

Université de Montréal

ÉTUDE DES MÉCANISMES D'ACTION DU RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE
CXCR7/ACKR3

par
Stéphanie Gravel

Département de biochimie,
Centre de recherche, CHU Ste-Justine
Faculté de médecine, Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Ph.D en biochimie.

Janvier 2018

© Stéphanie Gravel, 2018

Résumé

Le récepteur de chimiokine CXCR7 découvert récemment a été identifié comme liant la chimiokine CXCL12, qui était, jusqu'à ce jour, considérée comme ligand exclusif du récepteur de chimiokine CXCR4 (Balabanian et al., 2005). Ces deux récepteurs se trouvent exprimés au sein des mêmes types cellulaires. Étant donné son rôle de corécepteur d'entrée du VIH ainsi que son rôle dans le cancer, CXCR4 a grandement suscité l'intérêt pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. L'AMD3100, un antagoniste de CXCR4 maintenant commercialisé pour la mobilisation des cellules souches dans la circulation sanguine a été identifié comme liant, lui aussi, le récepteur de chimiokine CXCR7 (Kalatskaya et al., 2009). D'ailleurs, l'AMD3100 agit plutôt comme agoniste sur CXCR7 en induisant le recrutement de la β -arrestine à ce dernier. Ainsi, ces constatations incitent à réévaluer la sélectivité de la molécule thérapeutique TC14012, développée pour cibler exclusivement le récepteur CXCR4 comme agent anti-VIH. En résumé, à l'aide de la technique de BRET, nos résultats montrent que le TC14012 est, lui aussi, en mesure de lier le récepteur de chimiokine CXCR7. Tout comme pour l'AMD3100, le TC14012 agit comme agoniste sur CXCR7. Contrairement à CXCR4, les deux molécules induisent le recrutement de la β -arrestine. Nous observons que c'est le réarrangement spatial du corps des récepteurs CXCR4 et CXCR7 qui est responsable des effets respectifs opposés.

Dans un deuxième temps, la liaison de différents ligands à un même récepteur peut activer de façon préférentielle une voie de signalisation intracellulaire au détriment d'une autre. Ce concept est défini comme étant la sélectivité fonctionnelle. En plus de la chimiokine CXCL12, CXCR7 possède un autre ligand naturel endogène soit la chimiokine CXCL11. Le fait que CXCR7 possèdent deux ligands naturels endogènes suggère que ceux-ci pourraient

induire des réponses intracellulaires différentes mettant de l'avant le concept de la sélectivité fonctionnelle. Il a été découvert que même s'il existe une ressemblance structurelle entre les chimiokines, elles peuvent avoir différents effets sur la signalisation intracellulaire. Cela peut, entre autre, se produire grâce des changements de conformation distincts au sein du récepteur (Zidar et al., 2009). Notamment, nous avons observé qu'il existe bien une différence au niveau du comportement qu'adopte le récepteur lorsqu'il est en complexe avec ses ligands endogènes naturels (CXCL11 ou CXCL12) et la β -arrestine. En mutant le motif E/DRYLAIV du récepteur CXCR7, nous avons identifié le résidu arginine (R) comme étant nécessaire pour l'interaction de la β -arrestine à CXCR7 suite à sa stimulation par CXCL11 et non par CXCL12. Contrairement à CXCL12, nous montrons qu'en présence de CXCL11, CXCR7 retarde voire annule son recyclage à la surface cellulaire. Ce retard ou cette absence de recyclage de CXCR7 de type sauvage en présence de CXCL11 est complètement abrogé lorsque le résidu arginine (R) du motif E/DRYLAIV du récepteur CXCR7 est substitué par un résidu alanine. Également, nous avons observé qu'en absence de la β -arrestine, la dégradation de la chimiokine CXCL11 était moins efficace. Ainsi, le transport intracellulaire de CXCR7 est dépendant de la β -arrestine et est ligand-dépendant.

Mots clés : Récepteur de chimiokine, CXCR7, CXCR4, CXCL12, CXCL11, β -arrestine, TC14012, AMD3100, trafficking intracellulaire, BRET

Abstract

The recently discovered chemokine receptor CXCR7 was found to bind CXCL12, a chemokine previously thought to be an exclusive ligand of the CXCR4 chemokine receptor (Balabanian et al., 2005). It appears that those two receptors are expressed in similar cell types. Considering its roles as a co-receptor for the cellular entry of HIV and also its potent roles in cancer, CXCR4 has now become an interesting target for the development of new therapeutic molecules. AMD3100, a CXCR4 antagonist now approved for hematopoietic stem cell mobilization, was also found to bind the CXCR7 chemokine receptor (Kalatskaya et al., 2009). In fact, AMD3100 acts as a CXCR7 agonist by inducing β -arrestin recruitment to the receptor. These new findings prompt investigators to reevaluate the selectivity of a therapeutic molecule developed to target exclusively the CXCR4 receptor, TC14012, as an anti-HIV drug. Using BRET technology, our results demonstrate that TC14012 is also capable of binding the CXCR7 chemokine receptor. As does AMD3100, TC14012 acts as an agonist on CXCR7. However, as opposed to CXCR4, the two molecules induce β -arrestin recruitment. We observe that it is the spatial rearrangement of the CXCR4 and CXCR7 bodies that is responsible for these opposite effects.

Functional selectivity is defined when different ligands bind a single receptor, and each ligand preferentially activates intracellular signaling pathways in favor of others. In addition to the CXCL12 chemokine, CXCR7 also has another natural ligand, the CXCL11 chemokine. The fact that CXCR7 has two endogenous ligands highlights the concept of functional selectivity. It was discovered that even if a structural resemblance exists between chemokines, they can have diverging roles on intracellular signaling. This is thought to be due, at least in part, to distinct conformational change in the receptor (Zidar et al., 2009). We observed that

there is indeed a difference in behavior in the receptor when it is complexed-bound to its endogenous ligands CXCL11 or CXCL12, and β -arrestine. Using directed mutagenesis of the E/DRY/LAIV motif of the CXCR7 receptor, we identified the arginine residue to be necessary for the CXCR7/ β -arrestin interaction, upon stimulation with CXCL11, but not CXCL12. As opposed to CXCL12, we show that upon CXCL11 stimulation, CXCR7 significantly delays surface recycling. Additionally, we observed that this delay is completely abrogated by the substitution of arginine residue (R) at position 3.50 within the highly conserve motif E/DRYLAIV of the receptor with an alanine (A) (CXCR7-R142A). Also, we observed that in absence of β -arrestin, the degradation of the CXCL11 chemokine was less efficient. Take together, we demonstrate that β -arrestin recruitment to CXCR7 and cell surface expression of CXCR7 is ligand specific. Arginine residue (R) at position 3.50 within the highly conserve motif E/DRYLAIV of the CXCR7 receptor is important for cell surface expression and β -arrestin recruitment in response to CXCL11. In summary, our study highlights the concept of functional selectivity between CXCR7 and its two ligands CXCL11 and CXCL12.

Key words: Chemokine receptor, CXCR7, CXCR4, CXCL12, CXCL11, β -arrestin, TC14012, AMD3100, intracellulaire trafficking, BRET

TABLES DES MATIÈRES

Résumé.....	II
Abstract.....	IV
Liste des figures.....	VIII
Liste des sigles et des abréviations.....	IX
Remerciements	XI
INTRODUCTION	12
1. 7TMRs.....	12
1.1 Classification des 7TMRs	13
1.2 Espace conformationnel et vision probabiliste des récepteurs	15
1.2.1 Sélectivité fonctionnelle.....	15
1.3 Motifs et résidus importants des récepteurs de la famille à la rhodopsine.....	19
1.3.1 Motif E/DRYLAIV	19
1.3.2 Motif N(L/F)YSS	22
1.4 Interaction ligands/récepteurs	24
1.4.1 Propriétés des ligands des 7TMRs	24
1.4.2 Paramètres pharmacologiques	27
1.5 Activation des 7TMRs.....	29
1.6 Protéine G hétérotrimérique.....	30
1.7 Désensibilisation et internalisation des 7TMRs.....	31
1.8 β -arrestine.....	32
1.8.1 Rôle de la β -arrestine	34
1.8.2 Trafficking d'internalisation de la β -arrestine et classification d'interaction.....	36
1.8.3 Mode d'interaction possible des β -arrestines avec 7TMR's.....	38
2. Les chimiokines et leurs récepteurs	40
2.1 Chimiokines	40
2.1.1 Rôles des chimiokines.....	40
2.1.2 Classification et nomenclature	41
2.1.3 Promiscuité des chimiokines envers leurs récepteurs.....	43
2.2 Récepteurs de chimiokines	44
2.2.1 Généralités.....	44
2.2.2 CXCR7/ACKR3.....	47
2.2.2.1 Historique	47
2.2.2.2 Expression cellulaire et tissulaire	48
2.2.2.3 Signalisation atypique	50
2.2.2.4 Rôle de CXCR7 dans le cancer.....	54
2.2.3 CXCR4.....	55
2.2.3.1 Historique	55
2.2.3.2 Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques et dissémination métastatiques	57
2.2.3.3 Signalisation de CXCR4.....	59
2.2.4 Impact de CXCR7 sur la signalisation de CXCR4.....	61
3. Ligands synthétiques	63
3.1 AMD3100/Mozobil/Plerixafor.....	63
3.2 TC14012	66
3.3 Molécules synthétiques ciblant CXCR7	68

OBJECTIFS DE LA THÈSE	70
RÉSULTATS	74
Article 1	75
THE PEPTIDOMIMETIC CXCR4 ANTAGONIST TC14012 RECRUITS β-ARRESTIN TO CXCR7 : ROLES OF RECEPTOR DOMAINS	75
Article 2	104
LIGAND SELECTIVE BETA-ARRESTIN RECRUITMENT AND INTRACELLULAR TRAFFICKING OF THE CHEMOKINE RECEPTOR ACKR3 / CXCR7.	104
DISCUSSION	133
PERSPECTIVES	173
CONCLUSION	178
RÉFÉRENCES	180

Liste des figures

- Figure 1** : Changement de conformation du cadenas ionique (TM3-TM6) du récepteur à la rhodopsine suite à son activation **p.22**
- Figure 2** : Présentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR4 **p.24**
- Figure 3** : Boucle d'activation des protéines G hétérotrimériques **p.30**
- Figure 4** : Spectre de la signalisation intracellulaire médié par la β -arrestine suite à son interaction avec les 7TMRs **p.35**
- Figure 5** : Classification d'interaction de la β -arrestine avec les 7TMRs **p.37**
- Figure 6** : Mécanisme d'activation structurel et différentiel de la β -arrestine **p.40**
- Figure 7** : Classification des chimiokines **p.43**
- Figure 8** : Représentation schématique de la molécule AMD3100 **p.65**
- Figure 9** : Séquence des résidus d'acides aminés du T140 et de son analogue, le TC14012 **p.67**

Liste des sigles et des abréviations

7TM	Sept domaines transmembranaires
A	Alanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPC	3,5-adénosine monophosphate cyclique
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
CAM	Mutant constitutivement actif
CSH	Cellule souche hématopoïétique
C-terminale	Carboxy-terminale
D	Acide aspartique
E	Acide glutaminique
ERK	Extracellular signal regulated kinase
G	Glycine
GAP	GTPase activating protein
GAPDH	glyceraldéhyde-3- phosphate
G-CSF	Granulocyte-colony stimulative factor
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GRK	G-protein couple receptor kinase
GSK	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine triphosphate
HEK293	Human embryonic kidney
ITAC	Interferon-inducible T cell α chemoattractant

K	Lysine
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEF	Mouse embryonic fibroblast
N	Asparagine
N-terminale	Amino-terminale
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-kinase
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis toxin
R	Arginine
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RGS	Regulators of G-protein signalling
Rluc	Renilla luciférase
S	Sérine
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
V2R	Récepteur V2 de la vasopressine
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
YFP	Yellow fluorescent protein

Remerciements

Premièrement, un merci tout spécial enfin à mon mari, Louis-André Julien qui a su m'encourager, m'écouter, me conseiller durant toutes ces années. Merci aussi à mon beau Thomas et ma belle Émilie, qui m'apporte énormément d'amour et de joie dans la vie de tous les jours.

J'aimerais remercier du fond du coeur mes parents et ma sœur. Ils m'ont toujours encouragé et supporté pour l'atteinte de la réussite. Merci pour tout l'aide que vous m'avez donné.

J'aimerais remercier mes collègues pour l'aide qu'ils m'ont apporté ainsi que leur support (Yamina Berchiche, Marie-Eve Pelletier, Geneviève St-Onge, Nassr Namar, François Guité-Vinet et Marilou Lefrançois).

Merci aux organismes subventionnaires qui m'ont accordée des bourses tout au long de mes études graduées.

Comment pourrai-je passer sous silence le fait que j'ai pu travailler avec deux personnes talentueuses comme Guillaume Sylvain-Drolet et Nicolas Montpas. Merci les gars, votre présence, votre écoute et nos discussions m'ont permis de toujours garder le cap.

Merci à Amélie Comtois, Valérie De Rop et Catherine Proulx sans qui je n'aurais pas pu évoluer d'une telle façon. Merci d'avoir partagé avec moi ce périple qu'a été mes études graduées.

Merci à mon directeur de recherche, Dr Nikolaus Heveker de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir dirigé cette recherche.

INTRODUCTION

1. 7TMRs

Les récepteurs à sept passages transmembranaires (7TMR) représentent la plus grande classe de protéines exprimées à la surface cellulaire au niveau de la membrane plasmique. Cette super famille est la cible directe ou indirecte de près de la moitié des médicaments actuellement prescrits bien qu'elle ne représente que 3% à 4% du génome humain. Les 7TMRs sont impliqués dans diverses pathologies tel que des cancers épithéliaux, maladies auto-immunes ainsi que des maladies inflammatoires. Ces protéines sont donc des cibles pharmacologiques importantes (Murphy et al., 2000).

Ces récepteurs, bien qu'ils soient différents au niveau de leurs fonctions au sein du corps, partagent quelques éléments structuraux. Notamment, les 7TMRs sont composés de sept passages transmembranaires de type hélice alpha constitués de 25 à 35 acides aminés hautement hydrophobes. Ces passages transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles hydrophiles intracellulaires et extracellulaires respectivement identifiées comme i_1 , i_2 , i_3 et e_1 , e_2 , e_3 (Gether, 2000). En plus, les 7TMRs possèdent une partie N-terminale et une partie C-terminale plus ou moins longues. La partie N-terminale et les trois boucles extracellulaires sont situées à l'interface du milieu extracellulaire. En revanche, la partie C-terminale ainsi que les trois boucles intracellulaires sont situés du côté intracellulaire et sont essentiels à l'interaction des partenaires de signalisation intracellulaires tels que les protéines G hétérotrimériques, les GRK (*G protein-coupled receptor kinases*), les β -arrestines, etc...

L'acronyme GPCR (*G-protein coupled receptor*) bien qu'il soit utilisé pour décrire les 7TMRs ne s'avère pas toujours approprié pour décrire tous ces récepteurs. De manière

classique, les GPCRs médient l'activation de sa signalisation intracellulaire en se couplant avec des protéines G hétérotrimériques. Toutefois, des études récentes ont clairement démontrées que ces récepteurs sont capables d'induire une signalisation intracellulaire qui se fait indépendamment des protéines G hétérotrimériques. En effet, les récepteurs de chimiokine CXCR7, D6 et DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokine*) ont des signalisations indépendantes des protéines G hétérotrimériques d'où l'utilisation de l'acronyme 7TMR est plus approprié (Balabanian et al., 2005; Fra et al., 2003; Hansell et al., 2011).

1.1 Classification des 7TMRs

Les 7TMRs ont antérieurement été classés en trois groupes selon leur similarité de séquence (Vassilatis et al., 2003). En effet, la classe A rassemble les récepteurs s'apparentant à la rhodopsine; la classe B regroupe les récepteurs s'apparentant aux récepteurs de glucagon et de la calcitonine et la classe C ceux s'apparentant aux récepteurs métabotropiques et glutamiques. Un nouveau système de classification nommé **GRAFS** soit **g**lutamate, **r**hodopsine, **a**dhésion, **f**rizzled/taste2 et **s**écrétine a permis de regrouper cette grande famille en cinq classes (Schiöth and Fredriksson, 2005). Cette nouvelle classification est basée sur une étude phylogénétique du génome humain (Fredriksson et al., 2003).

Famille des récepteurs glutamate

Cette famille représente l'ancienne classe C des 7TMRs. Elle regroupe les huit récepteurs métabotropiques humains, les deux récepteurs GABA (*gamma aminobutyrique acid*) soit les variants GABA-BA et GABA-BB et non GABA-A, le récepteur sensible au

calcium (CASR) ainsi le récepteur du goût de type 1 (TAS1). Ces récepteurs partagent tous un domaine contenant le site de liaison du ligand au niveau de leur longue extrémité N-terminale (Pin et al., 2007).

Famille des récepteurs à la rhodopsine

Les récepteurs de cette famille partagent tous une séquence d'acides aminés spécifique située en bordure du troisième passage transmembranaire et de la deuxième boucle intracellulaire soit le motif E/DRYLAIV hautement conservé. L'impact de ce motif au sein des récepteurs de cette grande famille sera abordé en profondeur plus loin. Également, ces récepteurs s'apparentant à la rhodopsine ont un motif NSxxNPxxY situé au niveau du septième passage transmembranaire. Les récepteurs appartenant à cette classe présentent une partie N-terminale extracellulaire courte. Contrairement aux récepteurs appartenant aux autres familles, le ligand interagirait et lierait le récepteur au niveau de la cavité située au centre des domaines transmembranaires plutôt qu'avec la partie N-terminale de celui-ci. En plus de rassembler les récepteurs de la rhodopsine, cette famille regroupe aussi les récepteurs adrénergiques, aux opioïdes ainsi que les récepteurs des chimiokines dont cette thèse en est le sujet principal (Schiöth and Fredriksson, 2005).

Famille des récepteurs d'adhésion

Cette famille de récepteur regroupe des récepteurs ayant une longue partie N-terminale. Cette partie N-terminale est constituée d'acides aminés riches en sérines et thréonines et représente donc des sites de modification post-traductionnelle pour la O et N-glycosylation. Ces récepteurs possèdent également un domaine protéolytique situé au niveau de leur partie N-terminale importante pour l'interaction avec des protéines

d'adhésion telles les intégrines, les sélectines et les cadhérines (Schiöth and Fredriksson, 2005).

Famille des récepteurs frizzled/taste2

Les récepteurs de type frizzled sont impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la polarité cellulaire. Cette classe de récepteurs se caractérise pour leur longue partie N-terminale comptant environ 200 acides aminés dont des résidus cystéines hautement conservés sont impliqués dans la liaison de leur ligand, Wnt. Les récepteurs de goût de type 2 se retrouvent exprimés au niveau des cellules de la langue et des cellules épithéliales du palais. Ces récepteurs sont responsables de la sensation de goût amer. Ces deux types de récepteurs partagent trois séquences consensus au niveau de leur deuxième, cinquième et septième passage transmembranaire soit respectivement IFL, SFLL et SxKTL (Schiöth and Fredriksson, 2005).

Famille des récepteurs à la sécrétine

Cette famille rassemble entre autres les récepteurs de glucagon et de la calcitonine. Elle se distingue de la famille des récepteurs d'adhésion de par sa partie N-terminale comptant 60-80 acides aminés riches en cystéines formant des ponts disulfures conservés. Cette partie joue un rôle important dans la liaison de leur ligand principalement de type peptidique (Schiöth and Fredriksson, 2005).

1.2 Espace conformationnel et vision probabiliste des récepteurs

1.2.1 Sélectivité fonctionnelle

Des modèles pharmacologiques ont été suggérés dans la littérature afin de tenter d'expliquer l'effet de différents ligands sur un même 7TMR. Le premier modèle proposé

dans la littérature est celui du complexe ternaire où le récepteur fonctionne comme un interrupteur de type marche-arrêt. Le récepteur peut adopter seulement deux conformations : une conformation active ou une conformation inactive. Ce modèle suggère que les protéines G hétérotrimériques et les effecteurs intracellulaires sont des entités qui diffusent librement dans le cytosol tout près de la membrane plasmique. Dans ce modèle l'activation de la protéine G hétérotrimérique ainsi que les effecteurs dépendent, à prime abord, de la liaison du ligand au récepteur. Dans ce cas, seul le complexe ligand/récepteur entre en contact avec la protéine G ou les effecteurs (Kenakin, 1996; Samama et al., 1993). Bien vite, le modèle du complexe ternaire s'est vu modifié par la communauté scientifique pour, entre autres, expliquer l'activité constitutive des récepteurs, l'effet des agonistes inverses sur les récepteurs ou voir même pour expliquer la formation du complexe récepteur/protéine G en absence de ligand. Tous ces modèles restent simplistes et tentent d'identifier la relation entre le ligand, le récepteur et la protéine G (Galandrin et al., 2007).

Les récepteurs couplés aux protéines G étaient connus pour interagir uniquement avec les protéines G hétérotrimériques, comme le nom le suggère. Cependant, au courant des deux dernières décennies, les RCPGs ont été renommés 7TMRs puisque des observations faites en laboratoire ont démontrées que les 7TMRs peuvent induire l'activation d'une signalisation intracellulaire, et ce, indépendamment des protéines G hétérotrimériques telle que l'activation ERK1/2 via le recrutement de la β -arrestine au récepteur (Balabanian et al., 2005; DeFea et al., 2000; Gravel et al., 2010; Kalatskaya et al., 2009; Luttrell et al., 1999; Zhai, 2005). Maintenant, il est reconnu que plus d'un ligand peut lier un même récepteur. La liaison de ses ligands à un même récepteur active

de façon préférentielle une voie de signalisation intracellulaire plutôt qu'une autre. Ce mode de fonctionnement de la part des ligands peut être défini par un concept qui porte plusieurs noms soit la sélectivité fonctionnelle, agonisme dirigé (biased agonism), l'efficacité dirigée par le ligand (ligand-biased efficacy), etc (Allen et al., 2007; Kenakin, 2009). Or, la vision probabiliste des récepteurs suggère que le récepteur occupe un espace ou un paysage énergétique pouvant contenir une infinité de conformations du dit récepteur (Kenakin, 2009).

D'un point de vue théorique, un ligand permet d'induire une conformation unique au sein du récepteur qui lui est spécifique. Pour être identifié comme un agoniste biaisé, l'agoniste ou le ligand à l'étude doit toujours être mis en relation avec un agoniste de référence voire des ligands endogènes. Même les ligands endogènes peuvent démontrer une activation « préférentielle » de cascades de signalisation intracellulaire ce qui est décrit comme de la sélectivité fonctionnelle proprement dite. La sélectivité fonctionnelle est un phénomène documenté dans le cas de ligands naturels entres autres au sein des récepteurs de chimiokine appartenant à la grande famille des 7TMRs (Kohout et al., 2004; Zidar et al., 2009). À titre d'exemple, le récepteur de chimiokine CCR7 possède deux ligands naturels soient les chimiokines CCL19 et CCL21 ayant une structure et une affinité de liaison similaire. En 2004, Kohout et al. ont observé que CCL19 induit une augmentation robuste de la phosphorylation par ERK1/2 (4 fois plus) comparativement à CCL12 pour le récepteur CCR7 (Kohout et al., 2004). Également, ils ont déterminé que le mécanisme par lequel CCL19 engendre la phosphorylation de ERK1/2 est β -arrestine dépendant. En 2009 un groupe de recherche a montré que ces deux ligands endogènes se lient à CCR7, activent différentes GRKs ce qui mène au recrutement de la β -arrestine et

à une internalisation du récepteur spécifique au ligand appliqué (Zidar et al., 2009). En effet, lorsque CCR7 est activé par CCL21, l'internalisation du récepteur se fait indépendamment de la β -arrestine. En revanche, seule la chimiokine CCL19 induit la redistribution de la β -arrestine au niveau des vésicules d'endocytose ainsi que la désensibilisation du récepteur. De plus, Zidar et al. ont montré qu'en réponse aux deux chimiokines, il y a un recrutement et une activation différentielle des GRKs. En présence de CCL19, le récepteur CCR7 se voit phosphorylé par la GRK3 et la GRK6 tandis qu'en présence de CCL21 seule GRK6 est responsable de la phosphorylation du récepteur (Zidar et al., 2009). Ainsi, dépendamment de la nature du ligand endogène, l'activation d'une voie de signalisation spécifique via le récepteur est favorisée au détriment d'une autre voie.

La sélectivité fonctionnelle est un concept qui fut étudié et démontré dans le cas de ligands naturels endogènes tout comme pour des ligands synthétiques. En effet, dans cette thèse, nous caractériserons la sélectivité fonctionnelle du récepteur CXCR7, dans un premier temps, en présence de ligands synthétiques soit TC14012 et AMD3100 et dans un deuxième temps, en présence de ses deux ligands naturels endogènes CXCL11 et CXCL12. La littérature rapporte que même les ligands endogènes favorisent préférentiellement l'activation d'une voie signalétique plutôt qu'une autre via un même récepteur (Berchiche et al., 2011; Kohout et al., 2004; Ogilvie et al., 2001; Palczewski et al., 2000; Zidar et al., 2009). Cela confirme qu'il y a absence de redondances entre les ligands liant le même récepteur. Dans ces cas-là, les termes comme la sélectivité fonctionnelle, signalisation dirigée (biased signaling) ou trafic dirigé (stimulus trafficking) sont plus adéquats que le terme agonisme dirigé (biased agonism). Ainsi, un

ligand peut être hautement efficace au niveau de l'activation préférentielle d'une voie de signalisation spécifique par l'entremise d'un récepteur. Ainsi, pour que la sélectivité fonctionnelle ait lieu dans un tel système, la stœchiométrie et/ou la disponibilité des effecteurs intracellulaires jouent un rôle essentiel (Lefkowitz, 2007a; Rovati et al., 2007). À titre d'exemple, si en réponse à un ligand, un récepteur induit davantage le recrutement de la β -arrestine plutôt que l'activation de la protéine G, seule la disponibilité de la β -arrestine du côté cytosolique prédira l'activation préférentielle (Busillo et al., 2010). Ainsi, dépendamment de la disponibilité et de la quantité des molécules de signalisation intracellulaire présentes, le degré d'activation préférentiel variera et le phénomène de sélectivité fonctionnelle sera, alors, système dépendant.

1.3 Motifs et résidus importants des récepteurs de la famille à la rhodopsine

1.3.1 Motif E/DRYLAIV

Les récepteurs appartenant à la famille s'apparentant à la rhodopsine comme par exemple, les récepteurs de chimiokines possèdent tous une séquence en acide aminé spécifique soit le motif E/DRY. Le motif E/DRYLAIV se trouve à l'interface de la deuxième boucle intracellulaire et du troisième domaine transmembranaire. Plus précisément, cette séquence en acide aminé occupe les positions 3,49 à 3,51 selon la nomenclature établie par Ballesteros et Weinstein (Ballesteros and Weinstein, 1995). Le motif E/DRYLAIV a pour fonction d'assurer la stabilité du récepteur en le maintenant dans sa conformation basale (Rovati et al., 2007). Ce motif est donc, par le fait même, impliqué dans la transition conformationnelle du récepteur lors de son activation (Neubig et al., 2003). La cristallisation du récepteur à la rhodopsine a montré que l'arginine de ce

motif, située en position 3.5, forme un double pont salin avec l'acide glutamique situé en position 6.30 soit à l'extrémité du sixième domaine transmembranaire (Palczewski et al., 2000). Ce pont salin est dénommé « cadenas ionique » et serait responsable du maintien de la conformation inactive du récepteur en lui procurant une stabilité. Ainsi, l'activation du récepteur suite à la liaison d'un agoniste, occasionne la rupture de ce cadenas ionique et engendre un réarrangement conformationnel au sein du récepteur (voir figure 1) (Ballesteros and Palczewski, 2001; Palczewski et al., 2000).

Rovati et al. suggèrent de classifier les récepteurs appartenant à la famille s'apparentant à la rhodopsine en deux sous-groupes dépendamment de l'activité du motif E/DRYLAIV et indépendamment du type de la protéine G hétérotrimérique couplant le récepteur (Rovati et al., 2007). Le premier groupe porte un phénotype de type CAM, « *constitutive active mutants* ». Dans ce premier groupe, la mutation du résidu acide glutamique ou acide aspartique (E/D) en position 3,49 engendre des mutants, qui en absence de ligands, possèdent des activités basales comme c'est le cas pour le récepteur de la rhodopsine. Toujours dans ce même groupe, la mutation du résidu arginine en position 3,50 n'affecterait pas l'affinité de liaison de l'agoniste et le couplage de la protéine G hétérotrimérique au récepteur. Ainsi, le rôle du motif E/DRYLAIV pour ce premier groupe serait de maintenir la conformation du récepteur dans un état inactif (voir figure 2) (Wilbanks et al., 2002).

Pour d'autres récepteurs, tels que le récepteur de chimiokine CCR5, les récepteurs muscarinique M1 et M5, la mutation du résidu E/D 3.49 donne lieu à des « *constitutive inactive mutant* » (CIM) et constitue le deuxième phénotype. La mutation du résidu arginine en position 3.50, comme par exemple au sein du récepteur de la vasopressine

donne lieu à un récepteur constitutivement désensibilisé. Il y a donc perte d'interaction de la protéine G hétérotrimérique avec le récepteur. Cette perte de fonction serait caractérisée par une diminution de l'expression du récepteur à la membrane plasmique. Cette désensibilisation constitutive du récepteur pourrait représenter un mécanisme général expliquant la résistance hormonale (Greasley et al., 2002). De plus, des mutations naturelles du résidu arginine ont été identifiées comme jouant un rôle dans diverses pathologies telles que le diabète insipide et l'hypogonadisme.

Le résidu tyrosine représente le résidu le moins bien conservé au sein de ce motif pour les 7TMRs. La tyrosine peut être souvent remplacée par un résidu cystéine, histidine ou sérine. La mutation de ce résidu en position 3,51 n'affecte pas ou très peu l'activation de la signalisation intracellulaire du récepteur.

De plus, Greasley et al. ont démontré que la substitution d'un résidu de ce motif altère l'expression du récepteur alpha (1b)-adrénergique à la membrane plasmique (Greasley et al., 2002). Les auteurs suggèrent que cette perte d'expression peut être expliquée soit par une augmentation du taux d'internalisation du récepteur ou soit par un mauvais acheminement de ce dernier à la membrane plasmique.

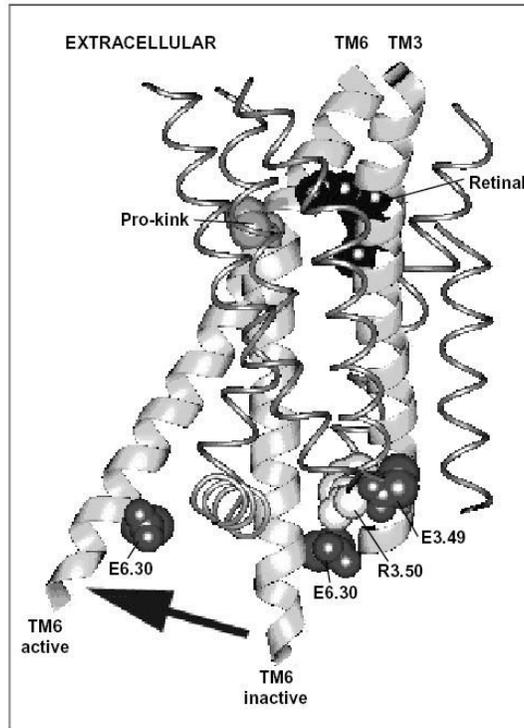


Figure 1: Changement de conformation du cadenas ionique (TM3-TM6) du récepteur à la rhodopsine suite à son activation. La conformation inactive du récepteur présente une conformation fermée où l'arginine du TM3 (R3.50) interagit avec l'acide glutamique du TM6 (E6.30). La conformation active brise cette interaction et le TM6 adoptera une conformation ouverte (Ballesteros and Palczewski, 2001).

1.3.2 Motif N(L/F)YSS

Le motif N(L/F)YSS est hautement conservé au niveau du troisième domaine transmembranaire des récepteurs de chimiokines de type CXC dont cette thèse en fait un sujet principal. Plus précisément, le résidu asparagine en position 3.35 joue un rôle critique dans le maintien de l'équilibre conformationnel dynamique régulant l'interaction de la sous-unité G α i aux récepteurs de chimiokine de type CXC. Ainsi, Zhang et al. ont démontré que des mutations au niveau de l'asparagine en position 3.35 au sein du récepteur de chimiokine CXCR4 altèrent directement le mécanisme d'activation de signalisation intracellulaire de ce récepteur (voir figure 2) (Zhang et al., 2002). En effet,

la substitution de l'asparagine en position 3.35 par un résidu sérine ou alanine au sein du récepteur CXCR4 donne lieu à des récepteurs mutants de type CAM. En revanche, la substitution de l'asparagine par un résidu lysine entraîne une conformation au sein du récepteur CXCR4 qui est constitutivement inactif (CIM) (Zhang et al., 2002). Les auteurs proposent que suite à la liaison du ligand au récepteur, il y aurait un réarrangement conformationnel au sein de ce dernier de sorte que les domaines hydrophobes et cytoplasmiques adopteraient une orientation favorisant la formation d'un complexe de haute affinité avec la sous-unité α_i de la protéine G hétérotrimérique (Christopoulos et al., 2014).

En résumé, le motif/DRYLAIV ainsi que le motif N(L/F)YSS ont tous les deux été démontrés dans la littérature pour être directement impliqués au niveau du maintien de la conformation de base du récepteur et/ou lors des réarrangements de conformation menant à l'activation du récepteur, soit l'activation de la protéine G hétérotrimérique via les différentes sous-unités α .

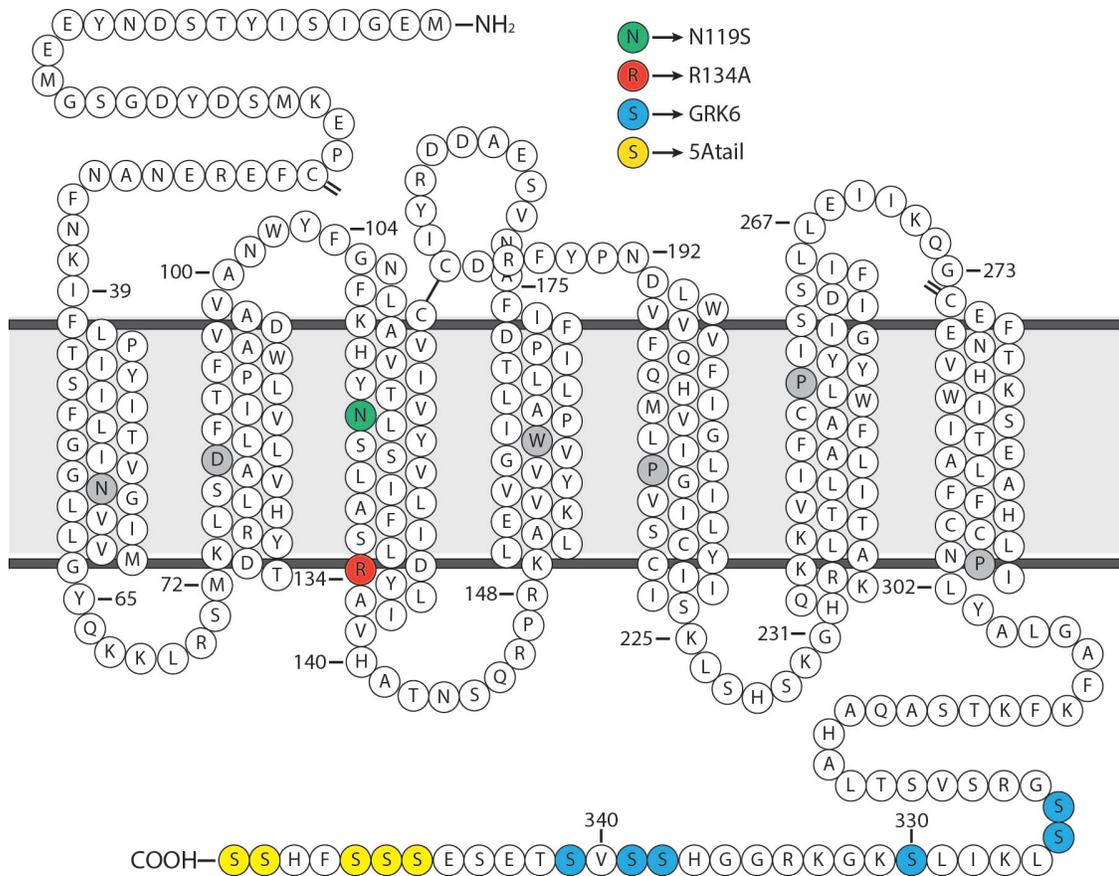


Figure 2: Représentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR4. Les acides aminés mutés sont désignés en vert et en rouge. ©Julien Bonnetterre

1.4 Interaction ligands/récepteurs

1.4.1 Propriétés des ligands des 7TMRs

Étant donné l'implication des 7TMRs au sein de plusieurs pathologies, ces protéines sont des cibles pharmacologiques importantes dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Le développement de composés thérapeutiques qui ont pour effet d'empêcher la signalisation d'un agoniste orthostérique endogène représente une approche logique dans la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. Un agoniste orthostérique est un ligand du récepteur d'intérêt qui se lie et reconnaît le site orthostérique du récepteur soit le site sur lequel le ligand endogène du

récepteur se lie (Neubig et al., 2003). Un agoniste altère l'état basal du récepteur sur lequel il se lie. À cet effet, l'agoniste engendre une activité ou une signalisation intracellulaire à travers le récepteur dans le but d'induire une réponse biologique (Neubig et al., 2003). À l'opposé, un antagoniste intervient dans l'interaction ligand/récepteur et annule ou réduit l'effet de l'agoniste. En effet, l'antagoniste bloque l'activation du récepteur d'intérêt et maintient ce dernier dans son état inactif (Christopoulos et al., 2014).

Cependant, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés dans la recherche et le développement de composés pharmacologiques dont leurs effets sont médiés par un site topographiquement différent de celui du ligand endogène, soit un site allostérique (Christopoulos et al., 2014). Les composantes structurales qui gouvernent l'interaction des ligands allostériques sont différentes de ceux qui déterminent le mode de liaison du ligand orthostérique au sein du récepteur d'intérêt. Par ailleurs, un modulateur allostérique correspond à un ligand qui a pour effet de modifier l'action d'un agoniste orthostérique, un ligand endogène ou voire même un antagoniste, et ce, en interagissant à un site allostérique au sein du récepteur d'intérêt. Il peut y avoir deux types de modulateurs allostériques; positifs (positive allosteric modulator, PAM) ou négatifs (negative allosteric modulator, NAM). Le PAM a pour effet d'augmenter l'affinité et/ou l'efficacité du ligand orthostérique contrairement à un NAM qui lui aura pour effet de diminuer l'affinité et/ou l'efficacité du ligand orthostérique (Kenakin, 2009). Ainsi, le développement de nouveaux modulateurs allostériques comme agents thérapeutiques pourrait permettre de cibler la fonction responsable de la pathologie plutôt que la signalisation physiologique normale du récepteur (Christopoulos et al., 2014; Kenakin,

2009). Toutefois, un modulateur allostérique peut également induire une réponse à lui seul et est décrit comme un modulateur ago-allostérique (Schwartz and Holst, 2006). En plus, d'induire une réponse à lui seul, un ago-allostérique peut agir comme super-agoniste et augmenter l'affinité et/ ou potentialiser la réponse du ligand orthostérique au récepteur d'intérêt.

Par ailleurs, les ligands allostériques offrent un meilleur potentiel au niveau de la sélectivité fonctionnelle puisqu'ils se lient à un site allostérique dont la séquence en acides aminés est bien différente de celle du site orthostérique. De plus, la signalisation des 7TMRs est reconnue pour être modulée par des mécanismes allostériques. Notamment, le récepteur est à la fois capable d'interagir avec un ligand au niveau de sa surface extracellulaire et, à la fois, avec un effecteur intracellulaire tels que la protéine G hétérotrimérique ou la β -arrestine. Par exemple, au même titre que la protéine G hétérotrimérique, la β -arrestine peut agir comme modulateur allostérique du récepteur et a pour fonction de modifier l'action du ligand orthostérique soit en augmentant ou diminuant l'affinité ou l'efficacité de celui-ci selon le récepteur d'intérêt. Étant donné qu'ils sont eux-mêmes régulés par des mécanismes allostériques, les 7TMRs sont des cibles de choix dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques (Kalatskaya et al., 2009).

AMD3100 dont il sera question un peu plus loin est une molécule synthétisée et commercialisée sous l'appellation de mozobil/plerixafor. AMD3100 cible le récepteur de chimiokine CXCR4 et a été défini comme modulateur allostérique négatif sur ce même récepteur (Allaway et al., 1998; De Clercq, 2009). En effet, il a pour effet d'inhiber les réponses intracellulaires médiées par CXCL12, le ligand endogène, sur le récepteur

CXCR4. Toutefois, Kalatskaya et al. montrent que l'AMD3100 agit comme modulateur allostérique positif sur le récepteur de chimiokine CXCR7 (Kalatskaya et al., 2009). CXCR7 se trouve à être le seul autre récepteur à avoir la chimiokine CXCL12 comme ligand orthostérique endogène. Ainsi, l'AMD3100 augmente l'affinité de CXCL12 pour son récepteur CXCR7 et potentialise le recrutement de la β -arrestine à celui-ci (Kalatskaya et al., 2009).

1.4.2 Paramètres pharmacologiques

Afin de bien caractériser un ligand ou une molécule thérapeutique nouvellement synthétisée envers sa cible d'intérêt, dans ce cas-ci un récepteur, des paramètres pharmacologiques ont été établis et sont nécessaires. Seront introduits ici-bas les termes de l'affinité, efficacité et puissance. Ces trois paramètres pharmacologiques définissent la réponse d'un récepteur face un à ligand. Tout d'abord, l'affinité est déterminée comme la force d'interaction d'un ligand à s'associer à un récepteur et à y rester (STEPHENSON, 1956). L'affinité est une mesure qui a pour but de quantifier cette force d'interaction entre deux partenaires d'interaction par le biais d'une constante d'affinité. La constante d'affinité représente une constante d'équilibre entre l'association et la dissociation des deux partenaires d'interaction. Les forces d'interaction qui régissent l'affinité du ligand pour son récepteur sont de types ponts hydrogène et Van der Waals. Toutes ces forces font en sorte que le ligand occupe une place spécifique et unique au sein de la pochette de liaison du récepteur. En revanche, le ligand n'est pas statique et possède des cycles d'association et de dissociation du récepteur et ce, dépendamment, de l'énergie du système. C'est durant ces cycles d'association et de dissociation que deux ligands

pourront être en compétition entre eux pour le site de liaison au sein du même récepteur (Kenakin, 2009). L'affinité est un paramètre qui se mesure, généralement par des études de radio-liaison. Ces études consistent à évaluer la capacité d'un ligand non-marqué à déplacer le radio-ligand lié au récepteur. La valeur correspondante à l'affinité qui est calculée grâce à ce type d'essai traduit la concentration requise de ligand non-marqué pour inhiber 50% des sites de liaisons occupés par le ligand radio-marqué. L'affinité correspond donc à une valeur unique d'un ligand pour son récepteur d'intérêt.

L'efficacité caractérise l'effet maximal de la réponse engendrer par un ligand à son récepteur décrit comme Emax (ARIENS, 1954). Dans un système expérimental, cette propriété traduit l'activité directe du ligand à induire un changement de conformation au sein du récepteur et à engendrer une réponse intracellulaire. Pour évaluer l'efficacité, des courbes doses-réponses montrent l'effet de la concentration croissante d'un ligand sur la réponse biologique à l'étude. Le graphique de cette courbe est d'allure sigmoïdale et présente la réponse en fonction de la concentration du ligand. Sur le graphique, l'efficacité est représentée par l'amplitude de la réponse (Kalatskaya et al., 2009; Kenakin, 2009).

La puissance correspond à la concentration nécessaire pour atteindre 50% de la réponse maximale du système expérimental à l'étude. Cette propriété pharmacologique traduit la force du ligand à induire un changement de comportement au sein de son récepteur afin de soit inhiber ou activer une réponse intracellulaire spécifique. La puissance est représentée dans la littérature par l'EC50 (Lefkowitz, 2007a).

1.5 Activation des 7TMRs

Afin d'induire un signal spécifique, les 7TMRs suivent un cycle d'activation/inactivation illustré à la figure 3. L'activation des 7TMRs implique d'abord et avant tout la liaison du ligand au niveau de la surface extracellulaire. Cette liaison provoque un changement de conformation au sein du récepteur qui sera ressenti jusqu'à son interface intracellulaire. Cette nouvelle conformation du complexe ligand/récepteur induit le recrutement de la protéine G hétérotrimérique spécifique à ce dernier. Le récepteur maintenant activé mène au relâchement du GDP qui sera remplacé par le GTP au niveau de la sous-unité $G\alpha$. La liaison du GTP à la sous-unité α induit un changement de conformation au sein de l'hétérotrimère ce qui occasionnera la dissociation de la protéine G hétérotrimérique en deux sous-unités soit la sous-unité α et le dimère β/γ . Ces deux sous-unités sont, à leur tour, capable d'activer des cascades de signalisation qui leur est bien distincte telles que la mobilisation de calcium (dimère β/γ) et la production d'AMPC via l'activation de l'adénylate cyclase (sous-unité α). Pour regagner un niveau basal, le GTP de la sous-unité α s'hydrolyse en GDP par l'entremise de protéines G régulatrices de la signalisation (RGS, *regulator of g protein signaling*) (Offermanns, 2003; Shenoy and Lefkowitz, 2003a).

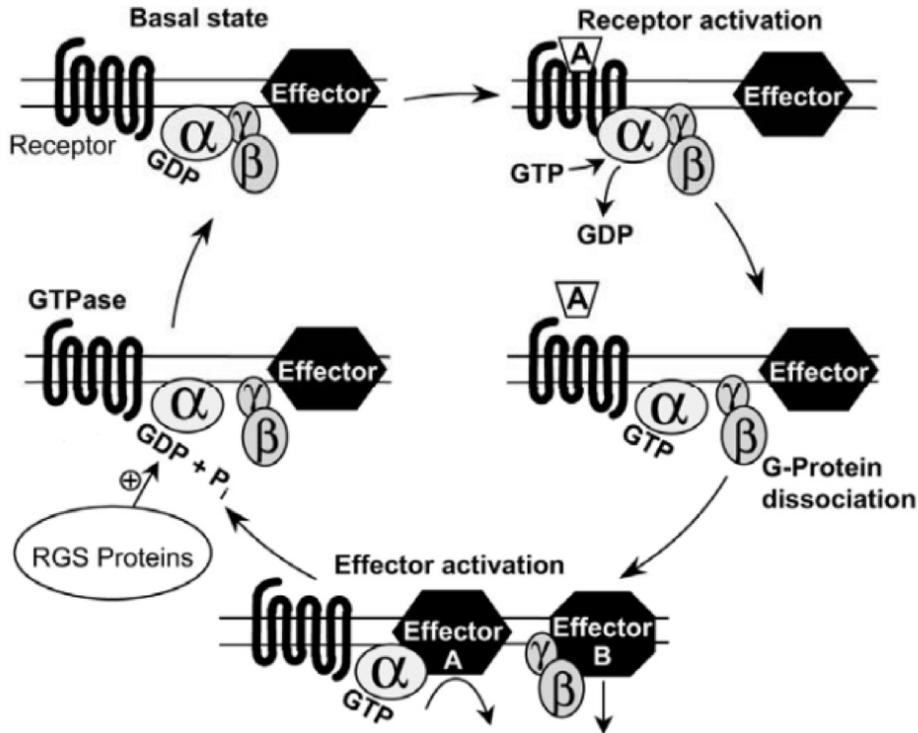


Figure 3: Boucle d'activation des protéines G hétérotrimériques. La lettre A représente un agoniste (Offermanns, 2003)

1.6 Protéine G hétérotrimérique

Dans le génome humain, 16 gènes encodent 21 sous-unités $G\alpha$, 6 gènes encodent 5 sous-unités $G\beta$ et 12 gènes encodent 12 sous-unités $G\gamma$. Les protéines G hétérotrimériques sont divisées en quatre groupes dépendamment du degré d'homologie de la séquence de la sous-unité $G\alpha$: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12/13}$. La structure cristallographique de la sous-unité α_{i1} révèle la présence d'un domaine GTPase hautement conservé à travers cette famille ainsi qu'un domaine en forme d'hélice (Lambright et al., 1996). La plupart des sous-unités β peut interagir avec les sous-unités γ pour former des hétérodimères, mais ce n'est pas toutes les 60 possibilités qui existent. De plus, les hétérodimères β/γ peuvent interagir avec différents isoformes de la sous-

unité $G\alpha$. Cette diversité d'hétérotrimère suggère une grande variété au niveau de leur expression et de leur localisation intracellulaire qui ont un impact direct sur leur rôle dans l'activation de la signalisation (Milligan and Kostenis, 2006).

