

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**ÉVALUATION DE L'EFFET DES ANTAGONISTES SYNTHÉTIQUES  
DU RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE CXCR4 SUR CXCR7**

Par  
Stéphanie Gravel

Département de biochimie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en biochimie

30 Avril 2010

© Stéphanie Gravel, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :  
**ÉVALUATION DE L'EFFET DES ANTAGONISTES SYNTHÉTIQUES  
DU RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE CXCR4 SUR CXCR7**

Présenté par :  
Stéphanie Gravel

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr.Nathalie Grandvaux

.....  
Président-rapporteur

Dr. Nikolaus Heveker

.....  
Directeur de recherche

Dr. Graciela Pineyro

.....  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

Le récepteur de chimiokine CXCR7 a été récemment identifié comme liant la chimiokine SDF-1, anciennement considérée comme ligand exclusif du récepteur CXCR4. Ces deux récepteurs sont exprimés majoritairement dans les mêmes types cellulaires et, ainsi, la découverte de CXCR7 incite à réévaluer les effets respectifs de SDF-1 sur CXCR4. Étant donné son rôle dans le cancer, CXCR4 est une cible de choix pour le développement de molécules thérapeutiques. Également, CXCR7 semble être impliqué dans la croissance tumorale. AMD3100, un antagoniste «sélectif» pour CXCR4, est maintenant commercialisé. Cet antagoniste a été identifié comme liant lui aussi CXCR7. De plus, sur CXCR7, l'AMD3100 agit comme agoniste puisqu'il induit le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, à l'opposé de son effet sur. En revanche, AMD3100 n'induit pas le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR4. Basé sur ces résultats, il est nécessaire de revoir la sélectivité d'autres antagonistes synthétiques de CXCR4.

À l'aide de la technique de BRET (Résonance d'un transfert d'énergie par bioluminescence), nos résultats montrent que le Tc14012, un autre antagoniste synthétique de CXCR4, et structurellement distinct de l'AMD3100, interagit avec CXCR7. Contrairement à CXCR4, les deux antagonistes de CXCR4 agissent comme agonistes sur CXCR7 en induisant le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Nos résultats suggèrent que l'organisation spatiale du corps du récepteur serait responsable de cet effet opposé.

En conclusion, AMD3100 et Tc14012 ne sont pas sélectifs pour CXCR4, puisqu'ils interagissent avec CXCR7. Lors du développement de nouvelles molécules synthétiques ciblant CXCR4, il serait alors nécessaire d'en évaluer leur sélectivité, et leurs effets en les testant aussi sur CXCR7.

**Mot-clés :** Récepteur de chimiokine CXCR4 et CXCR7, BRET, recrutement de la  $\beta$ -arrestine, AMD3100, Tc14012 et SDF-1.

## ASBTRACT

SDF-1 was at first thought to exclusively bind CXCR4, but it was subsequently found to also bind to the chemokine receptor CXCR7. CXCR4 is a promising target for drug development due to its role in cancer. AMD3100 is newly commercialised synthetic antagonist of CXCR4. This drug leads to massive release of hematopoietic stem cell into the peripheral blood. It was found that AMD3100 also binds to CXCR7 and acts as an agonist of  $\beta$ -arrestin recruitment to CXCR7. An antagonist of CXCR4 acts as an agonist on CXCR7. Prompted by this observation, we tested whether this might hold true for other CXCR4 antagonist. Tc14012, a peptidomimetic of T140, has been extensively described as a potent CXCR4 antagonist.

We find that TC14012 also interacts on CXCR7. Like AMD3100, TC14012 alone induces  $\beta$ -arrestin recruitment to CXCR7. Thus, two structurally unrelated CXCR4 antagonists, AMD3100 and TC14012, are agonists of the CXCR7-arrestin pathway. This suggests distinct activation mechanisms of the arrestin pathway by CXCR4 and CXCR7. The results we obtained using a BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)-based arrestin recruitment assay, suggest that the CXCR7 receptor core is responsible for the recruitment of beta-arrestin in response to AMD3100 and TC14012.

The finding that both AMD3100 and TC14012 do not only bind CXCR4, but also CXCR7, with opposite effects on arrestin recruitment, is important for the use of the compounds as tools to dissect SDF-1-mediated effects. This may be a general feature of synthetic ligands of the two receptors, with potential consequences for drug development.

**Key words:** Chemokine receptor, CXCR4 and CXCR7, BRET,  $\beta$ -arrestin recruitment, TC14012, AMD3100 and SDF-1.

## TABLE DES MATIÈRES

|  |            |
|--|------------|
| <b>RÉSUMÉ</b>  | <b>ii</b>  |
| <b>ASBTRACT</b>  | <b>iii</b> |
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b>  | <b>iv</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b>  | <b>vi</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES</b>   | <b>vii</b> |
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>  | <b>ix</b>  |
| <b>REMERCIEMENTS</b>   | <b>xi</b>  |
| <b>1. INTRODUCTION</b>   | <b>1</b>   |
| <b>1.1. Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TMR's)</b>   | <b>2</b>   |
| 1.1.1. Classification des 7TMR's   | 2          |
| 1.1.2. Activation des 7TMR's   | 3          |
| <b>1.2. Interaction ligand/récepteur</b>   | <b>4</b>   |
| 1.2.1 Paramètres pharmacologiques  | 5          |
| 1.2.2. Liaisons orthostériques et allostériques  | 6          |
| <b>1.3. <math>\beta</math>-arrestine</b>   | <b>8</b>   |
| <b>1.4. Les chimiokines</b>  | <b>12</b>  |
| <b>Figure 1.4 : Représentation schématique de voies de signalisation activées par les récepteurs de chimiokines. Figure modifiée et tirée de (Thelen, 2001).</b> | <b>13</b>  |
| <b>1.5. Les récepteurs de chimiokines</b>  | <b>14</b>  |
| 1.5.1. Récepteur de chimiokine, CXCR4  | 15         |
| 1.5.1.2 Historique et expression   | 15         |
| 1.5.1.2. Rôles du récepteur CXCR4  | 16         |
| 1.5.1.3. Signalisation du récepteur CXCR4  | 17         |
| 1.5.2. Récepteur de chimiokine, CXCR7  | 18         |
| 1.5.2.1 Historique   | 18         |
| 1.5.2.2. Expression  | 19         |
| 1.5.2.3. Rôles du récepteur CXCR7  | 20         |
| 1.5.2.4. Signalisation du récepteur CXCR7  | 23         |
| <b>1.6. Inhibiteurs synthétiques de CXCR4</b>  | <b>25</b>  |
| 1.6.1. AMD3100/Mozobile/Plerixafor   | 25         |
| 1.6.2. TC14012   | 27         |
| <b>1.7. Molécules synthétiques ciblant CXCR7</b>   | <b>29</b>  |
| <b>1.8. Projet de recherche</b>  | <b>32</b>  |
| 1.8.1. Problématique   | 32         |
| 1.8.2 Buts et objectifs  | 33         |
| <b>2. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>  | <b>34</b>  |
| <b>2.1. Techniques utilisés</b>  | <b>35</b>  |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2. Description de la technique de BRET _____  | 40        |
| <b>3. RÉSULTATS _____</b>   | <b>45</b> |
| 3.1. Recrutement de la $\beta$ -arrestine au récepteur de chimiokine CXCR7 _____        | 46        |
| 3.2. Interaction de Tc14012 avec le dimère du récepteur CXCR7 _____                     | 48        |
| 3.3. Caractérisation des récepteurs chimères CXCR4 et CXCR7 _____                       | 52        |
| 3.5. Recrutement constitutif de la $\beta$ -arrestine au chimère CXCR7-CtermX4 _____    | 61        |
| 3.6. Effets différents des différents ligands endogènes de CXCR7 _____                  | 64        |
| <b>4. DISCUSSION _____</b>  | <b>68</b> |
| 4.1. Interaction de TC14012 avec CXCR4 et CXCR7 _____                                   | 69        |
| 4.2. Effets opposés du Tc14012 sur CXCR4 et CXCR7 _____                                 | 69        |
| 4.3. Rôle du C-terminal pour la puissance de la réponse à SDF-1 _____                   | 70        |
| 4.4. Rôle du recrutement de la $\beta$ -arrestine à CXCR7 pour sa fonction biologique _ | 71        |
| 4.5. Perspectives _____   | 74        |
| <b>5. CONCLUSION _____</b>  | <b>76</b> |
| <b>6. RÉFÉRENCES _____</b>  | <b>79</b> |

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau I :** Résumé de l'analyse des paramètres des courbes de dose-réponse des différents ligands sur l'homo-dimérisation du récepteur CXCR7 (figure 3.2, p. 51).

**p. 52**

**Tableau II:** Résumé des analyses statistiques des paramètres des courbes de l'activation du recrutement de la  $\beta$ -arrestine aux différents récepteurs et récepteurs/chimères par SDF-1, Tc14012 et AMD3100 montrée à la figure 3.1 et 3.6 (p. 48, 59).

**p. 60**

**Tableau III :** Résumé des paramètres des courbes de saturation en fonction du ratio [accepteur]/[donneur] en BRET montrées à la figure 3.7 (p. 63).

**p. 64**

**Tableau IV :** Résumé de l'analyse des paramètres statistiques des courbes de doses-réponses de SDF-1 et ITAC sur la conformation de la  $\beta$ -arrestine suite à son recrutement à CXCR7 montrées à la figure 3.8 (p. 66).

**p. 67**

## LISTE DES FIGURES

|                     |   |              |
|---------------------|---|--------------|
| <b>Figure 1.1 :</b> | <b>Représentation schématique générale résumant l'activation des protéines G hétérotrimériques via les récepteurs à 7 domaines transmembranaires.</b> | <b>p. 4</b>  |
| <b>Figure 1.2 :</b> | <b>Représentation schématique du rôle classique de la <math>\beta</math>-arrestine.</b>   | <b>p. 8</b>  |
| <b>Figure 1.3 :</b> | <b>Représentation schématique des différents rôles connus de la <math>\beta</math>-arrestine.</b>   | <b>p. 10</b> |
| <b>Figure 1.4 :</b> | <b>Représentation schématique des voies de signalisation activées par les récepteurs de chimiokines.</b>  | <b>p. 13</b> |
| <b>Figure 1.5 :</b> | <b>Représentation schématique de la classification des chimiokines et de leurs récepteurs.</b>  | <b>p. 14</b> |
| <b>Figure 1.6 :</b> | <b>Représentation schématique de la structure chimique de la molécule AMD3100.</b>  | <b>p. 27</b> |
| <b>Figure 1.7 :</b> | <b>Représentation schématique de la séquence des acides aminés du T140 et de son analogue, le Tc14012.</b>  | <b>p. 29</b> |
| <b>Figure 2.1 :</b> | <b>Représentation schématique du système BRET.</b>  | <b>p. 41</b> |
| <b>Figure 2.2 :</b> | <b>Représentation schématique d'une courbe théorique de saturation en BRET.</b>   | <b>p. 43</b> |
| <b>Figure 3.1 :</b> | <b>Effet de divers ligands naturels ou synthétiques sur le recrutement de la <math>\beta</math>-arrestine au récepteur de chimiokine CXCR7.</b>       | <b>p. 48</b> |
| <b>Figure 3.2 :</b> | <b>Effet d'une concentration croissante de ligands sur la conformation du récepteur CXCR7.</b>  | <b>p. 51</b> |
| <b>Figure 3.3:</b>  | <b>Représentation schématique et alignement de séquences des parties C-terminales des récepteurs CXCR4 et CXCR7</b>                                   | <b>p. 53</b> |
| <b>Figure 3.4 :</b> | <b>Expression en surface des récepteurs chimères.</b>   | <b>p. 54</b> |



- Figure 3.5 :** Inhibition de la liaison de 50pM  $^{125}$ I-SDF-1 en présence d'une concentration croissante de compétiteur non-marqué, SDF-1, sur les différents récepteurs. **p. 56**
- Figure 3.6 :** Effet de divers ligands naturels ou synthétiques sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7, CXCR4 et les récepteurs/chimères. **p. 59**
- Figure 3.7 :** Courbe de saturation en fonction du ratio [accepteur]/[donneur] en BRET. **p. 63**
- Figure 3.8 :** Effet des ligands naturels du récepteur de chimiokine CXCR7 sur la conformation de la  $\beta$ -arrestine suite à son recrutement à CXCR7. **p. 67**

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|               |  |
|---------------|--|
| ADN           | Acide désoxyribonucléique                          |
| AMD3100       | AnorMED3100  |
| BRET          | Bioluminescence Resonance Energy Transfer          |
| ADNc          | Acide désoxyribonucléique complémentaire           |
| C-terminale   | Carboxy-Terminal                                   |
| ERK           | Extracellular signal-regulated kinase              |
| eYFP          | enhanced yellow fluorescent protein                |
| FDA           | Food and drug administration                       |
| GABA $\beta$  | $\gamma$ -aminobutyric acide, isoforme $\beta$     |
| G-CSF         | Granulocyte-colony stimulative factor              |
| GDP           | Guanosine diphosphate                              |
| GRK           | g-protein receptor kinase                          |
| GTP           | Guanosine triphosphate                             |
| HEK293        | Human embryonic kidney                             |
| HIF- $\alpha$ | Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$                |
| ITAC          | Interferon-inducible T-cells alpha chemoattractant |
| JAK           | Janus Kinase                                       |
| MAPK          | Mitogen-activated protein kinase                   |
| MCP-1         | Monocyte chemoattractant protein-1                 |
| N-terminal    | Amino-terminale                                    |
| PBS           | Phosphate saline buffer                            |
| PI3Kinase     | Phosphoinositol triphosphate kinase                |
| PKB           | Protéine kinase B                                  |
| PTX           | Pertussis toxin                                    |
| RDC1          | Receptor Dog cDNA-1                                |
| RLuc          | Renilla luciférase                                 |
| SCID          | Severe combined immunodeficiency                   |
| SDF-1         | Stromal cell-derived factor 1                      |
| STAT          | Signal transducer and activator of transcription   |

|     |                                  |
|-----|----------------------------------|
| VIH | Virus d'immunodéficience humaine |
| VIP | Vasoactive intestinal peptide    |

## REMERCIEMENTS

Je profite de l'occasion pour remercier les personnes qui me sont chères et qui m'ont supporté tout au long de mes études, particulièrement dans le cadre de cette maîtrise en biochimie à l'Université de Montréal.

D'abord, je voudrais remercier ma mère Carole Blanchard et mon père André Gravel. Ils m'ont encouragé, supporté et donné tous les outils nécessaires pour réussir. Je voudrais aussi remercier ma sœur Chloé, qui est très attentionnée et m'a toujours supportée dans toutes mes démarches scientifiques.

Je tiens aussi à remercier mon directeur de recherche, Dr Nikolaus Heveker. Je remercie Nikolaus pour son écoute et sa patience, pour son honnêteté et sa franchise. Je le remercie également pour sa disponibilité et pour son temps précieux qu'il m'a accordé pour faire de moi une meilleure scientifique.

Également, je remercie tous mes collègues de travail; Geneviève St-Onge, Marie-Ève Pelletier et Camille Malouf pour leur support et encouragement. Une attention toute particulière pour Yamina Agnès Berchiche qui a été mon mentor et ma référence scientifique principale.

Enfin, un merci spécial à Amélie Comtois, qui met du bonheur dans ma vie et est toujours là pour me remonter le moral dans les moments le plus difficiles. Merci à Valérie De Rop et Guillaume Sylvain-Drolet, Catherine Proulx et Nicolas Montpas, Mila Leboeuf et Charbel Abou-Rached qui ont fait le même genre d'études que moi et qui comprennent tout à fait quand je parle de science avec autant de passion.

Merci enfin à mon amoureux, Louis-André Julien qui est toujours là pour m'écouter et m'encourager à réaliser mes rêves.

## **1. INTRODUCTION**

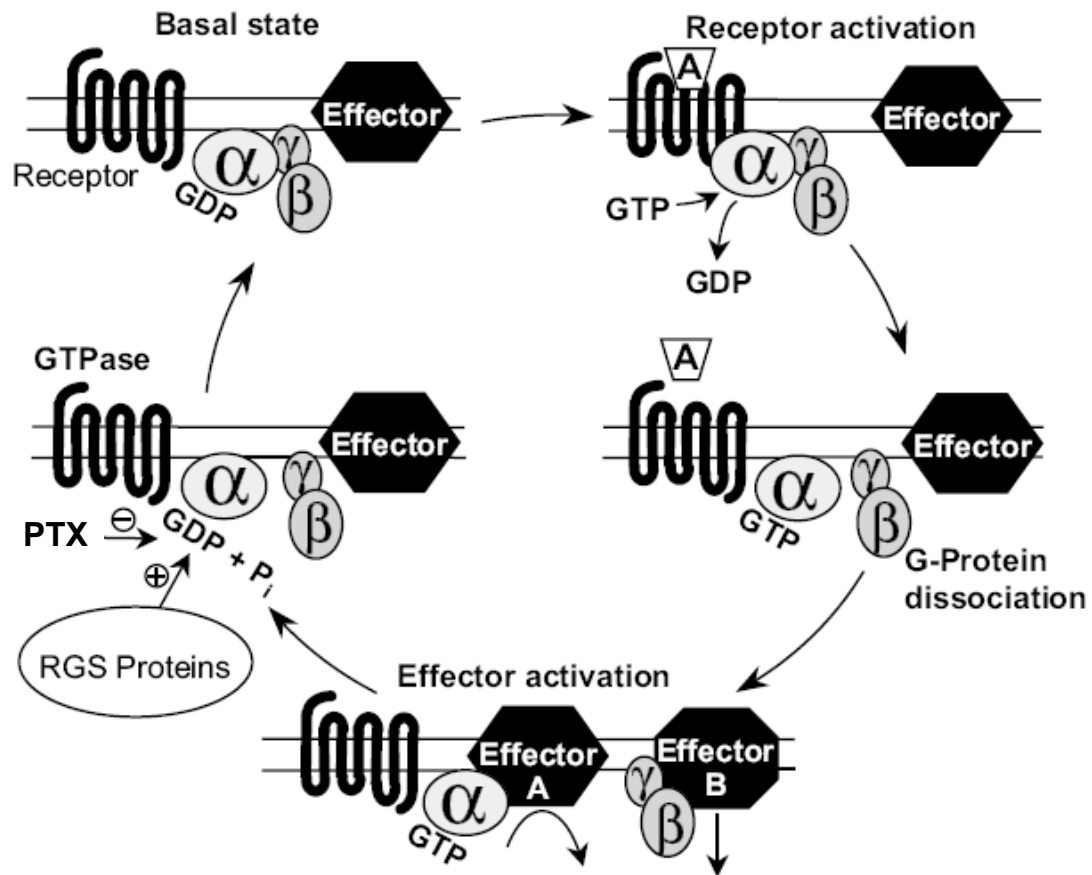
## 1.1. Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TMR's)

### 1.1.1. Classification des 7TMR's

La famille des 7TMR's constitue la plus grande classe de protéines exprimée à la surface cellulaire qui est impliquée dans la transduction du signal (Murphy *et al.*, 2000). En plus de réguler le métabolisme ou de répondre à divers stimuli tels que les hormones, les sens et les neurotransmetteurs, ces récepteurs sont constitués de sept domaines transmembranaires hydrophobes (Hamdan *et al.*, 2005). La plupart des 7TMR's interagissent avec une protéine G hétérotrimérique afin d'induire l'activation de voies signalétiques intracellulaires (Rajagopal *et al.*, 2010). Étant donné leur implication dans diverses pathologies telles que le cancer, les maladies auto-immunes ainsi que les maladies inflammatoires (athérosclérose), cette famille de récepteurs représente des cibles pharmacologiques importantes. En effet, plus de 30% des médicaments actuels visent directement ou indirectement ces récepteurs comme cible thérapeutique (Hamdan *et al.*, 2005). Ces récepteurs sont divisés en trois classes. La première classe, classe A, rassemble les récepteurs de la rhodopsine, du  $\beta$ 2-adrénergique, des dopamines, des chimiokines et des opioïdes (Vauquelin and Van Liefde, 2005). Ces récepteurs possèdent, dans leur séquence d'acides aminés, un motif DRY hautement conservé qui serait situé au niveau de la deuxième boucle intracellulaire (Gether, 2000) (Thelen and Thelen, 2008). La classe B regroupe les récepteurs apparentant aux récepteurs de glucagon et de calcitonine. Cette famille dispose d'une longue partie N-terminale riche en cystéines formant des ponts disulfures. Enfin, la classe C est constituée des récepteurs apparentant les récepteurs métabotropiques et glutamiques, des récepteurs de GABA<sub>B</sub> et de calcium (Vauquelin and Van Liefde, 2005). Ces récepteurs ont en commun une longue extrémité N-terminale très structurée qui renferme possiblement le site de liaison (Pin *et al.*, 2007). Plus particulièrement, les récepteurs de chimiokines de la classe A seront discutés davantage ultérieurement.

