: 10.1074/jbc.M607639200
- Holland, J. D., Kochetkova, M., Akekawatchai, C., Dottore, M., Lopez, A., & McColl, S. R. (2006). Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. *Cancer Res*, 66(8), 4117-4124. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1631
- Hopkins, A. L., & Groom, C. R. (2002). The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*, 1(9), 727-730. doi: 10.1038/nrd892
- Horuk, R. (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12(4), 313-335.
- Humpert, M. L., Tzouros, M., Thelen, S., Bignon, A., Levoye, A., Arenzana-Seisdedos, F., . . . Thelen, M. (2012). Complementary methods provide evidence for the expression of CXCR7 on human B cells. *Proteomics*, 12(12), 1938-1948. doi: 10.1002/pmic.201100581
- Infantino, S., Moepps, B., & Thelen, M. (2006). Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol*, 176(4), 2197-2207.
- Izhak, L., Wildbaum, G., Zohar, Y., Anunu, R., Klapper, L., Elkeles, A., . . . Karin, N. (2009). A novel recombinant fusion protein encoding a 20-amino acid residue of the third extracellular (E3) domain of CCR2 neutralizes the biological activity of CCL2. *J Immunol*, 183(1), 732-739. doi: 10.4049/jimmunol.0802746
- Jenh, C. H., Cox, M. A., Cui, L., Reich, E. P., Sullivan, L., Chen, S. C., . . . Lundell, D. (2012). A selective and potent CXCR3 antagonist SCH 546738 attenuates the

- development of autoimmune diseases and delays graft rejection. *BMC Immunol*, 13, 2. doi: 10.1186/1471-2172-13-2
- Kalatskaya, I., Berchiche, Y. A., Gravel, S., Limberg, B. J., Rosenbaum, J. S., & Heveker, N. (2009). AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol*, 75(5), 1240-1247. doi: 10.1124/mol.108.053389
- Kalatskaya, I., Berchiche, Y. A., Gravel, S., Limberg, B. J., Rosenbaum, J. S., and Heveker, N. (2009). AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol. Pharmacol*, 75(5), 1240–1247.
- Kenakin, T. (2010). *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods*. Elsevier Science.
- Klco, J. M., Nikiforovich, G. V., & Baranski, T. J. (2006). Genetic analysis of the first and third extracellular loops of the C5a receptor reveals an essential WXFG motif in the first loop. *J Biol Chem*, 281(17), 12010-12019. doi: 10.1074/jbc.M600548200
- Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., . . . Shimada, I. (2009). Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *J Biol Chem*, 284(50), 35240-35250. doi: 10.1074/jbc.M109.024851
- Kohidai, L. (2006). Structure of Chemokines. Repéré à <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ChtxChemkinStr2.png>
- Kohout, T. A., & Lefkowitz, R. J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol*, 63(1), 9-18.
- Kwak, H. B., Ha, H., Kim, H. N., Lee, J. H., Kim, H. S., Lee, S., . . . Lee, Z. H. (2008). Reciprocal cross-talk between RANKL and interferon-gamma-inducible protein 10 is responsible for bone-erosive experimental arthritis. *Arthritis Rheum*, 58(5), 1332-1342. doi: 10.1002/art.23372
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., . . . Romagnani, P. (2003). An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med*, 197(11), 1537-1549. doi: 10.1084/jem.20021897
- Lawson, Z., & Wheatley, M. (2004). The third extracellular loop of G-protein-coupled receptors: more than just a linker between two important transmembrane helices. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 6), 1048-1050. doi: 10.1042/BST0321048
- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., & Lagane, B. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113(24), 6085-6093. doi: 10.1182/blood-2008-12-196618
- Lin, G., Baribaud, F., Romano, J., Doms, R. W., & Hoxie, J. A. (2003). Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J Virol*, 77(2), 931-942.
- Ludeman, J. P., & Stone, M. J. (2014). The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition. *Br J Pharmacol*, 171(5), 1167-1179. doi: 10.1111/bph.12455
- Luker, E., Gupta, M., & Luker, D. (2009). Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation. *FASEB J*, 23(3), 823-834. doi: 10.1096/fj.08-116749
- Luker, K. E., Gupta, M., Steele, J. M., Foerster, B. R., & Luker, G. D. (2009). Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia*, 11(10), 1022-1035.