Dans la littérature, il est également suggéré que le récepteur serait plutôt déjà en complexe avec la protéine G hétérotrimérique, et ce, avant la liaison du ligand. Dans ce contexte, la liaison du ligand à ce complexe préformé de récepteur/protéine G hétérotrimérique engendrerait plutôt un réarrangement spatial (Audet et al., 2006; Thomsen et al., 2016). Plus récemment, des chercheurs ont montré que la sous unité $G\alpha_s$ de la protéine G hétérotrimérique et la β -arrestine préforment un méga-complexe. La formation d'un tel méga-complexe pourrait expliquer la signalisation soutenue des protéines G médiée par des 7TMRs se trouvant complètement à l'intérieure de la cellule (Thomsen et al., 2016).

1.7 Désensibilisation et internalisation des 7TMRs

Par la suite, le complexe activé est rapidement ciblé par des protéines G kinase (GRK) qui ont pour rôle de phosphoryler le récepteur au niveau des résidus sérine et thréonine situés au sein de la troisième boucle intracellulaire et/ou au sein de la partie C-terminale (Reiter and Lefkowitz, 2006). Ces phosphorylations augmentent l'affinité de la β -arrestine pour le récepteur et engendre son recrutement à celui-ci du côté cytosolique. Le recrutement de la β -arrestine occasionne un encombrement stérique et empêche alors l'interaction à la protéine G hétérotrimérique au récepteur. L'interaction de la β -arrestine avec le récepteur entraîne l'internalisation de celui-ci via des puits tapissés de clathrines (Oakley et al., 1999).

La β -arrestine est une protéine d'échafaudage et sert d'adapteur entre le récepteur et les partenaires nécessaires à l'internalisation entre autres, les clathrines et la protéine AP-2 (Laporte et al., 1999; Oakley et al., 1999). Étant donné l'importance de la β -arrestine dans mon projet de thèse, elle sera spécifiquement discutée un peu plus bas. Dépendamment du type d'interaction de la β -arrestine avec le récepteur, le récepteur peut emprunter deux voies d'endocytose (Oakley et al., 2000). La première, la β -arrestine se dissocie rapidement du récepteur, le ligand est alors dégradé puisqu'il se retrouve dans un milieu acidifié soit à l'intérieur de l'endosome. Le récepteur est recyclé à la surface cellulaire. La deuxième voie de transit intracellulaire implique soit la dégradation du récepteur ou soit un lent recyclage à la surface cellulaire (De Lean et al., 1980; Kenakin, 1996).

1.8 β -arrestine

La β -arrestine a été premièrement décrite pour sa capacité à arrêter la signalisation des protéines G hétérotrimériques médiée par l'activation des 7TMRs d'où la provenance de l'étymologie de son nom (Lohse et al., 1990). La β -arrestine est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme et il en existe 4 isoformes. Plus précisément les isoformes 1 et 2, communément appelé arrestine-2 et arrestine-3 respectivement, sont exprimés de façon ubiquitaire et partagent 78% d'homologie de séquence. Ces deux isoformes possèdent également 50% d'homologie de séquence entre les vertébrés et les invertébrés. Les deux autres isoformes correspondant à l'arrestine-1 et à l'arrestine 4 sont exprimés au niveau des neurones photorécepteurs de la rétine des yeux (Craft et al., 1994). La β -arrestine nécessite des modifications post-traductionnelles afin d'assurer sa signalisation

et son trafficking. La β -arrestine est phosphorylée de manière constitutive et doit subir une déphosphorylation au niveau de sa partie C-terminale afin d'être ciblée par les clathrines pour donner lieu à l'internalisation du récepteur d'intérêt. Les sites de phosphorylation sont spécifiques pour chacun des isoformes. Notamment, les sites de phosphorylation pour la β -arrestine2 correspondent à la sérine et à la thréonine se trouvant, respectivement en position 361 et 383 de la β -arrestine2 (Lin et al., 2002). En plus de la phosphorylation, la β -arrestine peut également être ubiquitinée. Cette modification post-traductionnelle au sein de la β -arrestine est nécessaire pour l'internalisation et détermine le sort du complexe récepteur/arrestine (Shenoy and Lefkowitz, 2005b). Notamment, différents patrons d'ubiquitination, spécifiquement sur les lysines en position 11 et 12 de la β -arrestine entraînent un changement de trafficking du récepteur, et par le fait même, régule l'habilité du complexe récepteur/arrestine à signaler au sein de l'endosome. Par exemple, la β -arrestine pré-associée à Mdm2, une E3 ubiquitine ligase engendre l'ubiquitination du récepteur et, par la suite, se dissocient (Shenoy and Lefkowitz, 2003b). Ainsi, cette modification post-traductionnelle donne lieu à un complexe récepteur/arrestine plus stable. Dans ce cas-ci, cette stabilité du complexe est requise et nécessaire pour l'internalisation du récepteur (Girnita et al., 2005). La β -arrestine de mammifère a été observé pour être phosphorylée de manière constitutive dans le cytosol. La β -arrestine serait donc déphosphorylée aussitôt qu'elle interagirait avec un 7TMR, ce qui en provoquerait son internalisation (Marchese et al., 2008). Également, la S-nitrosylation ainsi que la SUMOylation ont été rapportées dans la littérature comme autres modifications post-traductionnelles ayant un impact sur les

fonctions intracellulaires médiées par la β -arrestine (Ozawa et al., 2008; Wyatt et al., 2011).

1.8.1 Rôle de la β -arrestine

Le rôle classique et bien connue de la β -arrestine consiste à désensibiliser les 7TMRs de leur signalisation via les protéines G hétérotrimériques. Cet effet fut démontré pour la première fois par le récepteur β -adrénergique dans le milieu des années 1990 (Lohse et al., 1990). Dans la littérature, il est suggéré que la β -arrestine induit le découplage de la protéine G hétérotrimérique avec son récepteur par encombrement stérique. En effet, la β -arrestine interagit avec la deuxième et troisième boucle intracellulaire du 7TMRs. Ainsi, le recrutement de la β -arrestine au sein du récepteur entraîne donc l'inhibition de seconds messagers (Shenoy and Lefkowitz, 2003b).

Toutefois, pour que le recrutement de la β -arrestine aie lieu, le récepteur doit être phosphorylé du côté cytoplasmique. Cette phosphorylation est médiée par les GRK et peut se faire soit au niveau de la partie C-terminale du récepteur (ex. récepteur à la rhodopsine et récepteur β 2-adrénergique) ou au niveau de la troisième boucle intracellulaire (par exemple, récepteur α 2-adrénergique et récepteur muscarinique M2) (Nobles et al., 2011; Palczewski et al., 2000; Reiter and Lefkowitz, 2006; Valentin-Hansen et al., 2012). Il existe 7 isoformes de GRK, les isoformes 2,3,5 et 6 sont exprimés de façon ubiquitaire tandis que l'isoforme de type 4 se retrouve exprimé au niveau du système reproducteur. Cette phosphorylation des 7TMRs via les GRK est essentielle pour le recrutement de la β -arrestine, la désensibilisation du récepteur et son internalisation. Anciennement, le recrutement de la β -arrestine au 7TMRs était décrit comme donnant

lieu à une désensibilisation du récepteur suivi de son internalisation médiée par un puits tapissé de clathrines. Par la suite, le récepteur pourrait se voir recycler vers la membrane plasmique ou dégrader via le lysosome (Shenoy and Lefkowitz, 2005a).

En revanche, des études récentes montrent que la β -arrestine en complexe avec le récepteur peut réguler diverses fonctions cellulaires, et ce, indépendamment des protéines G hétérotrimériques. En effet, la β -arrestine peut ainsi moduler la signalisation via les MAPK, la voie AKT, les PI3 kinases, l'internalisation du récepteur, le cheminement intracellulaire du récepteur appelé trafficking, etc (voir figure 4) (Rajagopal et al., 2010; Shenoy and Lefkowitz, 2005a; Smith and Rajagopal, 2016). Notamment, la plupart de ces voies de signalisation ont été décrites comme étant fortement activées lors de la tumorigénèse ce qui entraîne une hausse de la prolifération cellulaire.

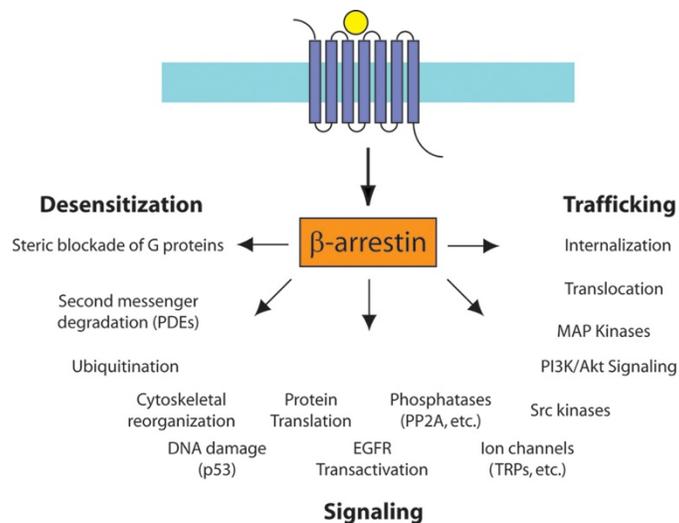


Figure 4 : Spectre de la signalisation intracellulaire médié par la β -arrestine suite à son interaction avec les 7TMRs (Shenoy and Lefkowitz, 2005b).

1.8.2 Trafficking d'internalisation de la β -arrestine et classification

d'interaction

Lorsque la β -arrestine interagit avec le récepteur, il y a formation d'un complexe récepteur/arrestine. Ce complexe sera ciblé par un puit tapissé de clathrines et donnera lieu à son internalisation au sein du cytoplasme (Oakley et al., 1999). À ce moment, la β -arrestine peut emprunter deux voies soit, elle reste en complexe avec le récepteur et se déplace à l'intérieur de la cellule de cette manière ou soit l'arrestine se dissocie du récepteur aussitôt internalisé. Ces modes d'interaction de la β -arrestine avec le récepteur ont été utilisées comme caractéristique permettant de les classer (voir figure 5) (Oakley et al., 2000). La classe A (par exemple le récepteur β 2-adrénérique) résulte en des récepteurs formant un complexe transitoire avec la β -arrestine. Aussitôt que la β -arrestine cible le récepteur activé, il forme un complexe avec ce dernier et procède à son internalisation. Cependant, la β -arrestine se dissocie du récepteur à même le puit tapissé de clathrines et seul le récepteur procède à son internalisation. Cette dissociation hâtive permet soit un recyclage rapide du récepteur vers la membrane plasmique soit la dégradation du récepteur via des lysosomes. Dans ce contexte, la β -arrestine subirait une dé-ubiquitination suite à l'internalisation du complexe ce qui semblerait nécessaire à la dissociation rapide du complexe (DeWire et al. 2007; Kendall and Luttrell 2009). D'autre part, la classe B correspond à la formation d'un complexe récepteur/ β -arrestine beaucoup plus stable comme c'est le cas pour le récepteur à la vasopressine, V2R (Oakley et al., 1999). Ce complexe est généralement retenu pour une plus longue période de temps à l'intérieur de la cellule. Ainsi, il peut donc médier à l'activation d'effecteurs intracellulaires telle l'activation de la voie MAPKinase via les endosomes et avoir une

signalisation soutenue. Les récepteurs d'interaction appartenant à cette classe possèdent une série de résidus sérine et thréonine conservés au niveau de leur partie C-terminal leur conférant une association de plus grande affinité avec l'arrestine, rendant ainsi le complexe récepteur/arrestine plus stable (Reiter and Lefkowitz, 2006). Comparativement à la classe A, les récepteurs montrent une longue et forte interaction avec la β -arrestine ce qui donne lieu soit à un recyclage beaucoup plus lent du récepteur vers la membrane plasmique ou soit à une dégradation tardive via les lysosomes. Contrairement à la classe A, il a été observé que les récepteurs d'interaction appartenant à la classe B ne subiraient pas de dé-ubiquitination ce qui aurait un impact direct sur la stabilité du complexe récepteur/arrestine (Shenoy and Lefkowitz, 2003b).

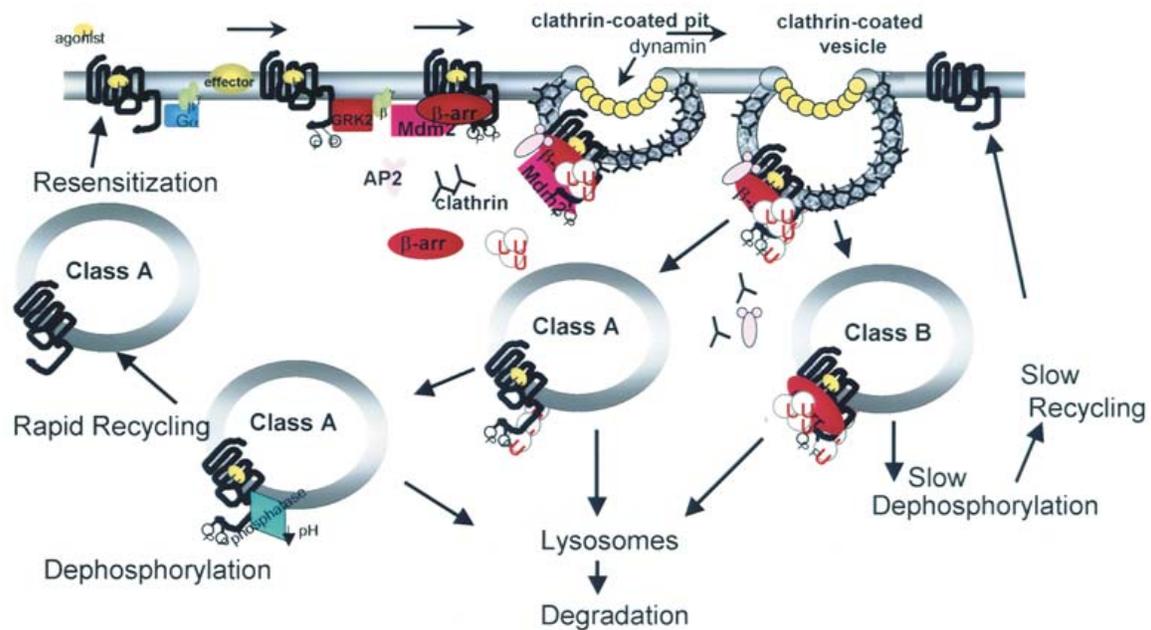


Figure 5: Classification d'interaction de la β -arrestine avec les 7TMRs. Le transport intracellulaire des 7TMRs dépend de leur type d'interaction avec la β -arrestine soit la classe A ou B (Shenoy and Lefkowitz, 2003a).

1.8.3 Mode d'interaction possible des β -arrestines avec 7TMR's

Plusieurs études suggèrent que la β -arrestine peut adopter plus d'une conformation (Charest et al., 2005; Lee et al., 2016; Nobles et al., 2011; Shukla et al., 2014). Chacune de ces conformations adoptées par la β -arrestine régule diverses voies de signalisation intracellulaires telles que citées plus haut. Les modes d'interactions des différents ligands avec le complexe récepteur/arrestine ainsi que les modifications post-traductionnelles au sein du récepteur et de l'arrestine dictent la conformation qu'adoptera la β -arrestine. Ces différents mécanismes de recrutement de la β -arrestine résultent en une signature signalétique du complexe récepteur/arrestine spécifique à ce complexe. L'interaction de la β -arrestine avec différentes partie C-terminale au sein de divers récepteurs se trouvant phosphorylés par différentes kinases dictent l'activation de diverses voies de signalisation intrinsèques comme par exemple, l'endocytose, la désensibilisation ou l'activation de seconds messages tels les MAPK. Par exemple, la phosphorylation sur différents résidus sérines au niveau de la partie C-terminale du récepteur de chimiokine CXCR4 (appartenant à la famille des 7TMRs) par soit GRK2, GRK3 et GRK6 ont différents effets sur la production de calcium et sur l'activation de ERK1/2. Notamment, suite à la stimulation du récepteur CXCR4 par son ligand naturel, CXCL12, ce dernier peut être phosphorylé par la GRK2 et GRK6, provoquant le recrutement de la β -arrestine 2 et inhibant la production de calcium médiée par l'arrêt de signalisation de la sous-unité $G\alpha_i$. De plus, le récepteur peut également être phosphorylé par la GRK3 et GRK6 donnant lieu au recrutement de la β -arrestine 1 et l'activation de ERK1/2, et ce, indépendamment de la signalisation via la protéine G hétérotrimérique (Busillo et al., 2010). Ainsi, l'information contenue dans la partie C-terminale du

récepteur est suffisant pour déterminer la classe d'interaction du récepteur avec la β -arrestine.

Toutefois, plusieurs autres résidus et motif au sein des récepteurs 7TMRs ont été observés pour être important pour la stabilité de l'interaction et l'activité de la β -arrestine avec le récepteur. En effet, plusieurs études suggèrent que les modalités de recrutement et d'interaction de la β -arrestine au récepteur seraient détectées par deux senseurs (voir figure 6). Le premier senseur est la phosphorylation qui a lieu au sein de la partie C-terminale (partie polaire) du récepteur. Le deuxième senseur est le senseur d'activation, c'est-à-dire, l'interaction de la β -arrestine avec la conformation active du récepteur. Ainsi, la nature de la conformation du cadenas ionique est responsable du maintien de la conformation inactive du récepteur. Plus spécifiquement, le résidu arginine appartenant au motif E/DRYLAIV hautement conservé à travers les 7TMRs forme un double pont salin avec un résidu chargé négativement tel l'acide glutamique au niveau du sixième domaine transmembranaire. Ainsi, une conformation active du récepteur suite à la stimulation par un agoniste se verra en conformation ouverte et résultera à un bris du cadenas ionique. La cristallisation du récepteur à la rhodopsine ainsi que celle du récepteur β 2-adrénergique montre que la β -arrestine interagit avec ces résidus (Palczewski et al., 2000; Rosenbaum et al., 2007). Ainsi, une fois la β -arrestine liée à la partie C-terminale du récepteur, il y aura compétition de cette dernière avec la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique pour le site de liaison (l'ouverture suite au bris du cadenas ionique) (Marion et al., 2006). Il est donc suggéré que ce serait de cette façon que la β -arrestine inhibe de façon stérique le couplage de la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique et, par le fait même, désensibilise le récepteur (Smith and Rajagopal, 2016).

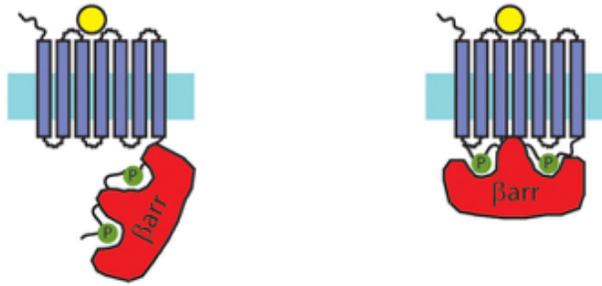


Figure 6 : Mécanisme d'activation structurel et différentiel de la β -arrestine.

À gauche, la β -arrestine interagit seulement avec la partie C-terminale qui est phosphorylée (senseur de phosphorylation). À droite, la β -arrestine, en plus d'interagir avec la partie C-terminale phosphorylée du récepteur, est en complexe avec les domaines transmembranaires du récepteur (senseur d'activation + senseur de phosphorylation) (Smith and Rajagopal, 2016).

2. Les chimiokines et leurs récepteurs

2.1 Chimiokines

2.1.1 Rôles des chimiokines

Les chimiokines sont des protéines basiques de petites tailles possédant de 60 à 130 acides aminés. Elles font partie de la grande famille des cytokines (Murphy et al., 2000). Suite à leur traduction, les chimiokines sont sécrétées par la cellule par sécrétion autocrine (Allen et al., 2007). Dans les années 80, les chimiokines ont été rapidement associées à la réponse immunitaire. Ce sont des cytokines chimiotactiques principalement décrites dans la littérature pour leur rôle dans l'inflammation notamment au niveau de la migration cellulaire des leucocytes et de la communication entre les cellules du système immunitaire. Un biais dans le fonctionnement des chimiokines comme par exemple des mutations ou une perte de fonction est à l'origine de plusieurs pathologies telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde et le VIH (Hernandez et al., 2003; Proudfoot and Ugucioni, 2016). Les chimiokines sont les ligands naturels des récepteurs de

chimiokines et ces derniers appartiennent à la des 7TMRs s'apparentant au récepteur à la rhodopsine. Les deux premiers agents thérapeutiques ciblant les récepteurs de chimiokines approuvés et commercialisés par la FDA (U.S. Food and Drug Administration) sont le maraviroc, ciblant le récepteur de chimiokine CCR5 aussi connue comme le co-récepteur d'entrée du VIH et le mozobil/plerixafor ciblant le récepteur de chimiokine CXCR4 lors de la mobilisation des cellules souches associé à une transplantation dans le cas d'un cancer par exemple (Proudfoot and Power, 2010). Les chimiokines jouent un rôle déterminant dans la migration orientée des cellules du système immunitaire définit comme la chimiotaxie. Toutefois, elles ne sont pas exclusives au système immunitaire et peuvent être, entre autre, impliquées au sein du système nerveux central plus spécifiquement durant le développement du cerveau (Schwiebert, 2005).

2.1.2 Classification et nomenclature

Jusqu'à présent, plusieurs structures de chimiokines ont été résolues par les méthodes de cristallographie par rayons-X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces structures révèlent qu'elles possèdent un domaine N-terminal de 6 à 10 acides aminés désorganisé qui consiste en un domaine clé pour leur activité suivie de trois feuillets β antiparallèles et d'une hélice C-terminale (Allen et al., 2007). Les chimiokines sont divisées en quatre sous-groupes dépendamment du nombre et d'espaces entre les résidus cystéines hautement conservés en position N-terminale. Effectivement, les chimiokines contiennent des résidus cystéines conservées au sein des deux premières boucles extracellulaires. Ces résidus cystéines s'associent ensemble afin de former des ponts disulfures (maximum de trois) entre ces boucles. Leur appellation se base sur la

présence de ces résidus dans la chaîne peptidique (Lefkowitz, 2007a). Ainsi, les chimiokines sont réparties dans les sous-groupes CX3C, CXC, CC et C où la lettre C désigne le résidu cystéine et X, un acide aminé quelconque (voir figure 7). Les chimiokines de type CXC et CC possèdent quatre résidus conservés, contrairement à ceux de type C qui n'en possèdent que deux. La plupart des chimiokines ciblant les neutrophiles appartiennent au sous-groupe CXC tandis que celles ciblant les monocytes ou les macrophages appartiennent au sous-groupe CC (Bachelier et al., 2014). La lymphotactine humaine α et β ainsi que la fractalkine sont les seules chimiokines de types C et CX3C respectivement. Ainsi, la plupart des chimiokines que l'on retrouve sont soit de type CXC ou CC (Murphy et al., 2000).

Toutefois, les chimiokines peuvent aussi être regroupées selon des critères fonctionnels. Notamment, certaines chimiokines sont décrites comme étant pro-inflammatoires et sont sécrétées par des leucocytes en circulation. L'expression de ces chimiokines peut être constitutive et/ou induite et associée à la réponse inflammatoire. Dans un tel contexte, l'expression des chimiokines peuvent être induites par des facteurs de nécrose tumorale, l'interferon- γ , des produits microbiens ou un traumatisme. Ces chimiokines occupent des rôles autant au niveau de l'immunité innée qu'adaptative en réponse à une infection, un dommage tissulaire, ou tout autre désordres physiologiques. L'expression accrue de ces chimiokines pro-inflammatoires sont généralement transitoires et reviennent à un niveau basal lorsque la situation est rectifiée (Bachelier et al., 2014). Le deuxième groupe rassemble des chimiokines ayant des rôles d'homéostasies, en absence de pathologie. Ces chimiokines sont généralement impliquées dans le développement ainsi que la domiciliation des cellules souches. En quelque sorte,

ces chimiokines coordonnent le niveau basal de migration cellulaire nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire. Toutefois, dépendamment du contexte, une chimiokine peut appartenir aux deux groupes comme c'est le cas pour la chimiokine CXCL12 et CXCL13 (Proudfoot and Power, 2010).

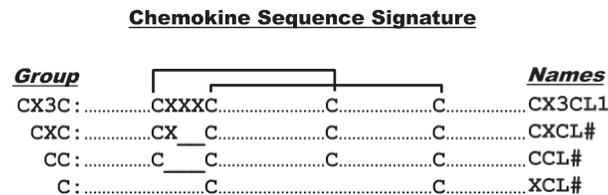


Figure 7: Classification des chimiokines. Les chimiokines sont classées parmi quatre sous-groupes : CX3C, CXC, CC et C où la lettre C désigne le résidu cystéine et X, un acide aminé quelconque. Les chimiokines de type CX3C, CXC et CC possèdent quatre résidus conservés, contrairement à ceux de type C qui n'en possèdent que deux (Bachelerie et al., 2014).

2.1.3 Promiscuité des chimiokines envers leurs récepteurs

Jusqu'à présent dans la littérature, environ 50 chimiokines/ligands ont été recensées pour approximativement 20 récepteurs de chimiokines. Étant donné, le nombre élevé de chimiokines comparativement au nombre de récepteurs, plus d'une chimiokine peut lier plus d'un récepteur et l'inverse est aussi possible. Ce concept est décrit dans la littérature comme le concept de promiscuité entre les chimiokines (Murphy et al., 2000). Les chimiokines et leurs récepteurs sont exprimés différemment par tous les leucocytes ainsi que par plusieurs cellules non-hématopoïétiques. Une distribution spécifique d'un sous-ensemble de leucocytes propre à chaque tissu sous condition d'homéostasie ou de pathologie dicte le résultat de la réponse cellulaire associé aux chimiokines (Proudfoot and Ugucioni, 2016). De plus, les chimiokines liant un même récepteur peuvent agir soit comme agoniste, agoniste partiel ou soit comme antagoniste. Ainsi, la liaison de

différentes chimiokines à un même récepteur peut entraîner l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire d'où le concept de sélectivité fonctionnelle comme par exemple, CCR2 et ses ligands, CCR7 et ses ligands, CCR5 et ses ligands etc... (Berchiche et al., 2011; Kohout et al., 2004; Ogilvie et al., 2001; Zidar et al., 2009).

2.2 Récepteurs de chimiokines

2.2.1 Généralités

Les récepteurs de chimiokines sont des 7TMRs appartenant à la famille des récepteurs s'apparentant à la rhodopsine. Ces récepteurs se trouvent différemment exprimés par tous les leucocytes et par plusieurs cellules non-hématopoïétiques incluant les cellules cancéreuses. Les récepteurs de chimiokines peuvent être divisés en deux groupes. Le premier groupe est défini par les récepteurs de chimiokine signalisant via les protéines $G\alpha_i$, inhibitrices de l'adénylate cyclase et sensibles à la PTX (pertussis toxin) (Proudfoot and Ugucioni, 2016). En effet, l'activation de la sous-unité α_i inhibe l'adénylate cyclase ce qui engendre une diminution de la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). Le deuxième groupe rassemble les récepteurs de chimiokines dits atypiques. Ces récepteurs de chimiokines, bien qu'ils soient capables de lier les chimiokines, n'induisent pas l'activation de la $G\alpha_i$ et leur signalisation serait plutôt β -arrestine dépendante. Anciennement étiqueté comme récepteurs « decoy » ou comme « scavenger », le terme maintenant accepté par le comité de l'union internationale de pharmacologie est récepteur de chimiokine atypique. Le principal rôle de ces récepteurs atypiques est, entre autres de maintenir le gradient de chimiokine pour assurer la directionnalité de la migration cellulaire. Pour ce faire, les récepteurs de chimiokines

atypiques interagissent avec la β -arrestine et signalisent via cette dernière plutôt qu'avec les protéines G hétérotrimériques. Cette interaction est essentielle pour l'internalisation rapide des récepteurs et, de ce fait, les récepteurs entraîneront avec eux les dépôts extracellulaires de chimiokines distinctes dans le but de les éliminer. De cette façon, le front de migration sera maintenu ce qui assurera la directionnalité de la migration cellulaire (Proudfoot and Ugucioni, 2016).

La séquence du motif E/DRYLAIV située à la fin du troisième domaine transmembranaire constitue une composante structurale qui distingue ces deux groupes. En effet, les récepteurs de chimiokine dits atypiques ont une séquence altérée au niveau de ce motif. Par exemple, le récepteur de chimiokine CXCR7 nouvellement défini comme ACKR3 possède une séquence DRYLSIT (Thelen and Thelen, 2008). Il a été suggéré que la divergence au sein de la séquence du motif E/DRYLAIV soit la cause des particularités des récepteurs de chimiokines atypiques (Yoshida et al. 1998; Chandrasekar et al. 2004). Aussi, le récepteur D6 maintenant ACKR2 possède une séquence altérée de ce motif soit DKYLEIV au sein de son troisième domaine transmembranaire (Comerford et al., 2007). De plus, le récepteur ACKR2 interagit constitutivement avec la β -arrestine et cette interaction lui est essentielle pour son internalisation rapide (Galliera et al., 2004). Toutefois, l'ensemble de la famille des récepteurs de chimiokines partagent plusieurs caractéristiques structurales telles que leur taille (environ 350 résidus d'acides aminés), une partie C-terminale contenant des résidus sérine et thréonine, importants pour la régulation post-traductionnelle de ces récepteurs et un court domaine N-terminal déterminant la spécificité de liaison des ligands (Lefkowitz, 2007a).

Jusqu'à ce jour, 19 récepteurs de chimiokines protéines G dépendants ont été identifiés soient 7 CXCR's (CXCR1-6 et CXCR8), 10 CCR's (CCR1-10), 1 CX3CR3 et 1 CXCR1. Les récepteurs de chimiokines couplant les protéines G hétérotrimériques sont nommés selon le type de chimiokine qu'ils lient et selon la position des résidus cystéines conservés au sein de leur partie N-terminale. Tel qu'énuméré ci-haut, les 4 types possibles sont les suivants : CXCR, CCR, CX3CR et CXR où la lettre R, C et X désignent respectivement récepteur, chimiokine et acide aminé quelconque.

De plus, 4 récepteurs de chimiokines atypiques (ACKR1-4) ont été reconnus pour induire leur signalisation via la β -arrestine ce qui a pour effet de séquestrer et de dégrader les chimiokines présentes dans le microenvironnement (Proudfoot and Ugucioni, 2016).

Jusqu'à ce jour dans la littérature seulement deux structures des récepteurs de chimiokines ont été publiées. La structure du récepteur de chimiokine CXCR4 fut la première à être révélée par Wu et al. en 2010 suivi de celle du récepteur de chimiokine CXCR1 par Park et al. en 2012 (Park et al., 2012; Wu et al., 2010). La structure du récepteur de chimiokine CXCR4 révèle qu'il y aurait deux sites de liaison pour le ligand. Notamment, le corps de la chimiokine lie la partie N-terminale du récepteur soit le premier site de liaison. Par la suite, c'est la partie N-terminale de la chimiokine qui interagirait avec des résidus acides au niveau de la cavité des domaines transmembranaires du récepteur (tel que l'acide aspartique en position 187) et cette interaction serait responsable de la signalisation du complexe. Or, il est de plus en plus évident, dans la littérature que ces deux sites de liaison ne sont pas indépendants un par rapport à l'autre (Kleist et al., 2016). Dans l'article de Wu et al., les auteurs ont choisi le peptide cyclique CVX15 afin de mimer la liaison du ligand naturel du récepteur CXCR4

soit la chimiokine CXCL12 (Wu et al., 2010). Ainsi, dans cette étude, le peptide CVX15 bloquerait complètement le site orthostérique de liaison de CXCL12 et il y aurait donc une compétition pour le site de liaison. Toutefois, une étude montre qu'AMD3100, un antagoniste de CXCR4 peut déplacer la partie N-terminale de la chimiokine CXCL12 de la pochette de liaison au sein du récepteur CXCR4 sans pour autant déloger le corps de la chimiokine qui est liée au sein de la partie N-terminale du récepteur (Kofuku et al., 2009).

2.2.2 CXCR7/ACKR3

2.2.2.1 Historique

Anciennement, le récepteur de chimiokine CXCR7 portait le nom RDC1 puisque le gène codant pour ce récepteur fut, à l'origine, cloné à l'aide d'une banque d'ADN complémentaire de thyroïde de chien (*Receptor Dog cDNA1*) (Libert et al., 1989). Le récepteur de chimiokine CXCR7 a été récemment renommé comme récepteur de chimiokine atypique 3, ACKR3. Ce récepteur possède deux ligands endogènes naturels soient les chimiokines CXCL12 (SDF-1 pour *stromal cell-derived factor 1* et CXCL11 (ITAC, *interferon-inducible T-cells alpha chemoattractant*) (Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006; Zabel et al., 2009). La chimiokine CXCL12 lie aussi le récepteur de chimiokine CXCR4 (Zou et al., 1998). Ce récepteur ne possède aucun autre ligand naturel endogène et lie exclusivement la chimiokine CXCL12. Une des fonctions immunorégulatrices clés du récepteur de chimiokine CXCR7 est d'assurer la formation et le maintien du gradient de CXCL12 lors du passage des cellules exprimant le récepteur de chimiokine CXCR4 à leur surface dans le but qu'il y ait une migration orientée des

cellules (Boldajipour et al., 2008). Afin d'assurer cette fonction biologique, CXCR7 possède une plus grande affinité (10 fois plus élevée) pour CXCL12 que CXCR4 pour CXCL12 (Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006). La chimiokine CXCL11 est un ligand non sélectif pour CXCR7 puisqu'il lie également le récepteur de chimiokine CXCR3 (Groom and Luster, 2011). En plus de lier CXCL11, CXCR3 possède trois autres ligands naturels endogènes soient les chimiokines CXCL4, CXCL9 et CXCL10. Ce récepteur est lié à l'inflammation et est rapidement exprimé à la surface des cellules T suite à leur activation (Groom and Luster, 2011). C'est grâce à des fortes affinités pour CXCL11 et CXCL12 que CXCR7 a été caractérisé comme récepteur de chimiokine (Thelen and Thelen, 2008). Le récepteur de chimiokine CXCR7 est caractérisé comme un récepteur atypique, puisque contrairement à la majorité des récepteurs de chimiokine, il ne mène pas à la migration orientée des cellules et ne fait donc pas de chimiotaxie (Boldajipour et al., 2008; Burns et al., 2006; Hartmann et al., 2008). De plus, son activation ne mène pas au recrutement et à la signalisation intracellulaire des protéines G hétérotrimériques. CXCR7 exercerait ses fonctions via la β -arrestine (Levoye et al., 2009).

2.2.2.2 Expression cellulaire et tissulaire

CXCR7 est exprimé de manière ubiquitaire au sein des tissus hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. Dans la littérature, l'expression de CXCR7 a été observée en surface des lymphocytes B et T ainsi que leurs précurseurs, des monocytes et des neutrophiles (Balabanian et al., 2005; Infantino et al., 2006; Sierro et al., 2007). L'expression en surface de CXCR7 ainsi que le niveau de son ARN messager sont plus

élevés sur les monocytes et les cellules précurseurs des lymphocytes B. Notamment, au cours du développement et de la différenciation des cellules pré-B, l'expression de CXCR7 est hautement régulée et corrèle avec la capacité de la cellule à se différencier en cellules plasmiques. Ainsi, il a été suggéré que CXCR7 représente un marqueur des lymphocytes B de type mémoire lorsqu'ils sont aptes à se transformer en des cellules sécrétrices d'anticorps (Infantino et al., 2006). CXCR7 se trouve aussi fortement exprimé à la surface des monocytes qui sont différenciés en cellules dendritiques. Toutefois, son expression varie en fonction de la maturation de ces cellules. En effet, l'expression de CXCR7 se trouve rapidement augmentée au niveau des dernières étapes de maturation des monocytes dérivées du sang (Infantino et al., 2006).

CXCR7 est un récepteur qui peut aussi être exprimé à la surface des cellules endothéliales. Notamment, il peut être exprimé au niveau de l'endothélium tôt dans le développement embryonnaire (Burns et al., 2006; Levoye et al., 2009). Ainsi, CXCR7 se trouve également exprimé au niveau des tissus non-hématopoïétiques. Ce récepteur joue également un rôle dans le développement du système cardiovasculaire puisque son absence donne lieu à une malformation des valves cardiaques. En absence de CXCR7 dans des souris double knock-out CXCR7 $-/-$, 75% des souris meurent en périnatalité. Ces souris présentent des cœurs plus larges ou plus épais accompagné d'une dégénérescence du tissu cardiaque ainsi que d'une sténose de la valve aortique et pulmonaire (Gerrits et al., 2008; Sierro et al., 2007; Yu et al., 2011).

En plus, des études récentes montrent le rôle de CXCR7 dans la myogénèse soit la formation des tissus musculaires. En effet, l'expression de CXCR7 fut tout d'abord observée au niveau des structures vésiculaires du cytoplasme des fibres musculaires

définies comme le sarcoplasme. Son expression a été observée autant durant le développement qu'à l'âge adulte (Puchert et al., 2016). Plusieurs évidences dans la littérature montrent l'association de l'expression de CXCR7 à divers cancers. Ainsi, CXCR7 jouerait un rôle central dans la tumorigenèse. Notamment, CXCR7 a été observé pour être présent à la surface des cellules cancéreuses de seins, de prostate, de poumon, de thyroïdes, des intestins (Liu et al., 2012; Miao et al., 2007; Wang et al., 2015; 2008).

2.2.2.3 Signalisation atypique

CXCR7, bien qu'il soit caractérisé comme un récepteur de chimiokine, ne signale pas de la façon classique. Contrairement aux autres récepteurs de chimiokine, CXCR7 ne permet pas d'inhiber l'adénylate cyclase via l'activation des protéines G α i, et ce, malgré une interaction directe du récepteur avec la protéine G α i observée (Levoye et al., 2009). Également, CXCR7 n'engendre pas de flux calciques intracellulaires via la protéine G α q (Levoye et al., 2009). L'implication de CXCR7 dans la chimiotaxie demeure sujet à débat due à des inconsistances du contexte expérimental et des types cellulaires utilisés (Lymphocytes T, cellules germinales et cellules métastatique de rhabdomyosarcoma). Notamment, Balabanian et al. et Grymula et al. observent de la migration orientée des cellules via CXCR7 alors que Burns et al. et Boldajipour et al. et Hartmann et al. montrent le contraire (Balabanian et al., 2005; Boldajipour et al., 2008; Burns et al., 2006; Grymula et al., 2010; Hartmann et al., 2008). Ainsi, contraire à la signalisation classique d'un récepteur de chimiokine, CXCR7 ne mène pas à l'activation des protéines G hétérotrimériques et ni à la chimiotaxie.

Pour la toute première fois en 2009, notre équipe de recherche a démontré que la stimulation de CXCR7 par un de ses ligands naturels endogènes CXCL12 induit le recrutement de la β -arrestine (Kalatskaya et al., 2009). De plus, il a été démontré que le recrutement de la β -arrestine à ce récepteur engendre l'activation des voies MAPK ERK1/2 (Gravel et al., 2010; Rajagopal et al., 2010; Zabel et al., 2009). Selon Rajagopal et al. la phosphorylation des MAPK ERK1/2 menant à leur activation est induite par la β -arrestine 2, et ce, de façon protéine G indépendante (Rajagopal et al., 2010). Les travaux de cette équipe montrent par microscopie confocale que le traitement des cellules HEK293 par CXCL11 et CXCL12, exprimant de façon transitoire le récepteur de chimiokine CXCR7, induit le recrutement de la β -arrestine2 ainsi que la phosphorylation des MAPK ERK1/2. L'activation des MAPK ERK1/2 et AKT passant spécifiquement par CXCR7 a été observé par plusieurs autres groupes de recherche et supporte l'hypothèse que CXCR7 mène à une signalisation intracellulaire plutôt que d'agir comme un récepteur silencieux dépourvu de signalisation (Grymula et al., 2010; Sierro et al., 2007; Tripathi et al., 2014; Wang et al., 2008).

Canals et al. ont tenté de comprendre comment CXCR7 régule ses fonctions en essayant d'identifier les interactions moléculaires responsables d'un tel processus (Canals et al., 2012). En accord avec ce qui avait déjà été observé, les travaux des auteurs montrent que suite à sa stimulation par CXCL12, CXCR7 internalise pour ensuite être recyclé à la surface cellulaire (Luker et al., 2010; Naumann et al., 2010). Notamment, Canals et al. interprètent leurs données d'expression en surface de façon à ce que l'internalisation de CXCR7 dépend de la β -arrestine ainsi que des résidus sérine/thréonine de la partie C-terminale (Canals et al., 2012). Pour la première fois, ils

montrent que CXCR7 est constitutivement ubiquitiné. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle responsable entre autres du transport intracellulaire des protéines. Ces auteurs observent qu'aussitôt stimulé par CXCL12, CXCR7 est dé-ubiquitiné. Également, ils identifient un résidu lysine situé au niveau de la partie C-terminal du récepteur comme étant essentiel pour son expression à la surface cellulaire (Canals et al., 2012). Chatterjee et al. montrent que la phosphorylation de ERK1/2 induit par CXCL12 engendre l'ubiquitination du récepteur CXCR7 et que ce processus est essentiel pour la translocation de CXCR7 à la surface cellulaire des plaquettes sanguines de souris (Chatterjee et al., 2014).

Plusieurs équipes de recherche maintiennent que, malgré tout, CXCR7 est un récepteur dit decoy ou dépourvu de signalisation propre à lui-même. Entre autres, en 2008, Boldajipour et al. montrent que CXCR7 est exprimé au niveau des cellules entourant les cellules germinales (Boldajipour et al., 2008). L'effet de celui-ci est de séquestrer la chimiokine CXCL12 au niveau de la surface extracellulaire ce qui permettra la création d'un gradient de CXCL12. Ainsi, ce gradient est essentiel à la migration orientée des cellules germinales. Il existe d'autres récepteurs de chimiokine de type decoy soient les récepteurs Duffy, D6 et CCX-CKR. Ils furent tous renommés comme récepteurs atypiques de chimiokine (ACKR1, 2 et 4 respectivement) (Proudfoot and Ugucioni, 2016). Tout comme CXCR7, ces récepteurs interagissent avec leurs chimiokines respectives, mais n'induisent pas de chimiotaxie (migration orientée des cellules). Ainsi, leur fonction est de lier et de séquestrer leurs chimiokines à la surface cellulaire pour ensuite les internaliser et provoquer leur dégradation. Ce processus aura pour effet de créer un gradient de chimiokine nécessaire à une migration orientée des

cellules vers un endroit précis. Le récepteur D6 a notamment été observé pour être constitutivement internalisé. Ce récepteur se lie à l'ensemble des chimiokines inflammatoires de type CCL. D6 se retrouve donc rapidement recyclé vers des endosomes de recyclages à la surface cellulaire. Par ailleurs, la chimiokine qui est internalisée avec D6 est rapidement dissociée de celui-ci dû à un changement de pH au sein des endosomes ce qui engendre une diminution de la liaison de la chimiokine à son récepteur D6. La chimiokine est, par la suite, dégradée (Comerford and Nibbs, 2005).

Les mécanismes moléculaires par lesquelles CXCR7 exerce son comportement atypique restent à être clarifiés. Le motif E/DRYLAIV est hautement conservé à travers les récepteurs s'apparentant à la rhodopsine. Les récepteurs de chimiokines font partie de cette sous-classe des 7TMRs. Ce motif se vaut être essentiel pour le couplage des protéines G hétérotrimériques et il est notamment impliqué dans la transition conformationnelle du récepteur lors de son activation (Rovati et al., 2007). En revanche, pour CXCR7 cette séquence se trouve altérée, DRYLSIT (Thelen and Thelen, 2008). Dans la littérature, il est proposé que cette divergence de séquences au sein de ce motif pourrait expliquer l'absence d'activation du récepteur CXCR7 avec les protéines G hétérotrimériques et, par le fait même, ses particularités atypiques. Graham et al. ont observé que même en mutant le motif DRYLSIT de CXCR7, le récepteur, une fois activé, n'est toujours pas en mesure d'engager de flux calciques intracellulaires (Graham et al., 2012). Ceci laisse supposer qu'il y aurait des éléments de séquences additionnels manquants ou que l'orientation des hélices au sein de récepteur de CXCR7 n'est pas compatible avec un couplage efficace des protéines G hétérotrimériques à CXCR7. Or, le récepteur de chimiokine CXCR6 ainsi que celui de la lymphotactine XCR1 possèdent

tous les deux des séquences altérées au sein de leur motif E/DRYLAIIV, mais il signalisent de façon classique via les protéines G hétérotrimériques (Chandrasekar et al., 2004; Yoshida et al., 1998).

2.2.2.4 Rôle de CXCR7 dans le cancer

Le récepteur CXCR7 se trouve exprimé à la surface d'un grand nombre de cellules cancéreuses et il a été démontré pour être important dans la tumorigénèse (Burns et al., 2006). Notamment, Dr Schall et son équipe ont observé que l'absence de CXCR7 corrèle avec une diminution du potentiel de prolifération des tumeurs de sein et de prostates (Miao et al., 2007; Wang et al., 2008). Récemment, Kallifatidis et al. ont démontré que le récepteur CXCR7 mène à une transactivation du récepteur à l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ce qui corrèle avec le potentiel des cellules cancéreuses à proliférer, notamment, dans le cas de tumeurs du cancer de la prostate (Kallifatidis et al., 2016). De plus, ces mêmes auteurs ont observé que la β -arrestine2, une fois activée, est responsable de la translocation nucléaire de EGFR ce qui mène donc à une baisse d'activité de EGFR et, par le fait même, une baisse de la prolifération tumorale. Ainsi, cette étude révèle que la β -arrestine2 agit comme suppresseur de tumeur. Également, CXCR7 a été observé pour augmenter la prolifération cellulaire dans des cellules de cancer de la prostate. Notamment, dans ces cellules, CXCR7 induit l'expression de l'interleukine-8 soit un facteur pro-angiogéniques (Maksym et al., 2009). Dans ce même article, les auteurs montrent que CXCR7 agit indépendamment de la présence du récepteur de chimiokine CXCR4 et qu'il est donc possible d'attribuer le développement et la croissance tumorale à CXCR7 seulement. Par ailleurs, l'élimination

de l'expression de CXCR7 par siRNA corrèle de façon significative avec des tumeurs de plus petites tailles. Contrairement aux vaisseaux sanguins normaux, CXCR7 se trouve fortement exprimé au niveau des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs. Ainsi, CXCR7 serait associé à la vascularisation tumorale. Comme observé par d'autres équipes de recherche, Burns et al. associent la présence d'expression de CXCR7 à la croissance tumorale (Burns et al., 2006; Miao et al., 2007). Bien qu'il soit clair que le récepteur de chimiokine CXCR7 joue un rôle clé au niveau de différents cancers, les mécanismes fonctionnels par lequel CXCR7 induit la croissance et le développement tumoral restent encore à être clarifiés davantage. Il en va de même pour le rôle qu'occupe CXCR7 au niveau de la domiciliation et de la mobilisation des cellules souches cancéreuses (Maksym et al., 2009).