### 1.1.2. Activation des 7TMR's

L'activation des 7TMR's implique la liaison d'un ligand. Par la suite, cette activation induit des changements de conformation au sein du récepteur qui se transmettent de la face extracellulaire du récepteur à sa face cytoplasmique, site de liaison des effecteurs de signalisation. Ainsi, ces changements de conformation peuvent induire le recrutement et la dissociation d'une protéine membranaire  $G\alpha\beta\gamma$  hétérotrimérique (Gales *et al.*). Plus précisément, la liaison de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G, associée à un GDP permet l'échange du GDP par un GTP cytoplasmique et induit la dissociation du complexe  $\beta$ - $\gamma$  (Gales *et al.*). La sous-unité  $G\alpha$  est activée suite à l'hydrolyse du GDP en GTP et permet une transduction du signal qui mène dans la plupart des cas, à la reconnaissance et à l'activation de cascades enzymatiques qui provoqueront à leurs tour diverses réponses cellulaires tels que la mobilisation de calcium ou l'activation de l'adénylate cyclase (Gales *et al.*). Récemment, il a été suggéré que l'interaction des récepteurs avec les protéines G hétérotrimériques précède l'activation du récepteur, ce qui consisterait plutôt en un réarrangement du complexe récepteur/protéine G préformée (Gales *et al.*, 2006). La forme activée du récepteur se retrouve rapidement phosphorylée par une protéine G kinase ce qui le conduit au recrutement de la  $\beta$ -arrestine (Shenoy and Lefkowitz, 2003).



**Figure 1.1 : Représentation schématique générale résumant l'activation des protéines G hétérotrimériques via les récepteurs à 7 domaines transmembranaires.** A, agoniste, PTX, pertussis toxine, RGS, régulateur de la signalisation des protéines G. Figure modifié et tiré de (Offermanns, 2003).

## 1.2. Interaction ligand/récepteur

Les 7TMR's font l'objet de cribles pharmacologiques dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Les 7TMR's sont des candidats de choix pour le contrôle allostérique puisque leurs fonctions physiologiques elles-mêmes sont régulées par des mécanismes allostériques. Le contrôle allostérique a pour fonction de moduler, d'inhiber ou même de potentialiser l'activité basale d'une cible biologique au sein de la cellule hôte afin d'induire des effets physiologiques (Kenakin, 2009) .



### 1.2.1 Paramètres pharmacologiques

Il existe des paramètres nécessaires afin de caractériser la molécule thérapeutique envers sa cible biologique. Tout d'abord, il y a l'affinité, un terme chimique, qui quantifie la capacité d'une molécule à se lier sur sa cible biologique et à y rester. L'affinité résulte en une mesure de forces d'interaction (Kenakin, 2009). Elle se mesure principalement par des études de radio-liaison. Ces essais de radio-liaison ont pour but d'observer la capacité du ligand non-marqué à déplacer le radio-ligand de sa cible biologique. Dans le contexte de ce mémoire, la cible biologique correspond à un récepteur. La valeur déterminant cette capacité de déplacement est une valeur d'affinité traduisant la concentration nécessaire de ligand non-marqué pour inhiber de moitié la liaison du radio-ligand à un récepteur (Burns *et al.*, 2006). L'affinité est une mesure unique de la molécule thérapeutique envers sa cible biologique (Kenakin, 2009).

À part de l'affinité, deux paramètres pharmacologiques définissent la réponse à un ligand : la puissance et l'efficacité. Une autre caractéristique importante est la puissance. Or, la puissance est un paramètre traduisant la force de la molécule à induire un changement de comportement de la cible biologique au niveau de la cellule hôte pour une voie de signalisation spécifique (Kenakin, 2009). La valeur de la puissance se définit par une mesure de  $EC_{50}$ . Cette mesure correspond à la concentration nécessaire d'un ligand donné pour atteindre 50% de la réponse maximale via la cible biologique (Kalatskaya *et al.*, 2009).

Ensuite, l'efficacité, un terme pharmacologique introduit par Stephenson, traduit l'activité directe d'une molécule thérapeutique à produire un effet physiologique (Stephenson, 1956). Ce paramètre définit l'amplitude de la réponse.

### 1.2.2. Liaisons orthostériques et allostériques

Un autre élément important de l'interaction ligand/récepteur est la notion de sites orthostériques versus allostériques. Lorsque deux molécules ont la même cible biologique, elles peuvent soit compétitionner pour le même site de liaison, (i.e. site orthostérique) ou soit se lier à des sites différents sur la cible biologique (Kenakin, 2009).

Un ligand orthostérique est défini comme un ligand endogène. En conséquent, la pochette de liaison du récepteur occupée par son ligand endogène est nommée «site orthostérique». Un ligand orthostérique peut agir soit comme un agoniste ou un antagoniste (Pineyro, 2009). Dans un système orthostérique, la cible biologique, le récepteur (dans le cadre de ce mémoire) ne peut interagir simultanément avec deux ligands. De plus, dans un tel système, la présence d'un antagoniste abolira complètement l'effet de l'agoniste en empêchant ce dernier de se lier sur le récepteur, ce qui rendra le récepteur inactif (Kenakin, 2009).

En revanche, dans un système allostérique, le récepteur peut interagir simultanément avec le ligand endogène (ligand orthostérique) et avec un modulateur allostérique (Kenakin, 2009). Les ligands allostériques se lient à un site distinct sur le récepteur, et ce faisant, ils induisent des changements de conformation ayant pour effet de réduire ou d'augmenter l'affinité du ligand orthostérique au récepteur. Les ligands allostériques peuvent aussi modifier les propriétés signalétiques d'un ligand orthostérique, et ce, de façon indépendante de leur effet sur l'affinité. Ainsi, les ligands allostériques qui ont pour fonction de moduler l'affinité de la liaison et/ou les conséquences signalétiques d'un ligand orthostérique se nomment des modulateurs allostériques (Pineyro, 2009). Les effets des modulateurs allostériques peuvent être saturables, de sorte qu'une concentration saturante en modulateur allostérique résulte en une réduction seulement partielle de la sensibilité du récepteur envers son ligand orthostérique. Aussi, un modulateur allostérique peut être agoniste-dépendant, c'est-

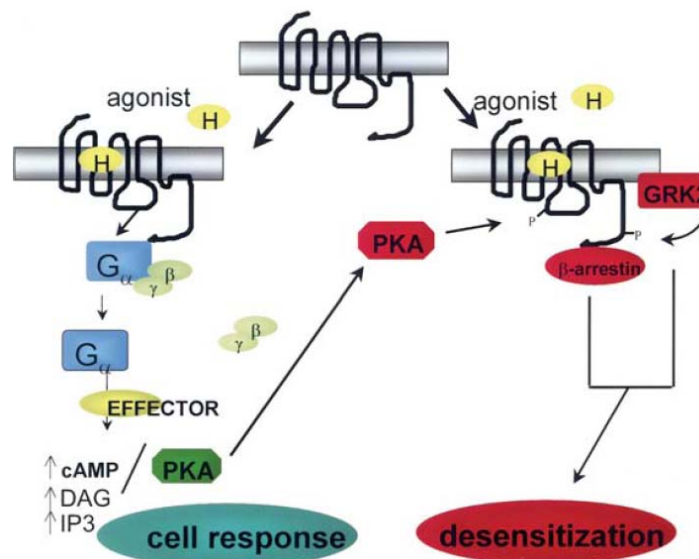
à-dire qu'il n'aura pas le même effet sur le récepteur dépendamment de l'agoniste présent au site orthostérique (Kenakin, 2010). Les modulateurs allostériques dits «positifs» potentialisent la réponse de l'agoniste en modifiant l'affinité et/ou l'efficacité de l'agoniste envers son récepteur (Kenakin, 2010).

En résumé, les modulateurs allostériques, qu'ils soient positifs ou négatifs, se lient sur le récepteur à des sites distincts de celui du ligand naturel (orthostérique). Ces modulateurs modifient la réponse intracellulaire induite par le ligand naturel de façon à rendre cette réponse plus active ou soit à la rendre plus faible (Kenakin, 2007). Cette propriété propre aux modulateurs allostériques pourrait permettre le développement de nouvelles drogues thérapeutiques en ciblant seulement la fonction pathologique et non la fonction physiologique normale du récepteur (Kenakin, 2009).

À titre d'exemple, la molécule synthétique AMD3100, commercialisée sous le nom de mozobil, et qui sera discuté plus bas, agit comme modulateur allostérique négatif (antagoniste) sur le récepteur de chimiokine CXCR4. De ce fait, l'AMD3100 inhibe les réponses intracellulaires médiées par SDF-1, le ligand endogène (orthostérique) de CXCR4, via ce récepteur. En revanche, sur le récepteur de chimiokine CXCR7, il agit non seulement comme modulateur allostérique positif de sorte qu'il augmente l'affinité de SDF-1 sur CXCR7, mais également comme agoniste allostérique (Kalatskaya *et al.*, 2009). Contrairement aux modulateurs allostériques, les agonistes allostériques sont capables d'initier ou d'induire une voie de signalisation intracellulaire spécifique via le récepteur, et ce, indépendamment de la présence ou non du ligand orthostérique. (Pineyro, 2009) De façon similaire à un modulateur allostérique, un agoniste allostérique ne partage pas le même site de liaison qu'un ligand orthostérique. Ainsi, les ligands définis comme «agonistes-allostériques» peuvent avoir des effets distincts de ceux sur l'agoniste au site orthostérique (i.e des effets sur l'affinité ou l'efficacité) (Kenakin, 2010).

### 1.3. $\beta$ -arrestine

La  $\beta$ -arrestine a été découverte notamment pour sa capacité à induire l'arrêt de la transduction du signal par les protéines G hétérotrimérique via les 7TMR's d'où l'étymologie du nom arrestine pour «arrêt» (DeWire *et al.*, 2007). Les protéines G kinases (GRK) ont pour effet de rapidement phosphoryler les récepteurs à 7 domaines transmembranaires au niveau de leur queue C-terminale intracellulaire. Ensuite, la  $\beta$ -arrestine s'y lie et désensibilise la signalisation de la protéine G hétérotrimérique du 7TMR via un mécanisme allostérique (DeWire *et al.*, 2007). La déphosphorylation de la  $\beta$ -arrestine à la membrane plasmique est nécessaire pour le recrutement de partenaires responsables de l'endocytose tels les clathrines (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

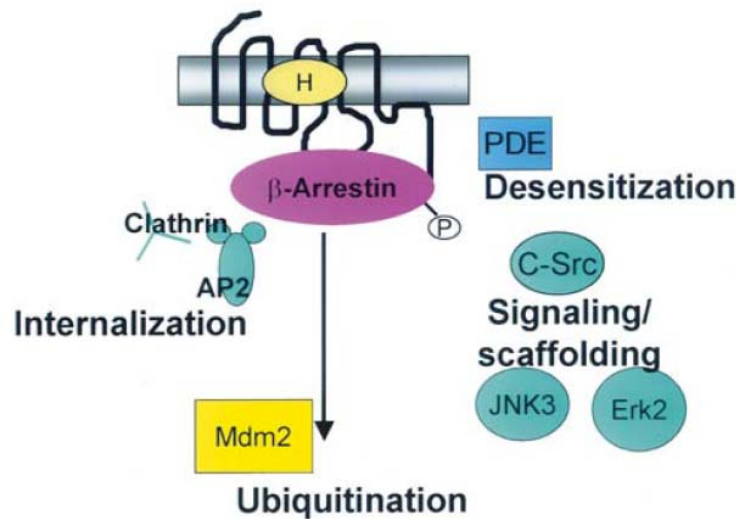


**Figure 1.2 : Représentation schématique du rôle classique de la  $\beta$ -arrestine (Shenoy and Lefkowitz, 2003).**

Il existe deux voies possibles pour le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et elles sont divisées en deux classes d'interaction. La première classe, la classe A résulte en une interaction transitoire et en une faible affinité de liaison de la  $\beta$ -arrestine avec le récepteur qui se caractérise par une accumulation rapide de  $\beta$ -arrestine au récepteur

activé (DeWire *et al.*, 2007). Aussitôt que la  $\beta$ -arrestine a ciblé le récepteur sous sa forme activée, elle est relâchée et le récepteur se retrouve dans un puits tapissé de clathrines (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Ainsi, le recyclage du récepteur suite à son internalisation est très rapide. La deuxième classe, la classe B, montre une forte et longue interaction donc une très haute affinité de liaison de la  $\beta$ -arrestine avec le récepteur. Or, la  $\beta$ -arrestine et la forme activée du récepteur restent liés ensemble même à la surface des vésicules d'endocytoses. Ainsi, la  $\beta$ -arrestine s'internalise avec le récepteur et, de ce fait, le recyclage des récepteurs appartenant à cette classe vers la membrane plasmique est plus lent. En fait, la plupart de ces récepteurs ne sont pas recyclés, mais ciblés au lysosome pour leur dégradation. Par ailleurs, la  $\beta$ -arrestine de mammifères est en tout temps phosphorylée dans le cytosol et est aussitôt déphosphorylée lorsqu'elle se lie à un 7TMR à la membrane plasmique ce qui provoque son internalisation (DeWire *et al.*, 2007).

Anciennement, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine était connu pour provoquer seulement une désensibilisation du récepteur suivit de son internalisation dans la membrane par le biais d'un puits tapissé de clathrines ce qui permet au récepteur d'être soit recyclé vers la membrane ou soit dégradé via le lysosome (Shenoy and Lefkowitz, 2003). En revanche, des études plus récentes montrent que, en plus de servir d'adaptateur d'endocytose, la  $\beta$ -arrestine peut agir comme transducteur de signal qui peut être dépendant ou non des protéines G hétérotrimériques, en activant distincte voie de signalisation telle que la voie MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), les tyrosines kinases, la voie AKT ou PKB, les PI3 kinases, la voie NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) et la voie JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Notamment, toutes ces voies de signalisation ont été reconnues comme étant fortement activés lors de la tumorigenèse ce qui a pour effet d'augmenter la croissance cellulaire.



**Figure 1.3 : Représentation schématique des différents rôles connus de la  $\beta$ -arrestine.** La  $\beta$ -arrestine agit aussi comme transducteur de signal pouvant activer différentes voies de signalisation. (Shenoy and Lefkowitz, 2003)

La  $\beta$ -arrestine est une protéine d'échafaudage pouvant lier des éléments spécifiques d'une voie de signalisation et conduire à leur activation. La première implication de la  $\beta$ -arrestine dans la signalisation cellulaire a été découverte via le recrutement de c-Src. Plus précisément, dans ce cas, l'internalisation du récepteur ainsi que le recrutement de la  $\beta$ -arrestine permet une activation complète de la voie MAPKinase (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Un autre groupe de recherche montre que deux ligands endogènes se liant à un même récepteur activent différents isoformes de GRK's menant à un recrutement de la  $\beta$ -arrestine et à l'activation différentielle de voies de signalisation. À titre d'exemple, le ligand du récepteur de chimiokine CCR7, CCL19 induit sa phosphorylation via les GRK3 et GRK6 contrairement au ligand CCL21 qui lui active seulement la GRK6. Seule la signalisation via CCL19 mène à une désensibilisation classique du récepteur suivi de son internalisation de sorte que la  $\beta$ -arrestine se trouve redistribuée à la surface de vésicules d'endosomes (Zidar *et al.*, 2009). Ainsi, en fonction de la nature du ligand endogène, l'activation d'une voie de signalisation spécifique, induite par le récepteur, sera favorisée (Vauquelin and Van Liefde, 2005). Ce modèle d'activation sélective de voies de signalisation

spécifiques et différentes, en fonction du ligand, se nomme le concept de sélectivité fonctionnelle. À titre d'exemple, d'autres ont observé que des ligands du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, soit le ICI118551 et le pronanolole, inhibent la production d'AMP cyclique par  $G\alpha_s$ , mais, en revanche, activent la voie des MAPkinases médiée par la  $\beta$ -arrestine (Azzi *et al.*, 2003). Or, ces deux ligands sont caractérisés comme des agonistes inverses puisqu'ils inhibent et renversent complètement l'activité constitutive sur la voie des protéines G du récepteur (Vauquelin and Van Liefde, 2005). Cet article illustre donc le fait que les récepteurs adoptent différentes conformations actives dépendamment de la nature du ligand, ce qui produit l'activation spécifique (ou non) de voies de signalisation, et, sont indépendantes les unes des autres.

La  $\beta$ -arrestine a aussi été montré pour adopter plusieurs conformations actives distinctes, pour un même récepteur, de façon ligand-dépendant (Shukla *et al.*, 2008). Ainsi, dépendamment de la nature du ligand, ce dernier stabilisera une conformation distincte et active au sein du récepteur. Ce changement de conformation pourra permettre le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, et ce, via les protéines G hétérotrimériques ou non. Par la suite, selon la conformation de la  $\beta$ -arrestine, celle-ci mènera à l'activation d'une voie distincte de signalisation (Shukla *et al.*, 2008).

Il est intéressant de mentionner qu'il existe deux isoformes de la  $\beta$ -arrestine soit la  $\beta$ -arrestine 1 et la  $\beta$ -arrestine 2. Ces deux isoformes possèdent 78% d'identité de séquences et les différences apparaissent dans leur partie C-terminale (De Lean *et al.*, 1980). Toutefois, des études démontrent que l'ablation d'une de ces deux isoformes dans des modèles murins n'affecte pas la viabilité. En revanche, la suppression des deux isoformes est létal (DeWire *et al.*, 2007). Ainsi, ces données suggèrent que les fonctions des deux isoformes de  $\beta$ -arrestine se complètent. En effet, la  $\beta$ -arrestine 1 et la  $\beta$ -arrestine 2 sont tous les deux capables d'induire l'internalisation du récepteur. Cependant, une isoforme est spécifique à une voie de signalisation, telle que la  $\beta$ -

arrestine 2 et non pas la  $\beta$ -arrestine 1 est essentielle pour l'internalisation du récepteur du  $\beta$ 2-adrénérique (DeWire *et al.*, 2007).