- Luker, K. E., Lewin, S. A., Mihalko, L. A., Schmidt, B. T., Winkler, J. S., Coggins, N. L., . . . Luker, G. D. (2012). Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene*, *31*(45), 4750-4758. doi: 10.1038/onc.2011.633
- Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, *115*(Pt 3), 455-465.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., . . . Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(16), 9448-9453.
- Ma, X., Norsworthy, K., Kundu, N., Rodgers, W. H., Gimotty, P. A., Goloubeva, O., . . . Fulton, A. (2009). CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Mol Cancer Ther*, *8*(3), 490-498. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0485
- Maishi, N., Ohga, N., Hida, Y., Akiyama, K., Kitayama, K., Osawa, T., . . . Hida, K. (2012). CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int*, *62*(5), 309-317. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02792.x
- Mantovani, A., Bonecchi, R., & Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol*, *6*(12), 907-918. doi: 10.1038/nri1964
- Marchese, A., & Benovic, J. L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem*, *276*(49), 45509-45512. doi: 10.1074/jbc.C100527200
- Maurel, D. (2008). La technologie BRET *Wikipédia*.
- Melter, M., Exeni, A., Reinders, M. E., Fang, J. C., McMahon, G., Ganz, P., . . . Briscoe, D. M. (2001). Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection. *Circulation*, *104*(21), 2558-2564.
- Memi, F., Abe, P., Cariboni, A., MacKay, F., Parnavelas, J. G., & Stumm, R. (2013). CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) affects the migration of GnRH neurons by regulating CXCL12 availability. *J Neurosci*, *33*(44), 17527-17537. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0857-13.2013
- Miao, Z., Luker, K. E., Summers, B. C., Berahovich, R., Bhojani, M. S., Rehemtulla, A., . . . Schall, T. J. (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(40), 15735-15740. doi: 10.1073/pnas.0610444104
- Miekus, K., Jarocho, D., Trzyna, E., & Majka, M. (2010). Role of I-TAC-binding receptors CXCR3 and CXCR7 in proliferation, activation of intracellular signaling pathways and migration of various tumor cell lines. *Folia Histochem Cytobiol*, *48*(1), 104-111. doi: 10.2478/v10042-008-0091-7
- Mines, M., Ding, Y., & Fan, G. H. (2007). The many roles of chemokine receptors in neurodegenerative disorders: emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem*, *14*(23), 2456-2470.
- Mishra, A., Shiozawa, Y., Pienta, K. J., & Taichman, R. S. (2011). Homing of cancer cells to the bone. *Cancer Microenviron*, *4*(3), 221-235. doi: 10.1007/s12307-011-0083-6
- Montecarlo, F. S., & Charo, I. F. (1996). The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine

- selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *J Biol Chem*, 271(32), 19084-19092.
- Montecclaro, F. S., & Charo, I. F. (1997). The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. Receptor activation by a pseudo-tethered ligand. *J Biol Chem*, 272(37), 23186-23190.
- Montpas, N., Cabana, J., St-Onge, G., Gravel, S., Morin, G., Kuroyanagi, T., . . . Heveker, N. (2015). Mode of binding of the cyclic agonist peptide TC14012 to CXCR7: identification of receptor and compound determinants. *Biochemistry*, 54(7), 1505-1515. doi: 10.1021/bi501526s
- Murphy, J. W., Cho, Y., Sachpatzidis, A., Fan, C., Hodsdon, M. E., & Lolis, E. (2007). Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. *J Biol Chem*, 282(13), 10018-10027. doi: 10.1074/jbc.M608796200
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., . . . Power, C. A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52(1), 145-176.
- Narlawar, R., Lane, J. R., Doddareddy, M., Lin, J., Brussee, J., & Ijzerman, A. P. (2010). Hybrid ortho/allosteric ligands for the adenosine A(1) receptor. *J Med Chem*, 53(8), 3028-3037. doi: 10.1021/jm901252a
- Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleswar, H., Raz, E., Zerwes, H. G., . . . Thelen, M. (2010). CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5(2), e9175. doi: 10.1371/journal.pone.0009175
- Navenot, J. M., Wang, Z. X., Trent, J. O., Murray, J. L., Hu, Q. X., DeLeeuw, L., . . . Peiper, S. C. (2001). Molecular anatomy of CCR5 engagement by physiologic and viral chemokines and HIV-1 envelope glycoproteins: differences in primary structural requirements for RANTES, MIP-1 alpha, and vMIP-II Binding. *J Mol Biol*, 313(5), 1181-1193. doi: 10.1006/jmbi.2001.5086
- Nedjai, B., Li, H., Stroke, I. L., Wise, E. L., Webb, M. L., Merritt, J. R., . . . Pease, J. E. (2012). Small molecule chemokine mimetics suggest a molecular basis for the observation that CXCL10 and CXCL11 are allosteric ligands of CXCR3. *Br J Pharmacol*, 166(3), 912-923. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01660.x
- Neusser, M. A., Kraus, A. K., Regele, H., Cohen, C. D., Fehr, T., Kerjaschki, D., . . . Segerer, S. (2010). The chemokine receptor CXCR7 is expressed on lymphatic endothelial cells during renal allograft rejection. *Kidney Int*, 77(9), 801-808. doi: 10.1038/ki.2010.6
- Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science*, 296(5573), 1636-1639. doi: 10.1126/science.1071550
- Nomiyama, H., & Yoshie, O. (2015). Functional roles of evolutionary conserved motifs and residues in vertebrate chemokine receptors. *J Leukoc Biol*, 97(1), 39-47. doi: 10.1189/jlb.2RU0614-290R
- Nygaard, R., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M., & Schwartz, T. W. (2009). Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci*, 30(5), 249-259. doi: 10.1016/j.tips.2009.02.006
- O'Boyle, G., Newton, P., Jenkins, Y., Ali, S., & Kirby, J. (2010). A strategy to inhibit effector T cell infiltration of allograft tissues by stimulation of the chemokine receptor CXCR3. *Transplantation*, 90, 144.

- O'Hayre, M., Salanga, C. L., Handel, T. M., & Hamel, D. J. (2010). Emerging concepts and approaches for chemokine-receptor drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, *5*(11), 1109-1122. doi: 10.1517/17460441.2010.525633
- Odemis, V., Lipfert, J., Kraft, R., Hajek, P., Abraham, G., Hattermann, K., . . . Engele, J. (2012). The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia*, *60*(3), 372-381. doi: 10.1002/glia.22271
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys*, *39*(2), 117-166. doi: 10.1017/S0033583506004306
- Ott, T. R., Pahuja, A., Nickolls, S. A., Alleva, D. G., & Struthers, R. S. (2004). Identification of CC chemokine receptor 7 residues important for receptor activation. *J Biol Chem*, *279*(41), 42383-42392. doi: 10.1074/jbc.M401097200
- Panzer, U., Steinmetz, O. M., Paust, H. J., Meyer-Schwesinger, C., Peters, A., Turner, J. E., . . . Stahl, R. A. (2007). Chemokine receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*, *18*(7), 2071-2084. doi: 10.1681/ASN.2006111237
- Patel, T. B. (2004). Single Transmembrane Spanning Heterotrimeric G Protein-Coupled Receptors and Their Signaling Cascades. *Pharmacological Reviews*, *56*(3), 371-385. doi: 10.1124
- Peeters, M. C., van Westen, G. J., Li, Q., & AP, I. J. (2011). Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*, *32*(1), 35-42. doi: 10.1016/j.tips.2010.10.001
- Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., & Bouvier, M. (2003). Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J*, *22*(15), 3816-3824. doi: 10.1093/emboj/cdg383
- Petit, S. J., Chayen, N. E., & Pease, J. E. (2008). Site-directed mutagenesis of the chemokine receptor CXCR6 suggests a novel paradigm for interactions with the ligand CXCL16. *Eur J Immunol*, *38*(8), 2337-2350. doi: 10.1002/eji.200838269
- Qin, L., Kufareva, I., Holden, L. G., Wang, C., Zheng, Y., Zhao, C., . . . Handel, T. M. (2015). Structural biology. Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. *Science*, *347*(6226), 1117-1122. doi: 10.1126/science.1261064
- Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., . . . Mackay, C. R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*, *101*(4), 746-754. doi: 10.1172/JCI1422
- Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., . . . Lefkowitz, R. J. (2010). Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(2), 628-632. doi: 10.1073/pnas.0912852107
- Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., . . . Lefkowitz, R. J. (2010a). Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(2), 628-632. doi: 10.1073/pnas.0912852107
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., & Lefkowitz, R. J. (2010b). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov*, *9*(5), 373-386. doi: 10.1038/nrd3024