2.2.3 CXCR4

2.2.3.1 Historique

Les récepteurs de chimiokine CXCR4 et CXCR7 sont les deux récepteurs les plus conservés à travers les vertébrés et sont essentiels pour la survie chez la souris (Sierro et al., 2007; Zou et al., 1998). Ces deux récepteurs partagent la chimiokine CXCL12 comme ligand naturel endogène. Avant la découverte du récepteur de chimiokine CXCR7 en 2005, CXCL12 était considéré comme le seul ligand naturel exclusif du récepteur CXCR4 (Balabanian et al., 2005). Contrairement à CXCR7, CXCR4 est un récepteur de chimiokine qui signale de façon classique, c'est-à-dire que l'activation de ce dernier mène à l'activation de la protéine $G\alpha_i$, la migration orientée des cellules, la chimiotaxie. Chez les vertébrés, CXCR4 est exprimé tout au long du développement et il est le seul

récepteur de chimiokine essentiel pour la vie. Ce récepteur est exprimé de manière ubiquitaire à la fois sur des tissus différenciés ou non. D'ailleurs, CXCR4 se trouve exprimé sur la plupart des cellules hématopoïétiques, des cellules endothéliales vasculaires, des neurones à la fois au niveau du système nerveux central et périphérique, des microglies et des astrocytes (Murphy et al., 2000). CXCR4 se trouve également exprimé par plusieurs cellules cancéreuses d'origine hématopoïétiques ou non-hématopoïétiques. En plus d'induire la croissance et la survie cellulaire, CXCR4 serait impliqué dans la migration orientée des métastases vers des organes riches en CXCL12 ou la dissémination métastatique comme par exemple, les métastases du cancer du sein migreront vers la moelle osseuse, les poumons et/ou le foie (Balkwill, 2004; Müller et al., 2001).

CXCR4 est également connu pour agir comme corécepteur d'entrée de la souche X4-tropique du virus d'immunodéficience humaine (VIH) (Balabanian et al., 2004; Oberlin et al., 1996; Wilen et al., 2012). CXCR4 lie, à la fois, la glycoprotéine CD4 se trouvant exprimée à la surface des lymphocyte T CD4+ et la protéine gp120 qui enveloppe la souche X4-tropique du VIH. Cela permet donc l'entrée de la protéine virale du VIH, gp41 (Allain et al., 1987; Sattentau and Weiss, 1988).

Aussi, le syndrome de WHIM est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. L'acronyme WHIM se définit comme étant des verrues (Warts) causées par le virus du papillome humain, VPH (Human Papillomavirus Onfection), par de multiples infections et/ou par la myelokathesis, des troubles hématologiques (neutropénie ou leucopénie). La plupart des mutations pour le syndrome de WHIM résultent en une troncation partielle de la partie C-terminale du récepteur de chimiokine

CXCR4 (Hernandez et al., 2003). Ceci engendre donc une augmentation de la signalisation de CXCR4. CXCR4 se voit incapable de s'auto-réguler et se retrouve à être constitutivement sous sa forme active. La mutation de CXCR4 aura pour effet de retenir les leucocytes matures au sein de la moelle osseuse et possiblement au sein de d'autres organes immuns. Ainsi, lors d'une infection, les patients atteints du syndrome de WHIM mobilisent ses leucocytes matures dans le sang ce qui provoquera des infections bactériennes à répétitions. Les mécanismes moléculaires responsables de l'amplification de l'activité du récepteur CXCR4 passeraient par une augmentation de l'activité de la protéine G α i, la signalisation dépendante de la β -arrestine (Lagane et al., 2008). De plus, la perte des sites de phosphorylation au sein de la partie C-terminale ne permet plus à CXCR4 d'être désensibilisé, internalisé et, par la suite, dégradé (Busillo and Benovic, 2007).

2.2.3.2 Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques et dissémination métastatiques

CXCL12 est une protéine appartenant à la famille des chimiokines se trouvant exprimé au sein des cellules stromales de la moelle osseuse ainsi que dans les cellules endothéliales. Les partenaires d'interaction CXCL12 et son récepteur CXCR4 sont également exprimés au niveau des cellules souches hématopoïétiques ainsi que sur les cellules progénitrices chez l'humain. L'axe CXCL12/CXCR4 est impliqué de façon prédominante au niveau de la domiciliation et de la prise de greffe au sein de la moelle osseuse lors d'une transplantation (Chute, 2006). En effet, il a été observé, chez des souris ayant un système immunitaire déficient, que le succès de la greffe et de la

domiciliation des cellules souches hématopoïétiques sont significativement affectés lorsque l'axe CXCL12/CXCR4 est inhibé (Peled et al., 1999). La domiciliation est défini comme étant la migration des cellules souches hématopoïétiques à travers l'endothélium vers la moelle osseuse et/ou différents organes d'intérêts. La domiciliation est un processus qui est notamment requis lors de la transplantation, tel que mentionné ci-haut, l'embryogénèse et lors de la réparation des tissus. Lorsque les cellules souches hématopoïétiques atteignent la moelle osseuse lors d'une transplantation clinique encore faut-il que les cellules y restent pour que, d'une part la prise de greffe ait lieu et d'autre part, qu'il y ait repopulation de la moelle osseuse. Notamment, les cellules souches hématopoïétiques qui seront transplantées expriment à leur surface le récepteur CXCR4 tandis que la chimiokine CXCL12 se trouve fortement exprimée au niveau de la moelle osseuse. Ainsi, il a été observé que ces cellules souches migrent vers le gradient de CXCL12 in vitro ce qui corrèle avec le potentiel de repopulation des cellules souches hématopoïétiques chez des patients ayant un système immunitaire déficient (Voermans et al., 2001). Le processus inverse de la domiciliation se nomme la mobilisation et se définit comme étant la sortie des cellules souches hématopoïétiques vers la circulation sanguine. La mobilisation est induite en réponse à un stress ou suite à la présence d'un agent immobilisant comme AMD3100/Mozobil/Plerixafor qui aura pour rôle d'inhiber la liaison de CXCL12 à CXCR4 (De Clercq, 2003). Ainsi, la liaison CXCL12 à CXCR4 est également impliquée dans la rétention des cellules souches hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse (Chute, 2006).

Lors d'un cancer les cellules se retrouvent à être dérégulées non seulement au niveau de leur prolifération ou de leur croissance, mais aussi au niveau de leurs fonctions

biologiques. La caractéristique d'agressivité d'un cancer est attribuée à la capacité de la tumeur à se déplacer dans l'organisme afin d'établir un second foyer tumoral. Ce foyer secondaire est localisé à un endroit distinct de la tumeur primaire et, est parfois, difficile à détecter. Ce processus est défini comme la dissémination métastatique. Le traitement contre une tumeur primaire non métastasée, par exemple lors d'un cancer du sein, est beaucoup plus efficace que lorsqu'il y a dissémination métastatique (Zlotnik, 2004). Muller et al. ont observé que, dans le cas cancer du sein, l'expression des récepteurs de chimiokines n'est pas aléatoire et que les récepteurs CXCR4 et CXCR7 sont majoritairement exprimés au sein de ces cellules cancéreuses. CXCL12, le ligand de CXCR4 est, quant à lui, fortement exprimé dans le poumon, le foie, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et dans le cerveau (Müller et al., 2001). Ainsi, l'expression de CXCL12 serait responsable de la dissémination métastatique des tumeurs du cancer du sein vers le poumon, le foie, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et le cerveau. L'équipe de recherche montre qu'un anticorps dirigé contre CXCR4 bloque la progression métastatique des cellules tumorales du cancer du sein vers les poumons. À la lumière de ces résultats, Muller et al. suggèrent un rôle important des chimiokines dans la dissémination métastatique du cancer du sein (Müller et al., 2001).

2.2.3.3 Signalisation de CXCR4

Les principales fonctions de CXCR4 sont la migration orientée des cellules, l'homéostasie, la néovascularisation, la croissance et la survie cellulaire. Comme la plupart des récepteurs de chimiokine, CXCR4 signale de façon classique. La forme active de CXCR4, suite à sa stimulation par CXCL12, engendre le couplage de la

protéine $G\alpha_i$, impliquée dans l'inhibition de l'adénylate cyclase provoquant ainsi la diminution de la production de l'AMPc. L'activation de la $G\alpha_i$ mène aussi à la stimulation de la phospholipase C qui engendrera, par la suite, la mobilisation du calcium, l'activation de la voie de signalisation de PI3K et des MAPK ainsi que le recrutement de la β -arrestine (Busillo and Benovic, 2007). La voie de signalisation des PI3K/PTEN induite par CXCR4 est impliquée dans la localisation des protéines menant au remodelage du cytosquelette. PI3K est une 3-phosphatidylinositol kinase. Elle phosphoryle le PIP2 en PIP3. PTEN, (*phosphatase and tensin homologue*), pour sa part, est une phosphatase qui rend cette réaction réversible. Lors d'une polarisation induite par la présence d'un gradient de chimioattractant, la cellule procède à un réarrangement de ses composantes intracellulaire ce qui permet la formation d'un axe asymétrique définissant ainsi une région antérieure soit le *leading edge* et une région postérieure, le *trailing end*. La cellule se trouve donc polarisée. Ainsi, l'activation de PI3K via CXCR4 induit une accumulation de PI3K au niveau du *leading edge* et provoque ainsi la polymérisation de l'actine à cet endroit. La protéine PTEN est, quant à elle, relocaliser au trailing end de la cellule et provoquera l'inhibition de la polymérisation de l'actine à cet endroit (Devreotes and Janetopoulos, 2003). Ainsi, l'activation de la signalisation PI3K/PTEN conduit à la contractilité de la myosine et permet à la cellule exprimant le récepteur CXCR4 de migrer vers le chimioattractant soit CXCL12 (Wang et al., 2000). La signalisation du récepteur de chimiokine CXCR4 été observé par Bussillo et al. pour être sensible à la PTX. Dans cet article, les auteurs montrent que la PTX prévient l'activation de la protéine $G\alpha_i$, et ce, en catalysant l'ADP-ribosylation sur un résidu cystéine au niveau de la partie C-terminale du récepteur (Busillo et al., 2010). Ainsi,

l'activation de CXCR4 par CXCL12 mène ultimement au recrutement de la β -arrestine. Afin de recruter la β -arrestine, CXCR4, une fois activée, doit être phosphorylé par des protéines G kinases au niveau de sa partie C-terminale. Busillo et al. ont montré que CXCR4 se trouve phosphorylé par les GRK2, 3, 5 et 6. Notamment, ils observent que la GRK3 et la GRK6 est nécessaire pour activer ERK1/2 de manière β -arrestine dépendante (Busillo et al., 2010). De plus, le recrutement de la β -arrestine à CXCR4 a été observée pour être requise lors de la chimiotaxie et serait médié par l'activation de la MAPK p38 de façon β -arrestine dépendante (Sun et al., 2002).

La signalisation de CXCR4 est contexte dépendant. En effet, sa signalisation dépend notamment de la durée de la stimulation ainsi que de l'efficacité de la liaison des protéines spécifiques. De plus, la concentration de CXCL12 à proximité de CXCR4 a un effet sur la qualité du signal. Étant donné que CXCR4 est un récepteur capable d'hétérodimériser avec d'autres récepteurs de chimiokines tels que les récepteurs de chimiokine CCR2 et CCR5, sa signalisation dépendra également de la présence des récepteurs de chimiokine l'environnant (Sohy et al., 2009).

2.2.4 Impact de CXCR7 sur la signalisation de CXCR4

La découverte tardive du récepteur de chimiokine CXCR7 comme étant lui aussi capable de lier la chimiokine CXCL12 invite à investiguer l'impact du rôle de CXCR7 par rapport à celui de CXCR4. Étant donné que la liaison de CXCL12 à CXCR4 était considérée comme exclusive avant la découverte du récepteur CXCR7, plusieurs équipes de recherche se sont intéressés à savoir si CXCR4 et CXCR7 agissent en pairs ou l'un influence la signalisation de l'autre (Décaillot et al., 2011; Levoye et al., 2009; Rajagopal

et al., 2010; Sierro et al., 2007; Thelen and Thelen, 2008). Plusieurs études montrent que CXCR7 peut influencer soit directement ou indirectement la signalisation du récepteur de chimiokine CXCR4. L'influence de CXCR7 sur CXCR4 dépend de l'expression des deux récepteurs au sein de la même cellule ou non. Par exemple, Boldajipour et al. observent que CXCR7 est exprimé au niveau des cellules endothéliales entourant les cellules germinales, qui elles, expriment le récepteur CXCR4 (Boldajipour et al., 2008). CXCR7 a pour effet de séquestrer le CXCL12 en circulation à la surface cellulaire ce qui créera un gradient de CXCL12 et engendrera la migration orientée des cellules germinales exprimant CXCR4 vers la cible d'intérêt. L'équipe de recherche du Dr. Luker montre que la progression et la dissémination métastatique des cellules du cancer du sein dépendent de l'expression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 (Luker et al., 2012). En effet, il est montré que les récepteurs sont différemment exprimés au sein des cellules tumorales où CXCR7 agit comme régulateur du niveau de CXCL12 ce qui aura un impact direct sur le pouvoir migratoire et prolifératif du récepteur CXCR4. En contre partie, plus la concentration de CXCL12 est élevée, comme par exemple lorsqu'il y a présence d'un gradient, plus la chimiokine CXCL12 a la chance de se retrouver sous forme de dimère (Drury et al., 2011). Ainsi, lorsque CXCL12 se trouve sous forme de dimère, il a été observé que CXCR4 est incapable d'induire la chimiotaxie (Drury et al., 2011).

Par ailleurs, lorsqu'ils se retrouvent exprimés au sein de la même cellule, CXCR7 et CXCR4 peuvent hétérodimériser. Cette hétérodimérisation a pour effet d'atténuer la signalisation de la protéine $G\alpha_i$ induite par CXCR4 lors de sa stimulation par CXCL12 (Levoye et al., 2009). Il a été montré que la signalisation de ce complexe passerait plutôt par le recrutement de la β -arrestine. En effet, CXCR4 et CXCR7 forme un complexe qui

recrute de manière constitutive la β -arrestine. L'interaction de la β -arrestine avec l'hétérodimère CXCR4/CXCR7 est responsable et engendre l'activation de la chimiotaxie via l'activation de ERK1/2 et p38 (Décaillot et al., 2011; Gravel et al., 2010; Rajagopal et al., 2010). Décaillot et al. montrent que le prétraitement des cellules avec la chimiokine CXCL11, l'autre ligand endogène de CXCR7 a pour effet de diminuer la migration stimulée par CXCL12 sur des cellules co-exprimant CXCR7 et CXCR4 (Décaillot et al., 2011). Ainsi, la modulation des différentes fonctions de CXCR4 a été suggéré comme un des principaux rôles de CXCR7 (Thelen and Thelen, 2008). À la lumière de ses résultats, Décaillot et al. suggèrent la régulation de la signalisation du complexe CXCR4/CXCR7 par des ligands de CXCR7, comme CXCL11 et mettent de l'avant l'implication de l'hétérodimérisation au sein des tumeurs et des métastases (Décaillot et al., 2011). Également, ils suggèrent le niveau d'expression du récepteur de chimiokine CXCR7 comme marqueur tumorale de sorte que, le niveau d'expression de CXCR7 corrèle avec le risque de dissémination métastatique d'un cancer.

3. Ligands synthétiques

3.1 AMD3100/Mozobil/Plerixafor

L'AMD3100 est une molécule chimique de la famille des bicyclames (voir figure 8). Cette molécule lie le récepteur de chimiokine CXCR4 et empêche CXCL12 de s'y lier lui aussi. Anciennement, cette molécule était identifiée comme JM1657 (JM définit comme Johnson Matthey) et a été découverte, de façon fortuite, comme un contaminant dans la préparation commerciale de monocyclames qui était évaluée pour son caractère anti-VIH. JM1657 fut modifié en JM3100 qui s'est avéré à être beaucoup plus puissant

comme agent rétroviral que JM1657. Johnson Matthey fut rapidement acheté par une compagnie portant le nom de AnorMeD d'où le nouveau nom de la molécule AMD3100 (De Clercq, 2015). AMD3100 s'est révélé être efficace contre le VIH de type 1 et de type 2 en plus d'être non cytotoxique pour l'être humain à des doses >500ug par mL. Avant la découverte de l'implication du récepteur de chimiokine CXCR4 dans le VIH en 1996, la glycoprotéine de l'enveloppe virale du VIH, gp120 avait été identifié comme cible potentiel de AMD3100 (De Clercq et al., 1992; de Vreese et al., 1996). La protéine gp120 a rapidement été identifié comme une cible indirecte. C'est le récepteur CXCR4 qui fut identifié comme cible directe de AMD3100. La protéine gp120 de l'enveloppe virale du VIH interagit avec le récepteur CXCR4 pour entrer dans la cellule hôte. La présence d'AMD3100 sur le récepteur CXCR4 empêche la protéine gp120 de s'y lier et rend l'entrée du virus plus difficile (Schols et al., 1997). En 2002, Hatse et al. observe que la molécule AMD3100 est hautement spécifique et exclusive au récepteur CXCR4 (Hatse et al., 2002). Ils montrent que l'AMD3100 empêche la mobilisation du calcium seulement pour CXCR4 et non pas pour les autres types de récepteurs de chimiokine soit de type CXC ou CC. Étant donné son caractère hautement puissant d'agent anti-rétroviral, AMD3100 passe rapidement en phase d'évaluation pré-clinique. Toutefois, durant l'évaluation pharmacocinétique de la molécule administrée par simple dose, par intraveineuse, un résultat inattendu a été obtenu. En effet, les patients sains ayant reçu une dose de l'AMD3100 présentaient une concentration de globules blancs anormalement élevée, soit trois fois plus que la normale, dans la circulation sanguine, et ce, environ 6 heures après l'injection (Hendrix et al., 2000). Par la suite, il s'est avéré que les globules blancs présents dans le sang périphérique ont été caractérisés comme cellules souches

hématopoïétiques CD34⁺ (Wood et al., 2002). Cette découverte a permis de pousser plus loin l'évaluation de l'administration de la molécule AMD3100 comme mobilisateur des cellules souches hématopoïétiques dans la circulation sanguine.

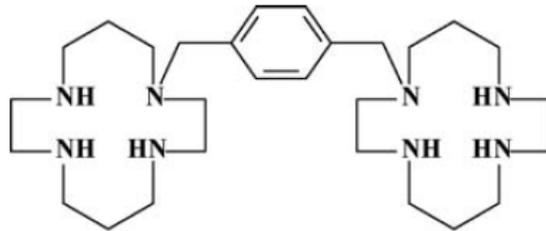


Figure 8: Représentation schématique de la molécule AMD3100 (De Clercq, 2009).

En 2009, la FDA (Food and Drug Administration) permet la commercialisation de la molécule AMD3100 sous le nom de Mozobil/Plerixafor. L'AMD3100 conjointement administré avec le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulation Factor) est utilisé et agit de façon synergique avec le GM-CSF sur la mobilisation rapide des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique. Le Mozobil en combinaison avec le GM-CSF est administré en clinique lors de transplantation de type hétérologue de moelle osseuse à des patients atteints de myélomes multiples ou de lymphome non-Hodgkinien. Par ailleurs, l'interaction CXCL12 avec CXCR4 au niveau de la moelle osseuse a pour rôle de retenir les cellules souches hématopoïétiques à l'intérieur de la moelle osseuse afin d'assurer un pool de cellules souches essentiels pour une hématopoïèse efficace. Lorsqu'administrée, l'AMD3100 se lie à CXCR4 et empêche CXCL12 de s'y lier ce qui engendra la libération ou la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse vers la circulation sanguine (De Clercq, 2009; 2015). Le Mozobil et le GM-CSF sont administrés au donneur, le sang est filtré par aphérèse afin d'enrichir les cellules souches hématopoïétique CD34⁺. Le jour de la greffe, les cellules souches sont

administrées au patient par intraveineuse. Le Mozobil fait l'objet de plusieurs études cliniques. Notamment, de petites doses de Mozobil sont évaluées dans le traitement de base contre le syndrome de WHIM où l'activité du récepteur CXCR4 est anormalement hyper élevée (McDermott et al., 2014). Aussi, le Mozobil est maintenant évalué en phase II d'essai clinique pour la transplantation efficace et sécuritaire, de type autologue (le patient est son propre donneur), de cellules souches hématopoïétiques d'un patient atteint d'un myélome multiples suite à un traitement par la chimiothérapie (Bachelerie et al., 2014).

En revanche, dans le cadre de cette thèse, nous démontrons qu'AMD3100 n'est pas exclusif à CXCR4 et est aussi capable de lier le récepteur de chimiokine CXCR7. Cette liaison a été observée pour induire le recrutement de la β -arrestine2 à CXCR7 (Kalatskaya et al., 2009). En plus, Kalatskaya et al. montrent qu'AMD3100 agit comme un modulateur allostérique positif sur CXCR7, et ce, en augmentant l'affinité de liaison de CXCL12 à CXCR7. En revanche, AMD3100 seul est en mesure d'induire le recrutement de la β -arrestine à CXCR7 (Kalatskaya et al., 2009).

3.2 TC14012

En plus de la molécule AMD3100, plusieurs autres antagonistes de CXCR4 ont été développés comme agents antirétroviraux contre l'infection du VIH de type 1 dont le peptide T140 et son analogue le TC14012 (Fujii et al., 2003; Murakami et al., 1997). Ces peptides cycliques comportent un pont disulfure reliant deux résidus cystéines entre eux et sont formés d'environ 14 acides aminés (voir figure 9). Le T140 est issu à partir de

limule américaine (*Horsehoe Crab*) et avait été isolé notamment pour son caractère antibactérien et antiviral.

Le T140 a été observé pour avoir le plus haut degré d'activité anti-VIH et s'est avéré à être l'antagonisme le plus puissant contre l'entrée du VIH de type 1 de souche X4-tropic, et ce parmi plusieurs antagonistes ciblant le récepteur CXCR4 (Tamamura et al., 2001).

Le T140 est un peptide amphiphile contenant des résidus basiques et hydrophobes lui conférant une charge positive totale de +7. Les interactions électrostatiques et/ou hydrophobes que ce type de peptide a avec la membrane basale corrèleraient avec la cytotoxicité du peptide plus précisément nombre de charges positives. En effet, les auteurs ont observé qu'en diminuant le nombre de charges positives en remplaçant des résidus basiques telles que l'arginine et la lysine par un résidu polaire et non basique comme la cirtulline, il était possible non seulement de diminuer la cytotoxicité des composés, mais aussi d'augmenter leur degré d'activité anti-VIH. Le TC14012 est un peptide analogue au T140 comportant deux résidus citrulline dont l'un d'eux est un désoxy-citrulline à la place d'une arginine et d'une désoxy-lysine respectivement. De plus, TC14012 possède une partie C-terminale qui le rend plus stable dans le sérum que le T140. Ainsi, TC14012 présente une faible cytotoxicité mais une forte activité anti-rétrovirale (Tamamura et al., 2001).

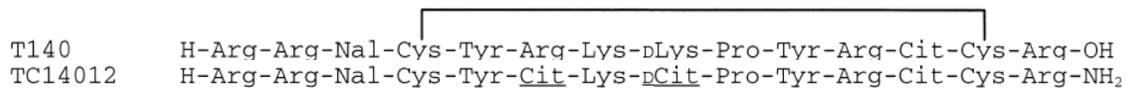


Figure 9: Séquence des résidus d'acides aminés du T140 et de son analogue, le TC14012 Le point disulfure reliant deux résidus cystéines est montré par une ligne noire. Les résidus d'acides aminés substitués sont soulignés. Nal=1-3-(2-naphthyl)alanine, Cit=l-citrulline (Tamamura et al., 2001).

Étant donné que CXCL12 n'est pas exclusif au récepteur de chimiokine CXCR4 et qu'il lie également le récepteur de chimiokine CXCR7, il est indispensable de revoir la sélectivité des autres molécules thérapeutiques ciblant CXCR4 tels que le TC14012.

3.3 Molécules synthétiques ciblant CXCR7

L'équipe de recherche du Dr. Schall a développé des petites molécules synthétiques inhibitrices ciblant spécifiquement le récepteur de chimiokine CXCR7 (Burns et al., 2006; Zabel et al., 2009). Ces molécules synthétiques dont l'information structurale est gardée secrète sont fabriquées par la compagnie Chemocentryx. CCX771 et ses analogues tels que CCX754 et CCX733 ont été vite considérés comme des antagonistes du récepteur CXCR7 étant donné qu'ils inhibent la liaison de CXCL12 à CXCR7. Ces molécules présentent une forte affinité de liaison à CXCR7 aux alentours de 5nM. Cependant, en 2009, deux équipes de recherche observent que le CCX771 est plutôt un agoniste sur CXCR7 puisqu'il induit le recrutement de la β -arrestine à ce dernier (Luker et al., 2009a) (Zabel et al., 2009). De plus, ces molécules ont été montrées pour leur efficacité à réduire la taille des tumeurs de multiples cancers comme par exemple le lymphome humain de type B (Burns et al., 2006; Zabel et al., 2009). Le récepteur de chimiokine CXCR4 ainsi que son ligand naturel, CXCL12 ont été montrés pour être exprimés au sein des cellules de Schwann et des astrocytes dans le système nerveux central. Le Dr. Schall et son équipe de recherche s'intéressent notamment à l'axe CXCL12/CXCR7 puisqu'il est impliqué dans plusieurs pathologies du cerveau tel que le glioblastome multiforme. Avant la découverte du récepteur de chimiokine CXCR7, CXCR4, à lui seul, avait été observé comme régulateur de la prolifération et du degré

d'invasion des tumeurs d'astrocytomes. Toutefois, Odemis et al. montrent, en 2010, que c'est plutôt CXCR7 et non CXCR4 qui est, à lui seul, responsable de la signalisation de CXCL12 au niveau des astrocytes et que la stimulation avec CCX754 a pour effet d'inhiber les effets de CXCL12 sur CXCR7 (Ödemis et al., 2010).

À la lumière de ces recherches, la molécule CCX662 a été développée sous prétexte qu'elle était un prototype plus réaliste contre le traitement du cancer du cerveau chez l'humain. D'ailleurs, cette molécule est présentement en évaluation pré-clinique pour le traitement du glioblastome multiforme (Bachelier et al., 2014). Notamment, Walter et al. montrent que la molécule CCX662 nouvellement développée pour cibler CXCR7 a pour effet de diminuer la taille des tumeurs et d'empêcher le caractère récurrent de la tumeur associée au glioblastome multiforme suite à la radiothérapie, et ce, en interférant avec les cellules souches dites cancéreuses (Walters et al., 2014).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

a. Problématique

Avant la découverte du récepteur de chimiokine CXCR7, la chimiokine CXCL12 était considérée comme liant exclusivement le récepteur de chimiokine CXCR4. Or, le récepteur CXCR7 a été montré pour lier, lui aussi, la chimiokine CXCL12 (Balabanian et al., 2005). Cette découverte incite la communauté scientifique à revisiter les rôles de l'interaction entre CXCR4 et CXCL12. À cet effet, plusieurs groupes de recherche ont émis l'hypothèse que CXCR7 serait un récepteur dépourvu de signalisation parce qu'il n'activait pas la protéine G hétérotrimérique. Contrairement à cette hypothèse, notre groupe a été le premier à observer que CXCR7 induit plutôt le recrutement de la β -arrestine au récepteur suite à sa stimulation par CXCL12 (Kalatskaya et al., 2009). De plus, nous avons identifié qu'un antagoniste synthétique de CXCR4, l'AMD3100, agit comme un agoniste sur CXCR7 en induisant le recrutement de la β -arrestine, démontrant que ce ligand n'est pas sélectif ni exclusif à CXCR4. À la lumière de ces résultats, il devenait primordial de réévaluer la sélectivité de molécules réputées pour cibler exclusivement le récepteur CXCR4, notamment de la molécule thérapeutique TC14012.

Ensuite, en plus de la chimiokine CXCL12, CXCR7 possède un autre ligand naturel, la chimiokine CXCL11 (Burns et al., 2006). La présence de ces deux ligands endogènes liant le même récepteur met de l'avant un concept important, celui de la sélectivité fonctionnelle. Il a été découvert que même s'il existe une ressemblance structurelle entre les chimiokines, elles peuvent avoir des rôles différents sur la signalisation intracellulaire (Zidar et al., 2009).

b. Hypothèses et objectifs de recherche de la thèse

Le but de cette thèse consiste à identifier et à mieux caractériser les mécanismes d'action de CXCR7, ce qui est essentiel pour le développement éventuel de molécules thérapeutiques sélectives à CXCR7. Pour atteindre ce but, deux hypothèses principales ont été adressées et sont l'objet des deux publications annexées à cette thèse (Gravel et al., 2010)(Gravel et al. en préparation).

- 1- Puisque nous avons démontré que l'AMD3100 était ni sélectif ni exclusif à CXCR4, en agissant comme agoniste sur CXCR7 en induisant le recrutement de la β -arrestine, nous avons émis notre première hypothèse de recherche:

Que la molécule thérapeutique TC14012, une molécule thérapeutique réputé pour cibler exclusivement le récepteur CXCR4 pourrait aussi cibler CXCR7 selon le concept de promiscuité des chimiokines.

Pour y répondre, nous avons les principaux objectifs suivants :

- 1- Déterminer si TC14012 interagit avec le récepteur CXCR7.
- 2- Déterminer si TC14012 agit comme agoniste sur ce dernier en induisant le recrutement de la β -arrestine.
- 3- Identifier les déterminants moléculaires du recrutement différentiel de la β -arrestine à CXCR7 et à CXCR4.

Pour répondre à cette hypothèse et à ces objectifs de recherche, nous avons effectué des essais de radio-liaison et des expériences de BRET pour évaluer le rôle de TC14012 sur le recrutement de la β -arrestine aux récepteurs. De plus, puisque la β -arrestine est typiquement recrutée à la partie C-terminale des 7TMRs, ces expériences auront nécessité la création de récepteurs mutants où les parties C-terminales des récepteurs ont été interchangées. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans une revue scientifique en 2010 (Gravel et al., 2010).

- 2- Puisqu'il a été démontré que plus d'une chimiokine pouvaient lier un même récepteur, et que celles-ci pouvaient induire des réponses de signalisation intracellulaire différentes (Berchiche et al., 2011; Burns et al., 2006; Zidar et al., 2009), nous avons émis notre deuxième hypothèse de recherche :

Que CXCL11 et CXCL12, des chimiokines endogènes de CXCR7, induisent une signalisation intracellulaire différentielles de la β -arrestine sur CXCR7.

Pour y répondre, nous avons les objectifs suivants :

- 1- Déterminer les différences de recrutement de la β -arrestine à CXCR7 en réponse à CXCL11 et CXCL12.
- 2- Déterminer l'impact du recrutement différentiel de la β -arrestine sur le transport intracellulaire de CXCR7.
- 3- Déterminer l'impact du recrutement différentiel de la β -arrestine sur la dégradation des chimiokines induites par CXCR7.

Pour répondre à cette hypothèse et à ces objectifs de recherche, nous avons généré des mutants ponctuels dans des résidus clés des motifs E/DRYLAIV et N(L/F)YSS, qui sont décrits dans la littérature pour être essentiel dans l'activation des récepteurs (Lagane et al., 2005; Rovati et al., 2007; Zhang et al., 2002). Nous avons évalué le recrutement de la β -arrestine par la technique de BRET. Nous avons étudié le transport intracellulaire du récepteur (c'est-à-dire la variation d'expression du récepteur à la surface cellulaire, son internalisation et son recyclage) par des expériences de cytométrie en flux. La dégradation des chimiokines a été évalué par des expériences de radioactivité. Ces travaux feront éventuellement l'objet d'une publication dans une revue scientifique (Gravel et al. en préparation).

RÉSULTATS

Article 1

THE PEPTIDOMIMETIC CXCR4 ANTAGONIST TC14012 RECRUITS β -ARRESTIN TO CXCR7 : ROLES OF RECEPTOR DOMAINS.

Le peptidomimétique de CXCR4, l'antagoniste TC14012 recrute la β -arrestine à CXCR7 : rôles des domaines du récepteurs.

Stéphanie Gravel, Camille Malouf, Philip E. Boulais, Yamina A. Berchiche. Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Richard Leduc, Daniel Sinnett et Nikolaus Heveker.

Journal of biological chemistry 2010; vol.283, no.49, pp. 37939-37943

CONTRIBUTON DES AUTEURS

En tant que premier auteur, j'ai participé à la confection, mise au point, production de tous les expériences. J'ai produit et analysé toutes les figures de ce papier. Également, j'ai participé à l'écriture du papier.

Camille Malouf a produit les chimères C-terminales des récepteurs CXCR4 et CXCR7 par mutagenèse dirigée et a procédé au séquençage de ces derniers.

Philip E. Boulais a participé aux expériences de compétition de radio-liaison du T140 avec le CXCL12 sur des cellules HEK293 exprimant le récepteur CXCR7(data not shown).

Yamina A. Berchiche a fourni des recommandations scientifiques et a participé à l'élaboration du projet.

Shinya Oishi et Nobutaka Fujii ont synthétisé et fourni les peptides TC14012, T140 et un de ses analogues, le FC131.

Richard Leduc et Daniel Sinnett ont fourni des recommandations scientifiques

Nikolaus Heveker a dirigé cette recherche afin de mener le projet à terme. Il a participé à l'élaboration du projet ainsi qu'à l'écriture du papier.

**THE PEPTIDOMIMETIC CXCR4 ANTAGONIST TC14012
RECRUITS β -ARRESTIN TO CXCR7 – ROLES OF RECEPTOR
DOMAINS-**

Stéphanie Gravel^{1,2}, Camille Malouf^{1,2}, Philip E. Boulais³, Yamina A. Berchiche^{1,2},
Shinya Oishi⁴, Nobutaka Fujii⁴, Richard Leduc³, Daniel Sinnett^{2,5}, and Nikolaus Heveker^{1,2}

From the ¹Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal H3T 1J4, Québec, Canada, the ²Research Centre/Hôpital Sainte-Justine, Montréal H3T 1C5, Québec, Canada, the ³Département de Pharmacologie, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4, the ⁴Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Japan and the ⁵Department of Pediatrics, Université de Montréal, Montréal H3T 1C5

Running title : TC14012 recruits β -arrestin to CXCR7

Correspondence : Nikolaus Heveker, Centre de Recherche, #6737 Hôpital Sainte-Justine, 3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada, Tel : (514) 345-4931 ext. 4190, Fax : (514) 345-4801, email : nikolaus.heveker@recherche-ste-justine.qc.ca

ABSTRACT

CXCR7 is an atypical chemokine receptor that signals through β -arrestin in response to agonists without detectable activation of heterotrimeric G-proteins. Its cognate chemokine ligand CXCL12 also binds CXCR4, a chemokine receptor of considerable clinical interest. Here we report that TC14012, a peptidomimetic inverse agonist of CXCR4, is an agonist on CXCR7. The potency of β -arrestin recruitment to CXCR7 by TC14012 is much higher than that of the previously reported CXCR4 antagonist AMD3100 and differs only by one log from that of the natural ligand CXCL12 (EC_{50} 350 nM for TC14012, compared to 30 nM for CXCL12 and 140 M for AMD3100). Moreover, like CXCL12, TC14012 leads to erk 1/2 activation in U373 glioma cells that express only CXCR7, but not CXCR4. Given that with TC14012 and AMD3100 two structurally unrelated CXCR4 antagonists turn out agonists on CXCR7, this likely reflects differences in the activation mechanism of the arrestin pathway by both receptors.

To identify the receptor domain responsible for these opposed effects, we investigated CXCR4 and CXCR7 C-terminus swapping chimeras. Using quantitative BRET, we find that the CXCR7 receptor core formed by the seven transmembrane domains and the connecting loops determines the agonistic activity of both TC14012 and AMD3100. Moreover, we find that the CXCR7 chimera bearing the CXCR4 C-terminal constitutively associates with arrestin in the absence of ligands.

Our data suggest that the CXCR4 and CXCR7 cores share ligand binding surfaces for the binding of the synthetic ligands, indicating that CXCR4 inhibitors should be tested also on CXCR7.

INTRODUCTION

CXCR4 is a seven transmembrane domain (7TMR) chemokine receptor of considerable clinical interest, involved in stem cell homing to bone marrow niches, cancer biology and metastasis, and HIV infection. Synthetic CXCR4 ligands are being developed, and the CXCR4 blocker AMD3100 has reached the clinic for the mobilization of hematopoietic stem cells from donor bone marrow. The natural CXCR4 ligand, the chemokine CXCL12 (also called SDF-1), has later been found to also bind the atypical chemokine receptor CXCR7, which in addition recognizes the chemokine CXCL11 (also called I-TAC)(1,2). CXCR7 is atypical in that no classical heterotrimeric G-protein signalling pathways are observed, and that it does not induce chemotaxis of motile cells. However, CXCR7 sets off G-protein-independent signalling via the β -arrestin pathway, leading to activation of the erk1/2 kinases (3,4). Functionally, CXCR7 has been implicated in cancer cell growth and transendothelial migration (2,5,6). Intriguingly, CXCR7 and CXCR4 can heteromerize, and this attenuates CXCR4 G-protein signalling (7,8). Modulation of CXCR4 functions has been suggested as a major role of CXCR7 (9).

Given that CXCR4 and CXCR7 share a natural chemokine ligand, we have previously tested the effects of AMD3100 on CXCR7, and found that it induces arrestin recruitment at high doses on this receptor, contrary to its effect on CXCR4 (3). This finding prompted us to investigate another, structurally unrelated CXCR4 inhibitor. T140 is a horseshoe crab polyphemusin-derived peptidomimetic described as an inverse agonist of CXCR4 (10-12). Here we report that TC14012, a serum stable derivative of T140 (13), recruits β -arrestin 2 to CXCR7.

In CXCR4 and CXCR7, the main element controlling arrestin recruitment in response to CXCL12 is located in the receptor C-terminus (6,14). Using C-terminal swapping mutants of CXCR4 and CXCR7, we demonstrate that the CXCR7 core receptor, formed by the transmembrane helices and the connecting loops, but not the CXCR7 C-terminus, is the determinant for the agonist activity of structurally unrelated synthetic CXCR4 blockers on the arrestin pathway mediated by CXCR7.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents

Recombinant CXCL12 was from peprotech, AMD3100 from Sigma, and ¹²⁵I-CXCL12 from Perkin Elmer. TC14012 was synthesized as described (13).

Cell culture and transfections

Human embryonic kidney (HEK) 293E cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent, Rocklin, CA), 100 units/ml penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine (Invitrogen). Transient transfections were performed in six-well dishes using the polyethylenimine (Polysciences, Warrington, PA) method.

Plasmids

CXCR4-YFP and CXCR7-YFP have been described previously (3). Plasmids encoding β -arrestin 2-Rluc (a generous gift of Michel Bouvier) have been described previously (15). To generate the C-terminal chimeras, a unique BsiWI restriction site was

inserted in CXCR4-YFP (position 916 of the CXCR4 cDNA sequence) and CXCR7-YFP (position 955 of the CXCR7 cDNA sequence) using the QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratgene), according to the manufacturer's instructions. The C-terminal domains were excised by BsiWI/NotI digestion and ligation of the resulting fragments into the respective opposite plasmid. Following ligation, the BsiWI site was removed by site-directed mutagenesis, restoring the respective CXCR7 and CXCR4 sequences. DNA constructions were verified by direct sequencing using the Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Nanuq platform, McGill University and Génome Québec Innovation Center, Montreal, Canada). The primers used for the site-directed mutagenesis were:

CXCR4mut916BsiWI,CATCCTCTATGCTTTCCTCGTACGCAAATTTAAAACCTCTGCC

CXCR7mut955BsiWI,CCCTGTCCTCTACAGCTTCATCGTACGCAACTACAGGTACGAG

C CXCR4-X7Cter-WT,CATCCTCTATGCTTTCCTTAATCGCAACTACAGGTACGAGC

CXCR7-X4Cter-

WT,CCCTGTCCTCTACAGCTTCATCGGAGCCAAATTTAAAACCTCTGCCC.

Radioligand binding assays

Cell membrane preparation and binding assays were performed as described previously (16) with minor modifications. Briefly, HEK293E cells expressing the respective receptor were washed once with PBS and subjected to one freeze–thaw cycle. Broken cells were then gently scraped in resuspension buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM CaCl₂ and 5 mM MgCl₂), centrifuged at 3500 g for 15 min at 4°C and resuspended in binding buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM CaCl₂ 5 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 0,5% BSA). For

competition binding assays, broken cells (1 μ g of protein) were incubated for 1 h at room temperature in binding buffer with 0.03 nM of 125 I-SDF-1 α as a tracer and increasing concentrations of competitor in a final volume of 0.5 ml. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration and receptor-bound radioactivity was quantified by γ -radiation counting.

BRET Measurements

β -arrestin recruitment was measured by BRET essentially as described previously (17). HEK293T cells were cotransfected with 1 μ g of receptor-eYFP construct with 0.05 μ g of β -arrestin 2-RLuc. For [acceptor]/[donor] titrations 0.05 μ g of β -arrestin 2-RLuc were cotransfected with increasing amounts of the receptor-eYFP construct. All transfections were completed to 2 μ g per well with empty vector. Following overnight culture, transiently transfected HEK293 cells were seeded in 96-well, white, clear-bottom microplates (ViewPlate; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) coated with poly(D-lysine) and left in culture for 24 h. Cells were washed once with PBS and the RLuc substrates coelenterazine h (NanoLight Technology, Pinetop, AZ) added at a final concentration of 5 μ M per well with empty vector. Following overnight culture, transiently transfected HEK293 cells were seeded in 96-well, white, clear-bottom microplates (ViewPlate; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) coated with poly(D-lysine) and left integration of the signals detected in the 460 to 500 nm (luciferase) and 510 to 550 nm (YFP) windows. The BRET signal was calculated as the ratio of light emitted by acceptor (YFP) over the light emitted by donor (RLuc). The values were corrected to net BRET by subtracting the background BRET signal obtained

in cells transfected with the Rluc construct alone. β -arrestin recruitment was measured 30 minutes after ligand addition.

Flow Cytometric Analysis

Receptor cell surface expression was confirmed by flow cytometry. The following antibodies were used for staining: anti-CXCR7-APC (clone 358426) and anti-CXCR4-APC (clone 12G5, both R&D systems). Cells were washed three times in ice-cold PBS resuspended and stained with antibody for 30 min at 4°C. After a final wash, the cells were resuspended in 0.5% paraformaldehyde and analyzed using a FACSCalibur Flow Cytometer (BD Bioscience).

Data Analysis

Data from BRET assays were the mean of independent experiments each of which was performed in triplicate. Curve-fitting by nonlinear regression and statistical analysis was conducted using Graph-Pad Prism 4 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical significance of the differences between more than two groups was calculated by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-test.

RESULTS

β -arrestin recruitment to CXCR7 by TC14012. We previously found that a small molecule antagonist of CXCR4, AMD3100, acted as an agonist on CXCR7, in that it induced recruitment of β -arrestin 2 to the receptor, albeit with low potency. Based on this finding, we tested whether this property was shared by different CXCR4 inhibitors. We thus tested the ability of TC14012, a serum stable derivative of the peptidomimetic T140, to induce recruitment of β -arrestin 2 to CXCR7, using a previously reported BRET-based experimental system (17). As shown in Figure 1A, TC14012 was found to be a potent and efficient agonist of β -arrestin recruitment to CXCR7, with an apparent EC_{50} of 350 nM. This is almost 3 log more potent than AMD3100 (EC_{50} of 138 M), and approximately one log less potent than the efficiency of the cognate CXCR7 chemokine ligand CXCL12 in this system (30 nM). The EC_{50} is in line with the IC_{50} of TC14012 observed in radioligand displacement assays using HEK293 cells stably expressing CXCR7 and radiolabelled CXCL12 (K_i of 157 nM \pm 36, n=3, data not shown). These experiments show that the previously reported capacity of AMD3100 to recruit β -arrestin to CXCR7 is shared by a second, structurally unrelated CXCR4 antagonist. To further confirm signalling downstream of arrestin (4), we addressed erk phosphorylation by TC14012 *via* CXCR7 in untransfected U373 glioma cells that express endogenous CXCR7 but no CXCR4, unlike HEK293 cells that express trace amounts of both receptors. TC14012, like CXCL12, leads to sustained erk 1/2 phosphorylation in these cells (supplementary figure S1).

Design and expression of CXCR4/CXCR7 chimeras. While limited receptor selectivity of synthetic chemokine receptor ligands is not uncommon, we were intrigued by the finding that both shared ligands of CXCR4 and CXCR7 had antagonistic activity on CXCR4, while they agonistically induced β -arrestin recruitment to CXCR7. Our interpretation is that these divergent effects are not fortuitous, but rather indicate differences between the two receptors in the activation mechanism of β -arrestin recruitment. Such differences might be due to differences in regulatory determinants for the recruitment of arrestin encoded by the receptor C-termini. Alternatively, differences between the CXCR4 and CXCR7 cores could entail different ligand-induced receptor rearrangements that translate into inhibition of arrestin recruitment in one case, but activation in the other.

To address this issue, we constructed chimeric CXCR4/CXCR7 receptors, by exchanging the C-terminal domains of one receptor onto the other (named CXCR4-Cter7 and CXCR7-Cter4, supplemental figure S2A). All constructs were expressed at the cell surface and detected by respective monoclonal antibodies by flow cytometry (supplemental figure S2B), suggesting no major alterations in overall receptor conformation.

β -arrestin recruitment to chimeric receptors induced by natural and synthetic ligands. Using the respective receptors/chimeras, we then tested β -arrestin recruitment induced by the different ligands in dose-response experiments (Figure 1 and Table 1). Significantly higher BRET was observed with the CXCR7-Cter4 chimera in the absence of ligand, suggesting constitutive recruitment of arrestin by this chimera. Upon

stimulation with TC14012, CXCR7 and the CXCR7-Cter4 chimera were able to recruit arrestin, while CXCR4 and CXCR4-Cter7 remained silent. A similar pattern was observed with AMD3100. These data show that it is the core of CXCR7, and not its C-terminus, that is responsible for the CXCR7 response to the synthetic ligands.

The use of quantitative BRET permitted additional observations concerning the respective responses to CXCL12. The responses of CXCR7 and the CXCR4-Cter7 chimera were significantly more potent (EC_{50} of 30 and 58 nM, respectively) than those of CXCR4 and the CXCR7-Cter4 chimera (EC_{50} of 242 and 191 nM, respectively) (CXCR4 versus CXCR7 $p < 0.01$; CXCR4 versus CXCR4-Cter7 and CXCR7 versus CXCR7-Cter4 $p < 0.05$; see also Table 1). This suggests that, unlike the ability to respond to TC14012, the potency of the response to CXCL12 was determined by the respective C-termini, possibly reflecting their effectiveness in translating ligand-induced conformational changes into arrestin recruitment. We cannot formally exclude the possibility that this was due to the C-terminal YFP BRET-fusion that might affect the regulatory function of this domain. However, our observation that the potency of arrestin recruitment to CXCR7 was identical in an alternative BRET system with unfused CXCR7 and a dual-brilliance RLuc-arrestin-YFP fusion ((18), data not shown), speaks against a role of the fusion for potency and supports the idea that the receptor C-terminus indeed determines the potency of the arrestin response.