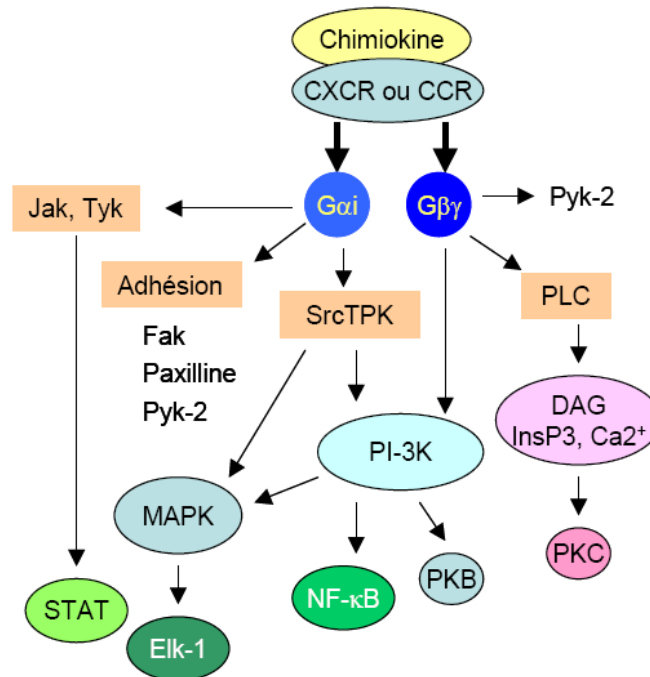
#### **1.4. Les chimiokines**

Les chimiokines ont tout d'abord été associées à la réponse inflammatoire étant donné leur rôle dans le contrôle migratoire des leucocytes dans les années 80 (Proudfoot *et al.*, 2010). Il y a une quinzaine d'années, des récepteurs de chimiokines ont été identifiés comme jouant un rôle de co-récepteur d'entrée du VIH dans les cellules cibles, soit les récepteurs CCR5 et CXCR4 (Proudfoot *et al.*, 2010). Les chimiokines sont de petites protéines basiques constituées de 70 à 130 acides aminés (Murphy *et al.*, 2000). Elles se lient à des 7TMR's spécifiques présents à la membrane plasmique des cellules cibles et représentent un régulateur principal de la migration et de l'adhésion cellulaire (Zlotnik and Yoshie, 2000). De plus, certaines chimiokines sont impliquées au niveau de la survie et de la croissance cellulaire (Horuk, 2001). Ces rôles fonctionnels font des récepteurs de chimiokine d'intéressantes cibles thérapeutiques (Proudfoot *et al.*, 2010). Le maraviroc (2007) et le mozobil (2009) sont les deux premiers agents thérapeutiques approuvés par la FDA (*Food and drug administration*) développés pour cibler les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4, respectivement. Quinze années se sont écoulées entre l'identification de CCR5 et CXCR4 et la commercialisation de maraviroc (ayant pour cible, CCR5) et de mozobile (ayant pour cible, CXCR4) (Proudfoot *et al.*, 2010). Or, les problèmes liés au développement de nouvelles molécules thérapeutiques ayant pour cible les chimiokines sont dus à la «présumée» redondance des chimiokines les unes par rapport aux autres (Proudfoot *et al.*, 2010). Effectivement, une chimiokine peut lier plus qu'un récepteur, et un récepteur peut lier plus qu'une seule chimiokine ce qui définit le concept de promiscuité entre les chimiokines (Murphy *et al.*, 2000). D'ailleurs, les diverses chimiokines qui lient un même récepteur peuvent agir soit comme agoniste ou soit comme antagoniste. Ainsi, la liaison de différents ligands à



un même récepteur peut entraîner l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire (Murphy *et al.*, 2000).

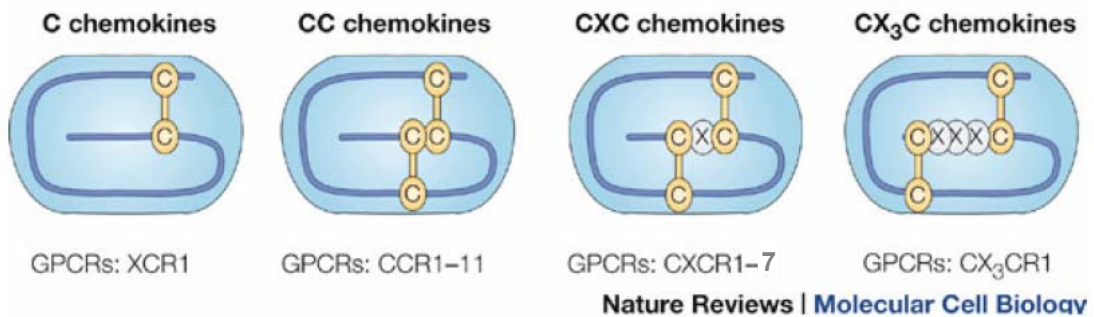
Les chimiokines peuvent être divisées en deux groupes selon leurs fonctions. Le premier groupe rassemble les chimiokines qui sont impliquées dans le développement et la domiciliation des cellules souches en plus d'être constitutivement exprimées. Elles ont donc des rôles d'homéostasie, en absence de pathologie. Le deuxième groupe réunit les cytokines pro-inflammatoires associées à la réponse inflammatoire et leur expression doit être induite (Proudfoot *et al.*, 2010). Anciennement, les ligands et les récepteurs de chimiokines requérant une induction pour leur expression étaient considérés pour être seulement impliqués dans les maladies inflammatoires. Toutefois, par la suite, il a été montré qu'un nombre important de chimiokines constitutivement exprimées ont été caractérisées comme jouant un rôle dans l'inflammation telle que CXCL12, CXCL13, MCP-1 (Proudfoot *et al.*, 2010).



**Figure 1.4 : Représentation schématique de voies de signalisation activées par les récepteurs de chimiokines.** Figure modifiée et tirée de (Thelen, 2001).

## 1.5. Les récepteurs de chimiokines

Les récepteurs de chimiokines font partie de la classe A des 7TMR's. Jusqu'à maintenant, environ 19 récepteurs de chimiokines ont été identifiés en plus de 40 différentes chimiokines (Murphy *et al.*, 2000) (Proudfoot *et al.*, 2010). Ces récepteurs sont classés selon la ou les chimiokines qu'ils lient et selon la position des résidus cystéines conservées au niveau de leur partie N-terminale. Or, il existe quatre familles de récepteurs de chimiokines soient les CXCR, les CCR, les XCR et les CX<sub>3</sub>CR où la lettre R, C et X désigne récepteur, cystéine et acide aminé respectivement. Ces récepteurs possèdent plusieurs caractéristiques communes en plus d'avoir approximativement entre 25 à 80% d'identité de séquences (Murphy *et al.*, 2000). Effectivement, les récepteurs de chimiokine disposent d'une partie N-terminale acide, d'une courte troisième boucle intracellulaire basique, d'un motif DRYLAI hautement conservé dans la deuxième boucle intracellulaire, d'un résidu cystéine dans chacune des 4 boucles extracellulaires servant à former des ponts disulfure dans le but d'assurer un bon repliement de la protéine en plus d'assurer une meilleure interaction avec le ligand (Van Coillie *et al.*, 1999) (Thelen and Thelen, 2008).



**Figure 1.5 : Représentation schématique de la classification des chimiokines et de leurs récepteurs.** Figure modifiée et tirée (Sodhi *et al.*, 2004).

### 1.5.1. Récepteur de chimiokine, CXCR4

#### 1.5.1.2 Historique et expression

Le récepteur de chimiokine CXCR4 (initialement aussi nommé «*fusin*») a été le premier récepteur de chimiokine à être identifié comme co-récepteur d'entrée du VIH. Ce polypeptide est composé de 352 acides aminés et le gène codant pour CXCR4 est situé au niveau du chromosome 2 en position pter-qter (Murphy *et al.*, 2000). CXCR4 est exprimé de façon ubiquitaire à la fois sur les cellules hématopoïétiques et non- hématopoïétiques. En effet, ce récepteur est exprimé à la surface de la majorité des cellules hématopoïétiques incluant les lymphocytes T, les cellules B et leurs précurseurs, les monocytes, les neutrophiles, les cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> dérivées du sang et de la moelle osseuse (Murphy *et al.*, 2000). Il est également présent à la surface des cellules dendritiques dérivées du sang, des cellules de Langerhans, des cellules T matures ou non du thymus. En plus, CXCR4 est exprimé à la surface des cellules endothéliales vasculaires, des neurones du système nerveux central et périphérique, des microglies et des astrocytes (Murphy *et al.*, 2000).

La chimiokine SDF-1/CXCL12 est le seul ligand endogène et agoniste pour CXCR4 (Murphy *et al.*, 2000). Avant la découverte du récepteur de chimiokine CXCR7, l'interaction de SDF-1 avec CXCR4 était considérée comme exclusive (Bleul *et al.*, 1996a) (Murphy *et al.*, 2000). Anciennement, la chimiokine SDF-1 a été isolée à partir de cellules stromales de moelle osseuse de souris d'où son nom SDF-1 pour «stromal-cell derived factor-1» (Murphy *et al.*, 2000). Le gène codant pour cette chimiokine est situé sur le chromosome 10 (Shirozu *et al.*, 1995). SDF-1 possède deux isoformes résultant d'un épissage alternatif, soit l'isoforme  $\alpha$  et l'isoforme  $\beta$ . La présence de quatre acides aminés au niveau de la partie C-terminale de SDF-1 $\beta$  différencie entre eux les deux variantes (Murphy *et al.*, 2000). La chimiokine SDF-1

est la plus ancienne sur le plan évolutif. En effet, les deux homologues de SDF-1 ainsi que CXCR4 sont présents chez des animaux tellement anciens qu'ils ne possèdent pas de système immunitaire (Miller *et al.*, 2008). SDF-1 est exprimée dans plusieurs tissus; cerveau, cœur, rein, poumon, foie et moelle osseuse. SDF-1 est un chimioattractant pour la quasi-totalité des types cellulaires motiles exprimant CXCR4 : les monocytes, pour la domiciliation et l'activation des lymphocytes T, des cellules pré-B, des cellules dendritiques, des cellules hématopoïétiques et de leurs précurseurs, des cellules endothéliales, des astrocytes (Bleul *et al.*, 1996b). L'expression de la chimiokine SDF-1 est constitutive. Son expression peut toutefois être induit par des agents causant des dommages à l'ADN tels le manque d'oxygène (hypoxie), les irradiations et les agents chimiothérapeutiques comme la cyclophosphamide utilisée pour le traitement de divers cancers et de maladies auto-immunes (Ponomaryov *et al.*, 2000).

#### 1.5.1.2. Rôles du récepteur CXCR4

Les souris n'exprimant pas de CXCR4 ou SDF-1 possèdent le même phénotype ce qui suggère l'exclusivité de la chimiokine pour son récepteur (Miller *et al.*, 2008). Ainsi, les souris n'exprimant pas CXCR4 ou SDF-1 meurent *in utero* ou autour de la naissance dues à un cerveau sous-développé, une malformation de la valve cardiaque ainsi qu'un mauvais fonctionnement du septum ventriculaire (Murphy *et al.*, 2000). En effet, SDF-1 et CXCR4 sont les deux chimiokines les plus exprimées durant le développement embryonnaire. L'interaction de la chimiokine SDF-1 avec son récepteur CXCR4 régule plusieurs processus biologiques essentiels comprenant le développement du cœur, des neurones, la mobilisation des cellules souches, la néovascularisation et la tumorigénèse (Vandercappellen *et al.*, 2008). En absence de pathologie, ces partenaires d'interactions assurent une homéostasie. L'axe SDF-1/CXCR4 joue un rôle important dans la dissémination des métastases (Miller *et al.*, 2008). La dissémination métastatique est un processus complexe qui comprend respectivement la transformation cellulaire, l'angiogénèse, l'invasion à travers la

matrice extracellulaire et la membrane vasculaire basale, l'entrée dans la circulation sanguine et éventuellement le développement de nouveaux sites métastatiques à des organes spécifiques (Vandercappellen *et al.*, 2008). Les foyers métastatiques exprimant CXCR4 sont préférentiellement répartis au niveau des tissus où l'expression de SDF-1 est élevée comme les poumons, le foie, la moelle osseuse et les ganglions. L'hypoxie est un régulateur du développement de tumeurs. En effet, lorsque la concentration d'oxygène diminue au sein de la tumeur, une métastase est favorisée puisque l'hypoxie induit l'expression de CXCR4 et de SDF-1 via HIF- $\alpha$  «*hypoxia inducible factor-1  $\alpha$* ». L'expression de SDF-1 va à son tour induire l'expression de métallo-protéases possédant une activité protéolytique et jouant un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale lors de l'invasion de la tumeur. Ainsi, le couple SDF-1/CXCR4 représente une cible thérapeutique potentielle comme traitement anti-cancer au niveau de leur capacité à attirer les cellules cancéreuses exprimant CXCR4 vers un organe spécifique exprimant son ligand endogène SDF-1 (Vandercappellen *et al.*, 2008).

#### 1.5.1.3. Signalisation du récepteur CXCR4

La stimulation de CXCR4 par la chimiokine SDF-1 permet d'activer diverses signalisations intracellulaires en fonction du type cellulaire. Comme pour la plupart des récepteurs de chimiokine, la forme active de CXCR4 induit son interaction avec les protéines G hétérotrimériques classiques soit la sous-unité G $\alpha_i$ , impliquée dans l'inhibition de l'adénylate cyclase et G $\alpha_q$  qui induit la mobilisation de calcium (Murphy *et al.*, 2000). Busillo *et al.* montre que CXCR4 est sensible à la toxine pertussis (PTX). La PTX catalyse l'ADP-ribosylation au niveau d'une cystéine située près de la partie C-terminale du récepteur et prévient l'activation de la protéine G, plus précisément la G $\alpha_i$  (Busillo *et al.*). Dans cet article, les auteurs montrent que le prétraitement à la PTX prévient l'activation de la protéine G nécessaire à la phosphorylation de sérines en partie C-terminale du récepteur (Busillo *et al.*, 2010). CXCR4, suite à son interaction avec SDF-1, induit le déplacement orienté des

cellules dans l'organisme, la chimiotaxie (Murphy *et al.*, 2000). Le récepteur de chimiokine CXCR4 induit aussi l'activation de la PI3-kinase qui est importante lors de la chimiotaxie. Notamment la PI3-kinase permet la contractilité de la myosine au «*trailing end*» de la cellule (Wang *et al.*, 2000). De plus, la liaison de SDF-1 à CXCR4 induit son interaction avec différentes GRK «G-protein coupled receptor» soit GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6. Par la suite, les auteurs montrent que GRK3 et GRK6 phosphoryle le récepteur ce qui induit le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR4. Enfin, ils montrent que l'interaction de la GRK3 et la GRK6 avec la  $\beta$ -arrestine est nécessaire pour activer ERK1/2 (Busillo *et al.*, 2010). Par ailleurs, pour CXCR4 la signalisation par la voie  $\beta$ -arrestine semble requise pour la migration cellulaire (Sun *et al.*, 2002).

## 1.5.2. Récepteur de chimiokine, CXCR7

### 1.5.2.1 Historique

L'interaction de la chimiokine SDF-1/CXCL12 avec le récepteur CXCR4 a été pendant longtemps considérée comme étant exclusive. Toutefois, il a été montré que SDF-1 lie aussi, et ce avec une plus forte affinité, le récepteur RDC1, récemment renommé CXCR7 (Burns *et al.*, 2006) (Balabanian *et al.*, 2005). Avant la découverte de son interaction avec SDF-1, RDC1 était considéré comme un récepteur orphelin, sans ligand connu. La chimiokine CXCL11 (ITAC, Interferon  $\gamma$ -inducible T-cells alpha chemoattractant) a également été identifiée comme liant le récepteur CXCR7/RDC1 (Burns *et al.*, 2006) (Zabel *et al.*, 2009).

À l'origine, le gène codant à CXCR7/RDC1 a été cloné à partir d'une banque d'ADN complémentaire de thyroïde de chien d'où son nom RDC1 «*Receptor Dog cDNA 1*». (Libert *et al.*, 1989). À ce moment, RDC1 était considéré comme un récepteur potentiel pour l'hormone VIP, «*vasoactive intestinal peptide*» et pour l'adrénoméduline, une hormone ayant des propriétés vasodilatatrices au niveau des

cellules de myocytes du cœur (Libert *et al.*, 1991) (Autelitano, 1998). Cependant, ces hypothèses furent questionnées et rejetées quelques années plus tard (Cueille *et al.*, 2002) (Thelen and Thelen, 2008). Or, étant donné la similarité (43%) et l'identité (32%) de séquences de RDC1 avec CXCR2, un lien entre RDC1 et les récepteurs de chimiokines a été proposé. Chez la souris, le gène codant pour RDC1 a été localisé au niveau du chromosome 1 soit à proximité des gènes codant pour CXCR1, CXCR2 et CXCR4 (Moepps *et al.*, 2006). Chez l'humain, l'organisation génomique diffère et le gène codant pour RDC1 se trouve à la position 2q37.3 du chromosome 2 (Libert *et al.*, 1991) (Fredriksson *et al.*, 2003).

D'un point de vue évolutif, RDC1/CXCR7 est hautement conservé à travers les mammifères; l'humain, le chien, la souris et le rat. En plus, des homologues de RDC1/CXCR7 ont été identifiés chez les vertébrés tels la grenouille et le poisson zébré, mais pas chez la drosophile. Des études phylogénétiques supportent le fait que CXCR7 est un 7TM appartenant à la sous-famille des récepteurs de chimiokine. En effet, la plupart des récepteurs de chimiokines possèdent un motif DRYLAIV hautement conservé en partie N-terminale de la deuxième boucle intracellulaire du récepteur. Ce motif est requis, mais insuffisant pour le couplage et l'interaction de la sous-unité G $\alpha$ i de la protéine G hétérotrimérique. Pour sa part, la séquence de ce motif dans CXCR7/RDC1 est altérée aux positions 5 (A/S) et 7 (V/T) (Thelen and Thelen, 2008).

#### 1.5.2.2. Expression

CXCR7 est un récepteur exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. CXCR7 se trouve exprimé en surface des neutrophiles, des monocytes, des lymphocytes B et T ainsi que leurs précurseurs (Balabanian *et al.*, 2005) (Infantino *et al.*, 2006) (Sierro *et al.*, 2007). Il est aussi présent à la surface des cellules endothéliales et au niveau du système nerveux central (Levoye *et al.*, 2009). CXCR7 se trouve également exprimé au niveau des cellules

endothéliales tôt dans le développement embryonnaires (Burns *et al.*, 2006). Le niveau d'ARNm ainsi que l'expression en surface de CXCR7 sont surtout élevés sur les monocytes et les cellules pré-B. En effet, l'expression de CXCR7 est hautement régulée au cours du développement et de la différenciation des cellules pré-B. Par exemple, dans les cellules B mémoires dérivées du sang, l'expression de CXCR7 corrèle avec la capacité de la cellule à se différencier en cellules plasmatisques. Cela suggère que CXCR7 est un marqueur des cellules B mémoires qui sont aptes à devenir des cellules sécrétrices d'anticorps (Infantino *et al.*, 2006).

De plus, l'expression de CXCR7 à la surface des lymphocytes B matures est inversement proportionnelle à l'activité de CXCR4 (Thelen and Thelen, 2008). L'expression de CXCR7 est plutôt faible au niveau des cellules dendritiques immatures dérivées du sang, mais se trouve rapidement augmentée au niveau des dernières étapes de maturation (Infantino *et al.*, 2006). Un autre groupe de recherche montre que CXCR7 est aussi présent à la surface de cellules cancéreuses de seins, de prostate, de poumon et qu'il occuperait un rôle central dans la tumorigenèse (Burns *et al.*, 2006) (Miao *et al.*, 2007) (Wang *et al.*, 2008).

### 1.5.2.3. Rôles du récepteur CXCR7

Tout comme pour CXCR4, l'absence de l'expression de CXCR7 cause une malformation de la valve cardiaque ainsi qu'un mauvais fonctionnement du septum ventriculaire provoquant la mort périnatale (Sierro *et al.*, 2007) (Thelen and Thelen, 2008). Ainsi, CXCR7 joue un rôle dans le développement du système cardiovasculaire que ce soit au niveau de la formation des différents compartiments du cœur ou au niveau de sa vascularisation (Thelen and Thelen, 2008).

L'équipe de recherche du Dr. Schall a montré que l'élimination complète du gène codant pour le récepteur CXCR7 au niveau des cellules cancéreuses de sein et de prostate diminue la progression de la prolifération de la tumeur (Miao *et al.*, 2007)



(Wang *et al.*, 2008). Tel que mentionné précédemment, CXCR7 se trouve exprimé à la surface cellulaire, et ce, à différentes étapes du processus d'hématopoïèse. Bien qu'il n'ait pas beaucoup de données sur ce sujet et que les connaissances sont fragmentaires, Maskyn *et al.* montrent que l'élimination du gène codant pour le récepteur CXCR7 occasionne des défauts au niveau du processus d'hématopoïèse ainsi que dans le processus de vascularisation (Maksym *et al.*, 2009). Cependant, Hartmann *et al.* montrent que l'absence de CXCR7 n'a pas d'effet sur le processus d'hématopoïèse ou de différenciation des précurseurs des cellules hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (Hartmann *et al.*, 2008).