- Rajagopalan, L., & Rajarathnam, K. (2006). Structural basis of chemokine receptor function-- a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci Rep*, 26(5), 325-339. doi: 10.1007/s10540-006-9025-9
- Rana, S., & Baranski, T. J. (2010). Third extracellular loop (EC3)-N terminus interaction is important for seven-transmembrane domain receptor function: implications for an activation microswitch region. *J Biol Chem*, 285(41), 31472-31483. doi: 10.1074/jbc.M110.129213
- Rovira, X., Pin, J. P., & Giraldo, J. (2010). The asymmetric/symmetric activation of GPCR dimers as a possible mechanistic rationale for multiple signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci*, 31(1), 15-21. doi: 10.1016/j.tips.2009.10.008
- Schall, T. J., & Proudfoot, A. E. (2011). Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol*, 11(5), 355-363. doi: 10.1038/nri2972
- Schioth, H. B., & Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*, 142(1-2), 94-101. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.12.018
- Scholten, D. J., Canals, M., Maussang, D., Roumen, L., Smit, M. J., Wijtmans, M., . . . Leurs, R. (2012). Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *Br J Pharmacol*, 165(6), 1617-1643. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01551.x
- Scholten, D. J., Roumen, L., Wijtmans, M., Verkade-Vreeker, M. C., Custers, H., Lai, M., . . . Leurs, R. (2014). Identification of overlapping but differential binding sites for the high-affinity CXCR3 antagonists NBI-74330 and VUF11211. *Mol Pharmacol*, 85(1), 116-126. doi: 10.1124/mol.113.088633
- Schwartz, G. A., Henion, T. R., Nugent, J. D., Caplan, B., & Tobet, S. (2006). Stromal cell-derived factor-1 (chemokine C-X-C motif ligand 12) and chemokine C-X-C motif receptor 4 are required for migration of gonadotropin-releasing hormone neurons to the forebrain. *J Neurosci*, 26(25), 6834-6840. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1728-06.2006
- Schwartz, T. W., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M., & Elling, C. E. (2006). Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 481-519. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141218
- Shenoy, S. K. (2007). Seven-transmembrane receptors and ubiquitination. *Circ Res*, 100(8), 1142-1154. doi: 10.1161/01.RES.0000261939.88744.5a
- Shi, L., & Javitch, J. A. (2002). The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 437-467. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091101.144224
- Shimaoka, T., Nakayama, T., Hieshima, K., Kume, N., Fukumoto, N., Minami, M., . . . Yonehara, S. (2004). Chemokines generally exhibit scavenger receptor activity through their receptor-binding domain. *J Biol Chem*, 279(26), 26807-26810. doi: 10.1074/jbc.C400163200
- Shukla, A. K., Xiao, K., & Lefkowitz, R. J. (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci*, 36(9), 457-469. doi: 10.1016/j.tibs.2011.06.003
- Siciliano, S. J., Rollins, T. E., DeMartino, J., Konteatis, Z., Malkowitz, L., Van Riper, G., . . . Springer, M. S. (1994). Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding

- paradigm for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(4), 1214-1218.
- Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., . . . Mackay, F. (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(37), 14759-14764. doi: 10.1073/pnas.0702229104
- Singh, A. K., Arya, R. K., Trivedi, A. K., Sanyal, S., Baral, R., Dormond, O., . . . Datta, D. (2013). Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev*, 24(1), 41-49. doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.08.007
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., . . . Wang, J. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 29(4), 709-722. doi: 10.1007/s10555-010-9256-x
- Sun, Y. X., Wang, J., Shelburne, C. E., Lopatin, D. E., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., . . . Taichman, R. S. (2003). Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem*, 89(3), 462-473. doi: 10.1002/jcb.10522
- Szpakowska, M., Fievez, V., Arumugan, K., van Nuland, N., Schmit, J. C., & Chevigne, A. (2012). Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochem Pharmacol*, 84(10), 1366-1380. doi: 10.1016/j.bcp.2012.08.008
- Szpakowska, M., Perez Bercoff, D., & Chevigne, A. (2014). Closing the ring: a fourth extracellular loop in chemokine receptors. *Sci Signal*, 7(341), pe21. doi: 10.1126/scisignal.2005664
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., . . . Nagasawa, T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393(6685), 591-594. doi: 10.1038/31261
- Teicher, B. A., & Fricker, S. P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 16(11), 2927-2931. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2329
- Tian, S., Choi, W. T., Liu, D., Pesavento, J., Wang, Y., An, J., . . . Huang, Z. (2005). Distinct functional sites for human immunodeficiency virus type 1 and stromal cell-derived factor 1alpha on CXCR4 transmembrane helical domains. *J Virol*, 79(20), 12667-12673. doi: 10.1128/JVI.79.20.12667-12673.2005
- Tsubaki, T., Takegawa, S., Hanamoto, H., Arita, N., Kamogawa, J., Yamamoto, H., . . . Nose, M. (2005). Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 141(2), 363-371. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02850.x
- Ulvmar, M. H., Hub, E., & Rot, A. (2011). Atypical chemokine receptors. *Exp Cell Res*, 317(5), 556-568. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.01.012
- Vauquelin, G., & Bengt, v. M. (2008). *G protein-coupled receptors : Molecular pharmacology*. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Veldkamp, C. T., Seibert, C., Peterson, F. C., De la Cruz, N. B., Haugner, J. C., 3rd, Basnet, H., . . . Volkman, B. F. (2008). Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci Signal*, 1(37), ra4. doi: 10.1126/scisignal.1160755

- Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *494*(7436), 185-194. doi: 10.1038/nature11896
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., . . . Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, *291*(5507), 1304-1351. doi: 10.1126/science.1058040
- Watanabe, K., Penfold, M. E., Matsuda, A., Ohyanagi, N., Kaneko, K., Miyabe, Y., . . . Nanki, T. (2010). Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, *62*(11), 3211-3220. doi: 10.1002/art.27650
- Wells, T. N., Power, C. A., Lusti-Narasimhan, M., Hoogewerf, A. J., Cooke, R. M., Chung, C. W., . . . Proudfoot, A. E. (1996). Selectivity and antagonism of chemokine receptors. *J Leukoc Biol*, *59*(1), 53-60.
- Wolf, M., Albrecht, S., & Marki, C. (2008). Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions. *Int J Biochem Cell Biol*, *40*(6-7), 1185-1198. doi: 10.1016/j.biocel.2007.12.009
- Wu, B., Chien, E. Y., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., . . . Stevens, R. C. (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, *330*(6007), 1066-1071. doi: 10.1126/science.1194396
- Xanthou, G., Williams, T. J., & Pease, J. E. (2003). Molecular characterization of the chemokine receptor CXCR3: evidence for the involvement of distinct extracellular domains in a multi-step model of ligand binding and receptor activation. *Eur J Immunol*, *33*(10), 2927-2936. doi: 10.1002/eji.200324235
- Yates, J. L., Warren, N., & Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, *313*(6005), 812-815.
- Zhou, H., & Tai, H.-H. (2000). Expression and Functional Characterization of Mutant Human CXCR4 in Insect Cells: Role of Cysteiny and Negatively Charged Residues in Ligand Binding. *Arch Biochem Biophys*, *373*(1), 211-217. doi: 10.1006/abbi.1999.1555

# Annexe 1. Essais de marquage en surface, de liaison de la chimiokine SDF-1 et de recrutement de $\beta$ -arrestine en réponse à ITAC et SDF-1 des mutants de la région N-terminale de CXCR7.