Spontaneous arrestin recruitment to CXCR7-Cter4 in absence of ligand. To further evaluate the constitutive BRET signal yielded by the CXCR7-Cter4 chimera, we performed BRET acceptor/donor titrations in the absence and presence of 100 nM

CXCL12. In the absence of chemokine, CXCR7-YFP titrations over β -arrestin 2-RLuc yielded a straight line representing increasing nonspecific bystander BRET (19), in line with the absence of baseline arrestin recruitment (supplemental Figure S3). However, the CXCR7-Cter4 chimera yielded a saturable hyperbolic curve, in line with specific BRET resulting from spontaneous arrestin recruitment by this chimera in the absence of ligand. Indeed, in simultaneous curve fitting analysis, the preferred model for the curve yielded by CXCR7-Cter4 in the absence of ligand was consistently hyperbolic ($p < 0.001$, $n = 4$), unlike for CXCR7, where the preferred model in the absence of ligand was a straight line, suggesting only non-specific BRET in the absence of ligand (19). In the presence of 100nM CXCL12, [acceptor]/[donor] titrations of both receptors yielded specific BRET as hyperbolic curves. The $BRET_{50}$ is a measure of the propensity with which an interaction takes place (19). Remarkably, in simultaneous curve fittings the $BRET_{50}$ of the CXCR7-Cter4 mutant is significantly smaller in the presence of the chemokine than in its absence ($p < 0.001$ in 3 out of 4 experiments, and $p < 0.01$ in 1 out of 4). This indicates that the constitutive activity of the CXCR7-Cter4 chimera is further activated by the presence of CXCL12.

DISCUSSION

The main finding of the present report is that the polyphemusin derivative TC14012, a CXCR4 inverse agonist (11,12), also binds CXCR7, but acts here as an agonist of the arrestin pathway. While this is similar to the previously reported agonist activity on CXCR7 of the structurally unrelated CXCR4 inhibitor AMD3100, TC14012 is a much more potent arrestin-recruiting agonist on CXCR7 than AMD3100 (EC_{50} of 350 nM for TC14012 *versus* 140 M for AMD3100), and only one log weaker than the natural chemokine agonist CXCL12 (35 nM). Given that AMD3100 and TC14012 are structurally unrelated, and that both receptors also share a natural ligand, we envision that, rather than being fortuitous, the cross reactivity of both synthetic ligands results from structural similarities of the ligand-binding surfaces of CXCR4 and CXCR7, despite a limited sequence homology of 31%.

Lack of selectivity for one given chemokine receptor of synthetic ligands has hampered the development of drug candidates targeting chemokine receptors, and our results suggest that newly developed CXCR4 inhibitors should be routinely tested also on CXCR7. However, previous work with different T140 analogues (20), and the recent finding that the small molecule FC131 does not bind to CXCR7 (21) and does not induce arrestin recruitment to CXCR7 (S.G. and N.H., not shown) indicate that CXCR4 inhibitors do not inherently also bind CXCR7, and that receptor selectivity can be achieved. To our knowledge, synthetic chemokine receptor ligands that exert opposite effects on two different chemokine receptors are still unreported. Of note, receptor promiscuity being a hallmark of natural chemokine receptor ligands, such inverse action on different receptors also exists among natural chemokine receptor ligands (such as the

opposite effects of eotaxin-1 on CCR2 and CCR3), but the structural basis for these opposite effects remains yet unknown, for both synthetic and natural ligands. While non-selectivity of synthetic 7TMR ligands is generally seen as a drawback in drug development, simultaneous agonism on one receptor and antagonism on a second one might actually be of advantage in specific settings. This emerging concept especially applies to 7TMRs that functionally and/or physically interact, and that share endogenous ligands. For example, simultaneous activation of the μ -opioid (MOR) receptor and inhibition of the δ -opioid (DOR) receptor is a desired property that has been shown to positively alter the side-effect profile (tolerance and dependence) of analgesics such as morphine, which activates both MOR and DOR (22). In this context, the documented physical and functional interactions between CXCR4 and CXCR7 (5,7,8), both binding the chemokine CXCL12, should be kept in mind. CXCR4 inhibition interferes with cancer biology at multiple steps including cancer cell growth and dissemination. Moreover, synthetic ligands of CXCR7, CCX451, CCX754 and CCX771 also reduce tumor growth and transendothelial migration (2,6). Interestingly, rather than being CXCR7 inhibitors, at least CCX771 turned out to be a potent activator of arrestin recruitment to CXCR7 (6). Taken together, these data suggest that simultaneous inhibition of CXCR4 and activation of CXCR7 might indeed be of interest in the context of cancer treatment.

The results obtained with CXCR4/CXCR7 C-terminus swapping chimera identified the receptor core as the determinant for the agonistic activity of TC14012 and AMD3100 on CXCR7, since the compounds induced arrestin recruitment also to the CXCR7-Cter4 chimera, but not to receptors containing the CXCR4 core. This finding was unexpected in

so far as that for both CXCR4 and CXCR7 the C-terminus is a crucial arrestin recruitment determinant. Phosphorylation of C-terminal serine residues promotes β -arrestin 2 recruitment to CXCR4 (14), and deletion of 43 CXCR7 C-terminal residues results in loss of arrestin recruitment (6). Generally, 7TMR activation of the β -arrestin pathway is regulated by the receptor C-terminus, which undergoes conformational changes after ligand binding to the receptor core, and β -arrestin recruitment is promoted by the phosphorylation of the C-terminus. Our finding that the potency of arrestin recruitment in response to CXCL12 depends on the receptor C-terminus is in line with a regulatory role of this domain. While independence of arrestin recruitment from receptor phosphorylation (but still dependent on the receptor C-terminus) has been described for some 7TMRs, among which is the chemokine scavenger receptor D6 which constitutively recruits β -arrestin (23), we find that CXCR7, which has also been suggested to be a chemokine scavenger receptor (24,25), does not constitutively recruit β -arrestin. In this context, our finding that the CXCR7-Cter4 chimera associates with β -arrestin in the absence of ligand is intriguing, and might reflect the overall greater proclivity of CXCR7 to recruit arrestin.

The opposite effects of TC14012 and AMD3100 on CXCR4 and CXCR7 reflect thus differences between their respective activation mechanisms of the arrestin pathway that are located in the receptor core. Despite growing information about interactions that contribute to binding of chemokines to their receptors (mostly involving the structured chemokine core and the receptor N-terminus), the chemokine receptor determinants for activation remain still elusive. Similar to other studied chemokine-receptor couples, CXCR4 activation requires the flexible N-terminus of the chemokine, and in particular

the lysine and proline residues in position 1 and 2 of CXCL12 (26). However, to date, and because of the lacking identification of receptor residues that are directly involved in interactions with the chemokine N-terminus, only speculative models of chemokine receptor activation have been forwarded. This remains true despite the recent publication of the CXCR4 crystal structure in presence of small antagonists (27). With reference to earlier models (26), a recent report puts forward the hypothesis that insertion of the CXCL12 N-terminus into the cavity formed by the CXCR4 transmembrane helices was required for activation, similar to binding pockets for small agonists of other class A 7TMRs (28). This is supported by data that show that AMD3100 prevents interaction of the CXCL12 N-terminus with this cavity, but not other receptor-chemokine interactions (28).

Following this model, our results indicate that CXCR7 activation does not require the CXCL12 N-terminus interaction in the same way as does CXCR4, since activation by the chemokine is not blocked by the small molecule ligands. Rather, CXCR7 activation determinants actually overlap with the AMD3100/CXCR7 and TC14012/CXCR7 interaction determinants, since both ligands promote CXCR7 activation. Intriguingly, with CXCR4, the interactions of both compounds have been mapped to the transmembrane domain/extracellular loop intersection rather than to the depth of the transmembrane crevice (11,29,30). At least for AMD3100, a similar binding mode to both CXCR4 and CXCR7 can be inferred by the conservation of CXCR4 key residues D171 and D262 for AMD3100 interaction in CXCR7. It is thus tempting to speculate that CXCR7 activation determinants are rather close to the surface, while those of CXCR4 are

located deeper in the crevice of the receptor. More work about the respective activation mechanisms of CXCR4 and CXCR7 by CXCL12 will be needed to test this hypothesis.

REFERENCES

1. Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005) *J Biol Chem* **280**, 35760-35766
2. Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Kuo, C. J., Wei, K., McMaster, B. E., Wright, K., Howard, M. C., and Schall, T. J. (2006) *J Exp Med* **203**, 2201-2213
3. Kalatskaya, I., Berchiche, Y. A., Gravel, S., Limberg, B. J., Rosenbaum, J. S., and Heveker, N. (2009) *Mol Pharmacol* **75**, 1240-1247
4. Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., Gerard, C., and Lefkowitz, R. J. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 628-632
5. Hartmann, T. N., Grabovsky, V., Pasvolsky, R., Shulman, Z., Buss, E. C., Spiegel, A., Nagler, A., Lapidot, T., Thelen, M., and Alon, R. (2008) *J Leukoc Biol* **84**, 1130-1140
6. Zabel, B. A., Wang, Y., Lewen, S., Berahovich, R. D., Penfold, M. E., Zhang, P., Powers, J., Summers, B. C., Miao, Z., Zhao, B., Jalili, A., Janowska-Wieczorek, A., Jaen, J. C., and Schall, T. J. (2009) *J Immunol* **183**, 3204-3211
7. Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., Harvey, R. P., Martinez, A. C., Mackay, C. R., and Mackay, F. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14759-14764
8. Levoe, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., and Lagane, B. (2009) *Blood* **113**, 6085-6093
9. Thelen, M., and Thelen, S. (2008) *Journal of neuroimmunology* **198**, 9-13

10. Tamamura, H., Xu, Y., Hattori, T., Zhang, X., Arakaki, R., Kanbara, K., Omagari, A., Otaka, A., Ibuka, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., and Fujii, N. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 877-882
11. Trent, J. O., Wang, Z.-x., Murray, J. L., Shao, W., Tamamura, H., Fujii, N., and Peiper, S. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47136-47144
12. Zhang, W. B., Navenot, J. M., Haribabu, B., Tamamura, H., Hiramatsu, K., Omagari, A., Pei, G., Manfredi, J. P., Fujii, N., Broach, J. R., and Peiper, S. C. (2002) *J Biol Chem* **277**, 24515-24521
13. Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Gotoh, K., Kanamoto, T., Xu, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Hattori, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., Otaka, A., and Fujii, N. (2001) *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 1897-1902
14. Busillo, J. M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., and Benovic, J. L. (2010) *J Biol Chem* **285**, 7805-7817
15. Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., and Bouvier, M. (2003) *EMBO J* **22**, 3816-3824
16. Boulais, P. E., Dulude, D., Cabana, J., Heveker, N., Escher, E., Lavigne, P., and Leduc, R. (2009) *Biochem Pharmacol* **78**, 1382-1390
17. Hamdan, F. F., Audet, M., Garneau, P., Pelletier, J., and Bouvier, M. (2005) *J Biomol Screen* **10**, 463-475
18. Charest, P. G., Terrillon, S., and Bouvier, M. (2005) *EMBO Rep* **6**, 334-340
19. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J Biol Chem* **277**, 44925-44931
20. Oishi, S., Masuda, R., Evans, B., Ueda, S., Goto, Y., Ohno, H., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Wang, Z., Peiper, S. C., Naito, T., Kodama, E., Matsuoka, M., and Fujii, N. (2008) *Chembiochem* **9**, 1154-1158
21. Narumi, T., Hayashi, R., Tomita, K., Kobayashi, K., Tanahara, N., Ohno, H., Naito, T., Kodama, E., Matsuoka, M., Oishi, S., and Fujii, N. (2010) *Org Biomol Chem* **8**, 616-621
22. Schiller, P. W. (2009) *Life Sci* **86**, 598-603

23. Galliera, E., Jala, V. R., Trent, J. O., Bonecchi, R., Signorelli, P., Lefkowitz, R. J., Mantovani, A., Locati, M., and Haribabu, B. (2004) *J Biol Chem* **279**, 25590-25597
24. Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008) *Cell* **132**, 463-473
25. Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleshwar, H., Raz, E., Zerwes, H. G., Rot, A., and Thelen, M. (2010) *PLoS One* **5**, e9175
26. Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., and Clark-Lewis, I. (1997) *EMBO J* **16**, 6996-7007
27. Wu, B., Chien, E. Y. T., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F. C., Hamel, D. J., Kuhn, P., Handel, T. M., Chertzov, V., and Stevens, R. C. (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. in *Science Express*
28. Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., Hirose, M., Maeda, Y., Takahashi, H., Terashima, Y., Matsushima, K., and Shimada, I. (2009) *J Biol Chem* **284**, 35240-35250
29. Labrosse, B., Brelot, A., Heveker, N., Sol, N., Schols, D., De Clercq, E., and Alizon, M. (1998) *J Virol* **72**, 6381-6388
30. Gerlach, L. O., Skerlj, R. T., Bridger, G. J., and Schwartz, T. W. (2001) *J Biol Chem* **276**, 14153-14160

FOOTNOTES

* This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan. S.G was supported by scholarships of the the “Fondation de l’Hôpital Sainte-Justine” and the “Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament”, C.M. by the “Fonds de la recherche en santé du Québec” (FRSQ), and P.E.B. and Y.A.B. by CIHR fellowships. N.H. is a CIHR New Investigator, D.S. holds the François-Karl

Viau Chair in Pediatric Oncogenomics and is a scholar of the FRSQ, and R.L. is a “Chercheur National” of the FRSQ. We are indebted to Geneviève Saint-Onge, Marie-Ève Pelletier and Guillaume Sylvian-Drolet for expert technical assistance.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of natural and synthetic ligands on the β -arrestin recruitment to CXCR4, CXCR7, and receptor chimeras. HEK293 cells transiently coexpressing β -arrestin 2-RLuc as a BRET donor and respective receptors fused to the BRET acceptor YFP were stimulated with the indicated concentrations of CXCL12 (grey circles), TC14012 (black circles), or AMD3100 (open circles). Resulting BRET measurements are given as BRET_{net}. Data are mean values from five to nine (CXCL12) or three to seven (TC14012 and AMD3100) independent experiments, each performed in triplicate. For statistical analysis see Table 1. **A:** CXCR7; **B:** CXCR4; **C:** CXCR7-Cter4; **D:** CXCR4-Cter4.

Table 1: The table summarizes the curve parameters of the activation of arrestin recruitment to the different receptors and chimera by CXCL12, TC14012, and AMD3100 shown in Figure 1. The differences in EC₅₀ upon stimulation with CXCL12 were statistically significant between CXCR4 and CXCR7 (p<0.001); CXCR4 and CXCR4-Cter7 (p<0.05); and between CXCR7 and CXCR7-Cter4 (p<0.01) (one way ANOVA with Tukey's post test). The difference of the curve bottom between CXCR7-Cter4 and all other receptor was also significant (p<0.001). The difference of the curve bottom between CXCR7 and CXCR4 was not statistically significant. The very high EC₅₀s observed for AMD3100 (1.5 and 0.5 mM) on CXCR4 and CXCR4-Cter7 may reflect experimental artefacts at extreme doses of the compound (higher than those applied in our previous report (3)). Alternatively, they may represent weak agonist activity of AMD3100 also on CXCR4, in line with its previous description as a partial agonist (11,19).

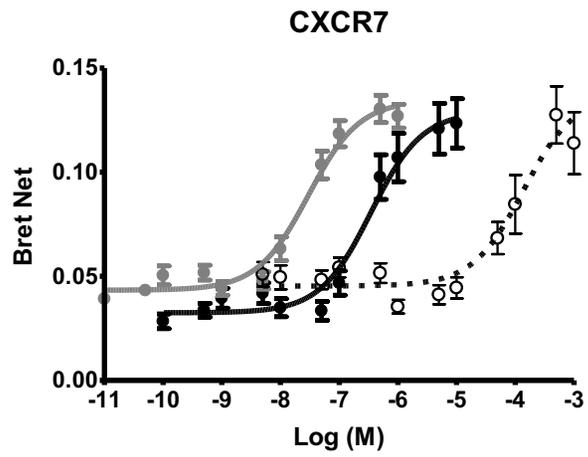
TABLE 1:

Curve fitting parameters of arrestin recruitment to CXCR4, CXCR7, and the respective chimeras

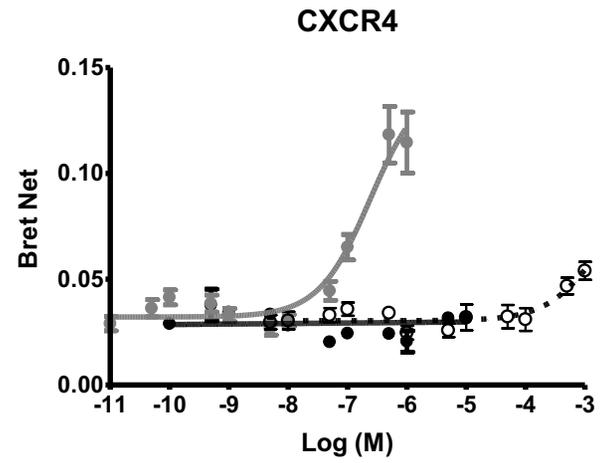
receptor	CXCL12					TC14012					AMD3100				
	EC ₅₀ (nM)	logEC ₅₀ ± SEM	top	bottom	n	EC ₅₀ (nM)	logEC ₅₀ ± SEM	top	bottom	n	EC ₅₀ (nM)	logEC ₅₀ ± SEM	top	bottom	n
CXCR4	242	-6,62±0,17	0,14±0,01	0,03±0,00	6	N/A	N/A	N/A	N/A	3	1629	-2,79±0,98	0,09±0,11	0,03±0,00	3
CXCR7	30	-7,52±0,09	0,13±0,00	0,04±0,00	9	350	-6,46±0,14	0,13±0,01	0,03±0,00	7	138	-3,86±0,19	0,14±0,01	0,05±0,00	3
CXCR4- CtailX7	56	-7,25±0,21	0,07±0,00	0,03±0,00	5	N/A	N/A	N/A	N/A	3	570	-3,24±0,55	0,07±0,03	0,03±0,00	3
CXCR7- CtailX4	191	-6,90±0,14	0,27±0,01	0,11±0,00	6	313	-6,51±0,17	0,31±0,01	0,14±0,01	3	154	-3,81±0,34	0,26±0,03	0,14±0,01	3

Figure 1

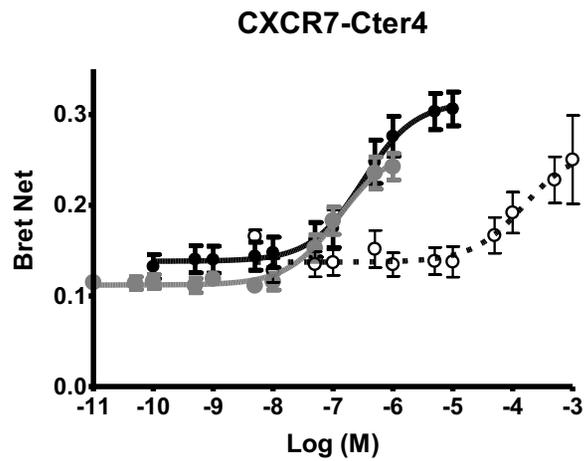
A



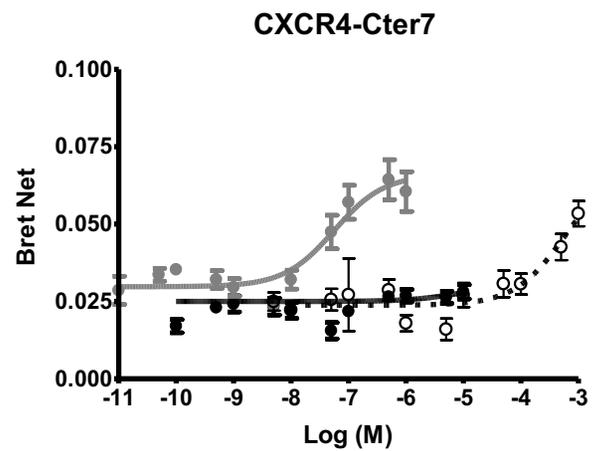
B



C



D



Supplemental Methods :

Erk 1/2 phosphorylation

U373 cells were lysed in culture plate using Laemmli reducing buffer (75mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 15% glycerol, 0.15mM DTT with bromophenol blue). Protein samples were resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) then electrotransferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Roche Diagnostics) for immunoblotting. Following transfer, membranes were blocked with 5% nonfat milk in PBS-T (1X PBS + 0,1% Tween20) for 1h at room temperature then probed with primary antibody (anti-Phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204) Erk1/2 (Cell Signaling Technology) diluted in 5% milk PBS-T overnight at 4°C. The blots were washed three times in PBS-T, and then incubated for 1h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated (HRP) secondary antibody (HRP-conjugated sheep anti-rabbit IgG, Millipore) diluted in 5% milk PBS-T. Labels were detected by chemiluminescence using the western lightning™ plus ECL system (PerkinElmer). Membranes were then stripped using stripping buffer (62,5mM Tris-HCl, pH 6.8, 100mM Beta-mercaptoethanol, 10% SDS), at 50°C in a rotating oven for 30 minutes, and reblotted using antibody against total erk 1/2 antibody (Cell Signaling Technology) as a primary antibody as a loading control.

Quantitative PCR

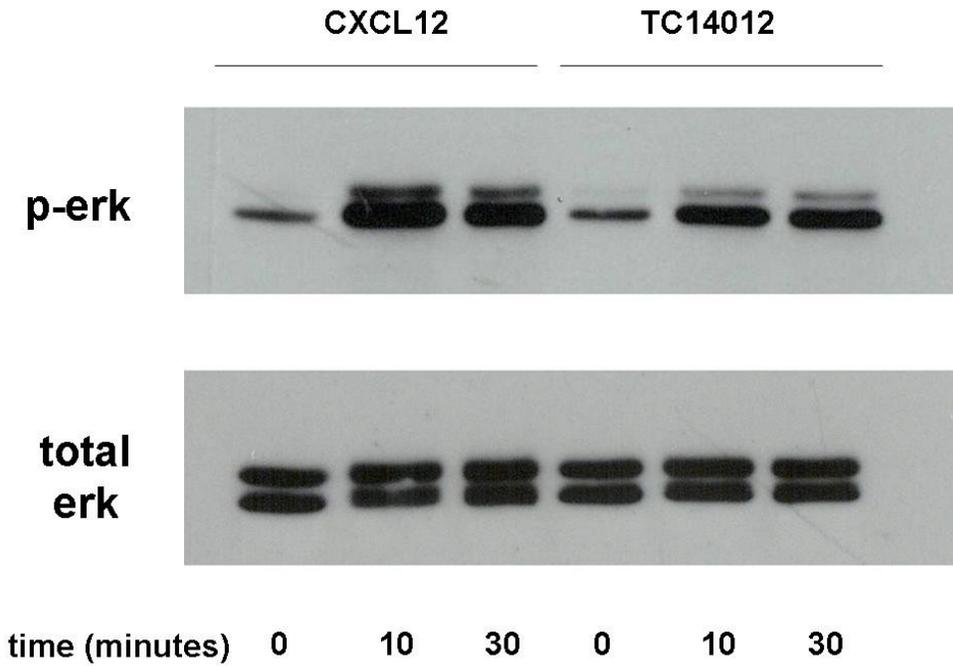
Total RNA was extracted from U373 cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies) according to manufacturer's instruction. RNA was quantified using a spectrophotometer. First strand cDNA was synthesized using 1 µg of total RNA and the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) ((Invitrogen, Life Technologies) with an oligo-dT₁₈ primer. The expression of CXCR4 and CXCR7 were analyzed by quantitative PCR (qPCR) with glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH) as an internal control. Gene expression level for endogenous control was determined using pre-validated Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems <http://www.appliedbiosystems.com/>). QPCR reactions in 384 well plate were performed using 1.5 µl of cDNA samples (5-25 ng), 5µl of the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.5 µl of the TaqMan Gene Expression Assay (20X) (Applied Biosystems, human GAPDH #Hs00266705) and 3 µl of water in a total volume of 10 µl. CXCR4 and CXCR7 gene expression levels were determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche (www.universalprobelibrary.com). QPCR reactions for 384-well plate format were performed using 1.5 µl of cDNA samples (5-25 ng), 5 µl of the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µM of each primer and 1 µM of a UPL probe in a total volume of 10 µl. The following probes as well as pairs of forward and reverse primer sets were used: CXCR4 UPL probe # 18, 5'-ggtggtctatgttggcgtct-3' and 5'actgacgttggcaaagatga-3; CXCR7 UPL probe 37, 5'-cggagtactctgccttggag-3' and 5'-caagtaaaccctcccagag-3'. The ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 5 sec and 60°C for 30 sec. All reactions were run in triplicate. The relative abundance of CXCR4 and CXCR7 in U373 cell line was calculated relative to the expression of the internal control GAPDH. Relative expression = $2^{-(C_t - C_{t0})} \times 1000$, where x_t is the difference between the Ct values of CXCR4 or CXCR7 and GAPDH. Quantitative RT-PCR was performed at the IRIC (Institute de recherche en immunologie and cancerologie, Université de Montréal) genomics core facility.

Supplemental Figure 1:

TC14012 leads to erk 1/2 phosphorylation in U373 cells, which express endogenous CXCR7 but not CXCR4.

Supplemental Figure S1A:



Supplemental Figure S1B:

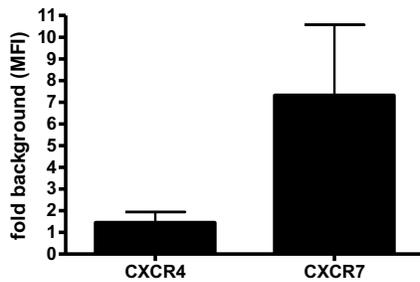
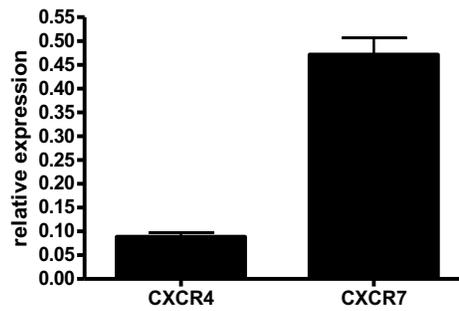


Fig Supplemental Figure S1C:



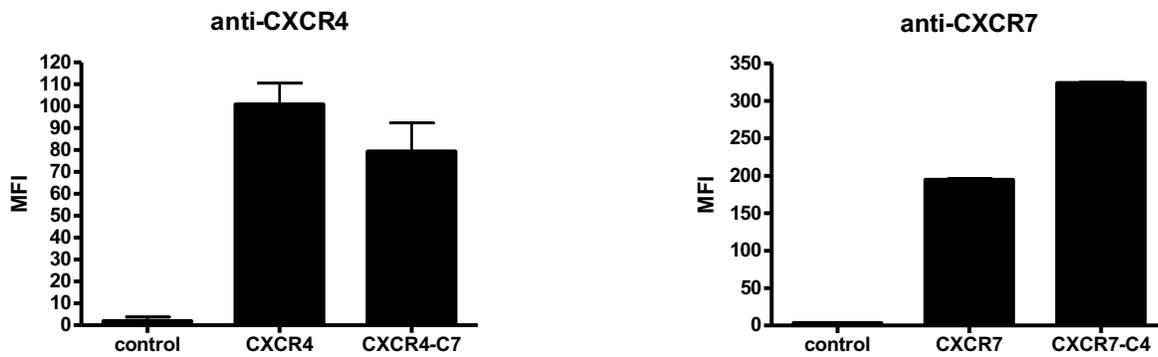
Supplemental figure S1: erk 1/2 phosphorylation. Figure S3A: TC14012, like SDF-1, leads to erk phosphorylation in U373 cells, indicating the relevance of beta-arrestin recruitment to CXCR7 by TC14012 for productive signalling. One representative experiment out of three is shown. U373 glioblastoma cells were chosen because they express endogenous CXCR7, but not CXCR4. CXCR4 and CXCR7 protein expression are shown in Figure S1B, detected by flow cytometry using monoclonal antibodies 12G5 (anti-CXCR4) and 358426 (anti-CXCR7). Values are expressed as fold increase of mean fluorescence intensity (MFI) compared to isotype control. The results are coherent with CXCR4 and CXCR7 mRNA expression in U373 cells (Figure S1C), detected by quantitative RT-PCR). Expression levels of the two receptors were normalized to the expression of the internal control GAPDH. Data shown are means of duplicates of three (flow cytometry) or two (Q-PCR) independent experiments and error bars correspond to standard error of mean.

Supplemental Figure S2A:

362	<p>CXCR7 NPVLYSFINRNYRYELMKA--FIFKYSAKTGLTKLIDASRVS-ETEYSALEQSTK</p> <p>NP+LY+F+ ++ A + + S+ L+K S TE + +</p>
352	<p>CXCR4 NPILYAFILGAKFKTSAQHALTSVSRGSSSLKILSKGKRGHSSVSTESESSSFHSS</p>

Supplemental Figure 2A: Alignment of the C-termini of CXCR7 and CXCR4. The reciprocally swapped residues in the chimera are highlighted.

Supplemental Figure S2B:



Supplemental Figure 2B: Surface expression of chimeric receptors. HEK293 cells transiently expressing the receptors were stained with anti-CXCR4 or anti-CXCR7 monoclonal antibodies coupled to the fluorochrome allophycocyanin (APC) and receptor surface expression measured by flow cytometry (FACSCalibur, BD biosciences). Results from two independent experiments are expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

Article 2

LIGAND SELECTIVE BETA-ARRESTIN RECRUITMENT AND INTRACELLULAR TRAFFICKING OF THE CHEMOKINE RECEPTOR ACKR3 / CXCR7.

Le recrutement de la beta-arrestine et le transport intracellulaire du récepteur de chimokine ACKR3 / CXCR7 sont ligand sélectif.

Stéphanie Gravel, Nicolas Montpas, Guillaume Sylvain-Drolet et Nikolaus Heveker.

En préparation pour soumission prochaine

CONTRIBUTION DES AUTEURS

En tant que premier auteur, j'ai participé à la confection, mise au point, production de tous les expériences. J'ai produit et analysé toutes les figures de ce papier. Également, j'ai écrit le papier en entier.

Nicolas Montpas a participé à la mise au point des expériences de variation d'expression, d'internalisation, de recyclage et de dégradation.

Guillaume Sylvain-Drolet a participé à la création et au séquençage des mutants du récepteur CXCR7. Il a aussi participé aux expériences de radio-liaison par compétition.

Nikolaus Heveker a participé à l'élaboration du projet et a dirigé celui-ci.

LIGAND SELECTIVE BETA-ARRESTIN RECRUITMENT AND INTRACELLULAR TRAFFICKING OF THE CHEMOKINE RECEPTOR ACKR3 / CXCR7

Stéphanie Gravel, Nicolas Montpas, Guillaume Sylvain-Drolet and Nikolaus Heveker

From the Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal H3T 1J4, Québec, Canada and the Research Centre/Hôpital Sainte-Justine, Montréal H3T 1C5, Québec, Canada

Running title: CXCR7 beta-arrestin recruitment and recycling is ligand selective

To whom correspondence should be addressed: Nikolaus Heveker, Centre de Recherche, #6737 Hôpital Sainte-Justine, 3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada; Tel: (514) 345-4931 ext. 4190, Fax: (514) 345-4801, E-mail: nikolaus.heveker@recherche-ste-justine.qc.ca

Abbreviations: BRET, Bioluminescence Resonance Energy Transfer; 7TMR, Seven transmembrane receptor; E/DRY, glutamic acid/aspartic acid, arginine, tyrosine; RLuc, Renilla luciferase

Keywords: Bioluminescence resonance energy transfer (BRET), ligand-binding protein, membrane trafficking and recycling, chemokine degradation, DRY motif, CXCR7, β -arrestin, CXCL11, CXCL12, 7TMRs

CXCR7 is a chemokine receptor of the Class A family of seven transmembrane domain receptors (7TMRs) (rhodopsin-like receptors). It is involved in inflammatory responses and pathological processes such as cancer, and it is known to bind and scavenge CXCL11 and CXCL12, its known endogenous chemokines. Like all atypical chemokine receptors (ACKRs), CXCR7 is devoid of G protein-responses. However, we have previously shown that CXCR7 recruits β -arrestin upon stimulation with CXCL12 and CXCL11. β -arrestin, a scaffold protein that controls trafficking and desensitization of 7TMRs, can mediate G-protein independent intracellular signaling. Our work aimed to determine if CXCL11 and CXCL12 induce distinct downstream signaling through CXCR7 and identify which molecular determinants mediate such promiscuity. More specifically, we introduced site-directed mutations in the E/DRYLAIV motif of CXCR7, a highly conserved motif in Class A 7TMRs, and in the N(L/F)YSS motif, a highly conserved motif in the CXC type chemokine receptor family. We characterized the impact of such mutations on β -arrestin recruitment, receptor internalization, receptor recycling, and chemokine degradation using Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays in living cells, flow cytometry and radioactivity labeled chemokines. First, we

demonstrate that β -arrestin recruitment to CXCR7 is ligand selective. We identified the arginine R(3.50)142 residue of the E/DRYLAIV motif to be necessary for β -arrestin recruitment to CXCR7 in response to CXCL11, but not CXCL12. We also identified that CXCR7 constitutively recruits β -arrestin when the asparagine N(3.35)127 residue of the N(L/F)YSS motif is mutated. Moreover, we show that CXCL11 significantly delays CXCR7 surface recycling, as opposed to CXCL12, and that this delay depends on an intact R(3.50)142 residue. Interestingly, we demonstrate that the internalization kinetics of CXCR7 do not depend on intact R(3.50)142 or N(3.35)127 in absence or in response to ligands. Finally, we show that CXCR7 can mediate the degradation of CXCL11 and CXCL12 independently of its interaction with β -arrestin. In summary, our study highlights the concept of functional selectivity between CXCR7 and its two endogenous chemokines CXCL11 and CXCL12.

INTRODUCTION

Chemokines are essential endogenous mediators of chemotaxis, the process of oriented cell migration across tissues through chemokine gradients. Chemotaxis is an essential process, bearing crucial roles notably in the normal

development of organisms, and in efficient inflammatory and immune responses. Therefore, dysregulation of chemotaxis leads to pathological processes and diseases, such as immune disorders and cancer (1-3).

The direction of leucocyte chemotaxis in order to reach a target inflammatory site is mediated by the expression of cognate chemokine receptors and by chemokine gradients (4). However, excess of chemokines at a precise site can rapidly become harmful, blur the chemokine gradient and lead to dysregulation of cell migration (3). Therefore, the regulation of chemokine accumulation and degradation along the path of migrating cells is essential to maintain appropriate cell guidance (5). As such, atypical chemokine receptors (ACKRs) play essential roles in chemokine scavenging and chemokine degradation, maintaining proper chemokine gradient.

CXCR7, also known as ACKR3 (Atypical Chemokine Receptor 3), is a chemokine receptor of the Class A family of seven transmembrane domain receptors (7TMRs) (rhodopsin-like receptor family). It is known to bind and scavenge two chemokines, CXCL11 and CXCL12. CXCL11 (also known as ITAC; interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) binds the typical chemokine receptor CXCR3, which is notably important for inflammatory responses and migration of activated T lymphocytes (6), whereas CXCL12 (also known as SDF-1; stromal cell-derived factor 1), binds the classical chemokine receptor CXCR4, which is important for embryonic development, hematopoiesis and inflammation (5, 7). Accordingly, CXCR7 was shown to maintain migration guidance by scavenging and degrading excess CXCL12 during leukocyte passage (5).

Unlike typical chemokine receptors, no reported evidence ever demonstrated ligand-induced CXCR7 activation of G_i-protein signaling, which is important for the regulation of cyclic AMP production and induction chemotaxis (8, 9). However, CXCL12 and CXCL11 were shown to induce G-protein independent CXCR7 signaling, by triggering recruitment of β -arrestin to CXCR7 (5, 10-12). β -Arrestin is a scaffold protein that induces 7TMR internalization via clathrin-coated pits (13). Once internalized, receptors may either follow the path of degradation or be recycled back

to the cell surface to undergo further rounds of signaling (14). Therefore, CXCR7 offers a unique model to specifically study the G protein-independent signaling of chemokine receptors.

Interestingly, receptors of the Class A family of 7TMRs have weak overall sequence homology with the exception of residues E/DRY localized within their E/DRYLAIV motif sequence (15). Their cytoplasmic E/DRYLAIV motif is located at the junction between the third transmembrane domain and the second intracellular loop (16). These highly conserved residues are believed to be a key region that control the basal activation levels of 7TMRs and to further act as a pivotal conformational switch essential for ligand induced receptor rearrangements, leading to receptor activation (17, 18). Moreover, this motif serves as a common receptor interface for the interaction of G protein and β -Arrestin (18, 19). In fact, mutations in this motif frequently generates constitutively activated 7TMRs (8, 17, 20).

The N(L/F)YSS motif is another highly conserved motif in the CXC type chemokine receptor family. Interestingly, it was demonstrated that the asparagine residue is important for the ligand-induced heterotrimeric G protein coupling to CXCR4 (9, 17, 21). In fact, the substitution of the asparagine N(3.35)119 to a serine generated a constitutively active CXCR4 for G_i signaling, although β -arrestin recruitment has never been reported for this mutant. This mutant receptor could also be further activated by stimulation with its natural ligand CXCL12 (4, 17).

Since the majority of chemokines and their receptors have promiscuous relationships, in which one chemokine can bind more than one receptor and vice-versa, our work aimed to determine if CXCL11 and CXCL12 induce distinct downstream signaling through CXCR7 and identify molecular determinants that mediate such promiscuity (22). More specifically, we targeted the conserved E/DRYLAIV and N(L/F)YSS motifs of CXCR7 for site-directed mutagenesis at sites known to affect receptor function (10, 17, 18, 21, 23, 24). We characterized the impact of such mutations on β -arrestin recruitment, receptor internalization, receptor recycling, and chemokine degradation in response to CXCL11 and CXCL12 stimulation. Bioluminescence resonance energy transfer

(BRET) assays in live cells were used to measure interactions between β -arrestin and CXCR7 mutants, as previously described (12, 15, 16, 25). Flow cytometry and radioactivity labeled chemokines were used for receptor trafficking and chemokine degradation experiments, respectively.

Taken together, our data demonstrate that β -arrestin recruitment to CXCR7 and cell surface expression of CXCR7 is ligand selective.

RESULTS

CXCR7 N(3.35)127 and R(3.50)142 residues are important for ligand induced β -arrestin recruitment.

Using BRET-based β -arrestin recruitment assays, we first investigated if CXCL11 and CXCL12 induced different β -arrestin recruitment responses to CXCR7. As shown in Fig. 1A and Table I, both CXCL11 and CXCL12 recruit β -arrestin to wild-type CXCR7 with similar potencies (EC₅₀; CXCL11 96nM versus CXCL12 49nM). However, the BRET response efficacy, corresponding to the maximum BRET signal, was statistically and significantly different for these two ligands (Table I). This suggests distinct inter-molecular interaction between CXCR7 and β -arrestin upon specific ligand stimulation. However, since maximum BRET signals depend as much on the quantity of the recruited protein as on the distance between the recruited protein and the receptor, our results may indicate that the distance between the fluorophores of the BRET partners (CXCR7-YFP and β -arrestin2-RLuc) is different whether CXCR7 is stimulated with CXCL11 or CXCL12 (26). Alternatively, it could indicate that the quantity of β -arrestin recruited to the receptor vary upon ligand-specific stimulation. Nonetheless, although which of these mechanisms is responsible for the difference in ligand-specific efficacy of the BRET response remains to be determined and requires further studies, our data show that CXCL11 and CXCL12 induce different β -arrestin recruitment responses to CXCR7.

To further investigate how CXCL11 and CXCL12 induce different β -arrestin recruitment responses to CXCR7, we carried site-directed mutagenesis of the conserved E/DRYLAIIV and N(L/F)YSS motifs of CXCR7 on sites known to

affect receptor function (N(3.35)127 S/D/K, D(3.49)141N, R(3.50)142A and Y(3.51)143A) (10, 17, 18, 21, 23, 24, 27). Using radio-ligand displacement assays, we confirmed that all mutants retained similar affinities for CXCL12 (Fig. S1).

β -arrestin recruitment BRET assays were carried out for each CXCR7 mutants following CXCL11 or CXCL12 stimulation. The potency to recruit β -arrestin in response to CXCL11 and CXCL12 for CXCR7-N127D, CXCR7-N127K, CXCR7- Y143A and CXCR7-D141N was similar to CXCR7-WT (Fig. 1A-D-E-F-G and Table I). In contrast, the efficacy of response of CXCR7-D141N in response to both CXCL11 and CXCL12 was lower when compared to CXCR7-WT. Therefore, to investigate the possibility that CXCR7-D141N can constitutively interact with β -arrestin, we performed BRET titration assays, where increasing amounts of CXCR7-D141N and a constant concentration of β -arrestin are in presence or absence of ligands (Fig. S2). At basal condition, in absence of ligands, we observed a linear response in BRET signal, which indicates the absence of specific interaction between the BRET partners and therefore, the absence of constitutive interaction between CXCR7-D141N and β -arrestin. Accordingly, the presence of both CXCL11 and CXCL12 induced hyperbolic saturation curves in BRET responses, indicating a specific interaction in presence of ligand.

Interestingly, CXCR7-N127S showed a 2.4-fold increase in basal BRET signal when compared to CXCR7-WT (Fig. 1A-B and Table I). Furthermore, the BRET signal was insensitive to agonist stimulation. These results suggest constitutive recruitment of β -arrestin to CXCR7-N127S. We confirmed this by titration assays (Fig. 2), where we observed hyperbolic saturation curves in BRET responses in absence of ligand, thus, indicating a specific and constitutive interaction between CXCR7-N127S and β -arrestin in absence of ligand (Fig. 2C-D). Taken together, these results indicate that the substitution of the asparagine of the N(L/F)YSS motif in CXCR7 generates a receptor that constitutively recruits β -arrestin.

Furthermore, we also observed that CXCR7-R142A recruits β -arrestin in response to CXCL12, but not to CXCL11 (Fig. 1C). The

presence and absence of specific interaction between CXCR7-R142A and β -arrestin in response to CXCL12 and CXCL11 respectively was also confirmed by titration assays (Fig. 2E-F). Accordingly, we observed a hyperbolic saturation curve in BRET response with CXCL12 but a linear response with CXCL11, thus indicating the absence of specific interaction between CXCR7-R142A and β -arrestin in response to CXCL11 only. Taken together, these results indicate that the arginine residue R(3.50)142 of the E/DRYLAIV motif of CXCR7 is essential for β -arrestin recruitment in response to CXCL11, but not CXCL12.

Since the substitution of the asparagine residue N(3.35)127 of the N(L/F)YSS motif to a serine (N127S) and of the arginine residue R(3.50)142 of the E/DRYLAIV motif to an alanine (R142A) both affected β -arrestin recruitment to CXCR7, we further investigated the role of those two residues in CXCR7 trafficking and in CXCR7-mediated degradation of CXCL11 and CXCL12.

Mutation of N(3.35)127S and R(3.50)142A don't affect the binding and affinity of chemokines to CXCR7. Since N(3.35)127S and R(3.50)142A substitutions both altered β -arrestin recruitment to CXCR7, we further investigated if these substitutions affected the affinity of the receptor for CXCL11 and CXCL12. Therefore, we performed radio-ligand displacement assays in a homologous system (125 I-CXCL11 vs unlabeled CXCL11 and 125 I-CXCL12 vs unlabeled CXCL12) using cell membrane preparations from HEK293E cells transiently expressing CXCR7 mutants (Fig. 3 and Table II).

We found no significant difference in affinity of CXCL11 and CXCL12 towards CXCR7-WT, N127S and R142A mutants, except for the affinity of R142A for CXCL12 compared to CXCR7 WT. Thus, this indicates that the absence of specific interaction between CXCR7-R142A and β -arrestin in response to CXCL11 is not due to a loss in affinity of CXCL11 towards the mutant receptor. These results also show that CXCR7-N127S, which constitutively recruits β -arrestin, competently bind both ligands even though this mutant is unresponsive to further agonist stimulation.

β -arrestin recruitment to CXCR7 is ligand selective yet association and dissociation kinetics remain unaffected. Next, we further investigated the propensity of association of β -arrestin with CXCR7 by calculating BRET₅₀ values from titration experiments shown in Fig. 2. BRET₅₀ represents the half maximal BRET, and it is interpreted as the propensity of interactors for each other and reflects the affinity of the receptor (BRET acceptor) for β -arrestin (BRET donor) (12, 17-19, 26). Therefore, lower BRET₅₀ values indicate higher propensity. As shown in Fig. 2G, the propensity of association between β -arrestin and CXCR7 was significantly and statistically higher in the presence of CXCL12 as opposed to CXCL11, as evidenced by lower BRET₅₀ values in the presence of CXCL12.

Consequently, we verified if the kinetic of association between β -arrestin and CXCR7 was ligand-specific. To do so, we performed BRET-based β -arrestin recruitment assays to CXCR7 in response to CXCL11 and CXCL12 and measured the intensity of BRET signal as a function of time (Fig. 4A). Our data show that CXCL12 seems to induce β -arrestin association to CXCR7 faster than CXCL11, although not sufficiently potent to demonstrate a statistically significant difference in association doubling time (ADT) (ADT for CXCL12: 1.51 min, IC95% [1.06; 2.58], ADT CXCL11: 2.76 min, IC95% [2.03; 4.34]).

Furthermore, we also performed β -arrestin and CXCR7 dissociation assays to determine if the kinetic of dissociation between β -arrestin and CXCR7 was ligand-specific. We show that the dissociation of β -arrestin and CXCR7 over time was similar after stimulation with either CXCL11 or CXCL12 ($t_{1/2}$ CXCL11: 3.49 min, $t_{1/2}$ CXCL12: 4.01 min). Interestingly, since the BRET signal persisted over time (not reaching zero BRET NET over time), this suggests that following ligand stimulation, β -arrestin and CXCR7 generate a stable association that lasts in time.

CXCR7 R(3.50)142 residue is important for cell surface expression levels of the receptor in response to CXCL11. One of the key functions of CXCR7 is the degradation and scavenging of its chemokines (5, 28, 29), we measured internalization and recycling of the CXCR7 as well as chemokine degradation after stimulation.

Since β -arrestin is involved in 7TMRs intracellular trafficking, we also addressed the impact of CXCR7 N(3.35)127S and R(3.50)142A mutations on CXCR7 trafficking. First, we investigated the expression of CXCR7 and mutant receptors at the cell surface, in absence of ligands, by direct detection using flow cytometry and APC-labeled anti-CXCR7 antibody (Fig. 5A). Interestingly, CXCR7-N127S and CXCR7-R142A were present at the cell surface, but at different levels compared to CXCR7-WT. In fact, CXCR7-N127S surface expression was significantly lower than that of CXCR7-WT ($p < 0,05$), whereas CXCR7-R142A surface expression was similar to CXCR7-WT ($p > 0,05$). Of note, total cellular receptor expression levels were similar between CXCR7-WT and mutants (Fig. 5B). Also, overall expression levels were stable over time and the stability of receptors were similar (Fig. S3), indicating that N127S and R142A mutations do not undergo increased degradation over time. Taken together, these results suggest an altered steady-state surface expression levels of CXCR7-N127S, since it is not due to decreased overall cellular receptor expression nor decreased stability. In fact, we already showed that CXCR7-N127S constitutively recruits β -arrestin (Fig. 1B, 2C-D). Consequently, the reduced surface expression observed for CXCR7-N127S may be attributed, at least in part, to constitutive β -arrestin recruitment.