Certaines équipes de recherche caractérisent CXCR7 comme un récepteur n'ayant aucun effet biologique spécifique à lui-même, un récepteur «*decoy*». Cependant, cette hypothèse reste très controversée. Entre autre, une étude montre que CXCR7 est présent à la surface cellulaire afin de séquestrer et de concentrer la chimiokine SDF-1, notamment lors du développement embryonnaire, ce qui aura maintiendra un gradient assurera la directionnalité de la migration des cellules dans l'organisme. Or, au cours du développement embryonnaire, SDF-1 se trouve concentrée à des endroits précis ce qui crée un gradient de migration. Dès lors, les cellules précurseurs d'organes pourront se diriger vers leur organe cible. L'article de Boldajipour *et al.*, montre que durant l'embryogenèse, la présence de CXCR7 sur des cellules mésenchymateuses, tout au long du trajet des cellules migrantes, est requise pour assurer la directionnalité de la migration et la maintenance du gradient de SDF-1. Ainsi, les auteurs identifient CXCR7 comme un récepteur «*decoy*». (Boldajipour *et al.*, 2008)

La découverte de CXCR7 comme liant, lui aussi, le ligand naturel du récepteur de chimiokine CXCR4, SDF-1, mène à revoir les données antérieures et leurs interprétation concernant les effets biologiques de SDF-1, qui avaient été attribuées exclusivement à CXCR4 (Maksym *et al.*, 2009). En plus d'être possiblement impliqué dans le processus d'hématopoïèse, tel que discuté plus haut, le rôle du

récepteur CXCR7 a été montré pour être important dans la tumorigenèse. En effet, l'expression de CXCR7 résulte en une augmentation de la prolifération des cellules tumorales de fibroblastes (Raggio *et al.*, 2005). Dans cet article, les auteurs comparent CXCR7 à l'oncogène Ras. Quelques années plus tard, diverses équipes de recherche montrent que ce récepteur joue un rôle clé dans l'induction du développement et de la progression de la prolifération de la tumeur, et ce, indépendamment de la présence de CXCR4 (Maksym *et al.*, 2009). L'équipe de recherche du Dr. Schall a établi que CXCR7 induit la croissance des cellules dans le cancer du sein et du poumon. CXCR7 est également exprimé par une variété de cancers tels que du cerveau, du rein et de l'œsophage (Burns *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que CXCR7 se retrouvait exprimé au niveau de vaisseaux sanguins associés à la tumeur et non pas dans des vaisseaux sanguins normaux (Miao *et al.*, 2007). Ainsi, l'expression en surface cellulaire de CXCR7 est proportionnelle avec la prolifération et la vascularisation de la tumeur. Dans une étude plus récente, CXCR7 a été identifié comme étant fortement exprimé à la surface des cellules humaines de cancer de la prostate (Wang *et al.*, 2008). Dans ces cellules, CXCR7 a été montré pour réguler la prolifération cellulaire de sorte qu'il promeut la survie et l'adhésion cellulaire, la chimiotaxie en plus d'induire l'expression de facteurs pro-angiogéniques tel que l'interleukine-8 (Maksym *et al.*, 2009).

Les stratégies thérapeutiques potentielles visant le récepteur de chimiokine, CXCR7, représente une opportunité unique afin de promouvoir le traitement du cancer tel que le cancer du sein et du poumon (Miao *et al.*, 2007). Dans cet article, les auteurs montrent que CXCR7, à lui seul, induit le développement et la croissance des tumeurs de cancer de sein et de poumon, et ce, sans la présence d'expression en surface cellulaire de CXCR4. D'ailleurs, l'abolition de l'expression de CXCR7 par siRNA résulte en des tumeurs de tailles significativement réduites. Toutefois, les mécanismes fonctionnels par lequel CXCR7 promeut la croissance cellulaire des tumeurs de seins et de poumon sont encore inconnus. Aussi, le rôle de CXCR7 au niveau de la domiciliation, de la mobilisation, de la prolifération et de la survie

cellulaire des cellules souches hématopoïétiques restent à être clarifiés (Maksym *et al.*, 2009). Les molécules synthétiques ciblant CXCR7 développées par la compagnie *Chemocentryx* sont des agonistes sur CXCR7 qui induisent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7. Dans ce contexte, ces molécules réduisent la taille des tumeurs de différents cancers tels que le lymphome humain de type B, cancer humain et murin du poumon et induisent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7. (Zabel *et al.*, 2009) Ainsi, cela pourrait suggérer que l'activation de CXCR7 par le recrutement de la  $\beta$ -arrestine aurait des effets bénéfiques dans le traitement des différents cancers énumérés ci-haut.

Pour terminer, tout comme pour le récepteur de chimiokine CXCR4, CXCR7 a été identifié comme corécepteur d'entrée pour certaines souches du virus d'immunodéficience humaine (Shimizu *et al.*, 2000) (Raggio *et al.*, 2005).

#### 1.5.2.4. Signalisation du récepteur CXCR7

CXCR7 est un récepteur de chimiokine qui ne signale pas de la façon attendu. Contrairement au récepteur de chimiokine CXCR4, CXCR7 n'a pas été montré pour activer les protéines G hétérotrimériques classiques et ni à induire la chimiotaxie. Toutefois, le rôle de CXCR7 dans le processus de la chimiotaxie est plutôt controversé parmi les équipes de recherche. L'équipe de recherche du Dr. Bachelier (Balabanian *et al.*, 2005) et du Dr. Ratajczak (Grymula *et al.*) montrent que CXCR7 n'induit pas la chimiotaxie alors l'équipe de recherche du Dr. Schall démontrent le contraire (Burns *et al.*, 2006).

La stimulation de CXCR7 par la chimiokine SDF-1 a été montrée pour induire le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Ce patron de signalisation a été décrit, pour la toute première fois, par notre équipe de recherche en mars 2009 (pour les signaux dépendants de la  $\beta$ -arrestine voir aussi ci-dessous) (Kalatskaya *et al.*, 2009). CXCR7 a été montré de ne pas induire l'inhibition de l'AMPcyclique. La voie de

l'activation de la sous-unité protéique G $\alpha$ i est caractérisée par l'inhibition de la production d'AMPcyclique (Burns *et al.*, 2006). Or, une étude récente a montré que CXCR7 interagit de façon constitutive avec la sous-unité G $\alpha$ i sans toutefois engendrer son activation (Levoye *et al.*, 2009). En revanche, le motif hautement conservé d'interaction sur les 7TMR's connu pour interagir avec la protéine G hétérotrimérique, le motif DRYLAIV, se trouve altéré pour le récepteur de chimiokine CXCR7 ce qui pourrait expliquer la nature de son interaction avec la sous-unité G $\alpha$ i (Berchiche *et al.*, 2007) (Thelen and Thelen, 2008). De plus, l'activation de CXCR7 ne mène pas à l'activation du flux calcique qui passe majoritairement par l'interaction et l'activation de la protéine G $\alpha$ q via les 7TMR's (Burns *et al.*, 2006). Différents groupes de recherche ont montré que le récepteur CXCR7 était sensible à la toxine pertussis (PTX). La PTX prévient l'interaction de la sous-unité protéique G $\alpha$ i avec les 7TMR's. Cependant, les expériences sont peu concluantes et l'hypothèse que CXCR7 serait sensible ou non à la PTX demande à être clarifié davantage. Notamment, sachant que SDF-1 est capable de lier à la fois CXCR4 et CXCR7 et que la chimiokine, ITAC lie CXCR7, Grymula *et al.* ont observé que suite à un prétraitement avec la PTX, la chimiotaxie ainsi que la phosphorylation des MAPK 42/44 induits par SDF-1 et ITAC étaient altérés voir absentes. Cependant, les auteurs omettent de tenir en compte que ITAC peut aussi lier le récepteur de chimiokine CXCR3 ce qui pourrait expliquer sa sensibilité envers la PTX (Grymula *et al.*, 2010). Toutefois, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine pourrait aussi se faire indépendamment de l'interaction du récepteur avec la protéine G hétérotrimérique et, à son tour, induire des cascades signalétiques menant à l'activation des MapKinase telles que les MAPK 42/44 (Wei *et al.*, 2003) (Rajagopal *et al.*, 2010). Notamment, Rajagopal *et al.* montrent que l'activation des MAPK 42/44 via CXCR7 est uniquement médiée par le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, et non par son interaction avec les protéines G hétérotrimériques (Rajagopal *et al.*, 2010). Ces résultats mettent en doute les conclusions tirées par Grymula *et al.*

Aussi, CXCR7 peut hétérodimériser avec le récepteur de chimiokine CXCR4 et, ainsi, affaiblir la signalisation des protéines G médiée par CXCR4 (Levoye *et al.*, 2009). La modulation des diverses fonctions du récepteur de chimiokine CXCR4 a été suggéré comme un des principaux rôles de CXCR7 (Thelen and Thelen, 2008). Or, plusieurs groupes de recherche considère CXCR7 comme un récepteur «*decoy*», c'est-à-dire sans signalisation propre et qu'il est fonctionnel seulement lorsqu'il dimérise avec un autre récepteur de chimiokine (Haraldsen and Rot, 2006) (Thelen and Thelen, 2008). Des auteurs supportent l'hypothèse que le récepteur de chimiokine, CXCR7 agit comme «*decoy*», sans aucun effet biologique. Ils observent que CXCR7 joue le rôle d'adaptateur pour un groupe de molécules impliquées dans l'activation rapide des intégrines médiée par l'axe SDF-1/CXCR4. Dans leur modèle, CXCR7 se trouve plutôt emmagasiné dans des vésicules d'endosomes précoces situées sous la membrane basale et qu'il y a un recyclage constant de CXCR7 entre cette membrane et les vésicules d'endosomes. Ainsi, ceci assure un pool cytoplasmique de CXCR7 dans le but de provoquer une activation des intégrines sur une longue période de temps (Thelen and Thelen, 2008) (Hartmann *et al.*, 2008).

## **1.6. Inhibiteurs synthétiques de CXCR4**

### **1.6.1. AMD3100/Mozobile/Plerixafor**

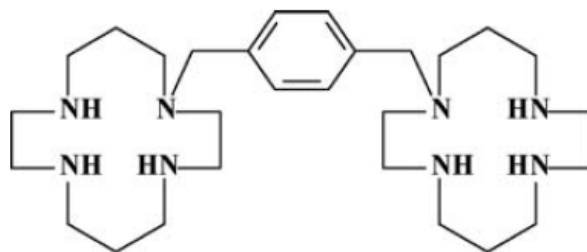
AMD3100 se lie à CXCR4 et bloque la signalisation de son ligand endogène, SDF-1. De plus, l'AMD3100 n'est pas toxique et présente un index de sélectivité très élevé envers sa cible (De Clercq, 2009). L'AMD3100 est une molécule synthétique appartenant à la famille des bicyclams. Antérieurement, cette molécule portait le nom JM3100 pour Johnson Matthey, une compagnie chimique. Par la suite, la molécule fut achetée par une autre compagnie, AnorMED d'où le nom de la molécule, AMD3100 (De Clercq, 2009). L'identification de l'AMD3100 comme agent anti-rétroviral a été établi tout à fait par hasard. AMD3100 a été, par la suite, développé pour inhiber le VIH de type 1 et 2 (De Clercq *et al.*, 1992). Cette molécule avait pour

cible une fonction exercée par la protéine de l'enveloppe virale, Gp120. Cependant, cette découverte précédait la découverte que le récepteur de chimiokine CXCR4 jouait le rôle de co-récepteur d'entrée du VIH dans les cellules cibles. Il a donc fallu attendre plusieurs années avant d'identifier CXCR4 comme la cible de AMD3100 (De Vreese *et al.*, 1997) (Schols *et al.*, 1997).

Étant donné, son potentiel anti-VIH, AMD3100 est passé en phase d'évaluation pré-clinique comme candidat au traitement de l'infection. De façon inattendue, les patients sains ayant reçu une injection intraveineuse d'AMD3100 présentait un taux anormalement élevé de globules blancs dans le sang, 6 à 9 heures suivant l'injection. (Liles *et al.*, 2003) Aujourd'hui, nous savons que l'interaction de SDF-1 à CXCR4 joue un rôle crucial dans la domiciliation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Miller *et al.*, 2008). L'interaction de SDF-1 avec son récepteur, CXCR4, retient les cellules souches hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse et assure la présence d'un pool de cellules souches nécessaire pour une hématopoïèse efficace (De Clercq, 2009). L'AMD3100 a pour effet d'empêcher l'effet de SDF-1 sur CXCR4. Par la suite, AMD3100 a alors été développé pour une autre indication thérapeutique. En combinaison avec le G-CSF (granulocyte-colony stimulant factor), AMD3100 et G-CSF agissent en synergie pour rapidement relâcher et mobiliser les cellules souches de la moelle osseuse dans la circulation sanguine (Liles *et al.*, 2005). En 2009, l'AMD3100 (Mozobil) a été approuvé par la FDA (*food and drug administration*) et est commercialisé pour mobiliser les cellules souches de la moelle osseuse dans le sang périphérique. Ainsi, le mozobil est administré à des donneurs, lors de transplantation de la moelle osseuse, pour des patients atteints de maladies du sang tel que le myélome multiple. Le Mozobil en combinaison avec le G-CSF est administré aux donneurs et les cellules souches sont recueillies par cytophérèse (De Clercq, 2009).

De plus, le Mozobil est présentement en phase pré-clinique pour augmenter l'efficacité de la chimiothérapie pour des patients atteints de leucémie

lymphoblastique aiguë ou de leucémie myéloblastique aiguë (De Clercq, 2009). Suite au traitement de chimiothérapie lors d'un cancer de cellules souches, les cellules souches cancéreuses peuvent se loger dans la moelle osseuse et elles deviennent, par leurs interactions avec les cellules stromales de cette niche tissulaire, chimio-résistantes (De Clercq, 2009). Ainsi, l'administration de Mozobil aura pour effet de relâcher les cellules souches cancéreuses de la moelle osseuse dans la circulation sanguine. Les cellules souches cancéreuses se retrouvant maintenant dans le sang seront beaucoup plus accessibles et sensibles aux différents agents chimiothérapeutiques, selon cette stratégie (De Clercq, 2009).



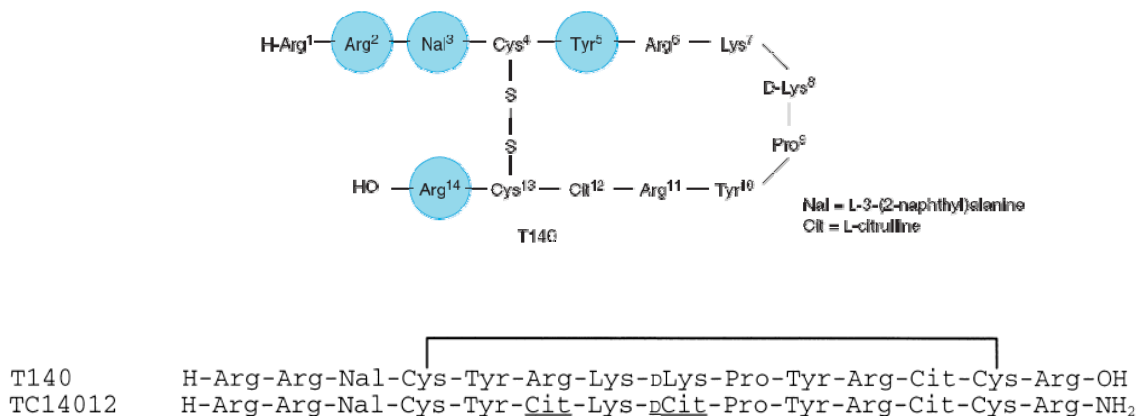
**Figure 1.6 : Représentation schématique de la structure chimique de la molécule AMD3100** tiré de De Clercq *et al.* (De Clercq, 2009)

### 1.6.2. TC14012

Le T140 a été développé comme inhibiteur spécifique de CXCR4, comme agent anti-rétroviral (Tamamura *et al.*, 1998). Le T140 est un peptide de 14 acides aminés contenant un pont disulfure, une désoxy-lysine en position (i+1) et un feuillet anti-parallèle de type  $\beta$  (Tamamura *et al.*, 2001). Ce peptide dérive de peptides d'auto-défense, nommés polyphémusines, de la limule, « *horseshoe crab* » (Tamamura *et al.*, 1998). Le T140 a été montré pour son activité anti-VIH et pour être l'antagoniste le plus puissant pour contrer l'entrée du VIH de type 1 de souche X4-tropique, et ce, parmi tous les antagonistes développés contre CXCR4 jusqu'à présent. Ce peptide amphiphile contient des résidus basiques et hydrophobiques lui conférant 7 charges

positives. Les charges électrostatiques et les interactions hydrophobiques de ce type de peptide avec la membrane basale seraient reliées à la cytotoxicité. En effet, lors de l'investigation sur le T140, les charges nettes positives présentes sur sa structure montrent une corrélation avec l'activité antirétrovirale et la cytotoxicité. Ainsi, la réduction des charges positives résulterait en une diminution de la cytotoxicité. De plus, le T140 a été observé pour être instable dans le sérum de bovin. La substitution des résidus basiques arginine et lysine par un acide aminé polaire, la citrulline, a été nécessaire pour développer de nouveaux analogues du T140 possédant une forte activité anti-VIH, mais une faible cytotoxicité. Tc14012 est un analogue du T140 possédant une citrulline et une désoxy-citrulline à l'endroit de l'arginine et de la désoxy-lysine respectivement, ce qui a pour effet de réduire la charge nette positive de la structure du peptide comparativement à celle du T140. De plus, le Tc14012 possède une extrémité C-terminal amidée lui attribuant une stabilité dans le sérum. (Tamamura *et al.*, 2001) Effectivement, des analogues du T140 stables dans le sérum présentent un intérêt clinique pour le traitement du cancer, la leucémie et l'arthrite rhumatoïde (Tamamura and Fujii, 2005). Notamment, les auteurs ont montré les propriétés anti-métastatiques d'un analogue stable dans le sérum du T140, le 4F-benzoyl-TN14003. À l'aide d'essais de migration cellulaire dans des chambres de migration, les auteurs montrent que SDF-1 double la migration des cellules cancéreuses de sein, MDA-MB-231. En revanche, le 4F-benzoyl-TN14003 inhibe jusqu'à 80% la migration de ces cellules induites par SDF-1. Aussi, les auteurs obtiennent le même effet avec la lignée cellulaire Sup-T1, des cellules leucémiques (Tamamura and Fujii, 2005).





**Figure 1.7 : Représentation schématique de la séquence des acides aminés du T140 et de son analogue, le Tc14012.** Un pont disulfure est montré par une ligne noire reliant les deux cystéines. Les acides aminés substitués sont sous-lignés. Nal= L-3-(2-naphtyl)alanine, Cit = L-citrulline. (Tamamura *et al.*, 2001) (Tamamura and Fujii, 2005)

### 1.7. Molécules synthétiques ciblant CXCR7

L'équipe de recherche du Dr. Schall a identifié une molécule, parmi une centaine d'autres nouvellement synthétisées, qui inhibent la liaison du SDF-1 radioactif au récepteur de chimiokine CXCR7. Bien que l'information structurale soit inaccessible, cette molécule se nomme CCX451 et est considéré, par les auteurs, comme un antagoniste puisqu'elle inhibe l'interaction de liaison entre SDF-1 et CXCR7. Par la suite, un analogue de CCX451 a été créé, le CCX754.