Les concentrations effectrices 50 (CE50) d'ITAC pour le recrutement de la  $\beta$ -arrestine qui sont plus de cinq fois supérieures que celles du récepteur WT sont en rouge. NA : non applicable. ND : non déterminé.

Récepteur	Expression à la surface (% du WT $\pm$ SEM)	Recrutement $\beta$ -arrestine-2-Rluc CE50 (nM)		Recrutement $\beta$ -arrestine-2-Rluc BRETmax (BRET net $\pm$ SEM)		Déplacement d'[125I] SDF-1 CI50 (nM)	Binding maximum d'[125I] SDF-1 (% du WT)	
		SDF-1	ITAC	SDF-1	ITAC			
Récepteur sauvage	CXCR7 WT	100	19,2 $\pm$ 2,3	11,7 $\pm$ 2	0,0977 $\pm$ 0,002	0,0858 $\pm$ 0,002	5 $\pm$ 1,7	100
Résidus Acides	D2N	110 $\pm$ 14	14,5 $\pm$ 4,4	85,6 $\pm$ 14,8	0,0996 $\pm$ 0,002	0,0871 $\pm$ 0,002	6,1 $\pm$ 2,3	99 $\pm$ 4
	D7N	48 $\pm$ 10	24,7 $\pm$ 10,7	81,4 $\pm$ 20,7	0,1013 $\pm$ 0,002	0,0902 $\pm$ 0,002	3,4 $\pm$ 0,6	105 $\pm$ 7
	E10Q	83 $\pm$ 2	18,2 $\pm$ 4,9	94,5 $\pm$ 3,5	0,1051 $\pm$ 0,002	0,0948 $\pm$ 0,002	8,1 $\pm$ 3,7	125 $\pm$ 18
	D16N	95 $\pm$ 1	25,5 $\pm$ 3	138,8 $\pm$ 31,5	0,1016 $\pm$ 0,002	0,0909 $\pm$ 0,003	9 $\pm$ 6,8	103 $\pm$ 4
	D25N	82 $\pm$ 4	13,7 $\pm$ 1	26,4 $\pm$ 7,5	0,0833 $\pm$ 0,002	0,0688 $\pm$ 0,002	4,2 $\pm$ 0	87 $\pm$ 0
	D30N	90 $\pm$ 7	24,3 $\pm$ 8,9	69,8 $\pm$ 14,2	0,0879 $\pm$ 0,002	0,0789 $\pm$ 0,002	8,4 $\pm$ 5,4	95 $\pm$ 6
Tyrosines	Y8F	34 $\pm$ 9	15,9 $\pm$ 4,4	43,8 $\pm$ 12	0,0832 $\pm$ 0,002	0,0785 $\pm$ 0,003	4 $\pm$ 0,7	105 $\pm$ 8
	Y45F	83 $\pm$ 27	15,1 $\pm$ 1,8	18,7 $\pm$ 9,1	0,0908 $\pm$ 0,002	0,0790 $\pm$ 0,002	8,7 $\pm$ 0	128 $\pm$ 0
Sites de N-glycosylation potentiels	N13A	114 $\pm$ 19	26,1 $\pm$ 0	41 $\pm$ 0	0,0824 $\pm$ 0,002	0,0790 $\pm$ 0,003	ND	ND
	N39A	86 $\pm$ 7	12,6 $\pm$ 0	16,3 $\pm$ 0	0,1106 $\pm$ 0,002	0,0991 $\pm$ 0,002	ND	ND
	C21S	114 $\pm$ 9	16,3 $\pm$ 2,4	26,9 $\pm$ 10,9	0,0974 $\pm$ 0,001	0,0857 $\pm$ 0,001	ND	ND
Cystéines	C26S	75 $\pm$ 3	NA	NA	0,0571 $\pm$ 0,006	0,0481 $\pm$ 0,003	ND	ND
	C34S	84 $\pm$ 21	NA	NA	0,0387 $\pm$ 0,021	0,0380 $\pm$ 0,004	ND	ND

# Annexe 2. Marquage en surface des mutants de la région N-terminale de CXCR7.