Using flow cytometry, we then monitored the surface expression of CXCR7 and mutants in time, and in response to CXCL11 and CXCL12. For CXCR7-WT, both chemokines induced robust loss of surface expression (Fig. 5C), as previously reported (11, 30). Interestingly, CXCR7-N127S surface expression decreased only modestly over time in response to both ligands (Fig. 5D). This may be explained by the fact that this mutant's surface expression is already lower (Fig. 5A), and that ligand stimulation induce only slight additional loss of surface expression.

Conversely, CXCR7-R142A surface expression levels markedly decreased upon CXCL12 stimulation, to levels comparable to CXCR7-WT (Fig. 5C-E). Strikingly, the decrease in surface expression is significantly lower with CXCL11 stimulation ($p < 0,05$, $p < 0,01$ and $p < 0,001$). Taken together, since R142A does not

recruit β -arrestin upon specific CXCL11 stimulation as detailed previously (Fig. 1C and 2F), this suggests that β -arrestin may play a role in CXCR7 cell surface expression in response to CXCL11.

Internalization kinetics of CXCR7 does not depend on R(3.50)142 and N(3.35)127 residues in absence or in response to ligands. We then aimed to determine if the decrease in CXCR7 surface expression in response to CXCL11 was mediated through regulation of receptor internalization or recycling. Since our previous experiments only measured surface expression of receptors, which is influenced by rates of internalization, recycling and degradation, we intended to specifically address the proportion of initial surface receptors that is actually internalized after ligand stimulation. To do so, we determined kinetics of internalization by measuring residual surface expression of pre-labeled surface receptors. Briefly, surface receptors were pre-labeled with a mouse derived primary antibody and cells were then stimulated with ligands for various periods of time. Remaining pre-labeled surface receptors after stimulation were tagged with an anti-mouse secondary antibody and quantified by flow cytometry.

Using this technique, we showed that CXCR7 internalizes in response to ligand stimulation, but also in the absence of ligand ($t_{1/2} < 5$ min) (Fig. 6A), in line with previous observations (31). Moreover, the internalization kinetics of CXCR7-N127S and CXCR7-R142A are similar to CXCR7-WT since all receptors internalize in absence or in presence of ligands ($t_{1/2} < 5$ min) (Fig. 6). Also, internalization kinetics do not show statistically significant differences in absence or in response to ligands, except in the early phase of the internalization process of both CXCR7-WT and CXCR7-R142A in response to CXCL11, as opposed to absence of ligand and CXCL12. This may represent a two-phase internalization process of CXCR7 in response to CXCL11 that is highlighted by the CXCR7-WT and the CXCR7-R142A receptors. Since CXCR7-R142A internalization kinetics were similar to CXCR7-WT, and knowing that this mutant does not recruit β -arrestin upon CXCL11 stimulation (Fig. 1C and 2F), these results strongly support

that CXCR7 internalization is β -arrestin independent. This is further emphasized considering that CXCR7-WT internalizes even in absence of ligand stimulation (Fig. 6A). Consequently, we hypothesized that the decrease in CXCR7 surface expression in response to CXCL11 is mediated through regulation of receptor recycling where β -arrestin may play a role.

CXCR7 recycling is ligand selective. We measured CXCR7 recycling as previously described to verify if the decrease in CXCR7 surface expression in response to CXCL11 is mediated by regulation of receptor recycling (30). Briefly, cells expressing CXCR7-WT and mutants were treated with cycloheximide to block de novo synthesis of proteins and receptors, and then cells were stimulated with ligands to induce internalization. Remaining cell-surface receptors and chemokines were removed by proteinase K enzymatic digestion. Internalized receptor recycling to the cell surface were quantified by flow cytometry.

Using this method, we showed that CXCR7 is recycled to the cell surface in absence of ligand and in response to CXCL12 as previously described, and up to levels reaching near 70% of pre-stimulation surface expression (Fig. 7A) (32). However, in response to CXCL11, CXCR7 recycles back to the cell surface to levels reaching only 25% of pre-stimulation surface expression, which is significantly less than that observed without ligand and in response to CXCL12 ($p < 0.05$). Interestingly, this reduced recycling in response to CXCL11 is abolished in cells expressing CXCR7-R142A mutant, which doesn't recruit β -arrestin in response to CXCL11 (Fig. 7C). This strongly suggests that β -arrestin is essential for the reduction in cell surface recycling of CXCR7 in response to CXCL11. This conclusion is further supported by our data for CXCR7-N127S mutant, which constitutively binds β -arrestin, that shows reduced cell surface recycling in response to CXCL11, such as CXCR7-WT (Fig. 7B).

CXCR7 R(3.50)142 residue is important for β -arrestin independent degradation of CXCR7 following ligand stimulation. CXCR7 has been

reported to lead both CXCL11 and CXCL12 toward proteolytic degradation in order to maintain a chemokine gradient, which is important for proper guidance of migrating cells. Therefore we examined the role of CXCR7 N(3.35)127 and R(3.50)142 residues in chemokine degradation. We measured chemokine degradation using cells transiently expressing CXCR7-WT; CXCR7-N127S or CXCR7-R142A, following incubation with radiolabeled CXCL11 or CXCL12. Our results show that cells expressing CXCR7-WT induce the degradation of 12% and 46% of radiolabeled CXCL12 and CXCL11 respectively (Fig. 8, A and B). Similarly, cells expressing CXCR7-N127S induce the degradation of CXCL12 and CXCL11 to levels similar to CXCR7-WT. By contrast, in CXCR7-R142A expressing cells, we measured a significant increased CXCL12 and decreased CXCL11 degradation (Fig. 8, A and B).

Since CXCR7-R142A does not recruit β -arrestin in response to CXCL11, we next investigated if β -arrestin was important for CXCR7-mediated chemokine scavenging. To do so, we used murine embryonic fibroblasts (MEFs) derived from WT or β -arrestin-1 and β -arrestin-2 double-knockout animals. It has been shown that these MEFs endogenously express a murine-CXCR7 that signals similarly to human-CXCR7 in response to human-CXCL12 (33). Yet, the response of the murine receptor to human-CXCL11 was never studied. In fact, although sequence homology between human-CXCL12 (NCBI GenBank: CR450283.1) and murine-CXCL12 (NCBI GenBank: CT010389.1) is high (identical at 90%), murine and human CXCL11 differ considerably (34). Therefore, to ensure proper human-CXCL11 and -CXCL12 responses in MEFs, we introduced transient ectopic expression of human-CXCR7 in these MEFs to insure proper human-CXCL11 and -CXCL12 responses. Ectopic expression of human-CXCR7 in MEFs was confirmed by flow cytometry.

Our results show that MEFs expressing human-CXCR7 induce 53% degradation of radiolabeled-CXCL12 (Fig. 8C). This degradation was specific to CXCR7 and was not due to other/unspecific mechanisms of CXCL12 degradation, as previously proposed (7). Indeed, this degradation was abolished by competition with unlabeled CXCL12 or CXCL11, but not by

AMD3100, an allosteric ligand of CXCR7. Interestingly, β -arrestin-1/2 double-knockout MEFs also showed substantial degradation of CXCL12 similar to WT MEFs (57% compared to 53%), indicating that β -arrestin-1/2 is not necessary for CXCL12 degradation.

MEFs expressing human-CXCR7 also induced 30% CXCR7-mediated degradation of radiolabeled-CXCL11 (Fig. 8C). However, β -arrestin-1/2 double-knockout MEFs showed a significant decrease in degradation of CXCL11 as opposed to WT-MEFs (19% compared to 31%), indicating that β -arrestin-1/2 could play a role in CXCR7-mediated CXCL11 degradation, but it is not essential.

Taken together, our results indicate that CXCR7 can mediate the degradation of CXCL11 and CXCL12 independently of its interaction with β -arrestin.

DISCUSSION

Our study characterizes CXCL11- and CXCL12-ligand specific signaling through CXCR7 and highlights the concept of functional selectivity between CXCR7 and its two endogenous chemokines. Our work aimed to identify molecular determinants that mediate such promiscuity. More specifically, we introduced site-directed mutations in the E/DRYLAIV and N(L/F)YSS motif of CXCR7, two highly conserved motifs in Class A 7TMRs and in CXC type chemokine receptor family.

First, our results demonstrate that β -arrestin recruitment to CXCR7 is ligand selective. Secondly, we identify the arginine R(3.50)142 residue of the E/DRYLAIV motif to be necessary for β -arrestin recruitment to CXCR7 specifically in response to CXCL11, but not CXCL12. Also, CXCR7 constitutively recruits β -arrestin when the asparagine N(3.35)127 residue of the N(L/F)YSS motif is mutated. Thirdly, we show that CXCL11 delays CXCR7 surface recycling, as opposed to CXCL12, and that this delay depends on an intact R(3.50)142 residue. However, mutation of R(3.50)142 or N(3.35)127 do not alter the internalization kinetics of CXCR7 in absence or in response to ligands. Lastly, we show that CXCR7 can mediate the degradation of CXCL11 and

CXCL12 independently of its interaction with β -arrestin.

This study highlights the importance of arginine R(3.50)142 of the E/DRYLAIV motif and of asparagine N(3.35)127 of the N(L/F)YSS motif in ligand-specific β -arrestin and CXCR7 interaction. Although no evidence demonstrates ligand-induced CXCR7 activation of G_i -protein signaling, it has been reported that both E/DRYLAIV and N(L/F)YSS motifs represent a shared interface for the interaction of G proteins with β -arrestin in other 7TMRs (18, 19).

Of note, Berchiche et al. demonstrated that the mutation of N(3.35)119S in the N(L/F)YSS motif of CXCR4 leads to constitutive G_i signaling that could be further increased in response to CXCL12 (17). Comparably, we showed that N(3.35)127 mutation in CXCR7 also leads to a constitutively active receptor towards β -arrestin. These data suggest that the size of the lateral chain of the residue at position 3.35 changes receptor activity and is in line with previous observations (17, 21, 35).

Further, as previously reported in other 7TMRs, the mutation of arginine R(3.50) of the E/DRYLAIV motif induces a loss of heterotrimeric G-protein signaling and a loss of receptor stabilization in its basal state (17, 36, 37). Similarly, our data demonstrate that when stimulated with CXCL11, but not CXCL12, the substitution of R(3.50) in CXCR7 induce a loss of interaction with β -arrestin. Importantly, we show that this loss of interaction is not due to a decrease in CXCL11 binding to the R(3.50)142A mutant receptor. This supports that the R(3.50) residue is key for CXCL11-mediated β -arrestin interaction with CXCR7.

Furthermore, it has been described by others that R(3.50), which is localized at the end of the third transmembrane domain (TMIII) of 7TMRs, is part of the ionic lock along with the glutamic acid E(6.30) of the sixth transmembrane domain (TMVI) (38, 39). This intramolecular ionic interaction between these two residues was first described in 2000 by Palczewski et al. and their determination of the crystal structure of the rhodopsin receptor (39). One year later, Ballesteros et al. showed that the activation of the β_2 -adrenergic receptor involves disruption of the ionic lock between R(3.50) and E(6.30) (40).

Valentin-Hansen et al. also confirmed that R(3.50) acts as a balancing micro-switch in the activation of the β 2-adrenergic receptor (36). In line with these observations, and since we show that R(3.50) of CXCR7 is necessary for β -arrestin recruitment specifically in response to CXCL11, our data suggest that substitution of this residue disrupts the intramolecular ionic lock of CXCR7 in response to CXCL11. Therefore, that CXCR7 needs an intact ionic lock to recruit β -arrestin in response to CXCL11, but not CXCL12.

In our study, we also show that CXCR7 internalizes in absence of chemokine stimulation, and that mutation of R(3.50) of the E/DRYLAIV motif does not alter internalization kinetics of CXCR7. Since mutation of R(3.50) abolishes recruitment of β -arrestin to CXCR7 upon CXCL11 stimulation, taken together, these results support that CXCR7 internalization is β -arrestin independent. These observations are in line with previous published findings (11, 30), but are in contrast with the study of Canals et al., which demonstrated that CXCR7 endocytosis is mainly β -arrestin-dependent using a C-terminus tail truncated mutant of CXCR7 (32). However, they did not specifically assess the presence or absence interaction between β -arrestin and the mutant receptor when stimulated with CXCL11 or CXCL12, nor the binding affinity of the truncated receptor for CXCL11.

We also report that CXCL11 delays CXCR7 surface recycling, as opposed to CXCL12, and that this delay depends on an intact R(3.50)142 residue. This supports that β -arrestin is important for reduced CXCR7 surface recycling in response to CXCL11. This is further emphasized since we report that a CXCR7 mutant that constitutively recruits β -arrestin (N127S) induces reduced recycling in response to CXCL11.

Interestingly, ligand binding to 7TMRs classically leads to rapid receptor phosphorylation on their C-terminal tail (41, 42). β -arrestin then interacts with the phosphorylated 7TMRs and serve as an adaptor, leading to internalization via clathrin coated-pits to desensitize the receptor (13, 29). β -arrestin complexed with a receptor can either traffic to endosomes or it can be uncoupled from the receptor during endocytosis and allow the receptor to rapidly regain cell surface (43). As such, patterns of interaction between β -arrestin

and receptors have been used as a characteristic to classify 7TMRs (13, 44, 45). Upon ligand specific stimulation, Class A type of receptors, such as β 2-adrenergic receptor, characteristically recruit and form transient and relatively unstable complexes with β -arrestin at the cell surface (13, 44, 45). Dissociation of these complexes occurs at or near the cell surface, and internalized receptors transit into endosomes without β -arrestin before rapid cell surface recycling (13). Conversely, Class B type of receptors, such as vasopressin receptor V2, generate stable complexes with β -arrestin upon ligand specific stimulation (13, 44, 45). These receptors are internalized in complex with β -arrestin and retained into endosomes, even after ligand withdrawal (45). Also, affinity of association for both β -arrestin isoforms is similar for Class B type of receptors, whereas Class A type of receptors generally have higher affinity of association for β -arrestin-2 than β -arrestin-1 (43).

CXCR7 is known to bind and scavenge chemokines, a process that is essential for chemotaxis, and that depends on internalization and recycling of receptors to permit additional rounds of chemokine scavenging (5). In fact, Scavenger function is conceptually more representative of Class A receptors (5, 33). Consistently, we show that CXCR7 undergo internalization independently of β -arrestin recruitment, and that CXCR7 is recycled to the cell surface in response to CXCL12, supporting its classification as a Class A receptor. However, 7TMRs and β -arrestin rapid dissociation half-lives ($t_{1/2}$) of Class A receptors are a matter of seconds as described in the literature (13, 46). However, we report that dissociation half-life of CXCR7 and β -arrestin in response to CXCL11 and CXCL12 is a matter of minutes (Fig 4, $t_{1/2}$ CXCL11 = 3,49min, CXCL12 $t_{1/2}$ = 4,01min). Additionally, we show that CXCR7 is not recycled to the cell surface by 45 min. in response to CXCL11. According to these findings, CXCR7 could also be classified as a Class B receptor. Therefore, we report that CXCR7 demonstrate patterns of interaction with β -arrestin that are characteristic of both Class A and Class B.

As perspectives, promiscuity of chemokines leads to complex interaction between chemokines and receptors at various cellular and physiological levels. It has been reported that

decreased surface expression of CXCR7, induced by the synthetic ameliorated antagonist compound CCX771, increases CXCL12 levels at the blood-brain barrier. This blocked transmigration of circulating leukocytes into the brain in an autoimmune encephalomyelitis model for multiple sclerosis (47). Moreover, by binding to CXCR4 and CXCR7, CXCL12 is known to retain in the bone marrow human multipotent stromal cells (hMSCs), cells that have self-renewal capacity and that can differentiate into mesodermal lineage cells such as stromal cells, osteocytes, osteoblasts and endothelial cells that participate in the establishment of the hematopoietic stem cell niche (48, 49). Interestingly, it was shown that intracellular CXCR7 accumulation in hMSCs could contribute to bone marrow egress by “blinding” hMSCs to CXCL12 (48). Of interest, we show that the CXCR7 endogenous chemokine CXCL11 reduces cell surface expression of the receptor. This indicates an endogenous mechanism of regulation of CXCR7 surface expression that may have roles in physiological and pathological processes, which further emphasize the complex interplay between CXCR7, CXCL12 and CXCL11.

Furthermore, since we report that CXCL11 delays CXCR7 cell surface recycling, the extension of the agonist bias concept to intracellular receptor transport decisions may open new avenues for drug development. This avenue is highlighted by reported evidences. First, AOP-RANTES, a modified chemokine, is an example of compound that achieve efficient reduction of target receptor surface expression by preventing its recycling to the plasma membrane (50). In addition, tolerance to opioid drugs that target the δ -opioid receptor correlates with differences in modalities of β -arrestin recruitment and receptor recycling (51). Also, CCX771 shows different β -arrestin recruitment potency and efficacy to CXCR7 as opposed to CXCL11 and CXCL12 (52).

To conclude, we report CXCL11- and CXCL12- ligand specific signaling through CXCR7. More specifically, we demonstrate ligand specific patterns of β -arrestin recruitment and receptor recycling. These data are of importance since patterns of endocytosis, degradation or recycling of 7TMRs are essential to their function.

Furthermore, our data further highlight the concept of functional selectivity between CXCR7 and its two endogenous chemokines, which may have implications in physiological and pathological processes such as chemotaxis, inflammation and cancer and may be of interest for therapeutic drug development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials — Recombinant CXCL11 and CXCL12 were from PeproTech Inc. 125 I-CXCL11 and 125 I-CXCL12 were from Perkin Elmer; and Benzylcoelenterazine (Coelenterazine H) was from Nanolight Technology, Cycloheximide from Sigma-Aldrich.

Plasmids — CXCR7-YFP were described previously (10). The plasmid encoding β -arrestin2-RLuc, a generous gift from Michel Bouvier lab (University of Montreal, Qc, Canada) was described previously (53). The CXCR7 (N(3.35)127 S/D/K, D(3.49)141N, R(3.50)142A and Y(3.51)143A) in CXCR7-YFP, mutations were inserted in CXCR7-YFP cDNA sequence using the QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit from Stratagene, according to the manufacturer’s directions (18, 27). To generate the D141N mutants the aspartic acid (GAC) was replaced with arginine (AAC) at position 141 of the CXCR7-YFP cDNA. For the R142A mutants, arginine (CGC) was replaced with alanine (GCC) at position 142 of CXCR7-YFP cDNA. For the Y143A mutants, the tyrosine (TAC) was replaced with an alanine (GCC) at position 143 of the CXCR7-YFP cDNA. The asparagine (AAC) of the N127D mutants was replaced with an aspartic acid (GAC), with a lysine (AAA) and with a serine AGC at position 127 of the CXCR7-YFP cDNA. The HA-FLAG-CXCR7 DRY/N without YFP mutants was generated by using the QuickChange Multi Site-Directed Kit as previously described.

Cell culture and transfections — Human embryonic kidney (HEK293E) cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) were cultured in Dulbecco’s modified Eagle’s medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent, Rocklin, CA), 100 units/mL of penicillin/streptomycin (Invitrogen), G-418 sulfate (Wisent), Plasmocin (Invivogen, San Diego, CA). The 2 mM L-glutamine. MEF (mouse embryonic fibroblast) wild-type cells and the MEF double knock-out for β -arrestin-1 and -2

cells (generate in Prof. Lefkowitz Lab at Duke University, USA) were cultured with the same conditions as HEK293 cells and was a gift from Prof. Michel Bouvier (University of Montreal, Qc, Canada). Transient transfections for HEK293E cells were performed in six-well dishes using the polyethylenimine (PEI)(Polysciences, Warrington, PA). Transient transfections of human-CXCR7 receptor in the MEF cells were performed in 24-well dishes using JET Prime transfection reagent and an anti-CXCR7 Allophycocyanin-APC (clone 358426) from R&D systems to measure CXCR7 expression by flow cytometry.

Recycling assays— HEK293E cells transiently expressing CXCR7 mutants (24h post-transfection) were pre-treated with cycloheximide (10 ug/ml) and incubated for 15 min at 37 °C with or without 200 nM of CXCL11 or CXCL12. Cells were then washed and treated with proteinase K (500 ng/mL) for 1.5 h at 4 °C. After incubation, the reaction was stopped by adding PBS 2% EDTA. Cells were collected and centrifuged at 500 × g for 7 min at 4 °C. The expression of the receptor mutants was detected using anti-CXCR7 Allophycocyanin-APC (clone 358426) from R&D systems and measured by flow cytometry.

Surface expression variation assays — HEK293E cells transiently expressing CXCR7 receptor mutants (24h post-transfection) was pre-treated with cycloheximide (10 ug/ml) and incubated at 37 °C with or without 200 nM of CXCL11 or CXCL12 over different periods of time. Antibody-labeled receptors remaining at the cell surface were quantified by flow cytometry and staining with an anti-CXCR7 Allophycocyanin-APC (clone 358426) from R&D systems at different time points.

Endocytosis assays — HEK293E cells transiently expressing CXCR7 mutants (24 h post-transfection) were pre-treated with cycloheximide for 2 h at 37 °C and pre-stained using anti-flag M2 as a primary antibody from Sigma Aldrich. Cells were then stimulated with buffer only, 200 nM of CXCL11 or CXCL12, and incubated at different times at 37 °C. Following the incubation, expression of the CXCR7 mutants was detected by using GAM-FITC as a secondary antibody and measured by flow cytometry. Resulting surface expression measurements are given as relative mean fluorescence intensity of internalized CXCR7 and were collected using a FACSCalibur

Flow Cytometer (BD Bioscience) and analyzed using Cell-quest Pro software.

Radioligand binding assays — Cell membrane preparations were prepared from HEK293E cells expressing CXCR7 mutants and washed once with PBS, then gently collected in PBS and centrifuged at 200 × g for 10 min at 4 °C (See table II; Fig.2). Cells were resuspended in buffer A (5mM Tris; pH 7.2; protease inhibitor cocktail) and homogenized by using a 1-ml insulin injector. The homogenate was then spun at 400 × g for 5 min at 4 °C and the supernatant was centrifuged again at 40,000 × g for 30 min at 4 °C. The pellet was homogenized in buffer B (50 mM Tris; pH 7.2; 5 mM MgCl₂; protease inhibitor cocktail) and then spun at 40,000 × g for 30 min at 4 °C. The pellet was resuspended in buffer D (50 mM Tris; pH 7.2; 10 mM MgCl₂; 25% sucrose; protease inhibitor cocktail) and subjected to one freeze-thaw cycle. Competition binding assays were performed as described, with minor modification (12). Membrane preparations (5 ug/well of 96-well plates) were incubated for 30 min at 37 °C in binding buffer (50 mM HEPES; pH 7.4; 1 mM CaCl₂; 5 mM MgCl₂; 140 mM NaCl; 0.5% BSA) with 0.03 nM of either ¹²⁵I-CXCL12 or ¹²⁵I-CXCL11 as a tracer and increasing concentrations of competitor in a final volume of 0.04 ml. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration and receptor-bound radioactivity was quantified by γ -radiation counting. Binding assays using ¹²⁵I-CXCL12 as a tracer (Fig. S1) were performed on transfected HEK293 cells expressing the respective CXCR7 DRY/N mutants as described (54).

Degradation assays — 48 hours post-transfection, human embryonic kidney (HEK293E) cells transiently expressing CXCR7 receptor mutants or the vehicle were stimulated at 37 °C for 2.5 h with 50 pM of either ¹²⁵I-CXCL11 or ¹²⁵I-CXCL12. After incubation, the supernatants were collected and placed in a microtube of 1.5 ml. The cells were then washed by acid wash (3M Glycine; pH 2.7 in water). The supernatants were collected and placed in the same microtubes as describe previously. The microtubes containing the supernatants were then subjected to protein precipitation by TCA (trichloroacetic acid) solution in water (25%) and incubated for 15 min. at 4 °C. The supernatants were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatants

were gently collected and placed in counting tubes (corresponding to degraded ligand fraction), the pellets were collected and placed in different counting tubes (corresponding to the non-degraded ligand fraction). The rest of the cells were resuspended in PBS (33% trypsin) and placed in a counting tube (corresponding to the cell's ligand uptake). Radioactivity was quantified by γ -radiation counting. The resulting degraded ligand is given in percentage of radioligand degraded referring to percent cpm over total.

BRET assays — Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays in live cells were used to measure interactions between β -arrestin and CXCR7 mutants, as previously described (12, 15). This technique measures the non-radiative transfer of energy between luciferase (energy donor) and yellow fluorescent protein YFP (energy acceptor) (16, 25). Our BRET system uses receptor CXCR7 fused to YFP (yellow fluorescent protein) at its C-terminal tail as the BRET acceptor, and β -arrestin fused to RLuc (*renilla* luciferase) at the C-terminus as the BRET donor. BRET experiments were conducted in BRET 96-well microplates (PerkinElmer, Waltham, MA), coated with 0.1% Poly-D-Lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). BRET tampon contained BSA Fraction V (WisEnt). The Luciferase substrate Coelenterazine H was from Nanolight Technology, Pinetop, AZ. β -Arrestin-2 recruitment to the CXCR7 receptors was measured using a BRET assay as previously described in Berchiche et al. 2011 (54). Live HEK293E cells were transiently cotransfected with 0.05 μ g of β -arrestin-2 tagged with the BRET donor *Renilla* Luciferase, and 1 μ g of CXCR7 DRY/N mutants tagged with YFP, the BRET acceptor. Total plasmid quantity was normalized to 2 μ g using pcDNA3. At 24 h post-transfection, cells were transferred to white, 96-well, clear-bottom microplates coated with poly-D-Lysine hydrobromide. At 36–48 h post-transfection, the cell medium was changed to BRET buffer (PBS; 0.5 mM $MgCl_2$ and 0.01% BSA). Level of fluorescence was measured by Mithras LB 940 instrument (Berthold Technologies) using an excitation filter at 485 nm and an emission filter at 535 nm. Cells were incubated with the RLuc substrate and Coelenterazine H was added to a concentration of 5 μ M for 10 min at room

temperature before signal acquisition. Total luminescence was also measured immediately before adding the ligands. Cells were subsequently stimulated with either CXCL11, CXCL12 or vehicle, followed by BRET measurement. Raw BRET was calculated as the ratio of emission of YFP at 515 nm to the emission of RLuc at 485 nm. Values were corrected by subtracting a background ratio detected when the β -Arrestin-2-RLuc was transfected alone, giving the BRET net values.

β -Arrestin2 association to the CXCR7 receptors was measured using a BRET assay as described above. After incubation of the cells with Colenterazine H for 10min. at room temperature, cells were subsequently stimulated with either 200nM CXCL12, 200nM CXCL11 or vehicle, followed immediately by BRET measurement approximately at every 1.38min and during 40min. For the β -Arrestin2 dissociation assays, the cells were incubated at room temperature for 10 min. with the Colenterazine H and stimulated at the same time with 200nM CXCL12, 200nM CXCL11 or vehicle. Subsequently, the cells were washed 3 times with PBS and fresh BRET buffer were added followed by BRET measurements at 2, 5, 10, 20, 30, 45 min.

Flow cytometry analysis — CXCR7 N/DRY mutant receptor cells expressions were confirmed by flow cytometry using an anti-CXCR7 Allophycocyanin-APC (clone 358426) from R&D systems for staining. FACSCalibur Flow Cytometer (BD Bioscience) and Cell-quest Pro software were used for data analysis.

Data analysis — Data from the BRET titration curve or from the kinetics of β -arrestin-2 recruitment were the mean of independent experiments with each performed in triplicate. Curve fitting by non-linear regression (one-site binding curve to determine the BRET50) and statistical analysis were conducted using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical significance of the differences between more than two groups was calculated by repeated measures and analyzed with an ANOVA, followed by Bonferroni's post-test. Association doubling time (ADT) (Fig. 4) and half-time (Fig.4-6) values were calculated by one phase exponential association and dissociation equations respectively.

Acknowledgments: We are indebted to Yamina A. Berchiche and Marie-Ève Pelletier for expert technical assistance and scientific recommendations. We thank M. Bouvier for his gift of plasmid encoding β -arrestin-2-RLuc.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Author contributions: SG conceived and coordinated the study and wrote the paper. SG also designed, performed and analyzed the experiments shown in all figures and tables. NM provided technical assistance and contributed to the design of Figs. 6, 7 and 8. GSD provided technical assistance for the design and preparation of the receptor mutants. NH contributed to the conception of the study and reviewed the results and the manuscripts.

FOOTNOTES

* This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan. SG was supported by scholarships from the “Fonds de la recherche en santé du Québec” (FRSQ); N.H. is a CIHR New Investigator.

REFERENCES

1. Hernandez, P. A., Gorlin, R. J., Lukens, J. N., and Taniuchi, S. (2003) Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nature*
2. Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., and Catron, D. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*
3. Zlotnik, A. (2006) Chemokines and cancer. *Int. J. Cancer*. **119**, 2026–2029
4. Proudfoot, A. E. I., and Uguccioni, M. (2016) Modulation of Chemokine Responses: Synergy and Cooperativity. *Front Immunol.* **7**, 183
5. Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008) Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*. **132**, 463–473
6. Groom, J. R., and Luster, A. D. (2011) CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 207–215
7. Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E. T., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Kuo, C. J., Wei, K., McMaster, B. E., Wright, K., Howard, M. C., and 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**, 2201–2213
8. Bachelier, F., Ben-Baruch, A., and Burkhardt, A. M. (2014) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for *Pharmacol. Rev.* **66**, 1–79
9. Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y. C., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 35760–35766
10. 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**, 1240–1247
11. Luker, K. E., Steele, J. M., Mihalko, L. A., Ray, P., and Luker, G. D. (2010) Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene*. **29**, 4599–4610
12. Gravel, S., Malouf, C., Boulais, P. E., Berchiche, Y. A., Oishi, S., Fujii, N., Leduc, R., Sinnett, D., and Heveker, N. (2010) The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *J. Biol. Chem.* **285**, 37939–37943
13. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., and Barak, L. S. (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 17201–17210
14. Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2011) β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*. **32**, 521–533
15. Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**, 1723–1729
16. Gether, U. (2000) Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocrine reviews*. **21**, 90–113
17. Berchiche, Y. A., Chow, K. Y., Lagane, B., Leduc, M., Percherancier, Y., Fujii, N., Tamamura, H., Bachelier, F., and Heveker, N. (2007) Direct Assessment of CXCR4 Mutant Conformations Reveals Complex Link between Receptor Structure and G i Activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 5111–5115
18. Kim, K.-M., and Caron, M. G. (2008) Complementary roles of the DRY motif and C-terminus tail of GPCRs for G protein coupling and beta-arrestin interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 42–47
19. Shukla, A. K., Westfield, G. H., Xiao, K., Reis, R. I., Huang, L.-Y., Tripathi-Shukla, P., Qian, J., Li, S., Blanc, A., Oleskie, A. N., Dosey, A. M., Su, M., Liang, C.-R., Gu, L.-L., Shan, J.-M., Chen,

- X., Hanna, R., Choi, M., Yao, X. J., Klink, B. U., Kahsai, A. W., Sidhu, S. S., Koide, S., Penczek, P. A., Kossiakoff, A. A., Jr, V. L. W., Kobilka, B. K., Skiniotis, G., and Lefkowitz, R. J. (2014) Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature*. **512**, 218–222
20. Rovati, G. E., Capra, V., and Neubig, R. R. (2007) The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State. *Mol. Pharmacol.* **71**, 959–964
 21. Zhang, W., Navenot, J. M., and Haribabu, B. (2002) A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists. *J. Biol. Chem.* **277**, 24515–24521
 22. Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., and Power, C. A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 145–176
 23. Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., Gerard, C., and 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**, 628–632
 24. Lagane, B., Ballet, S., Planchenault, T., Balabanian, K., Le Poul, E., Blanpain, C., Percherancier, Y., Staropoli, I., Vassart, G., Oppermann, M., Parmentier, M., and Bachelier, F. (2005) Mutation of the DRY motif reveals different structural requirements for the CC chemokine receptor 5-mediated signaling and receptor endocytosis. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1966–1976
 25. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilaiet, S., Chelsky, D., Dennis, M., and 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**, 3684–3689
 26. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., and Breit, A. (2002) Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **277**, 44925–44931
 27. Ballesteros, J. A., and Weinstein, H. (1995) [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in neurosciences*
 28. Kendall, R. T., and Luttrell, L. M. (2009) Diversity in arrestin function. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2953–2973
 29. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., and Caron, M. G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **274**, 32248–32257
 30. Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleshwar, H., Raz, E., Zerwes, H.-G., Rot, A., and Thelen, M. (2010) CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE*. **5**, e9175
 31. Luker, K. E., Lewin, S. A., Mihalko, L. A., and Schmidt, B. T. (2012) Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene*
 32. Canals, M., Scholten, D. J., de Munnik, S., Han, M. K. L., Smit, M. J., and Leurs, R. (2012) Ubiquitination of CXCR7 Controls Receptor Trafficking. *PLoS ONE*. **7**, e34192
 33. Luker, K. E., Gupta, M., Steele, J. M., Foerster, B. R., and Luker, G. D. (2009) Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia*
 34. Tensen, C. P., Flier, J., Rampersad, S. S., Sampat-Sardjoepersad, S., Scheper, R. J., Boorsma, D. M., and Willemze, R. (1999) Genomic organization, sequence and transcriptional regulation of the human CXCL 11(1) gene. *Biochim Biophys Acta*. **1446**, 167–172
 35. Feng, Y. H., Miura, S., Husain, A., and Karnik, S. S. (1998) Mechanism of constitutive activation of the AT1 receptor: influence of the size of the agonist switch binding residue Asn(111). *Biochemistry*. **37**, 15791–15798
 36. Valentin-Hansen, L., Groenen, M., and Nygaard, R. (2012) The arginine of the DRY motif in transmembrane segment III functions as a balancing micro-switch in the activation of the β 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **287**, 31973–31982
 37. Kling, R. C., Clark, T., and Gmeiner, P. (2016) Comparative MD Simulations Indicate a Dual

- Role for Arg1323.50 in Dopamine-Dependent D2R Activation. *PLoS ONE*. **11**, e0146612
38. Ballesteros, J., and Palczewski, K. (2001) G protein-coupled receptor drug discovery: implications from the crystal structure of rhodopsin. *Current opinion in drug discovery development*. **5**, 561–574
 39. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., and Behnke, C. A. (2000) Crystal structure of rhodopsin: AG protein-coupled receptor. *Science*. **289**, 739–745
 40. Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G., Shi, L., Gether, U., and Javitch, J. A. (2001) Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **276**, 29171–29177
 41. Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., Strachan, R. T., Huang, T.-Y., Bressler, E. A., Hara, M. R., Shenoy, S. K., Gygi, S. P., and Lefkowitz, R. J. (2011) Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci. Signal.* **4**, ra51
 42. Reiter, E., and Lefkowitz, R. J. (2006) GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology & metabolism*
 43. Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2003) Multifaceted roles of β -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochemical Journal*. **375**, 503–515
 44. Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 14498–14506
 45. Khoury, E., Nikolajev, L., Simaan, M., Namkung, Y., and Laporte, S. A. (2014) Differential Regulation of Endosomal GPCR/beta-Arrestin Complexes and Trafficking by MAPK. *J. Biol. Chem.* **289**, 23302–23317
 46. Zhang, J., Barak, L. S., Anborgh, P. H., Laporte, S. A., Caron, M. G., and Ferguson, S. S. (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10999–11006
 47. Cruz-Orengo, L., Holman, D. W., and Dorsey, D. (2011) CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J. Exp. Med.* **208**, 327–339
 48. Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., Coffelt, S. B., and Betancourt, A. M. (2012) Toll-like receptor 3 and suppressor of cytokine signaling proteins regulate CXCR4 and CXCR7 expression in bone marrow-derived human multipotent stromal *PLoS ONE*. **7**, e39592
 49. Chute, J. P. (2006) Stem cell homing. *Current opinion in hematology*
 50. Mack, M., Luckow, B., Nelson, P. J., Cihak, J., Simmons, G., Clapham, P. R., Signoret, N., Marsh, M., Stangassinger, M., Borlat, F., Wells, T. N., Schlöndorff, D., and Proudfoot, A. E. (1998) Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J. Exp. Med.* **187**, 1215–1224
 51. Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., and Amraei, M. (2012) Differential Association of Receptor-G β Complexes with β -Arrestin2 Determines Recycling Bias and Potential for Tolerance of Delta Opioid Receptor Agonists. *The Journal of Neurosciences*. **32**, 4827–4840
 52. Zabel, B. A., Wang, Y., Lewén, S., Berahovich, R. D., Penfold, M. E. T., Zhang, P., Powers, J., Summers, B. C., Miao, Z., Zhao, B., Jalili, A., Janowska-Wieczorek, A., Jaen, J. C., and Schall, T. J. (2009) Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J. Immunol.* **183**, 3204–3211
 53. Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chénier, S., and Bouvier, M. (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* **22**, 3816–3824
 54. Berchiche, Y. A., Gravel, S., Pelletier, M.-E., St-Onge, G., and Heveker, N. (2011) Different effects of the different natural CC chemokine receptor 2b ligands on beta-arrestin recruitment, Gai signaling, and receptor internalization. *Mol. Pharmacol.* **79**, 488–498

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Different effects of CXCL11 and CXCL12 on β -arrestin recruitment to CXCR7 mutants. HEK293 cells transiently co-expressing β -arrestin2-RLuc as a BRET donor and the respective CXCR7-DRY mutants fused to the BRET acceptor YFP were stimulated with the indicated concentrations of CXCL12 (black circles) and CXCL11 (grey triangles). All points are pooled data of three to five independent experiments. Resulting BRET measurements are given as BRET NET. For statistical analysis of the curves see Table I *A*, CXCR7 wild-type; *B*, CXCR7-N127S; *C*, CXCR7-R142A; *D*, CXCR7-D141N; *E*, CXCR7-N127D; *F*, CXCR7-N127K; *G*, CXCR7-Y143A.

FIGURE 2. BRET titration curves. BRET [acceptor]/[donor] titrations between receptor mutants-YFP and β -arrestin2-RLuc fusions in the absence (open squares) and presence of 200 nM CXCL12 (closed circles) or 200 nM CXCL11 (closed triangles). All data shown are of one representative of four independent experiments performed in triplicate. *A*, *C* and *E*, CXCR7 wild-type, CXCR7-N127S and CXCR7-R142A, respectively, with or without CXCL12; *B*, *D* and *F*, CXCR7 wild-type, CXCR7-N127S and CXCR7-R142A, respectively, with or without CXCL11. *G* shows the change in the tendency of β -arrestin to associate with the wild-type receptor upon CXCL11 or CXCL12 stimulation by measuring BRET₅₀. The difference between BRET₅₀ of CXCR7 WT is ligand-dependent and statistically significant ($p < 0.01$) (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test). The data shown in *G* are mean values from four independent experiments, each performed in triplicate.

FIGURE 3. Radioligand displacement of CXCR7 mutants. *A*, ¹²⁵I-CXCL12; or *B*, ¹²⁵I-CXCL11 displacement by unlabeled CXCL12 or CXCL11, respectively, on membranes derived from HEK293 cells expressing the different CXCR7 mutants. Data are mean values from four (*A*) or eight (*B*) independent experiments, each performed in duplicate. *C* (CXCL12) and *D* (CXCL11) show the change in affinity by measuring the logIC₅₀.

FIGURE 4. *A*. Arrestin association and *B*. dissociation with receptor CXCR7. HEK293 cells transiently co-expressing β -arrestin2-RLuc as a BRET donor and CXCR7 wild-type receptor fused to the BRET acceptor YFP were stimulated with 200 nM of CXCL12 (black circles) and CXCL11 (grey triangles) and incubated for the indicated times. Resulting BRET measurements are given as BRET NET. *A*. (Association doubling time (ADT) CXCL12: 1.51 min with IC_{95%} [1.06 min ; 2.58 min], ADT CXCL11: 2.76 min with IC_{95%} [2.03 min ; 4.34 min]). *B*, (T_{1/2} CXCL11 : 3.49 min with IC_{95%} [1.74 min ; infini], T_{1/2} CXCL12 : 4.01 min. with IC_{95%} [1.88 min ; infini]). All points are pooled data of three (association) or four (dissociation) independent experiments.

FIGURE 5. Surface expression variation of CXCR7-mutants. HEK293E transiently expressing the different CXCR7-YFP receptor and mutants as indicated. Measures show quantification of fluorescence from *A*, clone 358426 APC coupled antibody (anti-CXCR7-APC) (surface expression) and *B*, the C-terminal YFP-tag of each receptor (overall expression) using flow cytometry. All data shown are pooled data of six independent experiments. The difference between CXCR7 WT and CXCR7-N127S and CXCR7-WT and CXCR7-R142A expression using clone 358426 were statistically significant ($p < 0.05$) (one-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test). Total cellular receptor expression levels (YFP-tag) were similar between CXCR7-WT and mutants ($p > 0.05$; repeated measures ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test). *C*, *D* and *E*, HEK293E transiently expressing different CXCR7 receptor mutants as indicated. *C*, CXCR7-WT; *D*, CXCR7-N127S and *E*, CXCR7-R142A were stimulated with 200 nM of CXCL12 (black circles) or CXCL11 (grey triangles) and incubated for the indicated times. All data shown are pooled data of eight (without ligand); five (CXCL12); and three (CXCL11) independent experiments for all the receptors. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$; repeated measures ANOVA, Sidak's multiple comparison test between CXCL11 and CXCL12 for CXCR7-R142A)

FIGURE 6. Internalization of CXCR7 and mutants upon ligand stimulation. *A*, *B* and *C*: HEK293E transiently expressing different CXCR7 receptors as indicated. *A*, CXCR7-WT; *B*, CXCR7-N127S; and *C*, CXCR7-R142A. The mutants were pre-treated with cycloheximide and pre-labeled using mouse anti-flag antibody. After the cells were stimulated or not (open squares) with 200 nM of CXCL12 (black circles) or CXCL11 (grey triangles) and incubated at the indicated times 37 °C. After incubation, remaining surface receptor expression was detected by using anti-mouse-FITC secondary antibody and measured by flow cytometry. Resulting surface expression measurements are given as relative mean fluorescence intensity. All data shown are pooled data of three independent experiments for all the receptor mutants. (* $p < 0.05$; repeated measures ANOVA, Sidak's multiple comparison test between CXCL11 and CXCL12)

FIGURE 7. Recycling of CXCR7 receptor-mutants upon ligand stimulation. *A*, *B* and *C*, HEK293E transiently expressing CXCR7 receptors as indicated. *A*, CXCR7-WT; *B*, CXCR7-N127S; and *C*, CXCR7-R142A. Cells were pre-treated with cycloheximide and incubated for 15 min at 37 °C with or without (open squares) 200 nM of CXCL12 (black circles) or CXCL11 (grey triangles). Cells were then washed and treated with proteinase K for 1.5 h. Receptor expression was detected by using antibody clone 358426 APC coupled (anti-CXCR7-APC) and measured by flow cytometry. Resulting surface expression measurements are given as relative mean fluorescence intensity of recycled CXCR7. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$; repeated measures ANOVA, Sidak's multiple comparison test between CXCL11 and CXCL12) ($p > 0.05$ for CXCR7-R142A between CXCL11 and CXCL12 for 20-30-45 min.).

FIGURE 8. Importance of CXCR7 R(3.50)142 residue in CXCL11 and 12 degradation, independently of β -arrestin. *A* and *B*, HEK293E cells transiently expressing CXCR7 receptors as indicated were stimulated at 37 °C for 2.5 h with *A*, ^{125}I -CXCL12 or *B*, ^{125}I -CXCL11. CXCL11 degradation differs between CXCR7-WT and CXCR7-R142A ($p < 0.05$; repeated measures ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test). *C* and *D*, MEF or MEF β -arrestin-1 and -2 knock-out transiently expressing human-CXCR7 wild-type receptor were stimulated at 37 °C for 2.5 min with *C*, ^{125}I -CXCL12 or *D*, ^{125}I -CXCL11 in the presence or absence of 200 nM CXCL12, CXCL11 or 100 nM AMD3100. β -arrestin-1/2 double-knockout MEFs showed a significant decrease in degradation of CXCL11 as opposed to WT-MEFs (19% vs 31%, $p < 0.05$) ($p < 0.05$; repeated measures ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test) All data shown are pooled data of three independent experiments for all the CXCR7 receptor mutants expressed in HEK cells and for CXCR7 wild-type receptor expressed in MEF wild-type or MEF β -arrestin-1 and -2 knock-out.

TABLES

TABLE I. Curve-fitting by non-linear regression analysis parameters of β -arrestin recruitment to CXCR7 receptor and the respective mutants. The table summarizes the curve parameters of β -arrestin recruitment to CXCR7 receptor mutants by CXCL12 and CXCL11 shown in Fig. 1. Potency to recruit is reported as logEC₅₀. BRET response efficacy is reported as maximum BRET signal (Top). Basal BRET signal is reported as Bottom (minimum BRET signal). The difference in Top values for CXCR7 wild-type upon CXCL12 and CXCL11 stimulation were statistically significant ($p < 0.05$) (Extra sum-of-squares F test). Standard Error of the Mean, S.E.M. and N/D, not determined. N represents number of experiments done in triplicate.

	CXCR7-DRY mutants						
	WT	R142A	N127S	N127D	N127K	Y143A	D141N
<i>CXCL12 stimulation</i>							
N	5	5	5	5	5	5	5
EC₅₀ (nM)	49.01	68.25	N/A	24.56	90.75	51.86	43.09
logEC₅₀ ± S.E.M.	7.31 ± 0.14	7.17 ± 0.10	N/A	7.61 ± 0.08	7.04 ± 0.19	7.29 ± 0.14	7.37 ± 0.29
Top ± S.E.M.	0.113 ± 0.006*	0.108 ± 0.005	0.055 ± 0.003	0.127 ± 0.004	0.102 ± 0.008	0.070 ± 0.004	0.052 ± 0.003
Bottom ± S.E.M.	0.024 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.058 ± 0.002	0.020 ± 0.003	0.034 ± 0.003	0.021 ± 0.002	0.030 ± 0.002
<i>CXCL11 stimulation</i>							
N	5	5	5	5	5	5	5
EC₅₀ (nM)	95.71	N/A	N/A	168.10	779.70	103.40	52.73
logEC₅₀ ± S.E.M.	7.02 ± 0.16	N/A	N/A	6.77 ± 0.14	6.11 ± 1.66	6.99 ± 0.14	7.28 ± 0.32
Top ± S.E.M.	0.094 ± 0.005*	N/A	0.055 ± 0.003	0.055 ± 0.003	0.062 ± 0.058	0.063 ± 0.004	0.049 ± 0.003
Bottom ± S.E.M.	0.022 ± 0.002	N/A	0.058 ± 0.002	0.019 ± 0.001	0.032 ± 0.003	0.020 ± 0.001	0.028 ± 0.002

* $p < 0.05$

TABLE II. Curve-fitting parameters of radioligand displacement to CXCR7 receptor and mutants. The table summarizes the curve parameters of the radioligand displacement assays by ¹²⁵I-CXCL12 or ¹²⁵I-CXCL11 shown in Fig. 2. The differences in IC₅₀ upon CXCL12 stimulation were statistically significant between CXCR7WT and CXCR7-R142A (p<0.05) (one-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test). Standard Error of the Mean, S.E.M.