Le CCX754 a des propriétés pharmaco-cinétiques supérieures à celles du CCX451. Entre autres, CCX754 se lie plus fortement à CXCR7 (5nM) et montre une grande sélectivité à CXCR7 comparativement aux autres CXCRs (Burns *et al.*, 2006). L'efficacité de CCX754 a aussi été évaluée *in vivo* chez des souris SCID (*severe combined immunodeficiency*) où il y a eu inoculation de différents cancers; lymphome humain de type B, cancer humain et murin du poumon. Les auteurs ont

montré que chacune de ces tumeurs présentent une expression en surface du récepteur de chimiokine CXCR7. Ainsi, l'administration de CCX754 occasionne le développement de tumeurs de plus petites tailles suggérant un ralentissement de leur croissance. Cet effet sur la prolifération cellulaire a été également confirmé *in vitro* (Burns *et al.*, 2006). Une étude récente montre que CCX754 inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose des cellules T immortalisées du virus T-lymphotropique humain en interagissant avec le récepteur CXCR7 (Jin *et al.*, 2009). Dans le système nerveux central, SDF-1 et CXCR4 sont présents au niveau des cellules de Schwann et des astrocytes. L'axe SDF-1/CXCR4 est impliqué dans plusieurs pathologies du cerveau telles que les traumatismes crâniens et les infections chroniques du cerveau (Li and Ransohoff, 2008). Anciennement, CXCR4 avait été montré comme régulateur de la croissance, de la migration et de l'invasion des tumeurs lors du cancer des astrocytes, astrocytomes. Cependant, une étude récente montre que CXCR7 y est également exprimé, que seul CXCR7 médie la signalisation de SDF-1 au niveau des astrocytes, et que CCX754 abolie cette signalisation en inhibant la liaison de SDF-1 à CXCR7. (Odemis *et al.*) Toutefois, aucun de ces deux groupes de recherche n'étudient le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 suite à la liaison de CCX754. CCX754, en se liant à CXCR7 pourrait induire le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et provoquer l'activation de seconds messagers distincts (ou similaires) de ceux médiés par SDF-1.

Or, une nouvelle molécule de la série « CCX » ciblant sélectivement CXCR7, la molécule CCX771, induit le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 avec un EC50 de 2,8nM, comparativement à 52nM pour SDF-1 (Zabel *et al.*, 2009). Également, CCX771 inhibe plus fortement la migration transendothéliale des cellules empruntant l'axe SDF-1/CXCR4 que l'antagoniste du récepteur de chimiokine CXCR4, AMD3100 (Zabel *et al.*, 2009). Cette combinaison d'inhibition d'activité de CXCR7 et l'activation de la voie  $\beta$ -arrestine pourrait indiquer que ce serait plutôt l'activation de CXCR7 par les composés « CCX », et non pas leur inhibition de SDF-1, qui serait

responsable de leurs effets. Ils ne seraient donc non pas antagonistes, mais agonistes de CXCR7.

## 1.8. Projet de recherche

### 1.8.1. Problématique

Jusqu'à très récemment, la chimiokine SDF-1 fut considérée comme liant exclusivement CXCR4. Cependant, la découverte du récepteur CXCR7 comme liant, lui aussi, SDF-1, incite à revisiter les rôles de l'interaction CXCR4/SDF-1. Dans la littérature, tel que mentionné ci-haut, CXCR7 est souvent considéré comme un récepteur sans signalisation propre qui aurait pour seul rôle la modulation des concentrations de SDF-1 extracellulaires. Récemment, il a été rapporté que l'expression de CXCR7 inhiberait la signalisation de CXCR4 (Levoye *et al.*, 2009) (Zabel *et al.*, 2009). Notre groupe de recherche a été le premier à identifier le recrutement de la  $\beta$ -arrestine comme signal induit par la liaison de SDF-1 à CXCR7, ce qui met en question l'hypothèse que CXCR7 serait un récepteur « silencieux ». Ainsi, la  $\beta$ -arrestine n'est pas seulement un facteur d'arrêt de signalisation, mais une protéine d'échafaudage qui induit des cascades de signalisation indépendantes de l'interaction des protéines G hétérotrimériques avec les 7TMR's. Kalatskaya *et al.* montrent que l'AMD3100, considéré auparavant comme sélectif pour CXCR4, peut aussi lier CXCR7. Toutefois, la liaison de l'AMD3100 à CXCR7 augmente la liaison de SDF-1 à CXCR7 ce qui le caractérise comme un modulateur allostérique positif. De plus, contrairement à CXCR4, nous avons observé qu'AMD3100, à lui seul, induit le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 (Kalatskaya *et al.*, 2009). À la lumière des résultats obtenus, il est impératif de revoir la sélectivité d'autres molécules thérapeutiques développées pour cibler le récepteur de chimiokine CXCR4, tels que le TC14012.

### 1.8.2 Buts et objectifs

Basé sur ces considérations, l'objectif général du projet de recherche est d'identifier si cet effet pourrait aussi être observé pour Tc14012. Ainsi, le **premier objectif** de ce présent travail est de vérifier si le Tc14012 interagit aussi avec le récepteur de chimiokine CXCR7. Le **deuxième objectif** consiste à déterminer si Tc14012 est capable d'induire le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7. Le **troisième objectif** consiste à identifier les bases moléculaires responsables de l'activité agoniste des inhibiteurs de CXCR4 sur CXCR7. Sachant que la  $\beta$ -arrestine est recrutée au niveau du C-terminal des 7TMR's, nous voulons comprendre si le recrutement différentiel de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 et à CXCR4 en présence des inhibiteurs de CXCR4 (AMD3100 et Tc14012) réside au niveau de la structure «core» des récepteurs ou plutôt au niveau de leur partie C-terminale (DeWire *et al.*, 2007). Cela impliquera la création de récepteurs mutants et chimériques de CXCR4 et CXCR7. Nos résultats contribueront à une meilleure compréhension sur le mécanisme d'action de CXCR7, ce qui sera essentiel pour le développement de molécules thérapeutiques sélectives pour chacun des deux récepteurs.

L'interaction du Tc14012 avec le récepteur de chimiokine CXCR7 sera déterminée par des essais de radio-liaison. Par la suite, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 sera suivi par la technique de transfert d'énergie de bioluminescence (BRET). Ensuite, la création et l'expression des chimères seront effectuées et vérifiées respectivement par mutagenèse dirigée et par cytométrie en flux. Pour terminer, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine aux différentes chimères sera également suivi par BRET.

## **2. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1. Techniques utilisés

#### Réactifs :

SDF-1 $\alpha$  provient de Peptide Canada, AMD3100 de Sigma Corp. (St-Louis, MO), <sup>125</sup>I-SDF-1 $\alpha$  de PerkinElmer. Le TC14012, un analogue stable dans le sérum du T140 a été synthétisé et nous a été donné par l'équipe du Dr. Fujii tel que décrit ultérieurement (Tamamura et al., 2001).

#### Mutagenèse dirigée :

Afin de générer les chimères C-terminales, il a fallu insérer un site de restriction unique BsiWI dans CXCR4-YFP (en position 916 de l'ADN complémentaire de CXCR4) et dans CXCR7-YFP (en position 955 de l'ADN complémentaire de CXCR7) en utilisant la méthode de «*QuickChange, multi site-directed mutagenesis Kit*» fait par la compagnie Stratagene (Stratagene, 200514). Cette stratégie a aussi été utilisée pour ramener les chimères C-terminales mutées à leur état sauvage. Pour retirer la partie C-terminale, les mutants BsiWI ont été digérés à l'aide des endonucléases de restrictions BsiWI et NotI (NEB R0553S et Invitrogen 15441-017 respectivement) Les fragments d'ADN ont été séparés sur gel d'électrophorèse et purifiés à l'aide du «*QIAquick Gel Extraction Kit*» (QIAGEN, 28704) Les vecteurs restants ont été déphosphorylés à l'aide de l'enzyme CIAP suivant les instructions du manufacturier. (Fermentas, EF0341) La ligation a été effectuée durant 24 heures à 16°C et l'ADN a été transformée dans des cellules compétentes DH5- $\alpha$ . (Invitrogen, 18265-017) Chacune des constructions d'ADN ont été vérifiées par séquençage à l'aide «*Applied Biosystems 3730xl DNA Analyser*» (Plate-forme Nanup de l'Université McGill et du centre de l'innovation Génome Québec, Montréal, Canada) Les oligonucléotides qui ont été utilisés pour la mutagenèse dirigée sont :

- CXCR4mut916BsiWI, catcctctatgctttctctgtagcgaatttaaacctctgccc
- CXCR7mut955BsiWI, ccctgtcctctacagcttcacgtacgcaactacaggtcagcagc

- CXCR4-X7Cter-WT, catcctctatgctttccttaatcgcaactacaggtacgagc
- CXCR7-X4Cter-WT, ccctgtcctctacagcttcacggagcacaatttaaaccctctgccc

La création des chimères a été effectuée par Camille Malouf dans le laboratoire du Dr. Daniel Sinnett .

### **Culture cellulaire et transfection :**

Les cellules HEK293E sont maintenues dans du milieu Dulbecco's «modified Eagle's» complété avec 10% de sérum de bovin fœtal en plus de 100 unités/mL de pénicilline et streptomycine. Le tout provient de Wisent. 24 heures avant la transfection, les cellules sont étalées à une densité de 1 million de cellules par puits d'une plaque 6 puits. Suivant l'incubation de 24 heures, le milieu dans lequel baignent les cellules a été remplacé par du milieu frais (voir ci-haut). Ensuite, les cellules sont transfectées de manière transitoire à l'aide de la méthode de poly-éthylèneimine. Normalement, 0,05 b-arrestine2-Luc est transfectée seule ou en présence de 1µg de récepteurs fusionnés à la eYFP, (*enhanced yellow fluorescent protein*). La quantité d'ADN transfectée par puits est complétée à 2µg avec le vecteur vide soit le PcDNA3. Le lendemain, le milieu est encore une fois remplacé par du milieu frais et les cellules sont transférées dans des plaques 96 puits, à fonds transparents, prétraitées à la poly-D-lysine. Les cellules doivent rester en culture pendant 24 heures avant d'être analysées en BRET. Les plaques 96 puits à fonds transparents et la poly-D-lysine proviennent respectivement de Perkin Elmer et Sigma.

### **Analyse de BRET :**

Tous les récepteurs et les récepteurs/chimères ont été clonés dans le vecteur PcDNA3.1. Chaque récepteur a été sous-cloné à la eYFP tel que décrit dans Berchiche et al., 2007, pour CXCR4-YFP et dans Kalatskaya et al., 2009, pour CXCR7-YFP. 48 heures post-transfection, le milieu de culture dans la plaque 96 puits est remplacé, à température pièce, par du PBS contenant 0,1% de sérum de bovin



d'albumine (sigma). Par la suite, une concentration finale de 5 $\mu$ M de h-coelenterazine, de «*nanolight technology*» est ajoutée et la lecture de luminescence et fluorescence peut se faire avec le lecteur de plaque de type LB940 Mithras (Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany) tel que décrit ultérieurement (Percherancier et al., 2005; Berchiche et al., 2007; Kalatskaya et al., 2009). Toutes les mesures de BRET ont été effectuées pendant que les cellules demeuraient attachées sur la surface de plastique au fond des puits. La fluorescence est mesurée à l'aide d'un filtre de 485nm tandis que l'émission est mesurée à l'aide d'un filtre de 535nm.

#### Recrutement de la $\beta$ -arrestine

Le recrutement de la  $\beta$ -arrestine a été mesuré par la technique de BRET comme décrit ultérieurement (Hamdan et al., 2005; Kalatskaya et al., 2009). Les cellules HEK293E sont transfectées de façon transitoire avec 1 $\mu$ g de récepteur-eYFP et 0,05  $\mu$ g b-arrestine2-RLuc (un cadeau de l'équipe de recherche du Dr. Michel Bouvier) pour être complétées à 2 $\mu$ g avec le vecteur vide (PcDNA3.1) et ce, pour chaque puits d'une plaque 6 puits. 48 heures post-transfection, suite au transfère des cellules en plaque 96 puits, les cellules sont stimulées par différents ligands et analysées en BRET. Le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 et à la chimère CXCR7-CtermX4 est très rapide et est mesuré après 5 minutes de stimulation à 37°C. Cependant, pour CXCR4 et la chimère CXCR4-CtermX7, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine est plus lent et la mesure de BRET est prise suite à 30 minutes de stimulation.

#### Courbe de saturation

Les cellules HEK293E sont transfectées de façon transitoire avec une quantité constante de  $\beta$ -arrestine2-RLuc (0,05 $\mu$ g) et une quantité croissante de récepteur-eYFP. Avant les mesures de BRET, les cellules ont été stimulées avec 100 nM SDF-1 pendant 5 (CXCR7) ou 30 (CXCR4) minutes. Le signal de BRET est déterminé en calculant le ratio d'émission du récepteur-eYFP sur la  $\beta$ -arrestine2-RLuc. Le signal est ramené en BRET net où le bruit de fond, correspondant à

l'expression de la  $\beta$ -arrestine2-RLuc seule, a été soustrait. Les courbes de saturation sont mises en graphique en fonction du BRET net sur le ratio (accepteur/donneur). L'expression relative de l'accepteur et du donneur d'énergie est mesurée à l'aide de la fluorescence et luminescence totale de chacun des partenaires d'interaction.

### Double-brillance

Les cellules HEK293 sont transfectées de façon transitoire avec le récepteur CXCR7 de type sauvage sans fluorophore (1,0) et avec la  $\beta$ -arrestine2 fusionné en N-terminale à la luciférase et en C-terminale à la eYFP (0,05). Les cellules co-exprimant les partenaires de BRET ont été stimulées avec des quantités croissantes de SDF-1 et ITAC (jusqu'à concurrence de 1 $\mu$ M) et ce, pendant 5 minutes à 37°C.

### **Essais de radio-liaison :**

Les cellules HEK293E sont étalées sur plaques 6 puits à une densité de 1 million de cellules/puits. 24 heures plus tard, les cellules sont transfectées avec les différents récepteurs-YFP à 2 $\mu$ g/puits. Le lendemain, les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X avant d'être centrifugées à 1500rpm pendant 15 minutes à 4°C dans du tampon de «binding» (50mM HEPES, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM MgCl<sub>2</sub> et 0,2% de sérum de bovin d'albumine). Les cellules sont resuspendues dans du tampon de «binding» et distribuées dans une plaque 96 puits à fond plats transparents. La compétition de radio-liaison a lieu à l'aide de 100pM de <sup>125</sup>I-SDF-1 (Perkin Elmer) en présence d'une concentration croissante de SDF-1 non-marqué. La compétition de radio-liaison a lieu à 4°C pendant 1 heure et 30 minutes. Le ligand radio-marqué est lavé à l'aide d'un tampon de «binding» différent du premier (500mM NaCl, 50mM HEPES et 0,1% de sérum de bovin d'albumine) et est absorbé sur une membrane de borosilicate pré-incubée, dans un premier temps, avec une solution aqueuse contenant 0,33% de polyéthylèneimine et, dans un second temps, avec un tampon de lavage (50mM HEPES et 0,5% de sérum de bovin d'albumine). L'expérience se fait à l'aide d'un «cell harvester» et les comptes de radio-liaison sont mesurés à l'aide d'un

compteur gamma de type Wallace Wizard 1470 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) tel que décrit ultérieurement (Kalatskaya et al., 2009).

### **Cytométrie en flux :**

L'expression à la surface cellulaire des différents récepteurs a été vérifiée par cytométrie en flux. Les conditions de transfection sont les mêmes que pour les essais de radio-liaison. 24 heures post-transfection les cellules sont rincées au PBS 1X et sont reprises dans du PBS 1X avec 0,1% de sérum de bovin d'albumine. Les cellules sont incubées pendant 30minutes à 40C avec soit un anticorps monoclonal anti-CXCR4 (clone 12G5) conjugué à la phycoérythrine ou soit un anticorps monoclonal anti-CXCR7 (clone 358426) conjugué à l'allophycocyanine tous les deux provenant de R&D Systems. Les cellules sont, par la suite lavées au PBS 1X et sont repris dans une solution de PBS contenant 2% de formaldéhyde. L'expression à la surface cellulaire est quantifiée et analysée par cytométrie de flux à l'aide du «FACS Calibur flow cytometer» de BD Biosciences.

### **Analyse statistique :**

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism version 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA). Le recrutement de la  $\beta$ -arrestine ainsi que les essais de radio-liaison ont été analysés à l'aide d'une régression non-linéaire appliquée à un modèle de dose-réponse sigmoïde de type variable. Les calculs pour les valeurs de IC50 lors des essais de radio-liaison ont été faits par le logiciel Graph

$$Y = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radio\ signal]}{K_d}}$$

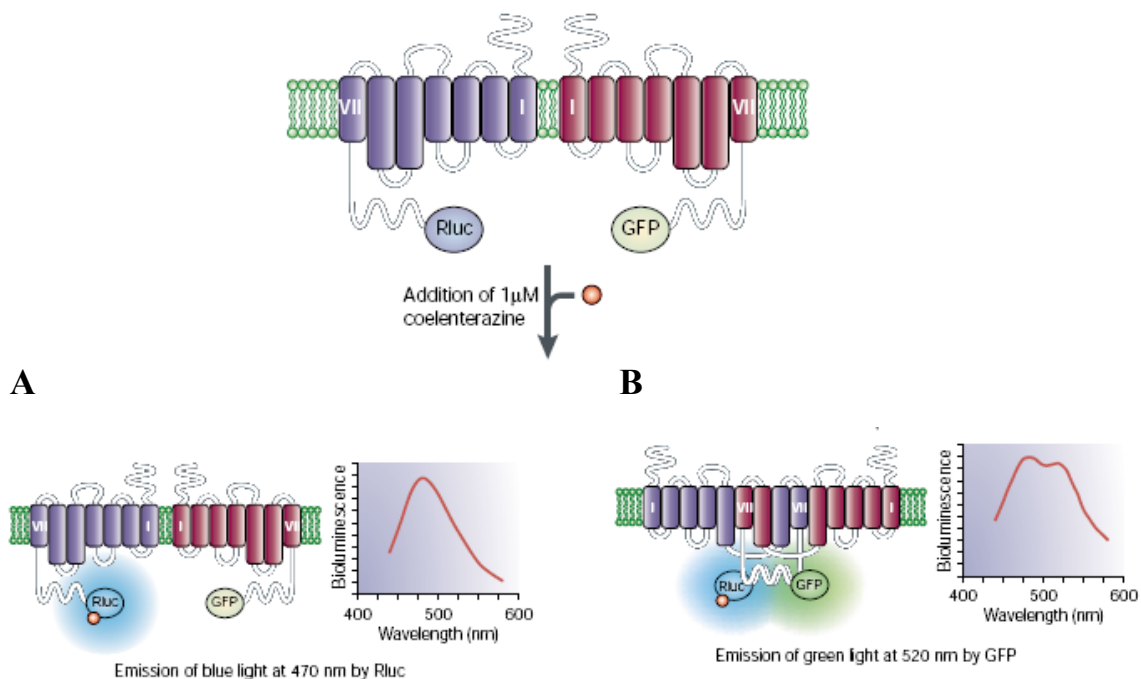
Pad Prime version 4.0 à l'aide de l'équation de Cheng et Prusoff;

(Cheng and Prusoff, 1973). Les courbes de saturation en fonction du ratio accepteur/donneur ont été analysées à l'aide de l'équation de l'hyperbole du premier site de liaison (*one-site binding hyperbola*).

## 2.2. Description de la technique de BRET

Le BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) est une méthode biophysique de transfert d'énergie par résonance. C'est un outil de choix pour étudier des interactions protéine-protéine dans des cellules vivantes (Gales *et al.*, 2006). Le BRET peut aussi servir pour détecter des changements de conformations intramoléculaires. Ce transfert d'énergie est non-radiatif et s'effectue entre les dipôles électromagnétiques d'un donneur d'énergie, et d'un accepteur (Gales *et al.*, 2005). Toutefois, pour qu'il y ait transfert d'énergie, il est essentiel que le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur se chevauchent, et que le donneur et l'accepteur se situent à proximité, soit inférieur à 100 Å (Bouvier, 2001). L'efficacité du transfert d'énergie, et donc l'intensité du signal de BRET, dépend de la distance qui sépare le donneur de l'accepteur (Gales *et al.*, 2006).

Dans le contexte du présent mémoire, le donneur d'énergie qui sera utilisé est une protéine luminescente, l'enzyme *Renilla* luciférase (RLuc). La RLuc provient d'un animal marin, le *Renilla reniformis*, dans lequel ce transfert d'énergie par résonance de bioluminescence a été observé comme étant un phénomène naturel (Gales *et al.*, 2005). Afin d'émettre de l'énergie, la luciférase doit oxyder la h-coelentérazine, son substrat. Ainsi, l'oxydation de la h-coelentérazine par la luciférase produira de la luminescence qui pourra être transférée à l'accepteur d'énergie. L'accepteur d'énergie utilisé sera la eYFP, *enhanced yellow fluorescent protein*. En absence de transfert d'énergie, suite à l'ajout de la h-coelentérazine, un signal lumineux correspondant à la luciférase seule et ayant un pic à 470nm est observé (Bouvier, 2001). Par contre, en présence de BRET, l'oxydation du substrat par la luciférase transfère son émission de lumière à la YFP, et donne ainsi lieu à un signal ayant un pic à 530nm (voir Figure 1.3, p. 31) (Bouvier, 2001).



**Figure 2.1 : Représentation schématique du système BRET.** (A) Suite à l'ajout de la h-coelentérazine, aucun transfert d'énergie n'a lieu et la luciférase seule émet un signal de bioluminescence à 470nm. (B) Un signal de BRET est mesuré lorsque les deux protéines fusionnés interagissent et réduisent la distance de leur fluorophores à moins de 100 Å. L'image a été modifiée et est tiré de l'article du Dr. Michel Bouvier (Bouvier, 2001).

Par la technique de BRET, on peut observer le changement de conformation au sein d'un dimère constitutif de récepteur, la présence d'interactions entre deux protéines, et un changement conformationnel intramolécuaire (Ayoub and Pflieger, 2010). Tous ces systèmes de BRET seront utilisés dans le cadre de ce projet de maîtrise.

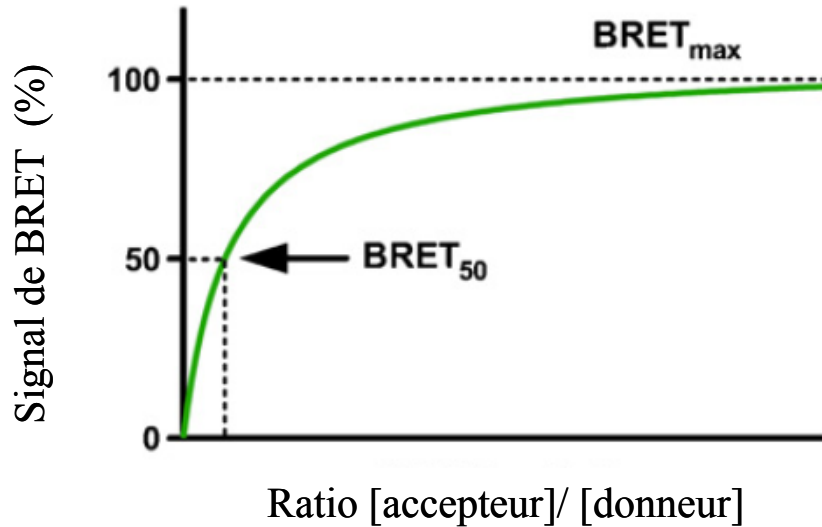
Le système de BRET d'un dimère constitutif de récepteur sera utilisé pour détecter un changement de conformation en son sein. Dans ce système, CXCR7 fusionné à la luciférase est co-exprimé avec CXCR7 fusionnée à la eYFP. La dimérisation constitutive de CXCR7 mène alors à la détection d'un signal de BRET dit « de base ». L'augmentation du signal de BRET de base suite à la stimulation par un

ligand, traduit un rapprochement des deux fluorophores (Percherancier *et al.*, 2005) (Mercier *et al.*, 2002) (Kalatskaya *et al.*, 2009). Cela peut être interprété de la sorte que le ligand module la conformation du récepteur dimérique, et donc comme effet de l'interaction récepteur-ligand.

L'interaction entre deux protéines est aussi un paramètre identifiable comme signal de BRET. Un signal BRET est observé lorsque les protéines fusionnées au donneur et à l'accepteur interagissent et que la distance entre ces dernières est réduite à 100 Å (Hamdan *et al.*, 2005). Dans le contexte de ce projet de maîtrise, la  $\beta$ -arrestine est fusionnée à la luciférase, le donneur d'énergie, tandis que CXCR7 est fusionné à la eYFP, l'accepteur d'énergie. Les deux molécules, co-exprimées dans une cellule, n'interagissent pas, et il n'y a aucun BRET spécifique de façon spontanée. Cependant, si une stimulation des cellules induit le recrutement de la  $\beta$ -arrestine-RLuc à CXCR7-eYFP, rapprochant ainsi donneur et accepteur d'énergie, un signal de transfert d'énergie spécifique devient détectable. Ainsi, à l'aide de la technique de BRET, il est possible d'observer l'induction de l'interaction entre ces deux partenaires.

Les mesures de BRET résultant d'une interaction spécifique sont quantifiables. Pour ce faire, le ratio de la concentration de l'accepteur d'énergie (eYFP) sur la concentration du donneur d'énergie (RLuc) doit être contrôlé. S'il y a interaction spécifique entre les deux partenaires de BRET, le signal de BRET augmente pour une même concentration de donneur d'énergie (RLuc) suivant l'augmentation de la concentration de l'accepteur d'énergie (eYFP) et atteint saturation. L'atteinte du plateau traduit le fait que tous les protéines fusionnées au donneur d'énergie interagissent spécifiquement avec les protéines fusionnées à l'accepteur d'énergie (Mercier *et al.*, 2002). Le signal de BRET n'augmentera alors pas en présence d'encore plus d'accepteurs. Ainsi, la valeur maximale obtenue par le signal de BRET, le  $BRET_{max}$ , dépend du nombre maximal d'interactions spécifiques formées. Il est aussi possible que le BRET détecté résulte d'une interaction non-spécifique entre les

deux partenaires de BRET. Dans ce cas, le signal de BRET donne lieu à une droite et résulte de collisions aléatoires entre l'accepteur d'énergie (eYFP) et le donneur d'énergie (RLuc). Ce signal non spécifique peut aussi être désigné comme «*bystander BRET*» (Mercier *et al.*, 2002).



**Figure 2.2 : Représentation schématique d'une courbe théorique de saturation en BRET.** Le signal BRET représenté en fonction du ratio entre la concentration du partenaire fusionné à l'accepteur d'énergie et la concentration du partenaire fusionné au donneur d'énergie. Le  $BRET_{max}$  reflète le nombre d'interactions spécifiques maximales. Le  $BRET_{50}$  désigne le ratio [accepteur]/[donneur] nécessaire pour observer 50% du transfert d'énergie de la réponse maximale. Tiré et adapté à partir d'Ayoub *et al.* (Ayoub and Pflieger, 2010).

Le  $BRET_{50}$  est un paramètre qui définit le ratio [accepteur]/[donneur] nécessaire pour observer 50% du transfert d'énergie. La valeur du  $BRET_{50}$  est un paramètre représentant la tendance d'association de la protéine fusionnée à l'accepteur pour la protéine fusionnée au donneur (Mercier *et al.*, 2002).

L'induction de l'interaction entre deux partenaires de BRET, comme celle entre récepteur et arrestine suite à une stimulation, transforme une courbe linéaire (non-

spécifique) en courbe hyperbolique de saturation avec un  $BRET_{50}$  (Ayoub and Pflieger, 2010). En revanche, le changement de conformation au sein d'une interaction constitutive de deux partenaires, tels que le dimère constitutif de CXCR7, n'affecte pas la valeur du  $BRET_{50}$ . En effet, le changement de conformation en réponse à une stimulation changera plutôt les valeurs de  $BRET_{max}$  (Ayoub and Pflieger, 2010). Ainsi, en réponse à une stimulation distincte, l'affinité relative entre les deux protéines restera la même. Cependant, la distance séparant les deux fluorophores pourra varier, ce qui résultera en un changement des valeurs de  $BRET_{max}$ .

Finalement, la technique de BRET par double-brillance a pour but d'observer un changement conformationnel intramoléculaire dans notre cas, la  $\beta$ -arrestine. Ainsi, la  $\beta$ -arrestine est fusionnée en N-terminal avec la luciférase et en C-terminal avec la YFP. La fixation du ligand sur le récepteur provoquera un changement de conformation au sein du récepteur ce qui engendrera le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Ainsi, le recrutement au récepteur induira un réarrangement des deux extrémités de la  $\beta$ -arrestine, ce qui se traduira par un changement de BRET intramoléculaire. Des différences dans ces changements en fonction du ligand utilisé traduisent des distances différentes entre les fluorophores, ce qui indique des conformations différentes adoptées par la  $\beta$ -arrestine (Shukla *et al.*, 2008).



### **3. RÉSULTATS**

### 3.1. Recrutement de la $\beta$ -arrestine au récepteur de chimiokine CXCR7

Le ligand naturel de CXCR7 est SDF-1. CXCR7 lie également AMD3100, antagoniste spécifique de CXCR4. Contrairement à son effet sur CXCR4, AMD3100 agit comme agoniste sur CXCR7, en induisant le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Basé sur ces données, nous avons voulu vérifier si cet effet est aussi observé avec d'autres inhibiteurs de CXCR4. Le Tc14012 est un analogue du T140 qui est stable dans le sérum et représente un antagoniste puissant de CXCR4 (Tamamura *et al.*, 2001).

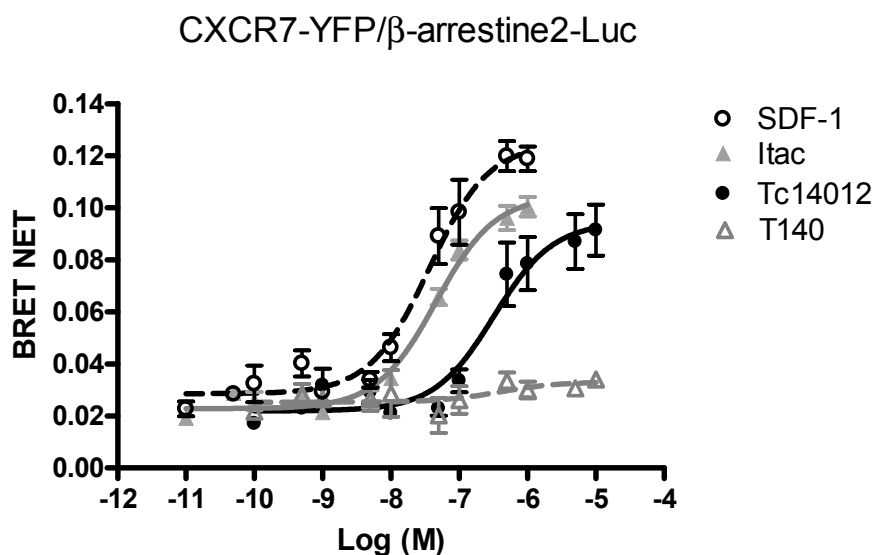
Pour vérifier si le Tc14012 induit, lui aussi, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7, nous avons utilisé la technique du BRET. Dans ce contexte, la  $\beta$ -arrestine est fusionnée à la luciférase, le donneur d'énergie, en partie C-terminale. CXCR7 est fusionné en partie C-terminale à la eYFP, l'accepteur d'énergie. Les deux molécules, co-exprimées dans une cellule, n'interagissent pas, et il n'y a aucun BRET de façon spontanée. Cependant, si une stimulation des cellules induit le recrutement de  $\beta$ -arrestine-RLuc à CXCR7-eYFP, rapprochant ainsi donneur et accepteur d'énergie, un signal de transfert d'énergie devient détectable. Ainsi, à l'aide de la technique de BRET, il est possible de tester l'effet de ligands sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine au récepteur.

Comme montré à la figure 3.1 (p. 48), une augmentation du signal de BRET est observée dans des cellules co-exprimant de façon transitoire CXCR7 et  $\beta$ -arrestine suite à la stimulation par les ligands naturels de CXCR7, les chimiokines SDF-1 et ITAC. De même, la stimulation par TC14012 provoque une augmentation du signal de BRET. En revanche, le T140 n'induit pas de recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Les effets des deux ligands naturels sont observés avec des  $EC_{50}$  semblables (30nM pour SDF-1 et 48nM pour ITAC). Le  $EC_{50}$  pour le Tc14012 (350nM) est un peu plus élevé que les  $EC_{50}$  pour SDF-1 et ITAC, mais reste beaucoup plus faible que pour l'AMD3100 (différence de 3 log). En effet, la valeur du  $EC_{50}$  pour le recrutement de

la  $\beta$ -arrestine induit par AMD3100 est de l'ordre de grandeur de cent micro-molaire ( $138\mu\text{M}$ , voir tableau II, p.60).

Ces résultats indiquent que SDF-1 et ITAC, les ligands naturels de CXCR7, induisent tous les deux des réponses de recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Les réponses montrent des courbes dose-réponse sigmoïdes, avec un  $\text{EC}_{50}$  et  $E_{\text{max}}$  quantifiables, démontrant la validité de notre système expérimental. L'expérience montre également que le Tc14012 induit lui aussi le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7, avec une puissance bien supérieure à celle d'AMD3100. La structure de Tc14012 est entièrement différente de celle de l'AMD3100. En revanche, T140, qui a une structure similaire à TC14012, n'est pas agoniste de CXCR7. Cela peut être interprété de la sorte que le T140 serait incapable de se lier à CXCR7 contrairement au Tc14012. Alternativement, le T140 pourrait se lier à CXCR7, mais sans induire le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7. Nous pensons que l'extrémité amidée du Tc14012 pourrait donner lieu à des interactions électrostatiques dans la pochette de liaison du récepteur CXCR7. La partie C-terminale du Tc14012 diffère de celle du T140 par la présence de ce groupement amide. Ainsi, ces interactions provoqueraient un changement de conformation différent de celui engendré par la fixation du T140. Effectivement, un article récent a montré que la partie C-terminale du T140 interagit avec le quatrième domaine transmembranaire et les deuxième et troisième boucles extracellulaires du récepteur de chimiokine CXCR4 (Boulais *et al.*, 2009). Ceci résulterait au recrutement de la  $\beta$ -arrestine en réponse au Tc14012, mais non au T140.

En conclusion, cette expérience montre que deux antagonistes de CXCR4, structurellement distincts, anciennement considérés comme exclusifs à celui-ci, sont des agonistes sur CXCR7, du moins en ce qui concerne le recrutement de la  $\beta$ -arrestine.



**Figure 3.1 :** Effet de divers ligands naturels ou synthétiques sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine au récepteur de chimiokine CXCR7. Co-expression transitoire dans des cellules HEK293 de la  $\beta$ -arrestine fusionnée à la luciférase, donneur d'énergie en BRET et du récepteur CXCR7 fusionné à la eYFP (*yellow fluorescent protein*), l'accepteur d'énergie en BRET. Les cellules co-exprimant les partenaires de BRET ont été stimulées au SDF-1 (cercle noir ouvert), ITAC (triangle gris fermé), Tc14012 (cercle noir fermé) ou par T140 (triangle gris ouvert) et ce, aux concentrations indiquées. Les mesures de BRET sont représentées en BRET<sub>net</sub>. Les résultats représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicatas. Pour l'analyse statistique voir le tableau II (p. 60).

### 3.2. Interaction de Tc14012 avec le dimère du récepteur CXCR7

CXCR7 se trouve constitutivement sous sa forme dimérique (Kalatskaya *et al.*, 2009), et la liaison de SDF-1 ou AMD3100 module la conformation de ce récepteur. La conformation ainsi adoptée par le récepteur est propre à chacun des ligands. Cet effet a été détectable en utilisant un système BRET de dimère de CXCR7 (Kalatskaya *et al.*, 2009). Basé sur ces données, nous avons voulu vérifier si c'était aussi le cas pour le TC14012.

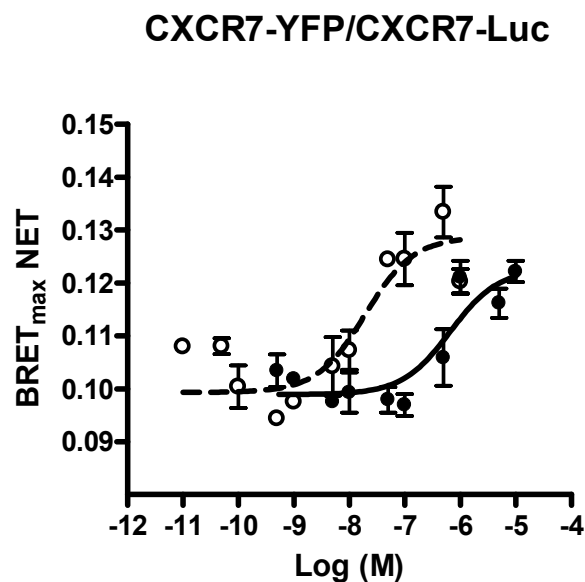
Il est possible à l'aide de la technique de BRET, de mesurer le changement de conformation au sein d'un récepteur constitutivement dimérique suite à la liaison de

ligands. Dans ce système, CXCR7 fusionné à la luciférase est co-exprimé avec CXCR7 fusionnée à la eYFP. L'augmentation du signal de BRET traduit un rapprochement des deux fluorophores (Percherancier *et al.*, 2005) (Mercier *et al.*, 2002) (Kalatskaya *et al.*, 2009). Cela peut être interprété de la sorte que le ligand module la conformation du récepteur dimérique, et donc comme effet de l'interaction récepteur-ligand.

La figure 3.2 (p. 51) montre que suite à la stimulation par SDF-1, une augmentation du signal de BRET est observée. Une augmentation similaire est observée avec TC14012. Cette augmentation de signal traduit un rapprochement des fluorophores fusionnées à CXCR7. Nous interprétons ce signal comme résultant de l'interaction des ligands avec CXCR7, qui induit un remaniement de la conformation du dimère de CXCR7. Effectivement, l'effet de SDF-1 sur le dimère de CXCR7 a été précédemment démontré comme résultats d'un tel changement, plutôt que de l'augmentation du nombre d'homo-dimères (Kalatskaya *et al.*, 2009) Toutefois, on pourrait conclure que l'augmentation du signal de BRET résulterait en une augmentation de la localisation membranaire de CXCR7 de sorte que l'ajout de SDF-1 provoquerait un regroupement non-spécifiques des dimères spécifiques de récepteurs à la membrane. Or, si tel était le cas, le signal de BRET augmenterait de façon non-spécifique, c'est-à-dire que, plus il y aurait de récepteurs regroupés plus le BRET non-spécifique contribuerait au signal détecté. Cependant, Percherancier *et al.* montre qu'une courbe de saturation, où la quantité de monomères fusionnés à la YFP augmente et où la quantité de monomères fusionnés à la luciférase reste constante, pour des homo-dimères spécifiques de récepteurs, atteint saturation autant en présence ou en absence de ligand. (Percherancier *et al.*, 2005) Or, si l'ajout de SDF-1 augmenterait le BRET non-spécifique, cette saturation ne serait pas attendue. La figure 3.2 démontre donc l'effet de SDF-1 sur le dimère spécifique de CXCR7. Ainsi, le signal de BRET obtenu traduit un rapprochement des fluorophores à CXCR7 plutôt qu'une augmentation du nombre d'homo-dimères de CXCR7 à la membrane.

La courbe du TC14012 a un  $EC_{50}$  de 368nM, et celle de SDF-1 de 27nM (voir tableau I, p. 52). Le  $EC_{50}$  est un paramètre pharmacologique qui définit la puissance de la réponse indiquant la concentration nécessaire à laquelle un ligand donné provoque 50% de la réponse maximale (Kalatskaya *et al.*, 2009) (Kenakin, 2009). Ainsi, les résultats obtenus indiquent que la puissance de la réponse induite par le TC14012 ( $EC_{50}$  de 368nM) est plus faible que celle induite par SDF-1 ( $EC_{50}$  de 27nM). De plus, la figure montre que les courbes semblent atteindre le même maximum de réponse, qui représente la valeur  $BRET_{max}$  (0,13 de  $BRET_{net}$  pour SDF-1 et 0,14 pour TC14012 (voir tableau I, p. 52). Ainsi, les résultats montrent qu'en réponse à SDF-1 et TC14012, les deux courbes atteignent la même valeur maximale. Cela peut être interprété de la sorte que le dimère de CXCR7 adopterait la même conformation en présence des deux ligands. En effet, des conformations différentes ne se traduiraient pas par des  $EC_{50}$ , mais par des maximas (efficacités, correspondant à l'amplitude de la réponse) différents. Toutefois, il n'est pas exclu que les deux conformations soient différentes, mais que cette différence ne soit pas observable en BRET puisque les deux fluorophores auraient la même distance l'un par rapport à l'autre dans les deux conformations.