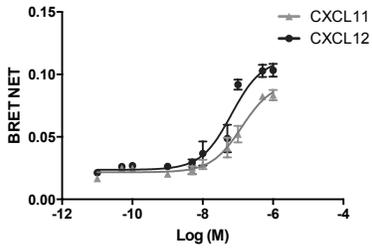
CXCR7-DRY Mutants			
	WT	R142A	N127S
¹²⁵I-CXCL12 displacement			
N	4	4	4
IC₅₀ (nM)	5.99*	18.69*	1.91
logIC₅₀ ± S.E.M.	-8.22 ± 0.10	-7.73 ± 0.06	-8.72 ± 0.08
¹²⁵I-CXCL11 displacement			
N	8	7	5
IC₅₀ (nM)	9.34	27.7	4.66
logIC₅₀ ± S.E.M.	-8.03 ± 0.07	-7.56 ± 0.10	-8.33 ± 0.07

***p<0.05**

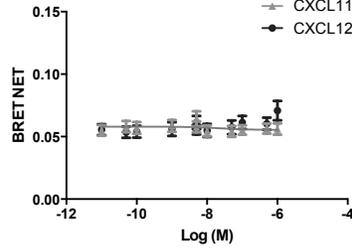
FIGURES

Figure 1

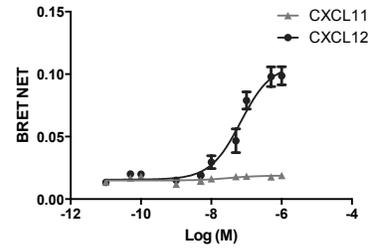
A. CXCR7-WT



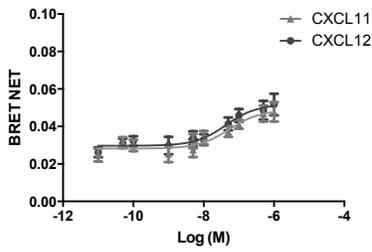
B. CXCR7-N127S



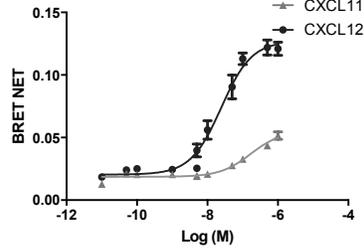
C. CXCR7-R142A



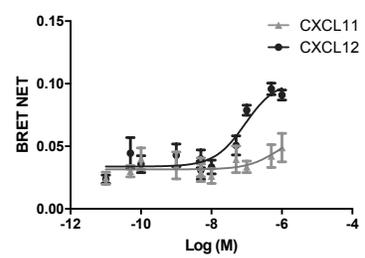
D. CXCR7-D141N



E. CXCR7-N127D



F. CXCR7-N127K



G. CXCR7-Y143A

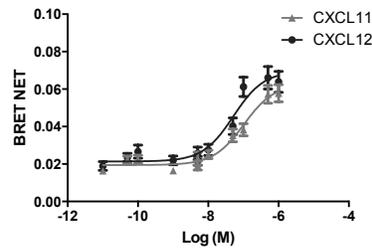
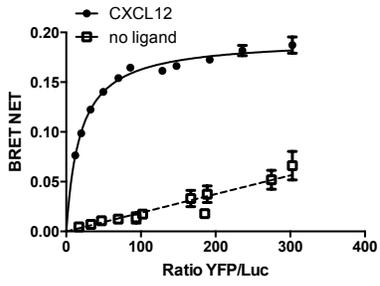
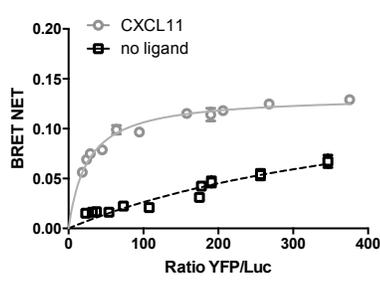


Figure 2

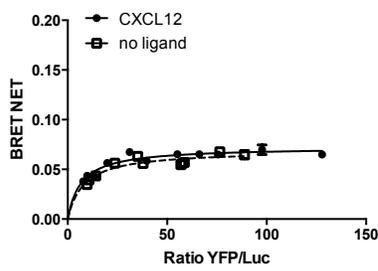
A. CXCR7 / β -arrestine



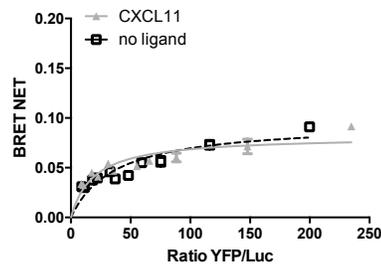
B. CXCR7 / β -arrestin



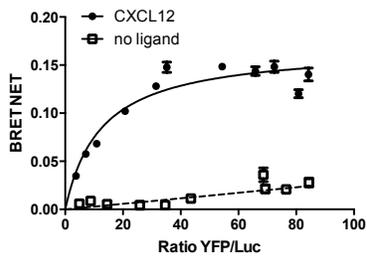
C. CXCR7-N127S / β -arrestine



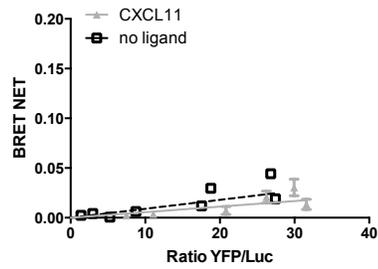
D. CXCR7-N127S / β -arrestin



E. CXCR7-R142A / β -arrestine



F. CXCR7-R142A / β -arrestin



G.

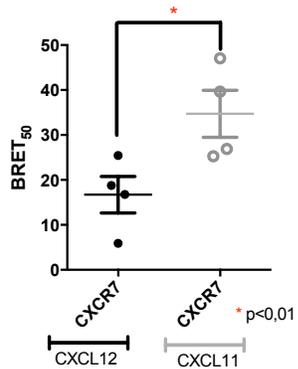


Figure 3

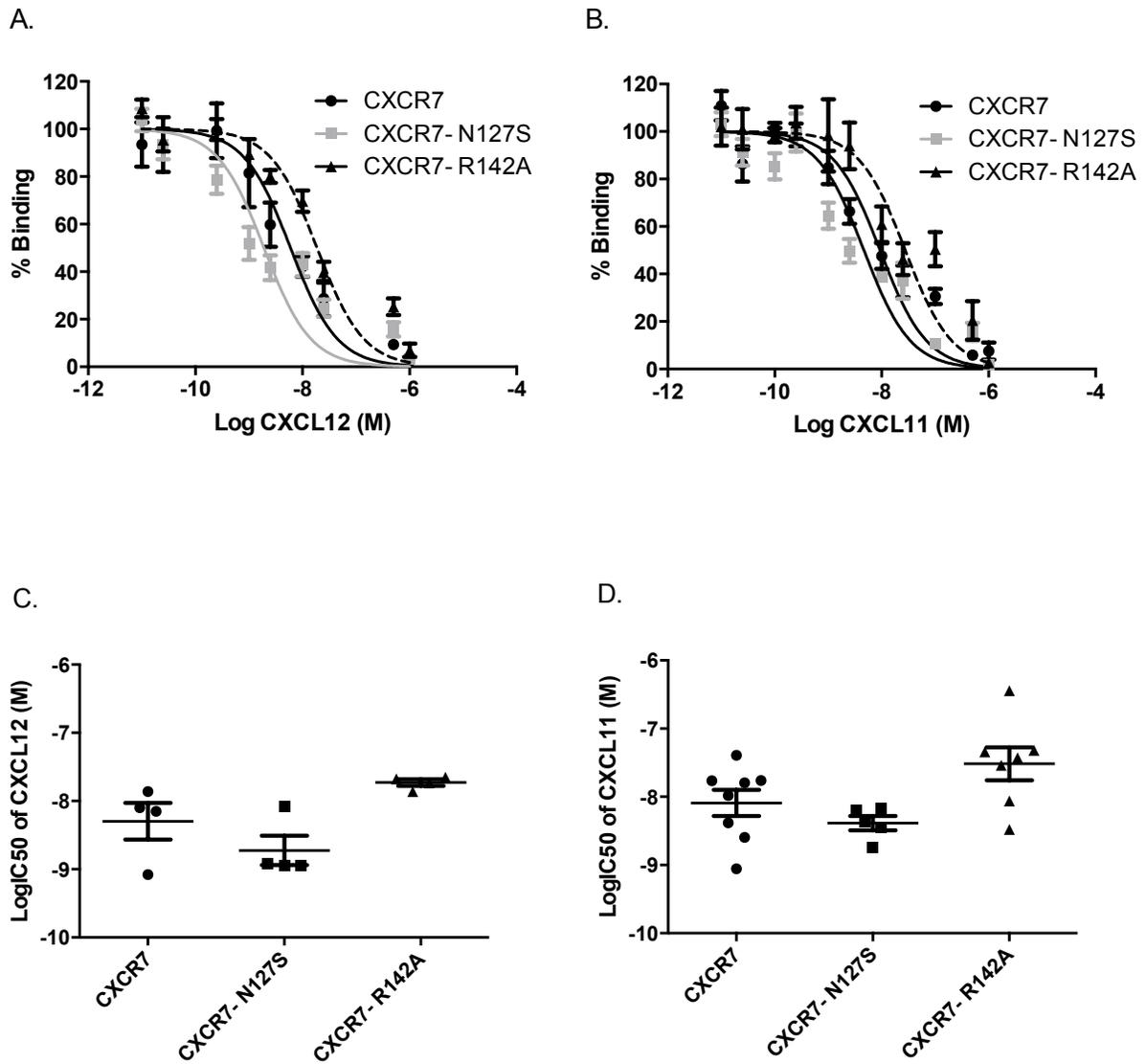
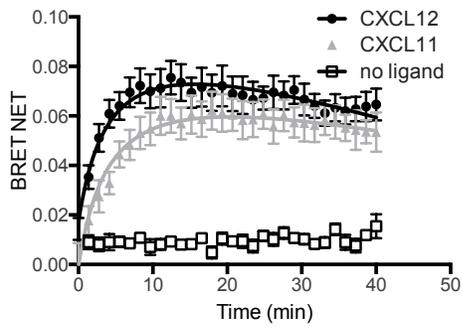


Figure 4

A. CXCR7 / β -arrestin (*Association*)



B. CXCR7 / β -arrestin (*Dissociation*)

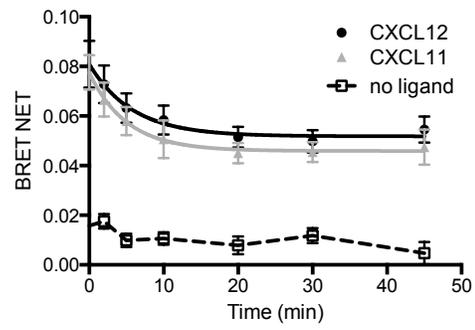


Figure 5

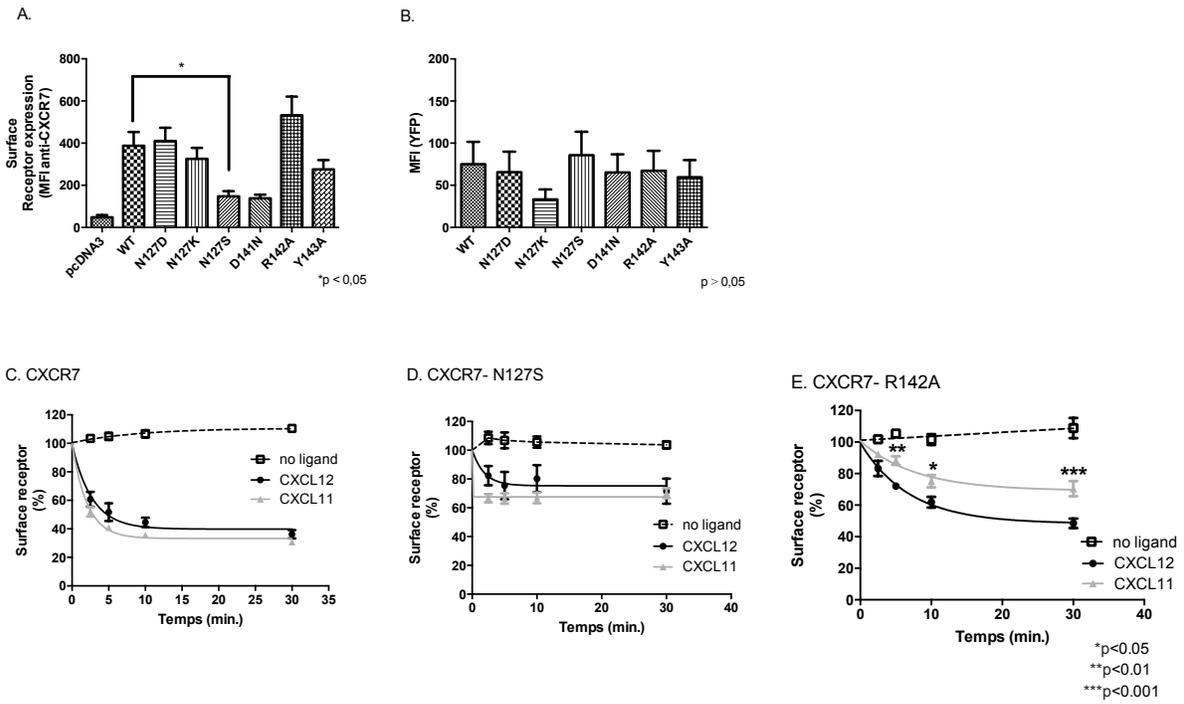


Figure 6

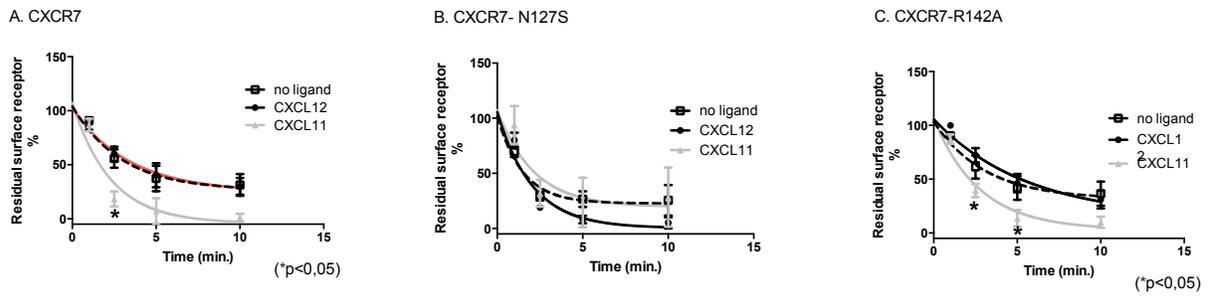


Figure 7

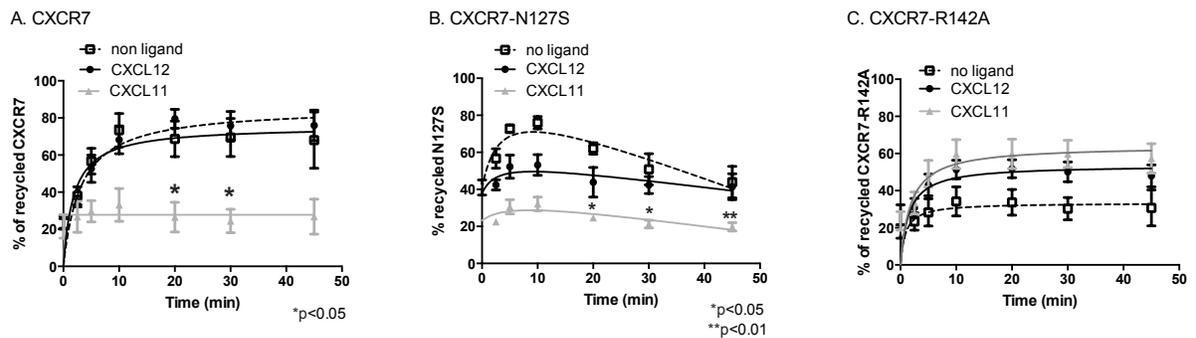
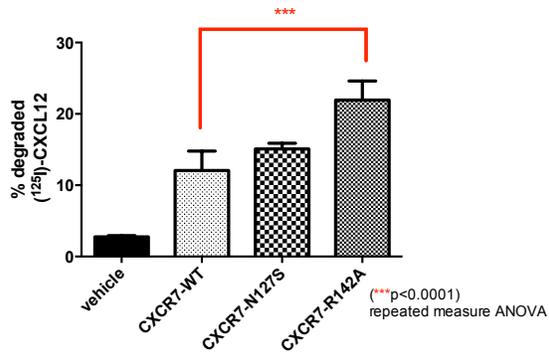
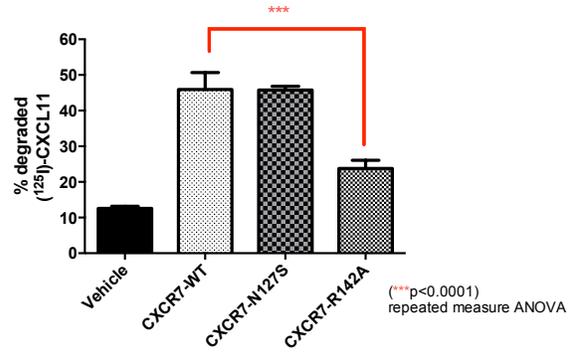


Figure 8

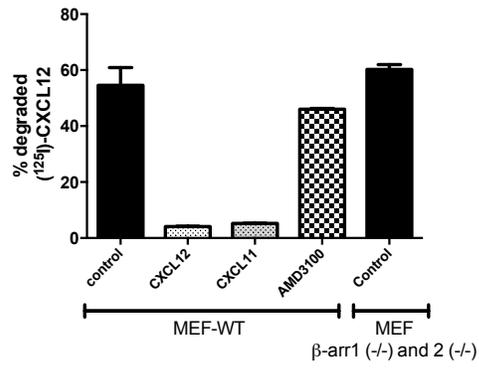
A. CXCL12



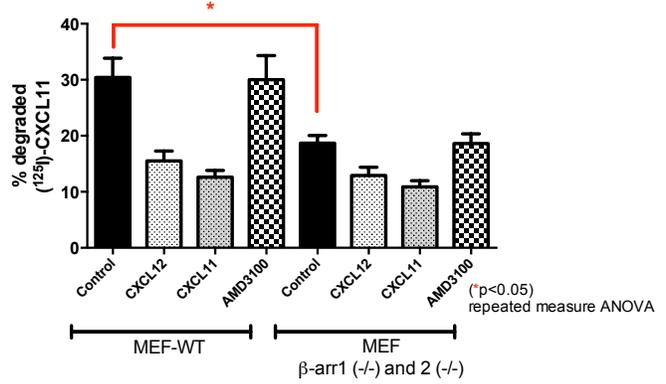
B. CXCL11



C. CXCL12 degradation



D. CXCL11 degradation



SUPPLEMENTAL DATA

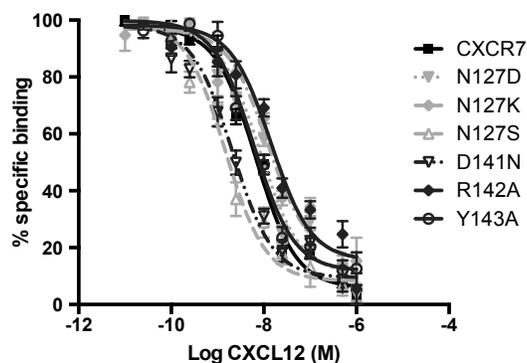
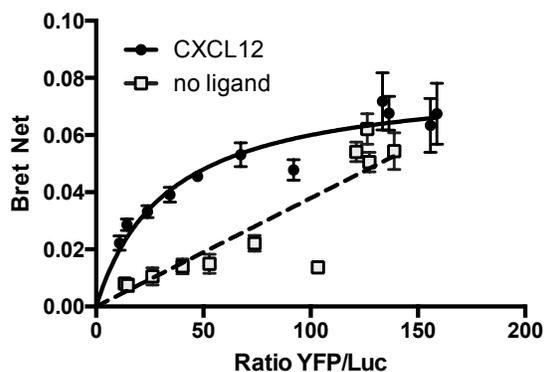


Figure S1. Characterization of all CXCR7-mutants binding with CXCL12. Radioligand binding of CXCR7 mutants. ^{125}I -CXCL12 displacement by unlabeled CXCL12 was performed on HEK293 cells expressing the different CXCR7 mutants. Data are mean values from five independent experiments, each performed in duplicate.

A. CXCR7-D141N



B. CXCR7-D141N

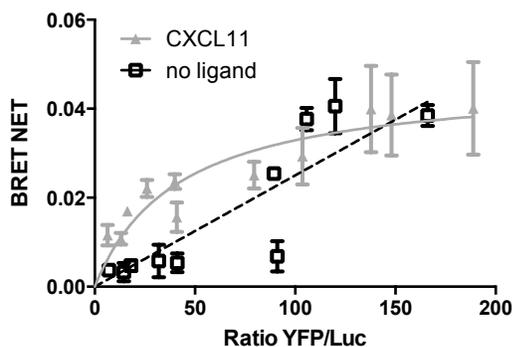


Figure S2. BRET titration assays and curves for D141N-CXCR7. BRET [acceptor]/[donor] titrations between receptor mutants YFP and β -arrestin2-RLuc fusions in *A*, the absence (open squares) and presence of 200 nM CXCL12 (closed circles) and *B*, 200 nM CXCL11 (closed triangles). All data shown are from one representative experiment out of four independent experiments, each performed in triplicate.

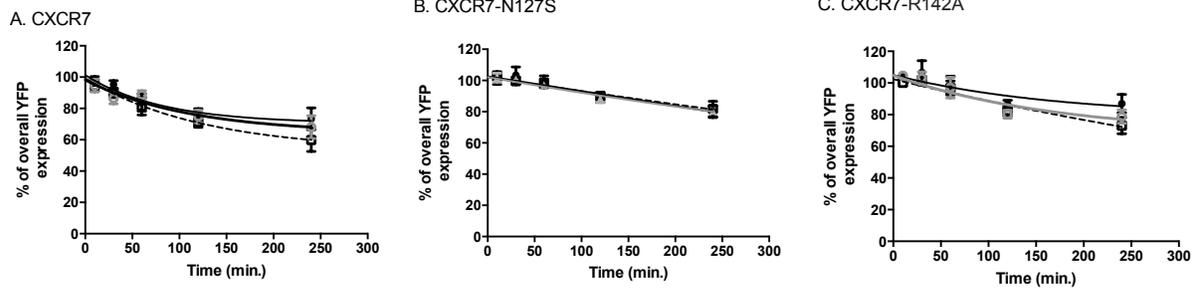


Figure S3. Overall expression levels of CXCR7 and mutant receptors is stable over time in absence or in presence of CXCL11 or CXCL12. HEK293E transiently expressing the different CXCR7-YFP receptor and mutants as indicated were pre-treated with cycloheximide and incubated for 2 h at 37 °C with or without (open squares) 200 nM of CXCL12 (black circles) or CXCL11 (grey triangles). Measures show quantification of fluorescence from the C-terminal YFP-tag of each receptor using flow cytometry and is given in percentage of overall YFP expression. All data shown are pooled data of three independent experiments. *A* (CXCR7-WT), *B*(CXCR7-N127S) and *C*(CXCR7-R142A).

DISCUSSION

Suite à la démonstration en 2005 que CXCL12, une chimiokine initialement reconnue exclusive à CXCR4, pouvait lier le récepteur CXCR7, les interactions entre les chimiokines et CXCR4 et CXCR7 ont dû être revisitées (Balabanian et al., 2005). De plus, étant donné l'implication du récepteur de chimiokine CXCR4 dans plusieurs pathologies et processus physiologiques tel que le VIH, le syndrome de WHIM et la dissémination métastatique lors d'un cancer du sein plusieurs équipes de recherche ont entrepris la recherche et la découverte de molécules thérapeutiques ciblant CXCR4 (Hernandez et al., 2003; Müller et al., 2001; Oberlin et al., 1996). La molécule AMD3100, un modulateur allostérique négatif de CXCR4, a été commercialisée pour la première fois aux États-Unis en décembre 2008 (De Clercq, 2009; 2015; Hatse et al., 2002; Labrosse et al., 1998). Par contre, en 2009, notre équipe de recherche a publié que l'AMD3100 pouvait aussi lier le récepteur de chimiokine CXCR7 et induire à lui seul le recrutement de la β -arrestine à CXCR7, et non à CXCR4 (Kalatskaya et al., 2009). Ces résultats démontraient que bien qu'il puisse lier à la fois CXCR4 et CXCR7, l'AMD3100 induit des effets opposés au niveau de ces récepteurs, notamment par le recrutement de la β -arrestine et en agissant comme agoniste sur le récepteur CXCR7.

Dans cet ordre d'idée, nous avons entrepris d'étudier une autre molécule d'intérêt ayant été développée comme antiviral pour le VIH et ciblant CXCR4, le ligand TC14012, afin d'étudier ses interactions et ses effets sur CXCR4 et CXCR7 (Fujii et al., 2003; Tamamura et al., 2001). De plus, nous nous sommes aussi intéressés aux effets des ligands naturels CXCL11 et CXCL12 sur CXCR7.

À cet effet, les travaux décrits dans cette thèse rapportent d'une part des effets opposés d'un même ligand sur deux récepteurs différents (Schéma 1A), et d'autre part que des ligands différents induisent des réponses différentes sur un seul et même récepteur (Schéma 1B).

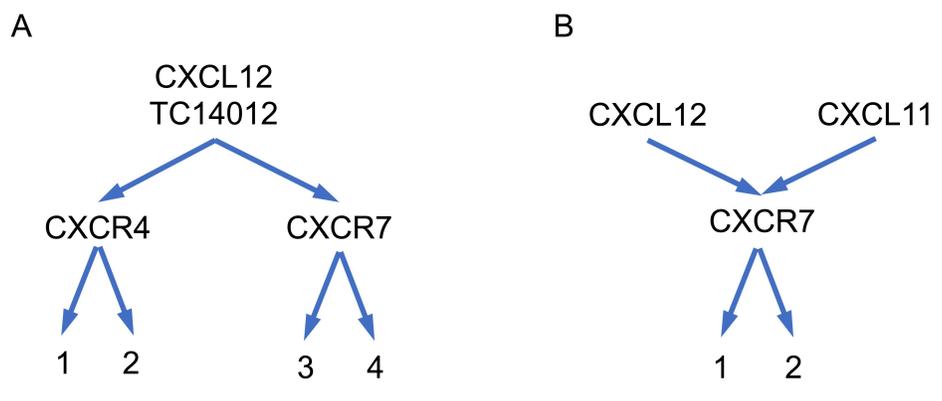


Schéma 1 : A. Effet des ligands CXCL12 et TC14012 sur les récepteurs CXCR4 et CXCR7. B. Effet des ligands CXCL12 et CXCL11 sur le récepteur CXCR7.

La discussion suivante portera dans un premier temps sur les effets opposés du ligand TC14012 sur les récepteurs CXCR4 et CXCR7. Plus précisément, nous discuterons de nos travaux qui montrent que c'est le corps du récepteur (constitué des sept domaines transmembranaires et des boucles les liant) qui serait en partie responsable des effets agonistes de TC14012 sur CXCR7.

Dans un deuxième temps, nous discuterons des différences entre les réponses de CXCR7 induites par ses ligands naturels CXCL11 et CXCL12. Plus spécifiquement, nous discuterons de nos résultats qui montrent que le recrutement de la β -arrestine à CXCR7 par CXCL11 retarde, voire inhibe, le recyclage de CXCR7 à la membrane plasmique. Nous discuterons aussi de la dégradation induite par CXCR7 des deux chimiokines, CXCL11 et CXCL12, et que la β -arrestine ne serait pas essentielle pour ce processus. En parallèle, nous avons investigué davantage le rôle du corps de CXCR7 dans le recrutement de la β -arrestine

induite par CXCL11 et CXCL12. Les motifs E/DRYLAIV et N(L/F)YSS sont des motifs conservés et contenus dans le corps des 7TMRs (Berchiche et al., 2007; Neubig et al., 2003; Rovati et al., 2007; Zhang et al., 2002). Ces motifs sont décrits pour jouer un rôle important lors de l'activation des 7TMRs. À l'aide de mutagenèse ciblant d'une part, l'acide aspartique (D), l'arginine (R) et la tyrosine (Y) du motif E/DRYLAIV et, d'autre part, l'asparagine (N) du motif N(L/F)YSS, nous discuterons de l'impact de ces motifs sur le recrutement de la β -arrestine à CXCR7 en réponse à CXCL11 et CXCL12. Nous discuterons également de l'impact de ces motifs sur le transport intracellulaire de CXCR7 et sur la dégradation induite par CXCR7 des chimiokines CXCL11 et CXCL12.

Enfin, nous discuterons de la classification des 7TMRs en fonction de l'activité de leur motif E/DRYLAIV ou de leur mode d'interaction avec la β -arrestine, et comment ces classifications peuvent s'appliquer à CXCR7 (Oakley et al., 2000; 2001; Rovati et al., 2007). Nous étudions CXCR7 comme modèle unique pour étudier la signalisation intracellulaire indépendante de protéines G. Effectivement, l'agonisme biaisé est souvent rapporté dans la littérature en comparant les réponses dépendantes des protéines G hétérotrimériques versus dépendantes de la β -arrestine (Berchiche et al., 2007; Rajagopal et al., 2010). Bien que CXCR7 soit un récepteur de chimiokine, il est considéré comme un récepteur atypique puisqu'il n'induit pas l'activation de la sous-unité $G\alpha_i$ de la protéine G hétérotrimérique (Balabanian et al., 2005). Or, CXCR7 n'est pas dépourvu de signalisation intracellulaire puisque ce dernier recrute la β -arrestine (Gravel et al., 2010; Kalatskaya et al., 2009). Nos travaux sur CXCR7 étudient la réponse β -arrestine en absence de réponse G et les différences entre les réponses induites par ses ligands naturels CXCL11 et CXCL12.

1. Promiscuité des chimokines envers leurs récepteurs

La chimiokine CXCL12 lie les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR7 dont il est question dans cette thèse. Tout comme CXCL12, la chimiokine CXCL11 lie le récepteur CXCR7. Étant donné, le nombre élevé de chimiokines par rapport au nombre de récepteurs, il est reconnu que plus d'une chimiokine peut lier plus d'un récepteur, et que l'inverse est aussi possible. Ce concept est défini comme étant de la « promiscuité » (Murphy et al., 2000; Proudfoot and Power, 2010). Cette promiscuité entre les chimiokines et leurs récepteurs et le fait qu'elles possèdent des structures similaires suggèrent que les chimiokines sont redondantes les unes par rapport aux autres.

De manière intéressante, une activité inverse d'une même chimiokine sur deux récepteurs différents a déjà été rapportée dans la littérature (Ogilvie et al., 2001). En effet, la chimiokine Éotaxine-1 peut lier les récepteurs CCR2, CCR3 et CCR5, mais elle engendre l'internalisation des récepteurs CCR3 et CCR5, et non celle de CCR2. Les auteurs concluent que cette chimiokine agit donc comme agoniste sur CCR3 et CCR5 et comme antagoniste sur CCR2 sans toutefois investiguer les mécanismes sous-jacents (Ogilvie et al., 2001).

Dans cette thèse, nous rapportons des différences entre les réponses de CXCR7 induites par ses ligands naturels CXCL11 et CXCL12 (se référer au deuxième article de cette thèse). En effet, nous montrons que CXCL11 et CXCL12 possèdent une affinité de liaison similaire à CXCR7 (9,34nM pour CXCL11 et 5,99nM pour CXCL12). Par contre, nous observons qu'il existe une différence au niveau du recrutement de la β -arrestine lorsque le récepteur est en complexe avec l'un ou l'autre de ces ligands. Notamment, nous avons identifié le résidu arginine (R), appartenant au motif E/DRYLAIV, en position 3.50 au sein de

CXCR7, comme étant en partie responsable et nécessaire pour l'interaction de la β -arrestine à CXCR7 suite à sa stimulation par CXCL11, et non par CXCL12.

Ces résultats suggèrent que les modalités de recrutement de la β -arrestine à CXCR7 seraient ligands-dépendants. D'ailleurs, des modalités de recrutement différentielles de la β -arrestine à un même récepteur existent parmi les chimiokines et ont déjà été rapporté dans la littérature (Drury et al., 2011; Rajagopal et al., 2013; Zidar et al., 2009).

D'abord, il a été démontré que même s'il existe une ressemblance structurale et une affinité de liaison similaire entre les chimiokines (CCL19 et CCL21) et leur récepteur (CCR7), ces chimiokines induisent via ce même récepteur des mécanismes moléculaires distincts pour une même signalisation intracellulaire donnée (Kohout et al., 2004; Zidar et al., 2009). Même si les deux ligands mènent au recrutement de la β -arrestine, les auteurs rapportent que seule CCL19 induit la redistribution de la β -arrestine au niveau des vésicules d'endocytose ainsi que la désensibilisation du récepteur (Zidar et al., 2009). De plus, ils montrent que les deux ligands naturels du récepteur de chimiokine CCR7, soit CCL19 et CCL21, mènent à l'activation de différentes GRKs. En présence de CCL19, le récepteur CCR7 se voit phosphoryler par la GRK3 et la GRK6 tandis qu'en présence de CCL21 seule GKR6 est responsable de la phosphorylation du récepteur.

Ensuite, il a été démontré que le récepteur de chimiokine CXCR4 présente des patrons de signalisation intracellulaire différents en fonction de ses ligands, soit la chimiokine CXCL12 monomérique ou dimérique (Drury et al., 2011). Les auteurs rapportent que contrairement au dimère de CXCL12, seul le monomère de CXCL12 recrute la β -arrestine via son récepteur CXCR4 et promeut la chimiotaxie.

Enfin, le groupe de Rajagopal et al. contredit la notion de redondance au niveau de la promiscuité des chimiokines envers leurs récepteurs (Rajagopal et al., 2013). Les auteurs rapportent dans une étude exhaustive les résultats sur six récepteurs de chimiokines (CCR1, CCR5, CCR10, CXCR1, CXCR2 et CXCR3) et de leurs chimiokines respectives. Plus précisément, ils évaluent la plasticité des réponses intracellulaires d'un même récepteur en fonction des différentes chimiokines qui le lient. Les réponses intracellulaires présentés et discutés dans cet article sont l'activation de la protéine G hétérotrimérique, le recrutement de la β -arrestine, et l'internalisation du récepteur. À titre d'exemple, ils montrent que bien que les chimiokines CCL27 et CCL28 activent la protéine G hétérotrimérique via leur récepteur CCR10, seule la chimiokine CCL27 induit le recrutement de la β -arrestine et l'internalisation de son récepteur. Les auteurs soutiennent que pour un même système avec plus d'un ligand endogène, le concept d'agonismes biaisés est un mécanisme généralisé et conservé entre les chimiokines et leurs récepteurs, et qui sert à activer différentes voies de signalisation via un même récepteur. Ainsi, ils concluent que les chimiokines sont des agonistes biaisés pour leurs récepteurs et ne sont pas redondantes (Rajagopal et al., 2013).

Les résultats présentés dans le second article de cette thèse sont en lien avec les conclusions apportées par Rajagopal et al. (Rajagopal et al., 2013). En effet, nous mettons de l'avant que les chimiokines CXCL11 et CXCL12 ne sont pas redondantes entre elles, mais agissent plutôt comme des agonistes biaisés en induisant des cinétiques de traffics différentiels via leur récepteur de chimiokine CXCR7. En effet, nous montrons qu'en présence de CXCL11, l'internalisation du récepteur se fait à un taux significativement plus rapide que pour CXCL12. D'un autre part, nous montrons que CXCL11 induit un retard ou voire même empêche le recyclage de CXCR7.

En perspective, dépendamment de la nature du ligand, soit CXCL11 ou CXCL12, nous pourrions penser que l'activation de la voie de signalisation spécifique à CXCL11 via CXCR7 est favorisée et a un impact physiologique important à un moment précis et ce, au détriment de la voie associée à CXCL12. En effet, CXCL11 a été montré pour jouer un rôle dans l'inhibition de la migration trans-endothéliale médiée par CXCL12 sur des cellules de lymphomes humains (Zabel et al., 2009; 2011). Évidemment, cela ne fait pas l'objet de ce qui est présenté dans cette thèse. Nous discuterons de l'impact de la chimiokine CXCL11 d'un point de vue physiologique un peu plus bas.

2. Mode d'interaction des ligands sur leurs récepteurs d'intérêt

2.1 Mode d'interaction de TC14012 avec CXCR4 et CXCR7

Dans le premier article présenté dans cette thèse (Gravel et al., 2010), nous rapportons des effets opposés du TC14012 et de l'AMD3100 sur le recrutement de la β -arrestine par CXCR4 et CXCR7. Nous montrions que TC14012 et AMD3100 agissent comme agonistes sur CXCR7 et induisent le recrutement de la β -arrestine, contrairement à CXCR4. Ces résultats suggèrent que ces ligands synthétiques ont des modes d'interactions différents sur chacun de ces récepteurs.

Étant donné que CXCR7 partage le même ligand naturel que CXCR4, soit la chimiokine CXCL12, des études publiées à partir de 2010 étudiant CXCR4 ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires d'interaction des ligands naturels et synthétiques avec CXCR4, mais aussi avec CXCR7 (Montpas et al., 2015; Wu et al., 2010). En effet, en 2010, le mode de liaison de TC14012 à CXCR4 a été mis en évidence et élucidé

par la co-cristallisation du récepteur CXCR4 avec la molécule CVX15, un analogue du TC14012 (Wu et al., 2010). La molécule CVX15 est un peptide cyclique analogue au TC14012 qui contient 16 acides aminés plutôt que 14 pour le TC14012 (voir les séquences figure 10). Il a été démontré que les deux résidus supplémentaires en N-terminal du CVX15 (une glycine et une désoxy-proline) ne semblent pas interférer avec sa liaison autant sur CXCR4 que sur CXCR7 (Montpas et al., 2015; Wu et al., 2010).

De plus, la co-cristallisation de CVX15 à CXCR4 a permis d'approfondir le mécanisme moléculaire de liaison de CXCR4 à sa chimiokine CXCL12. Notamment, il a été révélé que CXCR4 possède deux sites de liaison décrit comme « *two-site binding mode* » (Crump et al., 1997). À cet effet, la partie N-terminale du récepteur a été identifiée comme le premier site de liaison et lie le corps de sa chimiokine CXCL12. Le deuxième site de liaison est constitué des résidus acides au niveau de la cavité des domaines transmembranaires du récepteur (tel que l'acide aspartique en position 187) et lie la partie N-terminale de CXCL12, ce qui serait responsable de la signalisation du complexe récepteur-chimiokine (Crump et al., 1997; Lefrançois et al., 2011; Mona et al., 2016; Wu et al., 2010). De plus, Wu et al. montre que le peptide CVX15 bloquerait le deuxième site de liaison, empêchant ainsi la partie N-terminale de CXCL12 d'interagir au sein de la cavité des domaines transmembranaires de CXCR4 et bloquerait son activation (Wu et al., 2010).

CVX15 ₁Arg-₂Arg-₃Nal-₄Cys-₅Tyr-₆Gln-₇Lys-₈dPro-₉Pro-₁₀Tyr-₁₁Arg-₁₂Cit-₁₃Cys-₁₄Arg-₁₅Gly ₁₆dPro
 TC14012 ₁Arg-₂Arg-₃Nal-₄Cys-₅Tyr-₆Cit-₇Lys-₈pCit-₉Pro-₁₀Tyr-₁₁Arg-₁₂Cit-₁₃Cys-₁₄Arg

Figure 10 : Séquence d'acides aminés du TC14012 et de son analogue, le CVX15. Les acides aminés supplémentaires en N-terminal sont soulignés. Nal=1-3-(2-naphthyl)alanine, Cit=l-citrulline, dPro=désoxy-proline (Tamamura et al., 2001; Wu et al., 2010)

Ce n'est que cinq années plus tard que Montpas et al. étudient le mode d'interaction du peptide TC14012, analogue du CVX15, avec le récepteur CXCR7 (Montpas et al., 2015). Les auteurs ont fait des études de dynamique moléculaire pour CXCR7 en utilisant la modélisation du crystal CXCR4/CVX15 de Wu et al. (Wu et al., 2010). En combinant l'usage de composés analogues au TC14012, de récepteurs mutants ainsi que la modélisation moléculaire, Montpas et al. ont caractérisé le mode de liaison du TC14012 à CXCR7 (Montpas et al., 2015). De plus, ils montrent que le mode de liaison de TC14012 à CXCR7 est similaire à son mode de liaison à CXCR4. En effet, TC14012 utilise les mêmes résidus clés de CXCR4 pour lier CXCR7, soit les résidus en positions D4.60 (4^{ème} domaine transmembranaire, résidu acide aspartique en position 60) et D6.58 (6^{ème} domaine transmembranaire, résidu acide aspartique en position 58) de chacun des récepteurs. Ces deux résidus conservés entre CXCR4 et CXCR7 forment des ponts salins avec les arginines en position 2 et 14 du TC14012. TC14012 est positionné de manière à recouvrir la quasi-totalité de la surface correspondante à la pochette de liaison formée par le troisième et septième domaine transmembranaire de CXCR7, tout comme pour CXCR4. En se positionnant ainsi sur CXCR7, TC14012 bloquerait le 2^{ème} site de liaison à CXCL12, empêchant ainsi la partie N-terminale de CXCL12 d'entrer à l'intérieur de la pochette de liaison. Les auteurs suggèrent donc que contrairement à CXCR4, seule l'interaction en surface du TC14012 au niveau du 2^{ème} site de liaison de CXCR7 est suffisante et nécessaire pour induire le recrutement de la β -arrestine. Ce mécanisme serait aussi dépendant de la stabilisation structurale de la deuxième boucle extracellulaire (ECL2) de CXCR7. Leurs résultats tendent à démontrer que l'effet opposé de TC14012 sur CXCR4 et

CXCR7 n'est pas dû par le mode selon lequel il s'engage sur ces récepteurs puisque ce dernier est similaire.

Tel que mentionné ci-haut, les conclusions du premier article de cette thèse suggèrent qu'il y a un mécanisme d'activation différentiel des deux récepteurs CXCR7 et CXCR4 suite à la liaison des ligands TC14012 et AMD3100. Nous pouvons toutefois nuancer et corroborer nos conclusions à celles de Montpas et al. qui démontrent que le TC14012 s'engage de la même façon sur les deux récepteurs. Le recrutement de la β -arrestine à CXCR7 suite à sa liaison à TC14012 pourrait s'expliquer, par exemple, par un changement de conformation différent de celui induit chez CXCR4. Cet aspect n'a pas été étudié dans le premier article de cette thèse (Gravel et al., 2010), ni dans celui de Montpas et al. (Montpas et al., 2015) et pourrait faire l'objet de travaux futurs.

2.2 Mode d'interaction du CXCL11 et du CXCL12 à CXCR7

Les profils de recrutement de la β -arrestine à CXCR7 induits par CXCL11 et CXCL12, tels que montrés à l'aide d'expériences de doses-réponses et de titration en BRET présentés dans le deuxième article de cette thèse (Gravel et al. en préparation, Figure 1A, Tableau I et Figure 2G), nous permettent de constater que CXCL11 et CXCL12 interagissent différemment sur CXCR7. En effet, nous montrons que CXCL11 et CXCL12 induisent le recrutement de la β -arrestine au récepteur CXCR7 de type sauvage. Nous constatons qu'il semble y avoir une légère différence de recrutement entre CXCL11 et CXCL12. En effet, nous montrons que les efficacités de la réponse BRET du recrutement de la β -arrestine induites par CXCL11 et CXCL12 diffèrent et cette différence est statistiquement significative (Tableau I). La présence de signification statistique entre CXCL11 et CXCL12 est corroborée puisque nous montrons

dans cette même expérience une différence franche et significative de recrutement de β -arrestine a un mutant de CXCR7 (le mutant CXCR7-R142A), et en réponse à CXCL11 et CXCL12, notamment par l'absence recrutement de β -arrestine en réponse à CXCL11. De plus, les valeurs de BRET₅₀ suite aux expériences de titration sont statistiquement différents entre CXCL11 et CXCL12 pour CXCR7 de type sauvage ce qui signifie que la propension d'association de la β -arrestine à CXCR7 est dépendante de la chimiokine (Figure 2G). Sachant que les mesures de BRET sont des mesures de distance entre des partenaires BRET (ici CXCR7 et β -arrestine), elles ne permettent donc pas d'évaluer directement la conformation du récepteur. Ainsi, la présence de signification statistique entre les deux chimiokines pourrait s'expliquer par un changement de conformation distinct au sein de CXCR7 dépendamment de la chimiokine, cependant cet aspect n'a pas été étudié dans le contexte de cette thèse et pourrait faire l'objet de travaux futurs.

En lien, il est montré que CXCL11 et CXCL12 induisent des effets différents sur CXCR7 dans des expériences d'expression de surface et de recyclage (Gravel et al. en préparation, Figure 5C, Figure 6A et Figure 7A). De plus, des études récentes vont également en ce sens où il fut montré que CXCL11 et CXCL12 présentent différents mode d'interaction avec CXCR7 (Benredjem et al., 2017). Globalement, ces études tendent à démontrer que CXCL11 et CXCL12 ne sont pas des chimiokines redondantes sur CXCR7.

3. Rôles du corps et de la partie C-terminale des 7TMRs sur leurs interactions avec la β -arrestine

3.1 Rôle du corps des 7TMRs sur l'interaction avec la β -arrestine

Les résultats issus du premier article de cette thèse montrent que la β -arrestine interagit avec CXCR7 lorsqu'il est stimulé par le TC14012 et l'AMD3100 ce qui n'est pas observé avec CXCR4 (Gravel et al., 2010). Nous avons donc cherché à comprendre si cet effet est attribuable à la partie C-terminale ou au corps de chacun de ces récepteurs. Nous avons donc inter-changé les parties C-terminales de CXCR4 et CXCR7 et créé des récepteurs chimériques. Nous avons observé que le récepteur chimérique CXCR7-CtailCXCR4 conserve son interaction avec la β -arrestine en présence du TC14012 et de l'AMD3100 et agit comme le récepteur CXCR7 de type sauvage. Quant à elle, la chimère CXCR4-CtailCXCR7, lorsque stimulée par le TC14012 ou l'AMD3100, agit comme le récepteur CXCR4 de type sauvage et n'interagit pas avec la β -arrestine. Ces expériences nous ont permis de conclure que le corps des récepteurs CXCR4 et CXCR7, plutôt que leurs parties C-terminales, dictent le recrutement de la β -arrestine aux récepteurs en présence de ligands.

Dans le deuxième article de cette thèse, nous avons investigué davantage le rôle du corps de CXCR7 dans le recrutement de la β -arrestine (Gravel et al. en préparation). Nous avons identifié le résidu arginine (R) appartenant au motif E/DRYLAIV du 3^{ème} domaine transmembranaire de CXCR7 comme étant en partie responsable et nécessaire pour son interaction avec la β -arrestine suite à sa stimulation par CXCL11, et non par CXCL12. Le motif E/DRYLAIV a pour fonction d'assurer la stabilité du récepteur en le maintenant dans sa conformation basale et est donc, par le fait même, impliqué dans la transition conformationnelle du récepteur lors de son activation (Neubig et al., 2003; Rovati et al.,

2007). Le rôle de ce motif et son impact sur l'interaction avec la β -arrestine sera discuté plus loin à la sous-section suivante.

De manière générale, nos résultats montrent que le recrutement de la β -arrestine à CXCR7 est dépendante du corps du récepteur. Cela semble aller à l'encontre des conclusions émises par Zabel et al. qui suggèrent que le recrutement de la β -arrestine est dépendant de la partie C-terminale de CXCR7 (Zabel et al., 2009). Notamment, ils ont montré qu'une délétion de 43 acides aminés correspondant à la totalité de la partie C-terminale de CXCR7 résulte en une perte complète d'internalisation du récepteur. Les auteurs interprètent cette perte d'internalisation comme une perte de recrutement de la β -arrestine. Cependant, aucune observation ou expérience n'objective la perte réelle d'interaction entre le récepteur mutant et la β -arrestine. D'ailleurs, il n'est pas exclu que le récepteur CXCR7 muté pour sa partie C-terminale interagisse tout de même avec la β -arrestine au niveau du corps de CXCR7, ce qui serait cohérent avec les résultats et les conclusions que nous avançons.