En somme, tout comme SDF-1 et l'AMD3100, le TC14012 module la conformation du récepteur de chimiokine CXCR7. Ceci est une évidence supplémentaire pour l'interaction directe de TC14012 avec CXCR7. Ainsi, deux antagonistes structurellement non-reliés de CXCR4 interagissent sur CXCR7.



**Figure 3.2 : Effet d'une concentration croissante de ligands sur la conformation du récepteur CXCR7.** Co-expression transitoire dans des cellules HEK293 de CXCR7 fusionné à la luciférase, donneur d'énergie en BRET et de CXCR7 fusionné à la YFP, accepteur d'énergie en BRET. Les cellules ont été stimulées avec le SDF-1 (cercles ouverts) et le TC14012 (cercles fermés) aux concentrations indiquées. Les mesures de BRET sont représentées en BRET<sub>max</sub>net. Les résultats représentent une expérience représentative de 3 (SDF-1) ou 6 (TC14012) expériences indépendantes réalisées en triplicatas. Pour l'analyse statistique voir le tableau I, p.52.

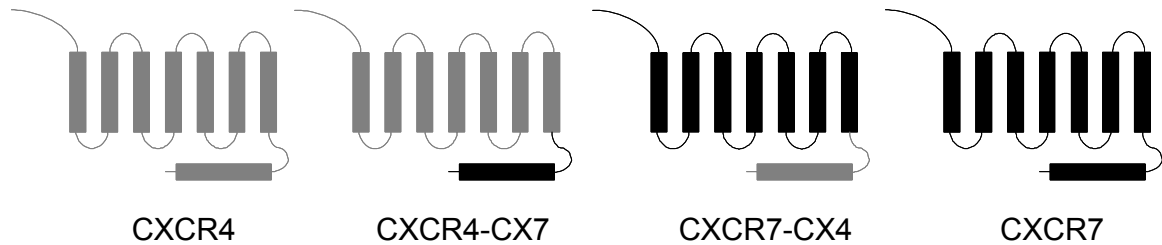
**Tableau I : Résumé de l'analyse des paramètres des courbes de dose-réponse des différents ligands sur l'homo-dimérisation du récepteur CXCR7 (figure 3.2, p. 51).** Co-expression transitoire dans des cellules HEK293 de CXCR7 fusionné à la luciférase, donneur d'énergie en BRET et de CXCR7 fusionné à la eYFP, accepteur d'énergie en BRET. Les cellules ont été stimulées avec le SDF-1 et le TC14012 aux concentrations indiquées à la figure 3.2. Les valeurs de  $EC_{50}$  représentent la puissance des ligands à moduler la conformation du dimère de CXCR7. Les mesures de BRET ont été représentées en  $BRET_{net}$ . Les résultats représentent la moyenne de 3 (SDF-1) ou 6 (TC14012) expériences indépendantes réalisées en triplicatas.

| <b>Ligands</b> | <b><math>EC_{50}</math> (nM)</b> | <b><math>\log EC_{50} \pm SEM</math></b> | <b><math>BRET_{max}</math></b> | <b>n</b> |
|----------------|----------------------------------|--|--------------------------------|----------|
| SDF-1          | 27                               | -7,6±0,13                                | 0,13±0,01                      | 3        |
| TC14012        | 368                              | -6,65±0,37                               | 0,14±0,02                      | 6        |

### 3.3. Caractérisation des récepteurs chimères CXCR4 et CXCR7

La figure 3.1 (p. 48) a montré que deux antagonistes de CXCR4, structurellement distincts, induisent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7. Ainsi, nous pensons que cette interaction n'est pas fortuite, ni due aux ligands, mais traduit des propriétés intrinsèques du récepteur CXCR7. Ces propriétés pourraient être situées au niveau du site de l'interaction avec les ligands (« poche de liaison »), ou au niveau du recrutement de  $\beta$ -arrestine. Sachant que la  $\beta$ -arrestine est souvent associée à la partie C-terminale des 7TMR's, nous avons voulu comprendre si cette partie est responsable de l'effet inverse des ligands synthétiques sur les deux récepteurs. Afin de vérifier cette hypothèse, des chimères des récepteurs CXCR4 et CXCR7, où les parties C-terminales ont été inter-changées, ont été créées par mutagenèse dirigée.

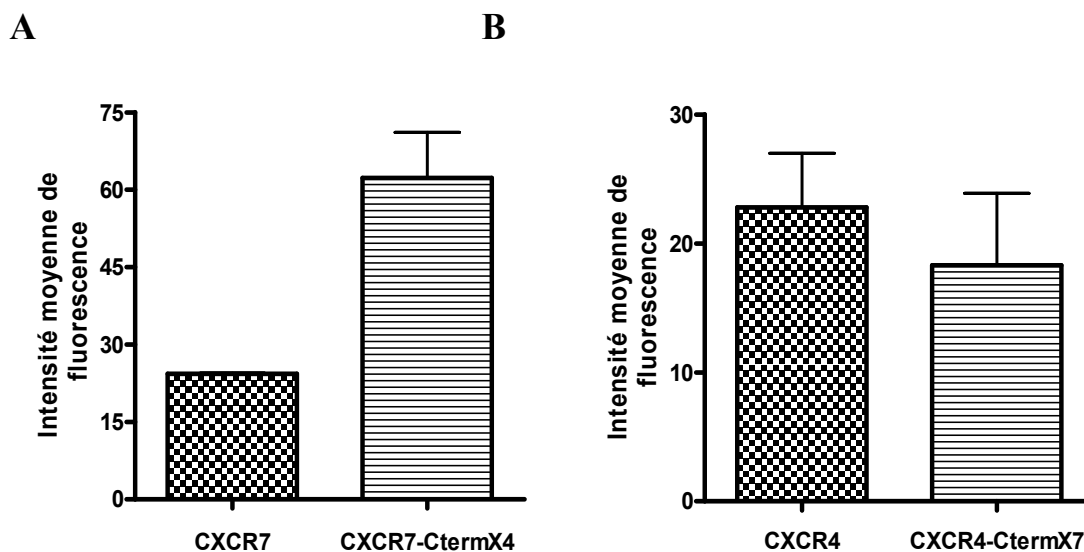




**CXCR7** NPVLYSFINRNYRYELMKA--FIFKYSAKTGLTKLIDASRVSETEYSALEQSTK 362  
 NP+LY+F+ ++ A ++S+ L+K S TE + +  
**CXCR4** NPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESSESSSFHSS 352

**Figure 3.3: Représentation schématique et alignement de séquences des parties C-terminales des récepteurs CXCR4 et CXCR7.** Les résidus inter-changés pour la création des chimères sont surlignés en gris.

Suite à la création des chimères, par mutagenèse dirigée, il a fallu déterminer l'intégrité des chimères en vérifiant leur capacité de s'exprimer à la surface cellulaire. La technique de cytométrie en flux a permis d'observer l'expression en surface des différents récepteurs/chimères via des anticorps spécifiques fluorescents. La figure 3.4 (p.54) montre le niveau d'intensité de fluorescence en surface des différents récepteurs. Les résultats montrent que les deux chimères nouvellement créées s'expriment à la surface cellulaire. Ainsi, le changement des parties C-terminales entre les deux récepteurs n'affecte pas leur expression en surface et leur intégrité semble conservée.



**Figure 3.4 : Expression en surface des récepteurs chimères.** Cellules HEK293 exprimant de façon transitoire les différents récepteurs ont été identifiées à l'aide d'anticorps monoclonaux, anti-CXCR4 (clone 12G5) et anti-CXCR7 (clone 358426) couplés à l'allophycocyanine (APC). L'expression en surface des récepteurs a été mesurée par cytométrie de flux (FACSCalibur, BD biosciences). Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence par rapport au niveau de fluorescence basal (cellules HEK293 transfectées avec le vecteur vide). Les résultats montrent la moyenne de deux expériences indépendantes. **A:** CXCR7 et CXCR7-CtermX4; **B:** CXCR4 et CXCR4-CtermX7

Pour vérifier si la fonctionnalité des récepteurs n'a pas été affectée par le changement de la partie C-terminale, il a fallu s'assurer que les chimères étaient capables de lier SDF-1. Nous avons testé cette propriété en utilisant la technique de compétition de radio-liaison homologue.

Les essais de radio-liaison ont pour but d'observer la capacité d'un ligand non-marqué radioactif à déplacer un ligand radio-marqué. Le ligand non-marqué compétitionne avec le radio-ligand pour le même site de liaison sur le récepteur. Ainsi, plus la concentration de ligand non-marqué est grande, plus, il lui sera facile de compétitionner pour son site de liaison ce qui ne permettra plus au radio-ligand de se

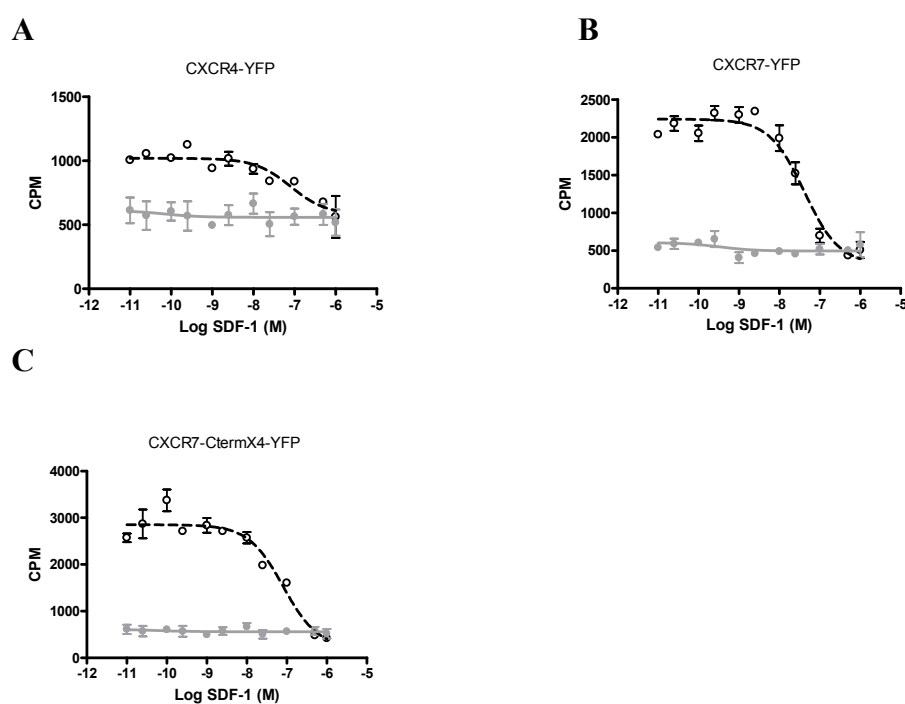
lier au récepteur. Cet effet se traduit par une baisse de la radioactivité associée aux cellules. En compétition homologe, le  $IC_{50}$  traduit l'affinité du compétiteur pour le récepteur.

La figure 3.5 (p. 56) montre que le SDF-1 se lie aux récepteurs CXCR4 et CXCR7 avec des valeurs de  $IC_{50}$  comparables (environ 30nM) ce qui nous assure de la fiabilité de l'expérience. La valeur du  $IC_{50}$  indique la concentration requise de ligand non-marqué pour inhiber 50% de la liaison du radio-ligand. Par la suite, les résultats montrent que le SDF-1 est aussi capable de lier la chimère CXCR7-CtermX4. Cependant, la valeur du  $IC_{50}$  pour CXCR7-CtermX4 est un peu plus élevée que les  $IC_{50}$  de CXCR4 et CXCR7 (différence d'un facteur 5). En effet, le  $IC_{50}$  pour CXCR7-CtermX4 est de grandeur de cent nano-molaire (121nM, voir figure 3.5, p.56). Ceci peut être interprété de la sorte que l'échange des parties C-terminales affecterait légèrement la conformation globale des récepteurs, de la sorte que leur affinité pour SDF-1 baisserait légèrement.

Toutefois, l'échange des parties C-terminales n'induit pas un mauvais repliement des récepteurs chimères, au quel cas, la perte complète de la fixation de SDF-1 (et probablement une perte de transport en surface, figure 3.4, p. 54) aurait été attendu. Ainsi, les résultats montrent que l'échange des parties C-terminales n'affecte pas la fonctionnalité de la chimère CXCR7-CtermX4.

Concernant le récepteur chimère CXCR4-CtermX7, bien qu'il soit exprimé à la surface des cellules, il reste à être ré-analysé, puisque les conditions expérimentales ne permettent pas de conclure sa capacité de liaison de SDF-1. Cela pourrait être expliqué par une baisse importante d'affinité de ce mutant pour SDF-1. Il se pourrait que l'échange de la partie C-terminale pour la chimère CXCR4-CtermX7 ait affecté légèrement la conformation globale du récepteur de sorte que SDF-1 ne se fixe que difficilement. Alternativement, il y pourrait y avoir des raisons plutôt techniques. Effectivement, ce chimère conserve la capacité de répondre à SDF-1 (voir section ci-

dessous), ce qui est incompatible avec une perte complète de la liaison de SDF-1. Une technique alternative afin d'étudier cette question serait de faire une compétition anticorps-ligand. Cette technique consiste à vérifier l'expression en surface du récepteur en présence d'une concentration croissante de ligand et d'une quantité constante d'anticorps marqué (en fluorescence). Ainsi, le ligand compétitionnera avec l'anticorps pour sa liaison sur le récepteur.



**Figure 3.5 : Inhibition de la liaison de 50pM  $^{125}\text{I}$ -SDF-1 en présence d'une concentration croissante de compétiteur non-marqué, SDF-1, sur les différents récepteurs.** Une seule expérience représentative est montrée. L'expérience a été répétée avec des résultats similaires (n=3-7). Des cellules HEK293 ont été transfectées avec CXCR4-YFP en A, CXCR7-YFP en B, CXCR7-CtermX4-YFP en C (cercle noir ouvert) et avec le vecteur vide, pCDNA3 en A, B et C (cercle gris). Le SDF-1 non radio-marqué compétitionne avec le  $^{125}\text{I}$ -SDF-1 et inhibe sa liaison avec les récepteurs de façon dose-dépendante. Les valeurs moyennes des  $\text{IC}_{50}$  représentent la concentration nécessaire de SDF-1 non radio-marqué pour inhiber 50% de la liaison du  $^{125}\text{I}$ -SDF-1 aux récepteurs sont : (pour CXCR4-YFP (n=3), le  $\text{IC}_{50}$ =36,3 nM, pour CXCR7-YFP(n=7) le  $\text{IC}_{50}$ =24,1 nM et pour CXCR7-CtermX4-YFP(n=7), le  $\text{IC}_{50}$ = 121 nM)

### **3.4. La partie C-terminale n'est pas déterminante pour l'effet inverse des ligands synthétiques sur le recrutement de la $\beta$ -arrestine à CXCR4 et CXCR7**

Ayant caractérisé ces récepteurs chimériques, nous voulions vérifier le rôle de la partie C-terminale dans le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Le système expérimental utilisé est essentiellement celui décrit en 3.1, en ayant recours aux constructions chimériques respectives, et aux récepteurs non mutés.

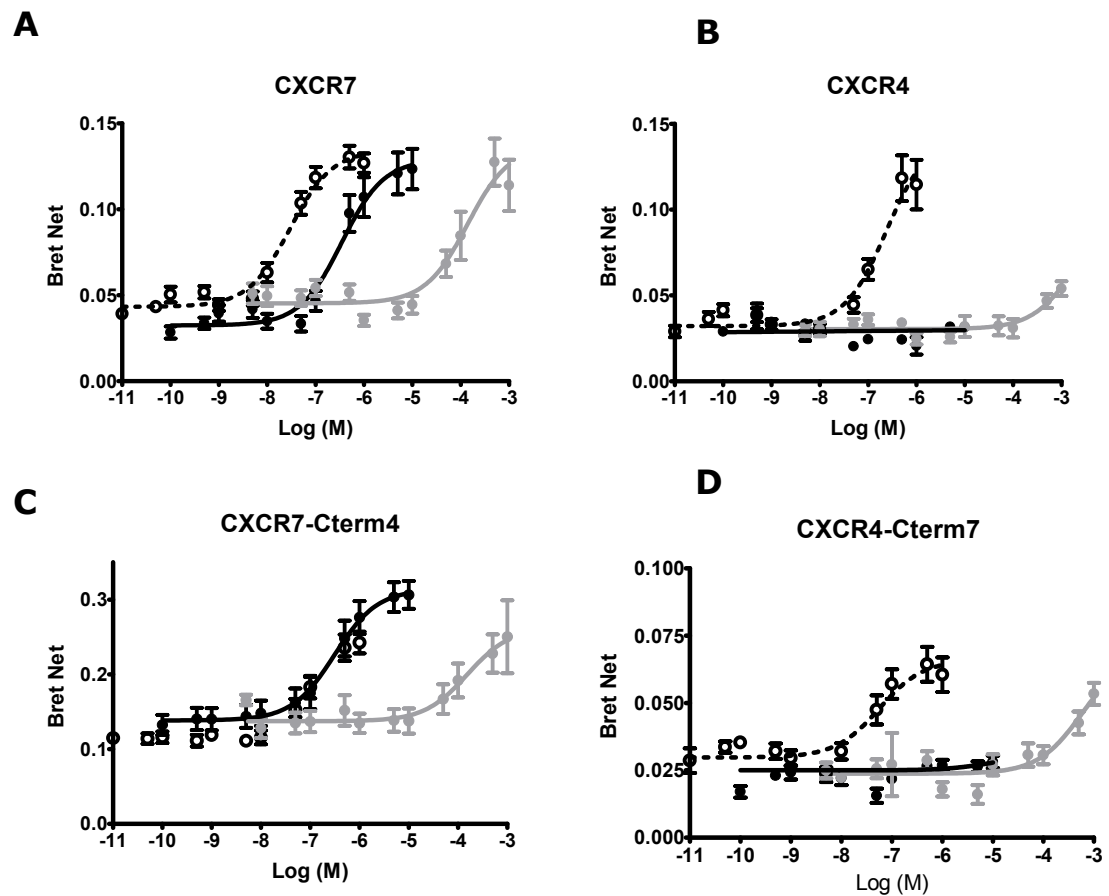
La figure 3.6 (p.59) montre que suite à la stimulation par SDF-1, les quatre récepteurs présentent une augmentation du signal de BRET, et donc un recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Ceci démontre non seulement la validité du système expérimental, mais établit également que le chimère CXCR4-CtermX7, avec lequel les expériences de radio-liaisons avaient échouées, est toutefois capable de répondre à la chimiokine. Ce chimère est donc fonctionnel, et nous pensons que l'échec de la radio-liaison aurait des raisons purement techniques. Les  $EC_{50}$  du recrutement sont, respectivement, pour CXCR4 d'environ 250 nM, pour CXCR7 de 30 nM, le chimère CXCR4-CtermX7 de 50 nM, et pour le chimère CXCR7-CtermX4 de 200 nM (paramètres statistiques au tableau II, p.60). Le recrutement induit par SDF-1 est alors plus puissant sur CXCR7 que sur CXCR4. De façon intéressante, le  $EC_{50}$  du chimère CXCR4-CtermX7 est similaire à celui de CXCR7, et le  $EC_{50}$  du chimère CXCR7-CtermX4 à celui de CXCR4. Il semblerait alors que la puissance de SDF-1 suive l'identité du C-terminal présent dans un récepteur.

En revanche, tel qu'attendu, l'AMD3100 et le TC14012 induisent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine seulement à CXCR7 et non à CXCR4. Les mêmes observations sont faites pour les récepteurs chimères de la sorte que l'AMD3100 et le TC14012 induisent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à la chimère CXCR7-CtermX4 et non à la chimère CXCR4-CtermX7. Ces résultats indiquent alors que l'échange de la partie C-terminale n'affecte pas l'effet agoniste des ligands synthétiques. Donc, la partie C-terminale n'est pas

responsable de l'effet inverse des antagonistes de CXCR4 sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine au récepteur CXCR7.