À cet effet, les évidences dans la littérature que le corps des 7TMR's, qui comprend les 7 domaines transmembranaires et les boucles les liant, occupe un rôle important dans son interaction avec la β -arrestine sont nombreuses (Kim and Caron, 2008; Krupnick et al., 1994; Lagane et al., 2005; Marion et al., 2006; Shukla et al., 2014; Watts et al., 2013). En effet, une des premières études montrant ce phénomène utilise des peptides synthétiques provenant de séquences cytoplasmiques de la rhodopsine et démontre que la β -arrestine interagit avec la troisième boucle intracellulaire du récepteur à la rhodopsine (Krupnick et al., 1994). De plus, cette même équipe de recherche montre qu'il y a une interaction directe entre la troisième boucle intracellulaire des récepteurs α 2-adrénérique, muscarinique M2 et M3 et la β -arrestine

(Wu et al., 1997). À la lumière de ce qu'il a observé, Krupnick désigne la troisième boucle cytoplasmique des 7TMRs comme la région responsable du recrutement de la β -arrestine (Krupnick and Benovic, 1998).

3.1.1 Impact du motif E/DRYLAIV du récepteur CXCR7 sur son interaction avec la β -arrestine

Les mécanismes d'activation du récepteur CXCR7 discutés dans cette thèse font de ce récepteur un modèle de choix pour étudier l'interaction ligand/récepteur responsable d'une signalisation intracellulaire protéine G hétérotrimérique-indépendante. Bien que le motif E/DRYLAIV est considéré comme une interface commune pour l'interaction de la protéine G hétérotrimérique et la β -arrestine pour la majorité des 7TMRs, il est connue que CXCR7 signale indépendamment de la protéine G (Balabanian et al., 2005; Kim and Caron, 2008; Shukla et al., 2014). Pour la première fois, les travaux de cette thèse s'intéressent spécifiquement à l'impact du motif E/DRYLAIV du récepteur CXCR7 sur l'interaction avec la β -arrestine et la signalisation intracellulaire qui en découle, telle que le transport intracellulaire du récepteur et la dégradation des chimiokines.

Le motif E/DRYLAIV est reconnu pour assurer la stabilité du récepteur en le maintenant dans sa conformation basale et est impliqué dans la transition conformationnelle du récepteur lors de son activation (Neubig et al., 2003; Rovati et al., 2007). Le résidu arginine de ce motif forme un double pont salin avec un résidu chargé négativement tel un acide glutamique au niveau du sixième domaine transmembranaire. Ce double pont salin est défini comme étant un cadenas ionique au sein des 7TMRs. Ainsi, la nature de la conformation du cadenas ionique est responsable du maintien de la conformation inactive du récepteur. Une

conformation active du récepteur suite à la stimulation par un agoniste se verra en conformation ouverte et résultera en un bris du cadenas ionique. Les différentes études montrant la cristallisation du récepteur à la rhodopsine ainsi que celle du récepteur β 2-adrénergique rapportent que la β -arrestine interagit avec ces résidus (Feuerstein et al., 2009; Palczewski et al., 2000; Rasmussen et al., 2011; Rosenbaum et al., 2007; Shukla et al., 2014). Selon les résultats montrés dans le deuxième article de cette thèse (Gravel et al. en préparation), nous observons que la substitution du résidu arginine au sein de ce motif par un résidu alanine ne permet pas à CXCR7 d'interagir avec la β -arrestine lorsqu'il est stimulé par CXCL11. La conformation de ce récepteur mutant se trouverait donc dans un état ouvert plutôt que fermé. En effet, le résidu alanine, n'étant pas chargé, n'est plus en mesure de former un double pont salin avec le résidu d'acide glutamique et le cadenas ionique se trouve en position ouverte.

Nos résultats pourraient suggérer que l'arginine au sein de CXCR7 est un résidu essentiel pour stabiliser son interaction avec la β -arrestine lorsqu'il est stimulé par CXCL11. À l'inverse, il se pourrait que la substitution du résidu arginine par un alanine affecte directement la conformation du récepteur CXCR7 lorsqu'il est stimulé par CXCL11 et, donc, cela aurait pour effet d'empêcher son interaction avec la β -arrestine. Tout comme le récepteur CXCR7, le récepteur de chimiokine CCX-CKR est considéré comme atypique et signale via la β -arrestine (Watts et al., 2013). Le récepteur CCX-CKR partage ses ligands endogènes CCL19, CCL21 et CCL25 avec d'autres récepteurs de chimiokines de types classiques, CCR7 et CCR9. Watts et al. présentent des chimères du récepteur CCX-CKR où les domaines transmembranaires (incluant les boucles intracellulaires) correspondant à chacun des récepteurs CCR7 et CCR9 ont été interchangeés et démontrent que le motif E/DRYLAIIV doit

être intact pour assurer la signalisation du récepteur CCX-CKR (Watts et al., 2013). Ainsi, nos résultats sur CXCL11 ainsi que ceux rapportés dans la littérature suggèrent que le mode d'interaction de certains ligands sur leurs récepteurs d'intérêts affecterait directement la conformation du cadenas ionique et influencerait leur interaction avec la β -arrestine.

En revanche, nos résultats suggèrent que l'interaction entre CXCL12 et CXCR7 ne semble pas avoir besoin d'un motif E/DRYLAIV intact pour recruter la β -arrestine. En effet, nous montrons que tous nos mutants du motif E/DRYLAIV de CXCR7 recrutent la β -arrestine en réponse à CXCL12 de façon comparable à CXCR7 avec un motif E/DRYLAIV intact (Gravel et al. en préparation, Figure 1). À titre de comparaison, l'impact du motif E/DRYLAIV pour le récepteur de chimiokine CCR5 sur son interaction avec la β -arrestine est assez bien documenté dans la littérature (Lagane et al., 2005; Stambouli et al., 2014). Contrairement à CXCR7, CCR5 signale de façon classique via la protéine G α i. Dans l'étude de Lagane et al., le résidu arginine du motif E/DRYLAIV de CCR5 a été muté pour une asparagine, un résidu ayant une chaîne polaire non chargée (mutant CCR5-R126N) (Lagane et al., 2005). Les auteurs rapportent que ce mutant, lorsque stimulé par CCL4 (un ligand endogène de CCR5), n'est plus en mesure d'activer la signalisation via la protéine G α i, qu'il ne perd pas son interaction avec la β -arrestine, et n'est plus en mesure d'induire la chimiotaxie. Par le fait même, leurs travaux montrent que le motif E/DRYLAIV de CCR5 n'a pas besoin d'être intact pour interagir avec la β -arrestine. Cela est en accord avec nos résultats sur l'interaction entre CXCL12 et CXCR7 qui ne semble pas avoir besoin d'un motif E/DRYLAIV intact pour recruter la β -arrestine.

3.1.2 Motifs E/DRYLAIV et N(L/F)YSS des 7TMRs et interface de recrutement commune de la protéine G hétérotrimérique et de la β -arrestine

Berchiche et al ont publié en 2007 un étude faisant la mutagenèse de résidus importants dans le maintien de l'équilibre conformationnel dynamique régulant l'interaction de la sous-unité $G\alpha_i$ aux récepteurs de chimiokine de type CXC, plus précisément l'asparagine en position 3.35 du motif N(L/F)YSS hautement conservé du troisième domaine transmembranaire (Berchiche et al., 2007). Cependant, ils ont plutôt évalué l'activation de la sous-unité $G\alpha_i$ par CXCR4, sans étudier l'interaction ou le recrutement de la β -arrestine. Il est intéressant de rappeler que CXCR4 et CXCR7 partagent la chimiokine CXCL12 comme ligand endogène. Berchiche et al. observent que le résidu asparagine (N) du motif N(L/F)YSS de CXCR4 est important pour le couplage et l'activation de la sous-unité $G\alpha_i$. Ainsi, ils montrent que la substitution de ce résidu par une sérine (S) donne lieu à un récepteur CXCR4 qui active constitutivement la sous-unité $G\alpha_i$, ce qui a pour effet d'inhiber la production d'AMPcyclique. Sachant que le récepteur mutant CXCR4-N119S interagit de façon constitutive avec la sous-unité $G\alpha_i$, il serait intéressant d'étudier si cette mutation a un impact sur l'interaction entre CXCR4 et la β -arrestine. À cet effet, puisque la sous-unité $G\alpha_i$ est liée de façon constitutive au mutant CXCR4-N119S, on pourrait s'attendre à ce que ce mutant interagisse faiblement avec la β -arrestine, ce qui n'a toutefois pas été étudié. En contrepartie, notre étude d'un mutant du même résidu chez CXCR7 (le mutant CXCR7-N127S) montre une interaction constitutive avec la β -arrestine (Gravel et al. en préparation, Figure 1 et Figure 2). Puisque le récepteur CXCR7 ne signale pas via la protéine G hétérotrimérique, ces résultats pourraient suggérer que l'asparagine du motif N(L/F)YSS hautement conservé du troisième

domaine transmembranaire agit comme interface commune pour le recrutement de la protéine G hétérotrimérique et de la β -arrestine. Une interface commune pour la protéine G hétérotrimérique et de la β -arrestine a d'ailleurs été démontré sur un autre type de motif, le motif E/DRYLAIV, tel que discuté ci-dessus (Kim and Caron, 2008; Lagane et al., 2005; Shukla et al., 2014).

En plus d'étudier le motif N(L/F)YSS, Berchiche et al. se sont aussi intéressés au motif E/DRYLAIV de CXCR4, par la mutagenèse des acide aspartique (D133N), arginine (R134A) et tyrosine (Y135A) aux positions 3.49, 3.50 et 3.51. Les mutants D133N et Y135A ne démontrent aucun changement apparent dans l'activation de la protéine $G_{\alpha i}$ médiée par la stimulation de CXCR4 par CXCL12 (Berchiche et al., 2007). En revanche, leur mutant CXCR4-R134A induit une activité fortement réduite de la protéine $G_{\alpha i}$. Ainsi, leurs résultats montrent que l'arginine du motif E/DRYLAIV de CXCR4 doit être intacte pour assurer le recrutement et l'activation de la protéine G hétérotrimérique.

Bien que Berchiche et al. n'évalue pas le recrutement de la β -arrestine à CXCR4, nous savons que le résidu arginine du motif E/DRYLAIV présente une interface commune et importante pour l'interaction de la protéine G hétérotrimérique et de la β -arrestine avec les 7TMRs (Kim and Caron, 2008; Shukla et al., 2014). Il est donc intéressant de faire un parallèle entre les phénotypes obtenues par Berchiche et al. et nos résultats de mutagenèse du motif E/DRYLAIV de CXCR7 pour le recrutement de la β -arrestine. À cet effet, nous avons observé que le mutant CXCR7-R142A ne permet pas le recrutement de la β -arrestine suite à l'induction par CXCL11 (Gravel et al. en préparation, Figure 1C). Nous pouvons donc également conclure que l'arginine du motif E/DRYLAIV de CXCR7 doit être intacte pour

induire le recrutement de la β -arrestine lorsqu'il est stimulé avec CXCL11. Toutefois, ces mêmes résultats montrent que cela ne semble pas être le cas lorsque CXCR7 est stimulé par CXCL12, où la β -arrestine est toujours recrutée à CXCR7 malgré la mutation de l'arginine. Ces constatations ne sont pas en contradiction avec ce qui a été précédemment abordé plus haut lors de la discussion sur les modes d'interaction différentiels des deux ligands CXCL11 et CXCL12 sur CXCR7.

À la lumière de ces résultats obtenus, nous sommes en mesure de constater et de proposer que pour certains ligands, le résidu asparagine du motif N(L/F)YSS et le résidu arginine du motif E/DRYLAIIV sont importants dans le maintien de la conformation de base et le réarrangement conformationnel menant à l'activation des récepteurs CXCR4 et CXCR7.

Pour conclure sur ce sujet, nos résultats discutés ici montrent pour la première fois l'impact du motif E/DRYLAIIV du récepteur de chimokine CXCR7 sur son interaction avec la β -arrestine. En effet, c'est la première fois qu'une étude s'intéresse à la mutagenèse systématique des trois résidus essentiels du motif E/DRYLAIIV d'un 7TMR sur le recrutement de la β -arrestine (c'est à dire l'acide aspartique, l'arginine et la tyrosine). À titre de comparaison, les études de Lagane et Watts portaient sur les récepteurs de chimiokines CCR5 et CCX-CKR et ne s'intéressaient pas directement à la mutation ciblée des trois résidus essentiels du motif E/DRYLAIIV (Lagane et al., 2005; Watts et al., 2013). De plus, nos travaux portent spécifiquement sur le recrutement de la β -arrestine, tandis que les leurs s'intéressent plutôt à l'activation de la protéine G hétérotrimérique.

3.2 Rôles de la partie C-terminale des 7TMRs sur l'interaction avec la β -arrestine

La partie C-terminale des 7TMRs est considéré comme un site important de phosphorylations nécessaires au recrutement de la β -arrestine (Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Kong et al., 2010; Lee et al., 2001). Ces phosphorylations augmentent l'affinité et assurent la stabilité de l'interaction de la β -arrestine avec la partie C-terminale des 7TMRs. Ce sont les protéines G kinases (GRKs) qui induisent la phosphorylation de résidus spécifiques tels que les sérines et thréonines de la partie C-terminale des 7TMRs, et ces kinases jouent un rôle essentiel dans l'interaction de la β -arrestine aux récepteurs (Lee et al., 2001; Nobles et al., 2011). En bref, le complexe activé ligand / récepteur induit l'activation des GRKs, ce qui mène à la phosphorylation de la partie C-terminale et induit le recrutement de la β -arrestine, engendrant généralement l'internalisation des récepteurs via des puits tapissés de clathrines. Cela a pour effet de mener soit au recyclage du récepteur à la surface cellulaire ou à la dégradation de celui-ci (Ferguson et al., 1996; Zhang et al., 1996).

Dans le premier article de cette thèse, nous avons démontré que la partie C-terminale des récepteurs CXCR4 et CXCR7 serait responsable de dicter la puissance du recrutement de la β -arrestine en réponse à CXCL12 (Gravel et al., 2010). La puissance est définie comme étant la concentration nécessaire d'un ligand pour atteindre 50% de la réponse maximale d'un système expérimental à l'étude. Cette propriété pharmacologique traduit donc la force du ligand à induire un changement de comportement au sein de son récepteur, soit pour l'inhiber, soit pour l'activer et mener à une réponse intracellulaire spécifique. Dans la littérature, la puissance est représentée par l'EC50 (Lefkowitz, 2007b). Dans le cas qui nous concerne, les réponses induites par CXCL12 sur le récepteur CXCR7 de type sauvage et sur la chimère CXCR4-CtailCXCR7 présentent des EC50 significativement plus petits (EC₅₀ de 30 and 58

nM, respectivement) que celles pour le récepteur CXCR4 de type sauvage et de la chimère CXCR7-CtailCXCR4 (EC_{50} de 242 and 191 nM, respectivement). Cela suggère que la partie C-terminale de CXCR7 a une plus grande puissance pour recruter la β -arrestine que celle de CXCR4. Par contre, nous ne pouvons exclure la possibilité que ce soit les fusion-BRETs des parties C-terminales avec la YFP qui affectent indirectement la puissance mesurée des parties C-terminales. Cette possibilité aurait pu être exclue en utilisant un système BRET alternatif, où les récepteurs CXCR4 et CXCR7 de types sauvages sont non fusionnés à la YFP et mis en présence d'une fusion double-brillance de la β -arrestine (RLuc-arrestin-YFP). Un tel système a été rapporté dans la littérature par Charest et al. (Charest et al., 2005).

De plus, il a été montré que CXCR4 se trouve phosphorylé sur des résidus sérines au niveau de sa partie C-terminale par différentes GRK (Busillo et al., 2010). Les auteurs montrent que GRK2, GRK3 et GRK6 engendrent différents effets sur la production de calcium et sur l'activation de ERK1/2 suite à la phosphorylation de la partie C-terminale de CXCR4 (Busillo et al., 2010). En effet, le complexe activé CXCL12/CXCR4 peut être phosphorylé par GRK2 et GRK6, provoquant le recrutement de β -arrestine 3 et l'inhibition de la production de calcium suite à l'arrêt de la signalisation par la sous-unité G α i. De plus, le récepteur peut également être phosphorylé par GRK3 et GRK6, menant au recrutement de β -arrestine 2 et à l'activation de ERK1/2, indépendamment de la signalisation via la protéine G hétérotrimérique. Ainsi, ils suggèrent que la biodisponibilité cytoplasmique des différentes isoformes de GRKs dicterait l'activation de diverses voies de signalisation intrinsèques aux 7TMRs, ici au CXCR4.

Toutefois, l'identification de sites de phosphorylation spécifiques au niveau de résidus sérines et thréonines de la partie C-terminale de CXCR7 par différentes kinases, telles que les

GRKs, n'est pas rapportée dans la littérature. Luker et al. rapportent que l'association de CXCR7 à la β -arrestine est augmentée en réponse à la kinase GRK2 activée de manière constitutive dans la cellule sans toutefois s'intéresser à l'interaction spécifique entre GRK2 et le récepteur CXCR7, notamment par l'identification de sites de phosphorylation ou la démonstration d'une phosphorylation directe de CXCR7 par GRK2 (Luker et al., 2009b). Par ailleurs, tel que discuté plus tôt et démontré dans le deuxième article de cette thèse, le profil d'activation de la signalisation β -arrestine par CXCR7 diffère entre les ligands de CXCR7 (Gravel et al. en préparation). Cela a été confirmé par Benredjem et al. qui confirment que CXCL11 et CXCL12 possèdent des modes d'interaction uniques et distincts envers CXCR7 (Benredjem et al., 2017). Ces travaux nous permettent d'émettre l'hypothèse que CXCR7 présente des profils de phosphorylation différents et uniques en fonction du ligand qui le lie, ce qui mène à des profils différents d'activation de la signalisation β -arrestine. D'ailleurs, de telles observations ont déjà été rapportées dans la littérature, notamment pour les récepteurs CCR7, CXCR4, β 2-adrénergique et muscarinique M3 (Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Kong et al., 2010; Nobles et al., 2011; Zidar et al., 2009).

3.3 Modèle intégrant le corps et la partie C-terminale des 7TMRs dans l'interaction entre les récepteurs et β -arrestine

Smith et al. ont proposé un modèle séquentiel d'activation structurelle et différentielle de la β -arrestine avec les 7TMRs (Smith and Rajagopal, 2016). Selon ce modèle, les modalités de recrutement et d'interaction de la β -arrestine au récepteur seraient détectées par deux senseurs moléculaires. Le premier senseur, nommé « *senseur de phosphorylation* », consiste en la phosphorylation de la partie C-terminale des 7TMRs qui serait nécessaire pour le

recrutement de la β -arrestine. Le deuxième senseur, nommé « *senseur d'activation* », consiste en la formation d'un complexe entre la β -arrestine et les domaines transmembranaires du récepteur et les boucles intracellulaires les liant, suite à l'interaction de la β -arrestine avec la partie C-terminale du récepteur (Figure 11). Ainsi, pour être complètement activée, la β -arrestine doit pouvoir interagir avec ces deux senseurs. Les modes d'interactions des différents ligands sur le complexe récepteur/ β -arrestine, ainsi que les modifications post-traductionnelles qui en découlent, dicteraient la conformation qu'adoptera la β -arrestine.

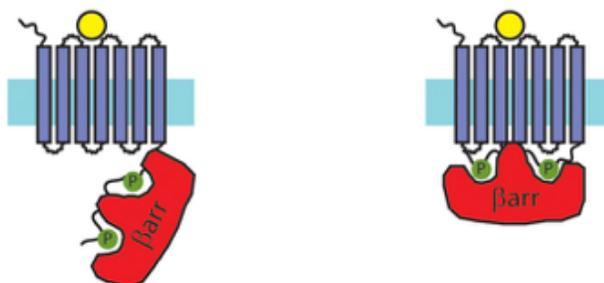


Figure 11 : Modèle séquentiel d'activation structurelle et différentielle de la β -arrestine avec les 7TMRs. À gauche, la β -arrestine interagit seulement avec la partie C-terminale qui est phosphorylée (senseur de phosphorylation). À droite, la β -arrestine, en plus d'interagir avec la partie C-terminale phosphorylée, est en complexe avec les domaines transmembranaires du récepteur (senseur de phosphorylation et senseur d'activation)(Smith and Rajagopal, 2016).

Les résultats que nous rapportons dans les deux articles de cette thèse (Gravel et al., 2010) (Gravel et al. en préparation) et discutés dans la section 3 de cette discussion, suggèrent que le corps de CXCR7 correspond au deuxième senseur d'interaction de la β -arrestine (le senseur d'activation). En effet, dans (Gravel et al., 2010), nous montrons que les inhibiteurs (TC14012 et AMD3100) de CXCR4 agissent comme agonistes sur CXCR7 en induisant le recrutement de la β -arrestine. Par contre, nous avons observé que cet effet n'est pas renversé

lorsque la partie C-terminale de CXCR4 est remplacée par celle de CXCR7 et vice et versa. De plus, dans Gravel et al. en préparation, nos résultats montrent que la mutation du motif E/DRYLAIV du corps de CXCR7 empêche le recrutement de la β -arrestine induite par CXCL11. Ces observations sont cohérentes et suggèrent que le corps de CXCR7 agit comme senseur d'interaction de la β -arrestine, tel que proposé dans le modèle d'activation séquentielle de Smith. Toutefois, ce modèle semble ne pas s'appliquer lorsque CXCR7 est stimulé par CXCL12, étant donné que dans ce contexte, la mutation du motif E/DRYLAIV n'empêche pas le recrutement de la β -arrestine. Bien que nous n'ayons pas explicitement étudié la conformation de la β -arrestine, nos résultats laissent croire qu'elle interagirait différemment avec CXCR7 en adoptant une conformation distincte et unique en fonction du ligand. Cela pourrait signifier l'existence d'une signature propre à CXCR7 en fonction de son ligand et qui encrypterait une signalisation différentielle de la β -arrestine, comme c'est le cas pour les récepteur β 2-adrénergique et CXCR4 (Busillo et al., 2010; Nobles et al., 2011).

Enfin, toujours selon le modèle de Smith, l'activation de la signalisation dépendante de la β -arrestine se produit de manière séquentielle et passe en premier lieu par le senseur de phosphorylation. Bien que nous savons que la phosphorylation de la partie C-terminale des 7TMRs est nécessaire pour leurs interactions avec la β -arrestine, aucune étude dans la littérature ne s'est intéressée à la phosphorylation de la partie C-terminale de CXCR7. De plus, nos expériences n'ont pas adressé spécifiquement le rôle de la partie C-terminale de CXCR7 dans le recrutement de la β -arrestine, notamment par la mutation de celle-ci. Donc le rôle de la partie C-terminale de CXCR7 comme senseur de phosphorylation selon le modèle de Smith n'est pas connu et reste à être déterminé.

4. Implication de la β -arrestine et du motif E/DRYLAIIV sur le transport intracellulaire de CXCR7

Dans le deuxième article de cette thèse, nous rapportons que l'expression du récepteur CXCR7 à la surface cellulaire varie différemment dans le temps en fonction du ligand qui le lie (Gravel et al. en préparation, figure 5). En effet, l'expression en surface de CXCR7 décroît plus rapidement lorsqu'il est stimulé par CXCL11 que par CXCL12. Toutefois, nous démontrons l'effet inverse lorsque l'arginine du motif E/DRYLAIIV du corps de CXCR7 est muté pour une alanine (mutant CXCR7-R142A). Puisque nous avons démontré que ce mutant ne recrute pas la β -arrestine en présence de CXCL11, mais pas CXCL12, ces résultats suggèrent fortement que celle-ci joue un rôle essentiel dans le mécanisme d'expression du récepteur CXCR7 à la surface cellulaire en réponse à CXCL11. Ce mécanisme implique nécessairement soit une augmentation du taux d'internalisation du récepteur, soit un mauvais réacheminement de ce dernier à la membrane plasmique.

De telles observations ont déjà été rapportées pour le récepteur α (1b)-adrénergique, où la substitution d'un résidu du motif E/DRYLAIIV altère l'expression du récepteur alpha (1b)-adrénergique à la membrane plasmique (Greasley et al., 2002). D'ailleurs, les auteurs suggèrent justement que cette perte d'expression peut être expliquée soit par une augmentation du taux d'internalisation ou par un mauvais réacheminement de ce dernier à la surface, sans toutefois évaluer le rôle de la β -arrestine sur l'un ou l'autre de ces mécanismes.

Dans cette thèse, nous avons été en mesure de démontrer que le résidu arginine (R) appartenant au motif E/DRYLAIIV affecte le recyclage de CXCR7 à la surface extracellulaire lorsque celui-ci est stimulé avec CXCL11 uniquement. Sachant que le mutant CXCR7-R142A n'interagit pas avec la β -arrestine lorsqu'il est stimulé avec CXCL11 et que ce mutant ne tarde

pas à recycler, nous pourrions émettre l'hypothèse que le retard ou l'absence de recyclage de CXCR7 de type sauvage est expliqué par la présence d'interaction de la β -arrestine avec CXCR7 induite par CXCL11. Cependant, le rôle de la β -arrestine au niveau de la différence d'expression de CXCR7 à la surface en réponse à CXCL11 et CXCL12 n'a pas été clairement démontré dans le contexte de cette thèse et pourrait faire l'objet de travaux futurs.

4.1 L'internalisation du récepteur CXCR7 est indépendante de la β -arrestine

Les résultats présentés dans le deuxième article de cette thèse montrent que CXCR7 peut s'internaliser en absence de ligand, ce qui a été déjà rapporté dans la littérature (Gravel et al. en préparation)(Luker et al., 2010; 2012). D'ailleurs, nous avons aussi montré à l'aide d'expériences de titrations en BRET, qu'en absence de ligand, la β -arrestine n'est pas recrutée à CXCR7 (Gravel et al. en préparation, Figure 2A et 2B). Donc dans des conditions non stimulées, CXCR7 s'internalise de façon indépendante de la β -arrestine.

Nous montrons aussi qu'en présence du ligand CXCL11, mais pas CXCL12, il y a une accélération de l'internalisation du récepteur CXCR7 tel que montré par des expériences de cytométrie en flux (Gravel et al. en préparation, Figure 6A). Une telle observation pourrait laisser croire qu'en présence de CXCL11, le recrutement de la β -arrestine pourrait jouer un rôle dans l'internalisation de CXCR7. Par contre, nous avons démontré que la mutation du motif E/DRYLAIV n'a pas d'impact statistiquement significatif sur l'internalisation du récepteur. Puisque nous montrons que le motif E/DRYLAIV est nécessaire pour le recrutement de la β -arrestine (Gravel et al. en préparation, et section 3 de cette discussion), ces résultats supportent que l'internalisation du récepteur en réponse à CXCL11, tout comme en absence de ligand, se fait de manière indépendant de la β -arrestine. De plus, CXCR7 pourrait

présenter des mécanismes d'internalisation différents en fonction du ligand étant donné la différence d'internalisation entre CXCL11 et CXCL12. Des partenaires d'internalisation différents en fonction du ligand de CXCR7 pourraient expliquer ces différences, tels que différentes GRKs qui mèneraient à un recrutement différentiel des protéines AP-2 et des clathrines.

Dans la littérature, l'internalisation dépendante de la β -arrestine des 7TMRs nécessite préalablement et obligatoirement la présence de la β -arrestine pour le recrutement des partenaires d'internalisation tels que la protéine AP-2 et les clathrines aux 7TMRs (Shenoy and Lefkowitz, 2005b). Par contre, il est rapporté que plusieurs 7TMRs s'internalisent de manière indépendante de la β -arrestine, tel que décrit pour les récepteurs de la sérotonine 5-HT_{2A}, de la prostacycline et du récepteur glutamate métabotropique de type 1 (Dhami et al., 2004; Gray et al., 2003; Moore et al., 2007; Smyth et al., 2000). De plus, Shiina et al., présentent la kinase GRK2 comme une protéine adaptatrice pouvant interagir directement avec les clathrines via un domaine de liaison de type *clathrin box*, ce qui serait responsable de l'internalisation du récepteur BLT1 de manière indépendante à la β -arrestine (Shiina et al., 2001). En 2004, Tulipano et al. démontrent que l'internalisation du récepteur à la somatostatine de type 2 en complexe avec la β -arrestine est dépendante de la GRK2 mais indépendante de la β -arrestine (Tulipano et al., 2004). Par ailleurs, Van Koppen et al. proposent un modèle d'internalisation des 7TMRs dépendant de la phosphorylation des récepteurs par des GRKs et qui serait indépendant du recrutement de la β -arrestine (van Koppen and Jakobs, 2004).

Un des concepts détaillés dans cette thèse est que les ligands naturels de CXCR7, soit le CXCL11 et CXCL12, induisent une réponse différente de recrutement de la β -arrestine suite

à leur liaison à CXCR7. Nous avons étudié l'impact de ce recrutement différentiel sur le transport intracellulaire de CXCR7 et sur l'élimination des chimiokines le liant (voir section 5 de cette discussion). Par ailleurs, Benredjem et al. confirment que CXCL11 et CXCL12 possèdent des modes d'interaction uniques et distincts envers CXCR7 (Benredjem et al., 2017). À ces égards, un aspect qui a été discuté plus haut mais qui n'a pas fait l'objet des travaux de cette thèse est l'étude de la phosphorylation de la partie C-terminale de CXCR7. De telles études impliquant des kinases de la famille des GRKs ont été rapportées dans la littérature pour d'autres récepteurs tels CCR7, CXCR4, β 2-adrénergique et muscarinique M3 mais aucune étude ne s'est intéressée à la phosphorylation de la partie C-terminale de CXCR7 (Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Kong et al., 2010; Nobles et al., 2011; Zidar et al., 2009). Il serait intéressant de déterminer si CXCR7 présente des profils de phosphorylation différents et uniques en fonction du ligand qui le lie, ce qui pourrait expliquer des profils de recrutement différents de la β -arrestine ainsi que de la signalisation intracellulaire qui en découle.

L'identification de sites de phosphorylations spécifiques de la partie C-terminale de CXCR7, ainsi que des kinases qui en sont responsables, possiblement des GRKs, pourraient définitivement constituer un projet de recherche futur. D'ailleurs, il a été rapporté que l'association de CXCR7 à la β -arrestine est augmentée en réponse à la présence d'une kinase constitutivement active de GRK2 (Luker et al., 2009b), par contre ni la phosphorylation directe du récepteur par GRK2 ni les sites de phosphorylations impliqués n'ont été identifiés. L'identification de sites spécifiques de phosphorylation de la partie C-terminale de CXCR7 par les GRKs ou d'autres kinases apporterait une meilleure compréhension de la régulation de la signalisation intracellulaire par la β -arrestine et pourrait éventuellement mener à la

recherche et l'identification de modulateurs thérapeutiques ciblant spécifiquement une des fonctions de la β -arrestine.

Enfin, bien que nos résultats montrent que l'internalisation de CXCR7 se fait de manière indépendante de la β -arrestine, ils ne sont pas en désaccord avec Zabel et al. qui montraient que l'internalisation de CXCR7 était dépendante de la partie C-terminale du récepteur (Zabel et al., 2009). En effet, l'ensemble de ces travaux suggèrent que la partie C-terminale de CXCR7 serait essentielle pour son interaction avec d'autres partenaires d'internalisation tels les GRKs, les clathrines ou la protéine AP-2, plutôt qu'au recrutement de la β -arrestine (Laporte et al., 1999; 2000; Lee et al., 2001; Lin et al., 1997; 2002; van Koppen and Jakobs, 2004). La présence de phosphorylation de la partie C-terminale de CXCR7 et la présence d'interaction avec de tels partenaires d'internalisation demeure un sujet à être étudié.

4.2 Le rôle de la β -arrestine au niveau du recyclage de CXCR7 à la surface cellulaire en réponse à CXCL11 et CXCL12.

Les résultats présentés dans le deuxième article de cette thèse montrent que CXCR7 de type sauvage retarde son recyclage ou voire ne recycle pas à la surface suite à sa stimulation par CXCL11 (Fig. 7A). Ce retard ou cette absence de recyclage de CXCR7 de type sauvage en présence de CXCL11 est complètement abrogé lorsque le résidu arginine (R) du motif E/DRYLAIV du récepteur CXCR7 est substitué par un résidu alanine. En effet, le récepteur muté (CXCR7-R142A) regagne la surface cellulaire au même rythme lorsque stimulé par CXCL11 ou CXCL12. Sachant que le mutant CXCR7-R142A n'interagit pas avec la β -arrestine lorsqu'il est stimulé avec CXCL11 et que ce mutant ne tarde pas à recycler, nous pourrions suggérer que le retard ou l'absence de recyclage de CXCR7 de type sauvage est

expliqué par la présence d'interaction de la β -arrestine avec CXCR7 induite par CXCL11 ou plus précisément que la β -arrestine serait responsable du retard de recyclage de CXCR7 à la surface cellulaire en réponse à CXCL11, mais pas CXCL12. De plus, nous montrons que l'internalisation de CXCR7 ne dépend pas de la β -arrestine. À la lumière de ces résultats, nous pourrions émettre l'hypothèse que la β -arrestine joue plutôt un rôle au niveau du réacheminement du récepteur à la surface, c'est-à-dire de son recyclage suite à la stimulation du récepteur par CXCL11. Par contre, nous ne pouvons suggérer un rôle pour la β -arrestine en réponse à CXCL12 dans nos expériences, étant donné que tous nos mutants du motif E/DRYLAIV recrutent la β -arrestine lorsque stimulés par CXCL12. Toutefois, le rôle de la β -arrestine au niveau de la différence d'expression de CXCR7 à la surface en réponse à CXCL11 et CXCL12 n'a pas été clairement démontré dans le contexte de cette thèse et pourrait faire l'objet de travaux futurs.

Or, cet aspect a été exploré en 2012, où il a été montré que le complexe CXCL12/CXCR7 est acheminé à des endosomes précoces et de recyclages (identifiés par Rab5), et que la β -arrestine contrôle l'accumulation du récepteur au niveau de ces endosomes (Mahabaleshwar et al., 2012). Les auteurs montrent qu'en absence de la β -arrestine, le récepteur s'accumule au niveau des endosomes tardifs / lysosomes (identifiés par LAMP-1), tandis que sa présence est diminuée au niveau des endosomes précoces et de recyclages qui expriment Rab5, indiquant que le recyclage de CXCR7 à la surface suite à une stimulation par CXCL12 est diminué en l'absence de β -arrestine. De manière intéressante, les auteurs démontrent également qu'en l'absence de β -arrestine, le gradient de CXCL12 extracellulaire est modifié, ce qui a un impact sur la chimiotaxie des cellules germinales du poisson zèbre.

Bien que les auteurs n'ont pas regardé le transport intracellulaire du récepteur suite à une stimulation par CXCL11, nos résultats vont dans le sens de ceux de Mahabaleshwar et al. qui montrent que la β -arrestine joue un rôle important au niveau du transport intracellulaire du récepteur CXCR7.

4.3 Limites de notre approche expérimentale dans l'évaluation du rôle de la β -arrestine dans le transport intracellulaire des 7TMRs

L'interprétation de nos résultats sur le transport intracellulaire de CXCR7 ont certaines limitations. D'abord, l'utilisons la cytométrie en flux (FACS) pour analyser le trafficking du récepteur de chimiokine CXCR7 ne se fait pas en cellules vivantes. De plus, la manière dont les expériences de cytométrie ont été planifiées permettait uniquement d'évaluer l'expression du récepteur à la surface, mais ne permettait pas d'évaluer le transport intracellulaire de CXCR7 et ni la localisation en parallèle de la β -arrestine. À cet effet, nous aurions pu utiliser d'autres méthodes afin d'évaluer le transport intracellulaire de CXCR7 et en parallèle celui de la β -arrestine, tels que la microscopie confocale (Luker et al., 2009b), la microscopie confocale en temps réel (de type *Spinning disk*) (Pike et al., 2017), ou la technique de BRET améliorée de type «*bystander*» (Namkung et al., 2016).

Parmi ces techniques, nous détaillons ici davantage la technique de BRET améliorée de type «*bystander*». La technique de BRET conventionnelle requière la combinaison de la luciférase provenant de la «*Renilla reniformis*» (RLuc) et d'une protéine jaune fluorescente (YFP). Ces deux chromophores n'interagissent pas entre eux spontanément, ce qui réduit considérablement les signaux non-spécifiques provenant d'interactions aléatoires, un phénomène définit comme l'effet «*bystander*». En juillet 2016, un article fort intéressant sur

l'évaluation du trafficking des 7TMRs et de la β -arrestine a utilisé la technique BRET améliorée de type de «*bystander*», et ce, dans des cellules vivantes (Namkung et al., 2016). Dans cet article, les auteurs prennent avantage des caractéristiques de ces deux chromophores et développent des nouveaux partenaires BRET. Ils ont développé des donneurs BRET en utilisant un mutant hautement luminescent de la RLuc, la RLucII, fusionné avec un 7TMR ou la β -arrestine. Les nouveaux accepteurs BRET sont localisés à la membrane plasmique ou aux endosomes précoces et sont fusionnés à la GFP. Les accepteurs BRET de la membrane plasmique sont fusionnés soit à la partie N-terminale de la protéine kinase Lyn, près de son site d'ancrage à la membrane plasmique, soit près de la séquence d'ancrage CAAX de la protéine K-Ras. Les accepteur BRET localisés aux endosomes précoces sont fusionnés avec le domaine FYVE de la protéine endofin qui a pour fonction de lier le PIP3 au niveau de ces endosomes.

Ainsi, grâce à cette technique, il est possible d'évaluer le transport intracellulaire des 7TMRs, tant au niveau de leur internalisation que de leur recyclage, leur localisation intracellulaire ainsi que celle de la β -arrestine, ce que la technique de cytométrie en flux ne nous permettait pas de faire. Par ailleurs, la technique de BRET améliorée de type «*bystander*», représente une avancée majeure par son applicabilité pour le criblage à haut débit et peut faciliter l'identification de nouveaux modulateurs de transport intracellulaire de complexes récepteur/ β -arrestine d'intérêts. Enfin, cette technique pourrait être utilisée pour étudier la capacité des ligands différents à contrôler de manière sélective le transport intracellulaire d'un complexe récepteur/ β -arrestine, tel que dans la réponse différentielle de CXCR7 à CXCL11 et CXCL12.

5. Rôle de la β -arrestine au niveau de la dégradation des chimiokines CXCL11 et CXCL12 induite par CXCR7

Un rôle physiologique reconnu de CXCR7 est d'assurer la chimiotaxie, soit la migration orientée des cellules dans l'organisme, en internalisant et en dégradant la chimiokine CXCL12 (Boldajipour et al., 2008). Ceci a pour fonction de maintenir un gradient et d'assurer la directionnalité de la migration orientée des cellules. Ce rôle d'internalisation et de dégradation de chimiokines par un récepteur de chimiokine est nommé « *Scavenger* ». Dans le deuxième article de cette thèse, nous nous sommes intéressés au *Scavenging* de CXCR7 sur CXCL11 et CXCL12, et à savoir si l'interaction de la β -arrestine avec CXCR7 a un impact sur le *Scavenging* (Gravel et al. en préparation, Figure 8).

Pour adresser cette question, nous avons effectué des expériences de dégradation de chimiokines dans des cellules HEK293 exprimant nos constructions de CXCR7. Nous avons mesuré la fraction de chimiokines dégradées après avoir incubé les cellules en présence de ligands pendant 2,5 heures. Pour CXCL12, nous montrons d'abord que CXCR7 de type sauvage induit 12% de dégradation de la chimiokine. Par contre, lorsque l'asparagine du motif N(L/F)YSS est mutée, ou lorsque l'arginine du motif E/DRYLAIV de CXCR7 est mutée, on observe toujours une dégradation de CXCL12 au moins équivalente à celle induite par CXCR7 de type sauvage. Par ailleurs, pour CXCL11, nous montrons que CXCR7 de type sauvage induit 46% de dégradation de la chimiokine. Bien que nous montrons que la mutation de l'asparagine du motif N(L/F)YSS n'affecte pas la dégradation, la mutation de l'arginine du motif E/DRYLAIV de CXCR7 (mutant CXCR7-R142A) montre une diminution significative de la dégradation de CXCL11, qui est réduite à 24%.

Puisque que le mutant CXCR7-R142A ne peut recruter la β -arrestine en réponse à CXCL11 (Gravel et al. en préparation, Figure 1), nous avons émis l'hypothèse que la β -arrestine pourrait être impliquée dans la dégradation de CXCL11 par CXCR7. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué d'autres expériences de dégradation de chimiokines dans un modèle de MEF où la β -arrestine est absente (MEF- β -arrestine1/2-KO) (Gravel et al en préparation, Figure 8D). En comparaison aux MEFs de type sauvage, nous observons une légère diminution de la dégradation de CXCL11 en absence de β -arrestine, mais la dégradation de CXCL11 a toujours lieu, et ce, de manière non négligeable.

Bref, de ces expériences, nous pouvons conclure que si la β -arrestine joue un rôle dans la dégradation de CXCL11 par CXCR7, ce dernier n'est pas essentiel. En ce sens, puisque le mutant CXCR7-R142A recycle plus rapidement à la surface cellulaire que le récepteur de type sauvage (Gravel et al. en préparation, Figure 7), nous aurions pu nous attendre à ce que la dégradation de CXCL11 soit augmentée avec ce mutant. D'ailleurs, un tel phénomène a déjà été décrit précédemment, où il fut démontré que le recyclage de CXCR7 suite à une stimulation par CXCL12 est diminué en l'absence de β -arrestine, compromettant la fonction de *Scavenger* du récepteur (Mahabaleshwar et al., 2012).

Néanmoins, la dégradation de CXCL11 par CXCR7 semble compromise par la mutation du l'arginine du motif E/DRYLAIV. Des études supplémentaires devraient être effectués afin de mieux caractériser les mécanismes expliquant cette perte de dégradation, et de mieux définir le rôle de la β -arrestine dans la fonction de *Scavenger* du récepteur. Notamment, des expériences de siRNA contre la β -arrestine 1 et 2 pourraient être effectuées, d'autres mutants de CXCR7 pourraient être testés en expérience de dégradation, et il n'est pas exclu que le mutant CXCR7-R142A réduise la dégradation de CXCL11 par d'autres

mécanismes que la β -arrestine, notamment en faisant intervenir d'autres intermédiaires qui demeurent à être identifiés.

6. Classification du récepteur CXCR7

6.1 Classification du récepteur CXCR7 selon son motif E/DRYLAIV

À la lumière des résultats présentés dans cette thèse, nous nous sommes questionnés à savoir si nous pouvions classer CXCR7 en fonction de l'activité de son motif E/DRYLAIV, tel que proposé par Rovati et al. (Rovati et al., 2007). Ces auteurs ont tenté de classer les récepteurs de la famille des récepteurs apparentés à la rhodopsine (rhodopsin-receptor-like) en deux sous-groupes, dépendamment de l'activité du motif E/DRYLAIV et indépendamment du type de la protéine G hétérotrimérique couplant le récepteur. Même si CXCR7 n'active pas la protéine G hétérotrimérique, il recrute la β -arrestine et il est décrit dans la littérature que le motif E/DRYLAIV de certains 7TMRs représente une interface commune pour leur interaction de la protéine G hétérotrimérique et la β -arrestine (Balabanian et al., 2004; Kim and Caron, 2008; Shukla et al., 2014). À cet effet, et dans la discussion qui suit, nous considérons le recrutement de la β -arrestine à CXCR7 comme une mesure de l'activité du récepteur.

Le premier sous-groupe décrit par Rovati et al. porte un phénotype de type CAM, « *constitutive active mutants* » (phénotype de type P1), où la mutation de l'acide glutamique ou de l'acide aspartique (E/D) en position 3.49 du motif E/DRYLAIV engendre des mutants qui possèdent des activités basales indépendantes de la présence de ligand, tel est le cas pour le récepteur à la rhodopsine (Rovati et al., 2007). De plus, la mutation de l'acide glutamique, de

l'acide aspartique ou de l'arginine n'affecterait pas l'affinité de la liaison du récepteur au ligand, ni le couplage de la protéine G hétérotrimérique au récepteur. Ainsi, dans ce premier groupe, le rôle du motif E/DRYLAIV serait de maintenir la conformation du récepteur dans un état inactif.

Le deuxième sous-groupe, qui comprend notamment le récepteur de chimiokine CCR5 et les récepteurs muscarinique M1 et M5, porte un phénotype de type CIM, « *constitutive inactive mutant* » (phénotype de type P2), où la mutation du résidu E/D 3.49 du motif E/DRYLAIV engendre des mutants qui n'ont pas d'augmentation de leur activité constitutive en absence de ligand, d'où l'appellation « constitutivement inactif ». Néanmoins, des mutations du motif E/DRYLAIV peuvent tout de même affecter la fonction de certains récepteurs de ce sous-groupe en présence de ligands, en ayant des effets divers, tels qu'une augmentation de l'affinité d'un ligand pour le récepteur, une diminution des EC50, et autres. D'ailleurs, dans certains cas, les réponses aux ligands sont plus efficaces, un concept décrit comme une forme « d'activabilité constitutive ». Par contre, la mutation du résidu arginine (R) en position 3.50 mène invariablement à une perte d'activité du récepteur en présence de ligand, ainsi qu'à une diminution de l'affinité du ligand à son récepteur.

Néanmoins, certains 7TMRs ne peuvent être classifiés définitivement dans l'une ou l'autre des deux catégories proposées par Rovati et al. Cela est d'ailleurs reconnu par les auteurs, qui admettent que leur classification demeure une simplification de notre compréhension des 7TMRs. Ces récepteurs sont inclus dans une troisième catégorie identifiée comme « indéfinie ».

À la lumière des résultats présentés dans cette thèse, nous montrons dans un premier temps qu'en absence de ligand, la mutation de l'arginine du motif E/DRYLAIV (mutant

CXCR7-R142A) n'induit pas une activation constitutive du récepteur (Gravel et al. en préparation, Figure 2E et 2F). À cet effet, CXCR7 ne pourrait pas être classifié dans le premier sous-groupe décrit par Rovati et al., c'est-à-dire le sous-groupe avec un phénotype de type CAM, « *constitutive active mutants* » (phénotype de type P1).

Dans un deuxième temps, la mutation de l'arginine du motif E/DRYLAIIV (mutant CXCR7-R142A) mène à une perte d'activité du récepteur en présence de CXCL11 (Gravel et al. en préparation, Figure 1C). Interprétée individuellement, cette observation nous permettrait de classifier CXCR7 dans le deuxième sous-groupe décrit par Rovati et al., c'est-à-dire le sous-groupe avec un phénotype de type CIM, « *constitutive inactive mutant* » (phénotype de type P2). Par contre, la même mutation ne mène pas à une perte d'activité du récepteur en présence de CXCL12 (Gravel et al. en préparation, Figure 1C).

Dans l'ensemble, nos résultats nous permettent d'affirmer que CXCR7 ne fait probablement pas partie du sous-groupe avec un phénotype de type CAM, « *constitutive active mutants* » (phénotype de type P1) de Rovati et al. De plus, nous ne pouvons le classifier définitivement dans le sous-groupe avec un phénotype de type CIM, « *constitutive inactive mutant* » (phénotype de type P2), puisque, selon Rovati et al., les récepteurs de ce sous-groupe mutés pour l'arginine du motif E/DRYLAIIV mènent invariablement à une perte d'activité du récepteur en présence de ligand. À cet effet, bien qu'en présence de CXCL11 nous observons une perte d'activité du récepteur, ce n'est pas le cas pour CXCL12. Dans ce contexte, il serait peut-être plus juste de classifier CXCR7 dans le groupe de récepteurs « indéfini », dans l'attente d'une classification plus élargie, mieux définie pour cette catégorie de récepteurs.

6.2 Classification du récepteur CXCR7 selon son mode d'interaction avec la β -arrestine

Une fois un 7TMR internalisé avec son ligand et la β -arrestine, cette dernière peut emprunter deux voies de transit intracellulaire. Soit la β -arrestine reste en complexe avec le récepteur et transit ainsi à l'intérieur de la cellule, soit elle se dissocie du récepteur aussitôt le complexe ligand-récepteur- β -arrestine internalisé. Ces modes d'interaction de la β -arrestine avec les récepteurs ont fait l'objet d'une importante étude dans le domaine des 7TMRs et ont permis de les catégoriser en deux classes (Oakley et al., 2000; 2001).

Les récepteurs montrant une interaction transitoire avec la β -arrestine de sorte qu'elle se dissocie de ce dernier aussitôt internalisée définissent la classe A. Cette interaction transitoire permet donc le recyclage rapide du récepteur à la surface cellulaire. Également, les récepteurs de classe A possèdent une meilleure affinité de liaison avec la β -arrestine 2 qu'avec la β -arrestine 1 (Oakley et al., 2000; 2001).

Les récepteurs montrant une interaction beaucoup plus stable et non transitoire avec la β -arrestine définissent la classe B (Oakley et al., 2000). Ce complexe est retenu plus longtemps à l'intérieur de la cellule et peut engendrer une activation soutenue de la voie MAPkinase via les endosomes de façon dépendante de l'interaction du récepteur avec la β -arrestine (Khoury et al., 2014; Simaan et al., 2005; Tohgo et al., 2003). Également, les récepteurs de classe B possèdent des affinités de liaison similaires envers la β -arrestine 1 et la β -arrestine 2 (Oakley et al., 2000).

Nos résultats montrent que la stabilité de l'interaction entre CXCR7 et β -arrestine est stable et persiste à travers le temps en réponse à CXCL11 et CXCL12 (Gravel et al. en

préparation, Figure 4B). En effet, nous observons que les temps de demi-vie correspondant à la dissociation de la β -arrestine d'avec CXCR7 suite au retrait des ligands sont mesurés en minutes ($T_{1/2}$ CXCL11 : 3.49 min avec IC95% [1.74 min ; infini], $T_{1/2}$ CXCL12 : 4.01 min. avec IC95% [1.88 min ; infini]).

Or, les temps de demi-vie d'une dissociation rapide caractéristique d'un récepteur de classe A ont été rapportés dans la littérature et s'expriment généralement en secondes (Oakley et al., 2000; Zhang et al., 1999). Ainsi, les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que l'interaction entre CXCR7 et β -arrestine font de CXCR7 un récepteur de classe B.

Pour le bénéfice de la présente discussion, il est intéressant de rappeler le rôle de *Scavenger* de CXCR7 dans la chimiotaxie. En effet, l'effet de *Scavenger* est conceptuellement plus représentatif des récepteurs de classe A, tel que serait le cas du complexe CXCL12/CXCR7/ β -arrestine (Boldajipour et al., 2008; Luker et al., 2009b). En effet, l'effet *Scavenger* nécessiterait une interaction brève et transitoire avec la β -arrestine, permettant un recyclage rapide du récepteur à la surface cellulaire pour engendrer un autre cycle de dégradation de chimiokines.

De plus, une étude publiée en 2009 montre que CXCR7 partage les propriétés de chacune des classes de récepteurs (Luker et al., 2009b). Les auteurs ont utilisé un système où la luciférase est fragmentée et dont l'activité peut être mesurée lors de sa reconstitution. Grâce à ce système, ils ont fusionné le premier fragment de la luciférase à la partie C-terminale de la β -arrestine 1 et 2, et le deuxième fragment à CXCR7. La présence d'interaction entre les deux protéines permettait de restaurer l'activité de la luciférase, qui pouvait alors mesurée. Ainsi, ils ont montré que CXCR7 semble interagir préférentiellement avec la β -arrestine 2 que la β -arrestine 1, ce qui est caractéristique d'un récepteur de classe A. D'autre

part, ils montrent que l'interaction de la β -arrestine 2 avec CXCR7 est stable et persiste dans le temps, ce qui est plutôt caractéristique d'un récepteur de classe B. Bien que Luker et al. suggèrent que CXCR7 agit en partie comme un récepteur de classe A, certaines de nos expériences de BRET non publiées montrent que la position de la luciférase sur β -arrestine 1 affecte son interaction à CXCR7 (voir figure 12 de cette discussion). À la lumière de ces résultats additionnels, il n'est pas exclu que les conclusions de Luker et al. auraient été différentes si la luciférase avait été placée en N-terminal de β -arrestine.

En conclusion, nos résultats suggèrent plutôt que l'interaction entre CXCR7 et β -arrestine font de CXCR7 un récepteur de classe B. Toutefois, les fonctions de *Scavenger* de CXCR7, ainsi que les conclusions de Luker et al. suggèrent qu'il pourrait faire partie de l'une ou l'autre de ces catégories. Ainsi, la classification de CXCR7 selon son interaction avec la β -arrestine en récepteurs de classe A ou B selon la classification de Oakley et al. demeure sujet à discussion (Oakley et al., 2000).

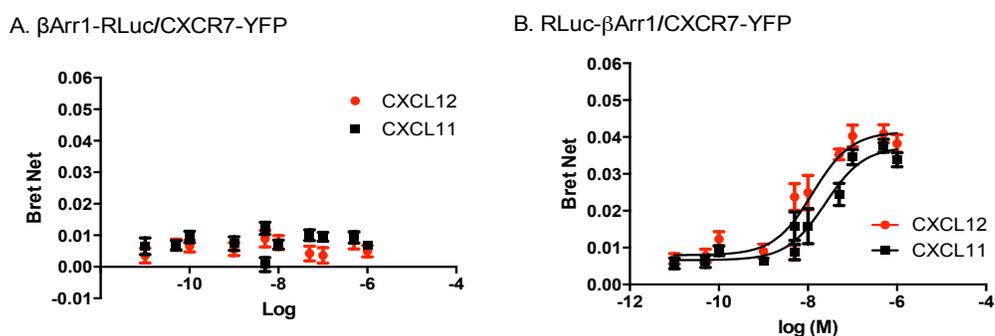


Figure 12. La position de la luciférase sur la β -arrestine 1 affecte son interaction avec CXCR7. Le recrutement de la β -arrestine 1 à CXCR7 a été mesuré par la technique de BRET en fonction de concentrations croissantes telles qu'indiquées de CXCL11 (carrés noirs) et CXCL12 (cercles rouges). La β -arrestine 1 fusionnée à la luciférase en position **A**. C-terminale (β Arr1-RLuc) ou **B**. en amont de la protéine (RLuc- β Arr1) est co-exprimé transitoirement dans des cellules HEK293E avec CXCR7, fusionné à la YFP (yellow fluorescent protein). Les résultats sont exprimés en valeur de BRET NET et représentent la mise en commun de trois expériences indépendantes. Les valeurs de EC50 ont été analysés avec le logiciel Graphpad prism en utilisant la régression non-linéaire comme

PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse s'intéressent à l'étude des mécanismes d'action du récepteur CXCR7 et de ses modes d'interaction avec la β -arrestine. Ils permettent de mieux comprendre la régulation et les mécanismes de transport intracellulaire des 7TMRs indépendants de la protéine G hétérotrimérique.

Puisque les 7TMRs ont des rôles biologiques variés tant aux niveaux des processus physiologiques que pathologiques, ils sont d'intérêt particulier au niveau pharmacologique et font l'objet d'intenses recherches comme cibles thérapeutiques de choix. Les découvertes détaillées dans cette thèse peuvent avoir des impacts à chacun de ces niveaux. Dans la section qui suit, nous discuterons davantage des perspectives découlant de l'internalisation et du transport intracellulaire du récepteur CXCR7, des impacts de la sélectivité fonctionnelle sur certains processus physiopathologiques, et enfin, d'aspects d'intérêt pharmacologique.

1. Régulation de l'internalisation et du transport intracellulaire de CXCR7

Les travaux de cette thèse montrent que l'internalisation de CXCR7 est indépendante de la β -arrestine. Bien que l'internalisation de nombreux 7TMRs dépend de la β -arrestine suite à leur activation par leurs ligands, les mécanismes d'internalisations indépendants de la β -arrestine sont peu fréquents (Dhami et al., 2004; Goodman et al., 1996; Gray et al., 2003; Laporte et al., 1999; Moore et al., 2007; Smyth et al., 2000). À la lumière de nos résultats, nous nous questionnons à savoir quels sont les mécanismes qui régulent l'internalisation de CXCR7.

Un domaine de recherche prometteur serait l'étude des modifications post-traductionnelles du récepteur. D'ailleurs, la régulation de 7TMRs par des modifications post-

traductionnelles est bien décrite dans la littérature (Shenoy and Lefkowitz, 2011). Parmi les modifications post-traductionnelles, la phosphorylation nous semble particulièrement d'intérêt. En effet, la partie C-terminale de CXCR7 est riche en résidus sérine et thréonine, et il est clairement démontré dans littérature que ces résidus sont activement phosphorylés dans plusieurs autres 7TMRs, ce qui a des impacts notamment au niveau de leur internalisation (Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Kong et al., 2010; Nobles et al., 2011; Zidar et al., 2009).

Des projets futurs pourraient s'intéresser à l'identification de sites de phosphorylation de CXCR7, à leurs impacts sur les mécanismes d'internalisation et de transport intracellulaire, ainsi qu'à l'identification des kinases impliquées. Ces travaux nécessiteraient, entre autres, des expériences de spectrométrie de masse, de la mutagenèse dirigée, et des études de phosphorylation par les kinases impliquées. À cet effet, les kinases de la famille GRK apparaissent comme des kinases d'intérêt, étant donnée leur implication démontrée sur d'autres 7TMRs (Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Kong et al., 2010; Nobles et al., 2011; Zidar et al., 2009).

2. Impacts physiopathologiques de la sélectivité fonctionnelle des ligands de CXCR7

Les travaux de cette thèse montrent que CXCL11 et CXCL12, les deux ligands naturels de CXCR7, induisent des réponses différentes sur le transport intracellulaire du récepteur, notamment un retard du recyclage de CXCR7 en réponse à CXCL11, un processus dépendant de la β -arrestine. Mis en perspective, ces découvertes pourraient avoir un impact dans notre compréhension de processus physiopathologiques, tels que le développement de cancers et les processus métastatiques.

À ce sujet, CXCL12 n'est pas une chimiokine exclusive à CXCR7. CXCL12 peut aussi lier CXCR4, ce qui a un impact majeur au niveau de la domiciliation et de la prise de greffe lors d'une greffe de moelle osseuse ainsi que dans la dissémination métastatique lors de cancers, la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de cancer (Chute, 2006; Miller et al., 2008).

À cet effet, CXCL12 se trouve fortement exprimé dans les foyers métastatiques, tels qu'au poumon, au foie, dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et le cerveau (Müller et al., 2001). De plus, il a été montré que CXCR7 est impliqué dans la migration trans-endothéliale (MTE), une étape critique lors de la dissémination métastatique (Zabel et al., 2011). Durant la MTE, les cellules malignes qui se trouvent dans la circulation sanguine doivent traverser la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins pour pénétrer le parenchyme de l'organe au site métastatique, un mécanisme qui s'apparente à la diapédèse des leucocytes.

De manière très intéressante, il fut montré que CXCL11 inhibe de manière significative la MTE médiée par CXCL12. De plus, CCX771, un ligand synthétique de CXCR7, représente l'inhibiteur le plus efficace de la MTE, tandis que l'AMD3100 n'a démontré aucun effet (Zabel et al., 2009; 2011). Bref, ces études illustrent bien le concept de sélectivité fonctionnelle de plusieurs ligands sur un seul et même récepteur, CXCR7, sans toutefois définir les mécanismes intracellulaires sous-jacents.

Plusieurs groupes ont montré que CXCL11, CCX771 et AMD3100 induisent le recrutement de la β -arrestine à CXCR7 (Kalatskaya et al., 2009; Luker et al., 2009b; Zabel et al., 2009). À la lumière de nos résultats, nous pourrions émettre l'hypothèse que le recrutement différentiel de la β -arrestine en fonction de ses ligands a un rôle important dans le développement de cancers et les processus métastatiques, notamment au niveau de la

migration trans-endothéliale. Cette hypothèse pourrait faire l'objet de travaux de recherche futures et, si avérée vraie, pourrait faire de l'interaction entre CXCR7 et la β -arrestine une cible thérapeutique d'intérêt dans le domaine de l'oncologie.

3. Mécanismes d'action de CXCR7 et implications pharmacologiques

Des effets opposés d'un même ligand synthétique sur deux récepteurs de chimiokines distincts avait fait l'objet d'une étude dans la littérature avant la publication du premier article de cette thèse (Kalatskaya et al., 2009). À cet effet, nous avons démontré que certaines molécules thérapeutiques, qui avaient été développées pour cibler sélectivement CXCR4, ciblaient aussi CXCR7, un récepteur qui n'a été découvert que tardivement (Balabanian et al., 2005; Gravel et al., 2010; Zou et al., 1998). Ces découvertes poussent la communauté scientifique à reconsidérer les rôles de CXCR4 et de CXCR7 dans diverses pathologies, et de revoir la sélectivité des molécules thérapeutiques ciblant CXCR4.

D'un point de vue pharmacologique, CXCR7 est la cible de molécules synthétiques ciblant le site orthostérique de ses ligands endogènes, une approche courante dans la recherche et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Ces molécules comprennent notamment TC14012, FC313, CCX771 et CCX662 (Burns et al., 2006; Neubig et al., 2003; Oishi et al., 2015; Tamamura et al., 2001; Walters et al., 2014; Zabel et al., 2009). Par contre, le concept de promiscuité entre chimiokines et récepteurs pose problème lors du développement de nouvelles molécules utilisant l'approche classique ciblant le site orthostérique d'un récepteur. L'utilisation de ligands allostériques est une alternative intéressante car ces molécules se lient à un site allostérique dont la séquence en acides aminés est distincte du site orthostérique, et par leur grand potentiel au niveau de la sélectivité

fonctionnelle (Bartuzi et al., 2018). En effet, de tels agents thérapeutiques ont le potentiel de cibler la fonction pathologique plutôt physiologique de leur récepteur (Christopoulos et al., 2014; Kenakin, 2009).

Nos résultats démontrent que la β -arrestine retarde le recyclage de CXCR7 en réponse à CXCL11, mais pas CXCL12. Ceci démontre que CXCR7 peut induire des réponses intracellulaires différentielles en réponse aux ligands qui le lie, notamment par le recrutement différentiel de la β -arrestine. Ces découvertes pourraient servir de fondements pour le développement de molécules allostériques ciblant la voie β -arrestine de CXCR7. D'ailleurs, des ligands synthétiques biaisés pour la voie de la β -arrestine ont été décrits pour d'autres récepteurs dans la littérature, entre autres pour les récepteurs de l'angiotensin 1A et de l'hormone parathyroïdienne (Drake et al., 2008; Gesty-Palmer et al., 2006; Wei et al., 2003). Par exemple, le PTH- β arr est un ligand synthétique biaisé pour la voie β -arrestine du récepteur à l'hormone parathyroïdienne de type 1 (PTH1R), au détriment de la voie de la protéine G hétérotrimérique du même récepteur (Bohinc and Gesty-Palmer, 2011; Gesty-Palmer et al., 2006). Il s'agit ainsi d'un exemple appliqué où l'exploitation de la voie β -arrestine par des modulateurs allostériques représente un bénéfice thérapeutique, ici dans le traitement des maladies osseuses. Ce concept d'agonisme biaisé est aussi exploité dans d'autres domaines pharmacologiques et thérapeutiques, notamment au niveau des récepteurs des opioïdes et dans le contrôle de la douleur (Manglik et al., 2016; Schiller, 2010).

En somme, cette thèse apporte de nouveaux éléments qui pourraient servir de fondements pour le développement de molécules allostériques ciblant la voie β -arrestine de CXCR7.

CONCLUSION

La vision probabiliste des 7TMRs suggère que le récepteur occupe un espace ou un paysage énergétique pouvant contenir une infinité de conformations du dit récepteur (Kenakin, 2009). Ce modèle probabiliste permet d'accommoder le concept de sélectivité fonctionnelle où différents ligands peuvent induire des signalisations intracellulaires distinctes via un même récepteur et que ce dernier peut adopter plus d'une conformation active.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons d'abord montré que les inhibiteurs thérapeutiques synthétiques nouvellement développés pour cibler CXCR4 ne sont pas exclusifs à CXCR4. Le TC14012 tout comme l'AMD3100 lient aussi le récepteur de chimiokine CXCR7 et, contrairement à CXCR4, ces deux molécules induisent le recrutement de la β -arrestine à CXCR7. Nous montrons que ces deux ligands structurellement distincts ont des modes d'interaction différents sur ces deux récepteurs. À l'aide des récepteurs chimériques, nous avons identifié le corps du récepteur comme étant responsable du recrutement différentiel de la β -arrestine à CXCR4 et CXCR7. De plus, nous montrons que la partie C-terminale des récepteurs détermine plutôt la puissance de recrutement de la β -arrestine à ces deux récepteurs.

Avant le début des travaux de recherche décrits dans cette thèse, rien n'était encore connu sur les mécanismes d'endocytose de CXCR7. Dans la littérature, il est rapporté que le recrutement de la β -arrestine est synchronisé avec l'internalisation des 7TMRs. Or, il est maintenant clair, aux vues des résultats détaillés dans cette thèse, corroborés à des études récentes de la littérature, que l'internalisation du récepteur CXCR7 ne dépend pas nécessairement de la β -arrestine. Plutôt, nous montrons que la β -arrestine serait déterminante pour le retour en surface de CXCR7 en ralentissant son recyclage lorsque stimulé par CXCL11

mais pas CXCL12. Également, il est montré que CXCR7 induit la dégradation de deux chimiokines, CXCL11 et CXCL12, mais que la β -arrestine ne semble pas essentielle pour ce processus.

Enfin, nous avons identifié le résidu arginine du motif E/DRYLAIV, un motif hautement conservé à travers les récepteurs s'apparentant à la rhodopsine, dont les récepteurs de chimiokines tels CXCR7, comme étant essentiel pour l'interaction de la β -arrestine avec le complexe CXCL11/CXCR7. Pour la première fois dans la littérature, nous observons qu'il existe bien une différence au niveau du comportement qu'adopte le récepteur CXCR7 lorsqu'il est en complexe avec ses ligands naturels, CXCL11 et CXCL12, ainsi qu'avec la β -arrestine.

Ainsi, l'ensemble des travaux de cette thèse, qui s'intéressent principalement à l'étude des mécanismes d'action du récepteur CXCR7 et de ses modes d'interaction avec la β -arrestine, permettent de mieux comprendre la régulation et les mécanismes de transport intracellulaire des récepteurs de types 7TMRs indépendamment de la protéine G hétérotrimérique. Étant donné les rôles ubiquitaires des 7TMRs, ces découvertes pourraient avoir des implications et des impacts divers, notamment dans notre compréhension de la physiologie, de la pathologie, de l'immunité et de la pharmacologie.

RÉFÉRENCES

- Allain, J.P., Laurian, Y., Paul, D.A., Verroust, F., Leuther, M., Gazengel, C., Senn, D., Larrieu, M.J., and Bosser, C. (1987). Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. Potential clinical importance. *N. Engl. J. Med.* *317*, 1114–1121.
- Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., and DeClercq, E. (1998). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nature Medicine*.
- Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*.
- ARIENS, E.J. (1954). Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. I. Problems and theory. *Arch Int Pharmacodyn Ther* *99*, 32–49.
- Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor–G protein complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
- Bachelierie, F., Ben-Baruch, A., and Burkhardt, A.M. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for *Pharmacol. Rev.* *66*, 1–79.
- Balabanian, K., Harriague, J., and Décron, C. (2004). CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. *The Journal of Immunology*.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y.C., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelierie, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* *280*, 35760–35766.
- Balkwill, F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in Cancer Biology*.
- Ballesteros, J.A., and Weinstein, H. (1995). [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*.
- Ballesteros, J., and Palczewski, K. (2001). G protein-coupled receptor drug discovery: implications from the crystal structure of rhodopsin. *Current Opinion in Drug Discovery Development* *5*, 561–574.
- Bartuzi, D., Kaczor, A.A., and Matosiuk, D. (2018). Opportunities and Challenges in the Discovery of Allosteric Modulators of GPCRs. *Methods Mol. Biol.* *1705*, 297–319.

Benredjem, B., Girard, M., Rhains, D., and Onge, G.S. (2017). Mutational Analysis of Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3/CXCR7) Interaction with Its Chemokine Ligands CXCL11 and CXCL12. *J. Biol. Chem.* 292, 31–42.

Berchiche, Y.A., Chow, K.Y., Lagane, B., Leduc, M., Percherancier, Y., Fujii, N., Tamamura, H., Bachelierie, F., and Heveker, N. (2007). Direct Assessment of CXCR4 Mutant Conformations Reveals Complex Link between Receptor Structure and G_i Activation. *J. Biol. Chem.* 282, 5111–5115.

Berchiche, Y.A., Gravel, S., Pelletier, M.-E., St-Onge, G., and Heveker, N. (2011). Different effects of the different natural CC chemokine receptor 2b ligands on beta-arrestin recruitment, G_{ai} signaling, and receptor internalization. *Mol. Pharmacol.* 79, 488–498.

Bohinc, B.N., and Gesty-Palmer, D. (2011). β -arrestin-biased agonism at the parathyroid hormone receptor uncouples bone formation from bone resorption. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 11, 112–119.

Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132, 463–473.

Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E.T., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., et al. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.* 203, 2201–2213.

Busillo, J.M., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta*.

Busillo, J.M., Armando, S., Sengupta, R., and Meucci, O. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J. Biol. Chem.*

Butcher, A.J., Prihandoko, R., Kong, K.C., McWilliams, P., Edwards, J.M., Bottrill, A., Mistry, S., and Tobin, A.B. (2011). Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J. Biol. Chem.* 286, 11506–11518.

Canals, M., Scholten, D.J., de Munnik, S., Han, M.K.L., Smit, M.J., and Leurs, R. (2012). Ubiquitination of CXCR7 Controls Receptor Trafficking. *PLoS ONE* 7, e34192.

Chandrasekar, B., Bysani, S., and Mummidi, S. (2004). CXCL16 signals via G_i, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I κ B kinase, and nuclear factor- κ B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*.

Charest, P.G., Terrillon, S., and Bouvier, M. (2005). Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep* 6, 334–340.

Chatterjee, M., Seizer, P., Borst, O., Schönberger, T., Mack, A., Geisler, T., Langer, H.F., May, A.E., Vogel, S., Lang, F., et al. (2014). SDF-1 α induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival. *Faseb J.* 28, 2864–2878.

Christopoulos, A., Changeux, J.-P., Catterall, W.A., Fabbro, D., Burris, T.P., Cidlowski, J.A., Olsen, R.W., Peters, J.A., Neubig, R.R., Pin, J.P., et al. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands. *Pharmacol. Rev.* 66, 918–947.

Chute, J.P. (2006). Stem cell homing. *Current Opinion in Hematology.*

Comerford, I., Litchfield, W., Lee, Y.H., and Nibbs, R. (2007). Regulation of chemotactic networks by “atypical” receptors. *BioEssays, Wiley Online Library.*

Comerford, I., and Nibbs, R.J.B. (2005). Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors? *Immunol. Lett.* 96, 163–174.

Craft, C.M., Whitmore, D.H., and Wiechmann, A.F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.* 269, 4613–4619.

Crump, M.P., Gong, J.H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Baggiolini, M., Sykes, B.D., and 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, 6996–7007.

De Clercq, E., Yamamoto, N., and Pauwels, R. (1992). Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event.

De Clercq, E. (2003). Timeline: The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2, 581–587.

De Clercq, E. (2009). The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem. Pharmacol.* 77, 1655–1664.

De Clercq, E. (2015). AMD3100/CXCR4 Inhibitor. *Front Immunol* 6, 276.

De Lean, A., Stadel, J.M., and Lefkowitz, R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry.*

de Vreese, K., Kofler-Mongold, V., Leutgeb, C., Weber, V., Vermeire, K., Schacht, S., Anné, J., De Clercq, E., Datema, R., and Werner, G. (1996). The molecular target of bicyclams, potent inhibitors of human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* 70, 689–696.

- DeFea, K.A., Zalevsky, J., Thoma, M.S., Déry, O., Mullins, R.D., and Bunnett, N.W. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell Biol.* *148*, 1267–1281.
- Devreotes, P., and Janetopoulos, C. (2003). Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *Journal of Biological Chemistry*.
- Décaillot, F.M., Kazmi, M.A., Lin, Y., Ray-Saha, S., Sakmar, T.P., and Sachdev, P. (2011). CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J. Biol. Chem.* *286*, 32188–32197.
- Dhami, G.K., Dale, L.B., Anborgh, P.H., O'Connor-Halligan, K.E., Sterne-Marr, R., and Ferguson, S.S.G. (2004). G Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 16614–16620.
- Drake, M.T., Violin, J.D., Whalen, E.J., Wisler, J.W., Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2008). beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *283*, 5669–5676.
- Drury, L.J., Ziarek, J.J., Gravel, S., Veldkamp, C.T., Takekoshi, T., Hwang, S.T., Heveker, N., Volkman, B.F., and Dwinell, M.B. (2011). Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *108*, 17655–17660.
- Ferguson, S.S., Downey, W.E., Colapietro, A.M., Barak, L.S., Ménard, L., and Caron, M.G. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* *271*, 363–366.
- Feuerstein, S.E., Pulvermüller, A., Hartmann, R., Granzin, J., Stoldt, M., Henklein, P., Ernst, O.P., Heck, M., Willbold, D., and Koenig, B.W. (2009). Helix formation in arrestin accompanies recognition of photoactivated rhodopsin. *Biochemistry* *48*, 10733–10742.
- Fra, A.M., Locati, M., Otero, K., Sironi, M., Signorelli, P., Massardi, M.L., Gobbi, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Mantovani, A. (2003). Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J. Immunol.* *170*, 2279–2282.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., and Lundin, L.G. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.*
- Fujii, N., Nakashima, H., and Tamamura, H. (2003). The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV. *Expert Opin Investig Drugs* *12*, 185–195.
- Galandrin, S., Oligny-Longpré, G., and Bouvier, M. (2007). The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*.

- Galliera, E., Jala, V.R., Trent, J.O., Bonecchi, R., Signorelli, P., Lefkowitz, R.J., Mantovani, A., Locati, M., and Haribabu, B. (2004). -Arrestin-dependent Constitutive Internalization of the Human Chemokine Decoy Receptor D6. *J. Biol. Chem.* 279, 25590–25597.
- Gerrits, H., van Ingen Schenau, D.S., Bakker, N.E.C., van Disseldorp, A.J.M., Strik, A., Hermens, L.S., Koenen, T.B., Krajnc-Franken, M.A.M., and Gossen, J.A. (2008). Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis* 46, 235–245.
- Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C.D., Wang, S., Eckhardt, A.E., Cowan, C.L., Spurney, R.F., Luttrell, L.M., et al. (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 281, 10856–10864.
- Gether, U. (2000). Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocrine Reviews* 21, 90–113.
- Girnita, L., Shenoy, S.K., Sehat, B., Vasilcanu, R., Girnita, A., Lefkowitz, R.J., and Larsson, O. (2005). β -Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J. Biol. Chem.* 280, 24412–24419.
- Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447–450.
- Graham, G.J., Locati, M., Mantovani, A., Rot, A., and Thelen, M. (2012). The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol. Lett.* 145, 30–38.
- Gravel, S., Malouf, C., Boulais, P.E., Berchiche, Y.A., Oishi, S., Fujii, N., Leduc, R., Sinnett, D., and Heveker, N. (2010). The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *J. Biol. Chem.* 285, 37939–37943.
- Gray, J.A., Bhatnagar, A., Gurevich, V.V., and Roth, B.L. (2003). The interaction of a constitutively active arrestin with the arrestin-insensitive 5-HT(2A) receptor induces agonist-independent internalization. *Mol. Pharmacol.* 63, 961–972.
- Greasley, P.J., Fanelli, F., Rossier, O., and Abuin, L. (2002). Mutagenesis and modelling of the α 1b-adrenergic receptor highlight the role of the helix 3/helix 6 interface in receptor activation. *Mol. Pharmacol.*
- Groom, J.R., and Luster, A.D. (2011). CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* 89, 207–215.
- Grymula, K., Tarnowski, M., Wysoczynski, M., Drukala, J., Barr, F.G., Ratajczak, J., Kucia, M., and Ratajczak, M.Z. (2010). Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int. J. Cancer* 127, 2554–2568.

Hansell, C.A.H., Hurson, C.E., and Nibbs, R.J.B. (2011). DARC and D6: silent partners in chemokine regulation? *Immunol. Cell Biol.* *89*, 197–206.

Hartmann, T.N., Grabovsky, V., Pasvolsky, R., Shulman, Z., Buss, E.C., Spiegel, A., Nagler, A., Lapidot, T., Thelen, M., and 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*, 1130–1140.

Hatse, S., Princen, K., Bridger, G., and De Clercq, E. (2002). Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.*

Hendrix, C.W., Flexner, C., MacFarland, R.T., Giandomenico, C., Fuchs, E.J., Redpath, E., Bridger, G., and Henson, G.W. (2000). Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 1667–1673.

Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., and Taniuchi, S. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nature.*

Infantino, S., Moepps, B., and Thelen, M. (2006). Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *The Journal of Immunology.*

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*, 1240–1247.

Kallifatidis, G., Munoz, D., Singh, R.K., Salazar, N., Hoy, J.J., and Lokeshwar, B.L. (2016). β -Arrestin-2 Counters CXCR7-Mediated EGFR Transactivation and Proliferation. *Mol. Cancer Res.* *14*, 493–503.

Kenakin, T. (1996). The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. (*Pharmacological Reviews*).

Kenakin, T. (2009). Quantifying biological activity in chemical terms: a pharmacology primer to describe drug effect. *ACS Chemical Biology.*

Khoury, E., Nikolajev, L., Simaan, M., Namkung, Y., and Laporte, S.A. (2014). Differential Regulation of Endosomal GPCR/beta-Arrestin Complexes and Trafficking by MAPK. *J. Biol. Chem.* *289*, 23302–23317.

Kim, K.-M., and Caron, M.G. (2008). Complementary roles of the DRY motif and C-terminus tail of GPCRS for G protein coupling and beta-arrestin interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *366*, 42–47.

- Kleist, A.B., Getschman, A.E., Ziarek, J.J., Nevins, A.M., Gauthier, P.-A., Chevigné, A., Szpakowska, M., and Volkman, B.F. (2016). New paradigms in chemokine receptor signal transduction: Moving beyond the two-site model. *Biochem. Pharmacol.*
- Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., Hirose, M., Maeda, Y., Takahashi, H., Terashima, Y., et al. (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*, 35240–35250.
- Kohout, T.A., Nicholas, S.L., Perry, S.J., Reinhart, G., Junger, S., and Struthers, R.S. (2004). Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J. Biol. Chem.* *279*, 23214–23222.
- Kong, K.C., Butcher, A.J., McWilliams, P., Jones, D., Wess, J., Hamdan, F.F., Werry, T., Rosethorne, E.M., Charlton, S.J., Munson, S.E., et al. (2010). M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 21181–21186.
- Krupnick, J.G., and Benovic, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *38*, 289–319.
- Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., and Schepers, T. (1994). Arrestin-rhodopsin interaction. Multi-site binding delineated by peptide inhibition. ... *Of Biological Chemistry*.
- Labrosse, B., Brelot, A., Heveker, N., and Sol, N. (1998). Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J. Virol.*
- Lagane, B., Chow, K., Balabanian, K., and Levoye, A. (2008). CXCR4 dimerization and β -arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood*.
- Lagane, B., Ballet, S., Planchenault, T., Balabanian, K., Le Poul, E., Blanpain, C., Percherancier, Y., Staropoli, I., Vassart, G., Oppermann, M., et al. (2005). Mutation of the DRY motif reveals different structural requirements for the CC chemokine receptor 5-mediated signaling and receptor endocytosis. *Mol. Pharmacol.* *67*, 1966–1976.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* *379*, 311–319.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., and Barak, L.S. (2000). The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *Journal of Biological Chemistry*
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S.G., Caron, M.G., and Barak, L.S. (1999). The β 2-adrenergic receptor/arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 3712–3717.

Lee, K.A., Niemi, G.A., Craven, K.B., Garwin, G.G., and Saari, J.C. (2001). Multiple phosphorylation of rhodopsin and the in vivo chemistry underlying rod photoreceptor dark adaptation. *Neuron*.

Lee, M.-H., Appleton, K.M., Strungs, E.G., Kwon, J.Y., Morinelli, T.A., Peterson, Y.K., Laporte, S.A., and Luttrell, L.M. (2016). The conformational signature of β -arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature* *531*, 665–668.

Lefkowitz, R. (2007a). Introduction to Special Section on β -Arrestins. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* *69*, annurev.ph.69.013107.100021.

Lefkowitz, R. (2007b). Introduction to Special Section on β -Arrestins. [Http://Dx.Doi.org/10.1146/Annurev.Ph.69.013107.100021](http://Dx.Doi.org/10.1146/Annurev.Ph.69.013107.100021).

Lefrançois, M., Lefebvre, M.-R., Saint-Onge, G., Boulais, P.E., Lamothe, S., Leduc, R., Lavigne, P., Heveker, N., and Escher, E. (2011). Agonists for the Chemokine Receptor CXCR4. *ACS Med Chem Lett* *2*, 597–602.

Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., and Bachelier, F. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*.

Libert, F., Parmentier, M., Lefort, A., Dinsart, C., Van Sande, J., Maenhaut, C., Simons, M.-J., Dumont, J.E., and Vassart, G. (1989). Selective Amplification and Cloning of Four New Members of the G Protein-Coupled Receptor Family. *Science* *244*, 569–572.

Lin, F.T., Krueger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A., and Lefkowitz, R.J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J. Biol. Chem.* *272*, 31051–31057.

Lin, F.-T., Chen, W., Shenoy, S., Cong, M., Exum, S.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* *41*, 10692–10699.

Liu, Z., Sun, D.X., Teng, X.Y., Xu, W.X., and Meng, X.P. (2012). Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR7 in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine Pathology*.

Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* *248*, 1547–1550.

Luker, K.E., Gupta, M., and Luker, G.D. (2009a). Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation. *The FASEB Journal*.

Luker, K.E., Gupta, M., Steele, J.M., Foerster, B.R., and Luker, G.D. (2009b). Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia*.

- Luker, K.E., Lewin, S.A., Mihalko, L.A., and Schmidt, B.T. (2012). Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene*.
- Luker, K.E., Steele, J.M., Mihalko, L.A., Ray, P., and Luker, G.D. (2010). Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene* 29, 4599–4610.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Rocca, Della, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., et al. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655–661.
- Mahabaleshwar, H., Tarbashevich, K., Nowak, M., Brand, M., and Raz, E. (2012). β -arrestin control of late endosomal sorting facilitates decoy receptor function and chemokine gradient formation. *Development* 139, 2897–2902.
- Maksym, R.B., Tarnowski, M., and Grymula, K. (2009). The role of stromal-derived factor-1—CXCR7 axis in development and cancer. *European Journal of Pharmacology*.
- Manglik, A., Lin, H., Aryal, D.K., McCorvy, J.D., Dengler, D., Corder, G., Levit, A., Kling, R.C., Bernat, V., Hübner, H., et al. (2016). Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 1–6.
- Marchese, A., Paing, M.M., and Temple, B. (2008). G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
- Marion, S., Oakley, R.H., Kim, K.-M., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2006). A beta-arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 281, 2932–2938.
- McDermott, D.H., Liu, Q., Velez, D., and Lopez, L. (2014). A phase 1 clinical trial of long-term, low-dose treatment of WHIM syndrome with the CXCR4 antagonist plerixafor. *Blood*.
- Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., and Breit, A. (2002). Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 277, 44925–44931.
- Miao, Z., Luker, K.E., and Summers, B.C. (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature (*Proc Natl Acad Sci USA*).
- Miller, R.J., Banisadr, G., and Bhattacharyya, B.J. (2008). CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *Journal of Neuroimmunology*.
- Milligan, G., and Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*.

Mona, C.E., Besserer-Offroy, É., Cabana, J., Lefrançois, M., Boulais, P.E., Lefebvre, M.-R., Leduc, R., Lavigne, P., Heveker, N., Marsault, É., et al. (2016). Structure-Activity Relationship and Signaling of New Chimeric CXCR4 Agonists. *J. Med. Chem.* *59*, 7512–7524.

Montpas, N., Cabana, J., St-Onge, G., Gravel, S., Morin, G., Kuroyanagi, T., Lavigne, P., Fujii, N., Oishi, S., and Heveker, N. (2015). Mode of binding of the cyclic agonist peptide TC14012 to CXCR7: identification of receptor and compound determinants. *Biochemistry* *54*, 1505–1515.

Moore, C., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.*

Murakami, T., Nakajima, T., Koyanagi, Y., Tachibana, K., Fujii, N., Tamamura, H., Yoshida, N., Waki, M., Matsumoto, A., Yoshie, O., et al. (1997). A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* *186*, 1389–1393.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* *52*, 145–176.

Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., and Catron, D. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*.

Namkung, Y., Le Gouill, C., Lukashova, V., Kobayashi, H., Hogue, M., Khoury, E., Song, M., Bouvier, M., and Laporte, S.A. (2016). Monitoring G protein-coupled receptor and β -arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. *Nat Commun* *7*, 12178.

Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleswar, H., Raz, E., Zerwes, H.-G., Rot, A., and Thelen, M. (2010). CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE* *5*, e9175.

Neubig, R.R., Spedding, M., Kenakin, T., and Christopoulos, A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on receptor N, drug C. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and ... (Pharmacol Rev).

Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A.K., Lam, C.M., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Huang, T.-Y., Bressler, E.A., Hara, M.R., et al. (2011). Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci. Signal.* *4*, ra51.

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* *274*, 32248–32257.

- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J. Biol. Chem.* *276*, 19452–19460.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* *275*, 17201–17210.
- Oberlin, E., Amara, A., Bessia, C., and Virelizier, J.L. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*.
- Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *83*, 101–130.
- Ogilvie, P., Bardi, G., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Uguccioni, M. (2001). Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* *97*, 1920–1924.
- Oishi, S., Kuroyanagi, T., Kubo, T., Montpas, N., Yoshikawa, Y., Misu, R., Kobayashi, Y., Ohno, H., Heveker, N., Furuya, T., et al. (2015). Development of novel CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) ligands: selectivity switch from CXCR4 antagonists with a cyclic pentapeptide scaffold. *J. Med. Chem.* *58*, 5218–5225.
- Ozawa, K., Whalen, E.J., Nelson, C.D., Mu, Y., Hess, D.T., Lefkowitz, R.J., and Stamler, J.S. (2008). S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol. Cell* *31*, 395–405.
- Ödemis, V., Boosmann, K., Heinen, A., Küry, P., and Engele, J. (2010). CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. *J. Cell. Sci.* *123*, 1081–1088.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., and Behnke, C.A. (2000). Crystal structure of rhodopsin: AG protein-coupled receptor. *Science* *289*, 739–745.
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F.M., et al. (2012). Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* *491*, 779–783.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., et al. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* *283*, 845–848.
- Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* *280*, 9895–9903.
- Pike, J.A., Styles, I.B., Rappoport, J.Z., and Heath, J.K. (2017). Quantifying receptor trafficking and colocalization with confocal microscopy. *Methods* *115*, 42–54.

Pin, J.P., Neubig, R., Bouvier, M., Devi, L., and Filizola, M. (2007). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol. Rev.*

Proudfoot, A., and Power, C.A. (2010). Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert Opin Investig Drugs.*

Proudfoot, A.E.I., and Ugucioni, M. (2016). Modulation of Chemokine Responses: Synergy and Cooperativity. *Front Immunol* 7, 183.

Puchert, M., Adams, V., Linke, A., and Engele, J. (2016). Evidence for the involvement of the CXCL12 system in the adaptation of skeletal muscles to physical exercise. *Cell Signal* 28, 1205–1215.

Rajagopal, S., Bassoni, D.L., Campbell, J.J., Gerard, N.P., Gerard, C., and Wehrman, T.S. (2013). Biased agonism as a mechanism for differential signaling by chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* 288, 35039–35048.

Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C.M., Gerard, N.P., Gerard, C., and 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, 628–632.

Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., et al. (2011). Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549–555.

Reiter, E., and Lefkowitz, R.J. (2006). GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism.*

Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., and Edwards, P.C. (2007). Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.*

Rovati, G.E., Capra, V., and Neubig, R.R. (2007). The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State. *Mol. Pharmacol.* 71, 959–964.

Samama, P., Cotecchia, S., and Costa, T. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.*

Sattentau, Q.J., and Weiss, R.A. (1988). The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 52, 631–633.

Schiller, P.W. (2010). Bi-or multifunctional opioid peptide drugs. *Life Sciences.*

Schiöth, H.B., and Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology.*

- Schols, D., Struyf, S., Van Damme, J., and Esté, J.A. (1997). Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J. Exp. Med.*
- Schwartz, T.W., and Holst, B. (2006). Ago-allosteric modulation and other types of allostery in dimeric 7TM receptors. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 26, 107–128.
- Schwiebert, L.M. (2005). Chemokines, chemokine receptors, and disease.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2003a). Multifaceted roles of β -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochemical Journal* 375, 503–515.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2005a). Seven-Transmembrane Receptor Signaling Through β -Arrestin. *Sci. Signal.* 2005, cm10–cm10.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2003b). Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* 278, 14498–14506.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2005b). Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.* 280, 15315–15324.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2011). β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences* 32, 521–533.
- Shiina, T., Arai, K., Tanabe, S., Yoshida, N., Haga, T., Nagao, T., and Kurose, H. (2001). Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* 276, 33019–33026.
- Shukla, A.K., Westfield, G.H., Xiao, K., Reis, R.I., Huang, L.-Y., Tripathi-Shukla, P., Qian, J., Li, S., Blanc, A., Oleskie, A.N., et al. (2014). Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* 512, 218–222.
- Sierro, F., Biben, C., and Martínez-Muñoz, L. (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7 (*Proc Natl Acad Sci USA*).
- Simaan, M., Bédard-Goulet, S., Fessart, D., Gratton, J.-P., and Laporte, S.A. (2005). Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization. *Cell Signal* 17, 1074–1083.
- Smith, J.S., and Rajagopal, S. (2016). The β -Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* 291, 8969–8977.
- Smyth, E.M., Austin, S.C., Reilly, M.P., and FitzGerald, G.A. (2000). Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 32037–32045.

- Sohy, D., Yano, H., De Nadai, P., and Urizar, E. (2009). Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of “selective” antagonists. *J. Biol. Chem.*
- Stambouli, N., Dridi, M., Wei, N.-N., Jlizi, A., Bouraoui, A., and Elgaaied, A.B.A. (2014). Structural insight into the binding complex: β -arrestin/CCR5 complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* *32*, 866–875.
- STEPHENSON, R.P. (1956). A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* *11*, 379–393.
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002). β -arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *Journal of Biological Chemistry*.
- Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Gotoh, K., Kanamoto, T., Xu, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Hattori, T., Yamamoto, N., et al. (2001). Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *11*, 1897–1902.
- Thelen, M., and Thelen, S. (2008). CXCR7, CXCR4 and CXCL12: An eccentric trio? *Journal of Neuroimmunology* *198*, 9–13.
- Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Cahill, T.J., Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., et al. (2016). GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* *166*, 907–919.
- Tohgo, A., Choy, E.W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K.L., Laporte, S., Oakley, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Luttrell, L.M. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 6258–6267.
- Tripathi, V., Kumar, R., Dinda, A.K., Kaur, J., and Luthra, K. (2014). CXCL12-CXCR7 signaling activates ERK and Akt pathways in human choriocarcinoma cells. *Cell Commun. Adhes.* *21*, 221–228.
- Tulipano, G., Stumm, R., Pfeiffer, M., Kreienkamp, H.-J., Höllt, V., and Schulz, S. (2004). Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* *279*, 21374–21382.
- Valentin-Hansen, L., Groenen, M., and Nygaard, R. (2012). The arginine of the DRY motif in transmembrane segment III functions as a balancing micro-switch in the activation of the β 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *287*, 31973–31982.
- van Koppen, C.J., and Jakobs, K.H. (2004). Arrestin-independent internalization of G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* *66*, 365–367.

Vassilatis, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J.E., Mortrud, M.T., Brown, A., Rodriguez, S.S., Weller, J.R., Wright, A.C., et al. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *100*, 4903–4908.

Voermans, C., Kooi, M., Rodenhuis, S., and van der Lelie, H. (2001). In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood*.

Walters, M.J., Ebsworth, K., and Berahovich, R.D. (2014). Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats. *British Journal of Cancer*.

Wang, H.X., Tao, L.Y., Qi, K.E., Zhang, H.Y., Feng, D., Wei, W.J., Kong, H., Chen, T.W., Lin, Q.S., and Chen, D.J. (2015). Role of CXC chemokine receptor type 7 in carcinogenesis and lymph node metastasis of colon cancer. *Mol Clin Oncol* *3*, 1229–1232.

Wang, J.F., Park, I.W., and Gropman, J.E. (2000). Stromal cell-derived factor-1 α stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: *Blood*.

Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K.J., Mehra, R., Loberg, R., and Taichman, R.S. (2008). The Role of CXCR7/RDC1 as a Chemokine Receptor for CXCL12/SDF-1 in Prostate Cancer. *J. Biol. Chem.* *283*, 4283–4294.

Watts, A.O., Verkaar, F., van der Lee, M.M.C., Timmerman, C.A.W., Kuijper, M., van Offenbeek, J., van Lith, L.H.C.J., Smit, M.J., Leurs, R., Zaman, G.J.R., et al. (2013). β -Arrestin recruitment and G protein signaling by the atypical human chemokine decoy receptor CCX-CKR. *J. Biol. Chem.* *288*, 7169–7181.

Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *100*, 10782–10787.

Wilbanks, A.M., Laporte, S.A., Bohn, L.M., and Barak, L.S. (2002). Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors. *Biochemistry*.

Wilén, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). Molecular mechanisms of HIV entry. *Viral Molecular Machines*.

Wood, B., Price, T.H., and Dale, D.C. (2002). Mobilization and collection of CD34+ progenitor cells from normal human volunteers with AMD-3100, a CXCR4 antagonist, and G-CSF.

Wu, B., Chien, E.Y.T., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., et al. (2010). Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. *Science* *330*, 1066–1071.

- Wu, G., Krupnick, J.G., Benovic, J.L., and Lanier, S.M. (1997). Interaction of arrestins with intracellular domains of muscarinic and α 2-adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*.
- Wyatt, D., Malik, R., Vesecky, A.C., and Marchese, A. (2011). Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* *286*, 3884–3893.
- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., and Yoshie, O. (1998). Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J. Biol. Chem.* *273*, 16551–16554.
- Yu, S., Crawford, D., Tsuchihashi, T., Behrens, T.W., and Srivastava, D. (2011). The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Dev. Dyn.* *240*, 384–393.
- Zabel, B.A., Lewén, S., Berahovich, R.D., Jaen, J.C., and Schall, T.J. (2011). The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Mol. Cancer* *10*, 73.
- Zabel, B.A., Wang, Y., Lewén, S., Berahovich, R.D., Penfold, M.E.T., Zhang, P., Powers, J., Summers, B.C., Miao, Z., Zhao, B., et al. (2009). Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J. Immunol.* *183*, 3204–3211.
- Zhai, P. (2005). Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G q/G i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation* *115*, 3045–3056.
- Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G., and Ferguson, S.S. (1999). Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* *274*, 10999–11006.
- Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., Ménard, L., and Caron, M.G. (1996). Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* *271*, 18302–18305.
- Zhang, W., Navenot, J.M., and Haribabu, B. (2002). A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists. *J. Biol. Chem.* *277*, 24515–24521.
- Zidar, D.A., Violin, J.D., and Whalen, E.J. (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands.
- Zlotnik, A. (2004). Chemokines in neoplastic progression. *Seminars in Cancer Biology*.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., and Taniuchi, I. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*.