Une autre observation intéressante que nous avons faite est que la valeur minimale du  $BRET_{net}$  de la chimère CXCR7-CtermX4 est beaucoup plus élevée comparativement aux autres récepteurs (d'environ 3-4 fois plus élevée). En effet, la valeur minimale du  $BRET_{net}$  pour CXCR7-CtermX4 est de 0,11 comparativement environ 0,03 pour CXCR4, CXCR7 et la chimère CXCR4-CtermX7 (voir tableau II, p.60). Cela pourrait suggérer la présence d'une interaction constitutive de la chimère avec la  $\beta$ -arrestine.

En somme, la figure 3.6 (p.59) montre que la partie C-terminale n'est pas responsable de l'effet inverse des deux inhibiteurs de CXCR4 sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7. Ce serait alors plutôt la structure du corps du récepteur, formé par les sept domaines transmembranaires et les boucles les entrecoupant, qui en serait responsable. Cependant, la puissance de la réponse à SDF-1 serait médiée par la partie C-terminale des deux récepteurs.



**Figure 3.6 : Effet de divers ligands naturels ou synthétiques sur le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7, CXCR4 et les récepteurs/chimères.** Co-expression transitoire dans des cellules HEK293 de la  $\beta$ -arrestine fusionnée à la luciférase, donneur d'énergie en BRET et du récepteur fusionné à la eYFP (*yellow fluorescent protein*), l'accepteur d'énergie en BRET. Les cellules co-exprimant les partenaires de BRET ont été stimulées au SDF-1 (cercle noir ouvert), TC14012 (cercle noir) ou par AMD3100 (cercle gris) et ce, aux concentrations indiquées. Les mesures de BRET sont représentées en  $BRET_{net}$ . Les résultats représentent la moyenne de 9 (SDF-1) et de 3 à 7 (respectivement TC14012 et AMD3100) expériences indépendantes réalisées en triplicatas. Pour l'analyse statistique des paramètres des courbes, voir le tableau II (p. 55). **A:** CXCR7; **B:** CXCR4; **C:** CXCR7-CtermX4; **D:** CXCR4-CtermX7.

**Tableau II: Résumé des analyses statistiques des paramètres des courbes de l'activation du recrutement de la  $\beta$ -arrestine aux différents récepteurs et récepteurs/chimères par SDF-1, Tc14012 et AMD3100 montrée à la figure 3.1 et 3.6 (p. 48, 59).** Les différences de EC50 suite à la stimulation par SDF-1 sont statistiquement significatives entre CXCR4 et CXCR7 ( $p < 0.001$ ); CXCR4 et CXCR4-CtermX7 ( $p < 0.05$ ); et entre CXCR7 et CXCR7-CtermX4 ( $p < 0.01$ ) (one way ANOVA avec Tukey's post test). La différence de minimum des courbes entre CXCR7-CtermX4 et tous les autres récepteurs est aussi significative ( $p < 0.001$ ). La différence de minimum des courbes entre CXCR7 et CXCR4 n'est pas statistiquement significative. Les valeurs élevées des EC50 obtenues par AMD3100 (1,5 et 0,5mM) sur CXCR4 et CXCR4-CtermX7 peuvent représentées des artefacts dues à des concentrations extrêmes de composés (plus élevée que celles utilisés dans notre article publié récemment) (Kalatskaya *et al.*, 2009). À forte concentration, AMD3100 pourrait être représenté comme un faible agoniste ou agoniste partiel sur CXCR4 et sa chimère (Zhang *et al.*, 2002).

| récepteur         | SDF-1                    |                              |           |           |   | TC14012                  |                              |           |           |   | AMD3100                  |                              |           |           |   |
|-------------------|--------------------------|------------------------------|-----------|-----------|---|--------------------------|------------------------------|-----------|-----------|---|--------------------------|------------------------------|-----------|-----------|---|
|                   | EC <sub>50</sub><br>(nM) | logEC <sub>50</sub> ±<br>SEM | top       | bottom    | n | EC <sub>50</sub><br>(nM) | logEC <sub>50</sub> ±<br>SEM | top       | bottom    | n | EC <sub>50</sub><br>(μM) | logEC <sub>50</sub> ±<br>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-<br>CtermX7 | 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-<br>CtermX4 | 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 |



### 3.5. Recrutement constitutif de la $\beta$ -arrestine au chimère CXCR7-CtermX4

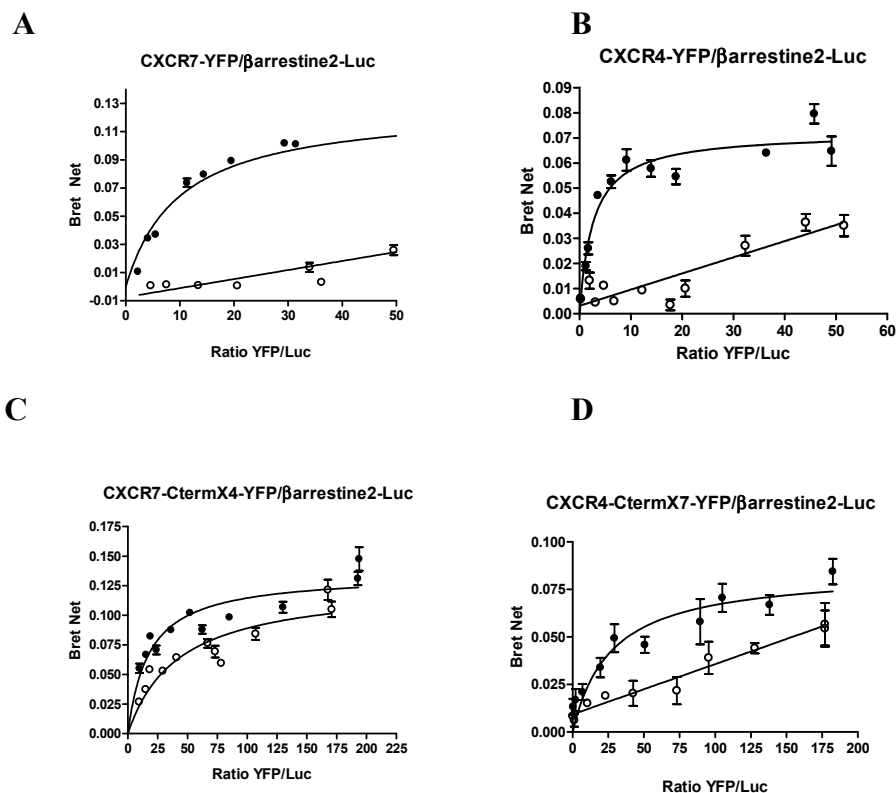
Basé sur les données obtenues à la figure 3.6 (p.59), nous avons voulu étudier davantage l'interaction constitutive ou non de la  $\beta$ -arrestine avec la chimère CXCR7-CtermX4.

À l'aide d'un système de BRET, des courbes de titration (ratio entre accepteur/donneur d'énergie) permettent d'établir la spécificité d'un signal de BRET. Un signal non-spécifique, aussi appelé « *bystander-BRET* », croitra de façon linéaire avec l'augmentation du ratio [donneur]/[accepteur]. En revanche, une interaction spécifique résultera en une courbe de saturation. Lorsque chaque donneur interagit spécifiquement avec un accepteur, l'ajout de davantage d'accepteurs n'augmentera pas le signal (Mercier *et al.*, 2002). Appliqué sur notre système expérimental récepteur/ $\beta$ -arrestine, ceci veut dire qu'en absence de ligand, une droite plutôt qu'une courbe de saturation est attendue, si récepteur et arrestine n'interagissent pas de façon spontanée. En présence de ligand, cependant, une courbe de saturation est attendue (induction de l'interaction spécifiques récepteur/arrestine). En revanche, une interaction spontanée résulterait en une courbe de titration saturée, même en absence de ligand.

La figure 3.7 (p.63) montre que suite à la stimulation par SDF-1, toutes les courbes forment une hyperbole. Ainsi, tel qu'attendu, les résultats indiquent qu'une stimulation par SDF-1 induit le recrutement spécifique de la  $\beta$ -arrestine aux différents récepteurs. En revanche, la chimère CXCR7-CtermX4 montre déjà une courbe de saturation en l'absence de stimulation par la chimiokine SDF-1 (figure 3.7c, p.63). Ceci confirmant que, effectivement, cette chimère interagit spontanément avec la  $\beta$ -arrestine. De plus, les paramètres statistiques montrés au tableau III (p.64) indiquent que la chimère CXCR7-CtermX4 présente un BRET<sub>50</sub> de 189,5nM comparativement à 13,54nM en présence de SDF-1. Les valeurs de BRET<sub>50</sub> correspondent au ratio [accepteur]/[donneur] nécessaire pour atteindre la moitié de la réponse maximale. La

valeur du  $BRET_{50}$  est alors comparable à une constante d'affinité et représente donc l'affinité de la  $\beta$ -arrestine pour le récepteur. La différence de valeur de  $BRET_{50}$  de CXCR7-CtermX4 en absence versus présence de SDF-1 indique qu'en présence de ligand, l'activité constitutive de la chimère CXCR7-CtermX4 est davantage activée.

Somme toute, les résultats confirment qu'en absence de ligand, la chimère CXCR7-CtermX4 interagit spontanément avec la  $\beta$ -arrestine.



**Figure 3.7 : Courbe de saturation en fonction du ratio [accepteur]/[donneur] en BRET.** Courbes de saturation en fonction du ratio [accepteur]/[donneur] en BRET se fait entre une quantité croissante de la  $\beta$ -arrestine fusionnée à la luciférase, donneur d'énergie et entre une quantité constante de récepteur fusionné à la YFP, l'accepteur d'énergie en absence (cercles ouverts) ou en présence de 100nM de SDF-1 (cercles fermés) Les résultats montrent une expérience représentative de quatre expériences indépendantes effectuées en triplicatas. En présence de chimiokine, les valeurs de BRET suivent une courbe hyperbolique ce qui traduit l'interaction entre le récepteur et la  $\beta$ -arrestine. La chimère CXCR7-CtermX4 montre un courbe de saturation de type hyperbole, et ce, même en absence de chimiokine comparativement à CXCR7, qui en absence de chimiokine, forme une droite indiquant l'absence d'interaction entre la  $\beta$ -arrestine et le récepteur. Cet effet est le même dans les quatre expériences ayant la courbe hyperbolique comme modèle de référence au lieu de la droite, ceci en faisant la comparaison des courbes ce qui suggère un recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine avec le récepteur chimère CXCR7-CtermX4. Les valeurs de BRET<sub>50</sub> des courbes de cette chimère en absence de la chimiokine sont significativement plus faibles qu'en présence de chimiokine ( $p < 0.001$  de 3 des 4 expériences,  $p < 0.01$  pour 1 des 4), indiquant que le recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine est augmenté en présence de chimiokine. Un résumé de l'analyse des paramètres des courbes est représenté au tableau III (p. 64).

**Tableau III : Résumé des paramètres des courbes de saturation en fonction du ratio [accepteur]/[donneur] en BRET montrées à la figure 3.7 (p. 63).** Les valeurs de BRET<sub>50</sub> indiquent la capacité d'interaction entre le donneur et l'accepteur d'énergie. Les valeurs de BRET<sub>max</sub> sont reproductibles et spécifiques à chaque récepteur indiquant des différences au niveau du nombre d'interaction spécifique maximales de la  $\beta$ -arrestine avec les différents récepteurs et récepteurs/chimères.

| récepteur     | En absence de SDF-1        |                     |   | En présence de 100nM SDF-1 |                     |   |
|---------------|----------------------------|---------------------|---|----------------------------|---------------------|---|
|               | BRET <sub>50</sub><br>(nM) | BRET <sub>max</sub> | n | BRET <sub>50</sub><br>(nM) | BRET <sub>max</sub> | n |
| CXCR4         | N/A                        | N/A                 | 4 | 7,97                       | 0,08±0,01           | 5 |
| CXCR7         | N/A                        | N/A                 | 3 | 31,3548                    | 0,18±0,03           | 5 |
| CXCR4-CtermX7 | N/A                        | N/A                 | 4 | 23,91                      | 0,08±0,02           | 4 |
| CXCR7-CtermX4 | 189,5                      | 0,17±0,04           | 4 | 13,54                      | 0,21±0,04           | 4 |

### 3.6. Effets différents des différents ligands endogènes de CXCR7

Sur la figure 3.1 (p.48), nous avons remarqué que les maximas des signaux de BRET induits par les chimiokines SDF-1 et ITAC sont différents. Un article récent suggère que différentes conformations de la  $\beta$ -arrestine engendrent l'activation de différentes voies de signalisation, et ce, pour un même récepteur stimulé par différents ligands (Shukla *et al.*, 2008). Afin de vérifier si la conformation de la  $\beta$ -arrestine est différente dépendamment du ligand (SDF-1 ou ITAC), nous avons effectué un essai en BRET par double-brillance de la  $\beta$ -arrestine.

La technique de BRET par double-brillance a pour but d'observer la conformation de la  $\beta$ -arrestine. Ainsi, la  $\beta$ -arrestine est fusionnée en N-terminal avec la luciférase et en C-terminal avec la YFP. La fixation du ligand sur le récepteur provoquera un changement de conformation au sein du récepteur ce qui engendrera le recrutement

de la  $\beta$ -arrestine. Ainsi, le recrutement au récepteur induira un réarrangement des deux extrémités de la  $\beta$ -arrestine, ce qui se traduira par un changement de BRET intramoléculaire. Des différences dans ces changements en fonction du ligand utilisé ont été interprétés comme traduisant des distances différentes entre les fluorophores, ce qui indique des conformations différentes adoptées par la  $\beta$ -arrestine (Shukla *et al.*, 2008).

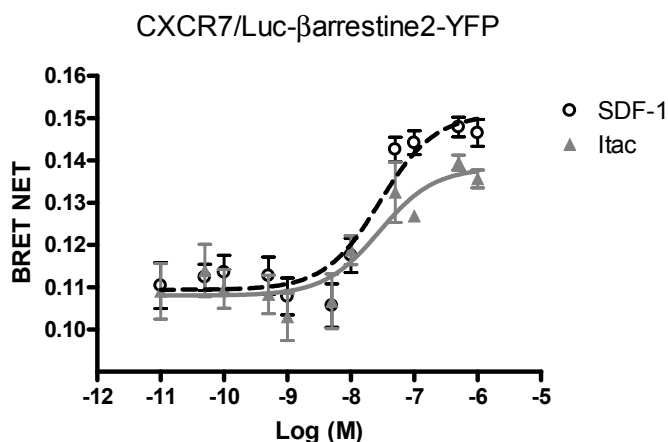
La figure 3.8 (p.67) montre que les courbes de dose-réponse induits par SDF-1 et ITAC se superposent jusqu'à un certain point. Toutefois, à plus hautes concentrations de chimiokine, les courbes de chaque ligand atteignent des maxima distincts (voir tableau IV p.67). Ceci suggère, selon l'interprétation de Shukla et al. que les différents ligands mèneraient à des conformations différentes de la  $\beta$ -arrestine (Shukla *et al.*, 2008). La figure 3.7 (p.63) et le tableau IV (p.67) montrent également que les deux ligands confèrent un  $EC_{50}$  semblable pour CXCR7.

La méthode utilisée pour vérifier le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 à la figure 3.1 (p.48) et celle utilisée dans ce contexte (figure 3.8, p.67) résultent en des valeurs des  $EC_{50}$  inchangés pour les chimiokines SDF-1 et ITAC. À la figure 3.1 (p.48), c'est l'interaction entre CXCR7 et la  $\beta$ -arrestine qui est observé et cette figure indique qu'environ 40nM de SDF-1 ou ITAC sont nécessaires pour induire la moitié de la réponse. Tandis qu'à la figure 3.8 (p.67), c'est la conformation de la  $\beta$ -arrestine seule qui est montrée. Toutefois, environ 30nM de ligands sont nécessaire pour observer la moitié de l'effet. Ainsi, le fait que les valeurs des  $EC_{50}$  soient semblables dans les deux méthodes indique que la fusion YFP sur le récepteur CXCR7 n'influe pas la valeur du  $EC_{50}$ , et renforce la fiabilité de cette quantification. .

En revanche, il serait nécessaire de répéter l'expérience encore quelque fois puisque la figure 3.8 représente seulement 2 expériences indépendantes. Ainsi, il n'y a pas encore de conclusion définitive. Toutefois, une interprétation alternative de ces données reste possible. La force du signal BRET dépend autant de la quantité de

protéines recrutées que de la conformation qu'elles adoptent. Ainsi, l'interprétation que nous faisons des résultats observés à la figure 3.1 (p.48) et à la figure 3.8 (p.67), suggère que les conformations adoptées par la  $\beta$ -arrestine soient différentes et spécifiques à chacune des chimiokines, et ceci, en stipulant que la quantité de récepteur et de  $\beta$ -arrestine soit la même dans les deux cas. En revanche, il n'est pas exclu que la  $\beta$ -arrestine adopterait une conformation identique en présence des deux chimiokines et que ce soit le nombre de molécules de  $\beta$ -arrestine recruté soit moindre en présence de ITAC. Dans ce cas, les BRET seraient également différents pour chacune des chimiokines tel qu'observé dans les figures 3.1 et 3.8. Cette alternative n'a pas été considéré par Shukla et al. dans l'interprétation de leurs données (Shukla *et al.*, 2008).

Sans pouvoir trancher actuellement entre ces possibilités de façon définitive, il reste à retenir que la différence en BRET<sub>max</sub> traduit dans les deux cas d'interprétation, des différences entre les effets des deux chimiokines.



**Figure 3.8 : Effet des ligands naturels du récepteur de chimiokine CXCR7 sur la conformation de la  $\beta$ -arrestine suite à son recrutement à CXCR7.** Co-expression transitoire dans des cellules HEK293 du récepteur CXCR7 de type sauvage sans fluorophore avec la  $\beta$ -arrestine2 fusionné en N-terminale à la luciférase, donneur d'énergie en BRET et en C-terminale à la eYFP, accepteur d'énergie en BRET. Les cellules co-exprimant les partenaires de BRET ont été stimulées au SDF-1 (cercle noir ouvert) et ITAC (triangle gris fermé) et ce, aux concentrations indiquées. Les mesures de BRET sont représentées en BRET<sub>net</sub>. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicatas. Pour l'analyse statistique voir le tableau IV (p.67).

**Tableau IV : Résumé de l'analyse des paramètres statistiques des courbes de doses-réponses de SDF-1 et ITAC sur la conformation de la  $\beta$ -arrestine suite à son recrutement à CXCR7 montrées à la figure 3.8 (p. 67).** Les valeurs de EC50 représentent la puissance des ligands à induire un changement de conformation au sein de la  $\beta$ -arrestine. La différence entre le maximum des 2 courbes est significative ( $p < 0.05$ ).

| ligands | EC <sub>50</sub> (nM) | logEC <sub>50</sub> ± SEM | maximum    | n |
|---------|-----------------------|---------------------------|------------|---|
| SDF-1   | 28                    | -7,55±0,01                | 0,15±0,003 | 2 |
| ITAC    | 29                    | -7,56±0,13                | 0,14±0,001 | 2 |

## **4. DISCUSSION**



#### **4.1. Interaction de TC14012 avec CXCR4 et CXCR7**

Les résultats obtenus au cours de cette maîtrise montrent que le Tc14012, analogue du T140, interagit avec le récepteur de chimiokine, CXCR7. Précédemment, AMD3100, un autre antagoniste de CXCR4 considéré sélectif, a été montré de lier CXCR7 (Kalatskaya). Ainsi, deux ligands anciennement considérés sélectifs pour CXCR4 interagissent également avec CXCR7. En plus, ces deux récepteurs lient tous les deux le même ligand endogène, soit la chimiokine SDF-1. Étant donné que AMD3100 et TC14012 ne partagent aucune similarité structurale, il est peu probable que leur liaison à CXCR7 soit fortuite, voire non-spécifique. Plutôt, nous pensons que des similarités structurales entre les deux récepteurs soient à la base des interactions croisées de leurs ligands, et ce malgré leur homologie de séquence limitée, soit seulement 31%. Effectivement, la surface d'interaction avec des ligands de CXCR7 pourrait être analogue à celle de CXCR4, malgré les différences de séquence primaire. Il serait alors recommandable que les inhibiteurs thérapeutiques synthétiques nouvellement développés pour cibler CXCR4 soient aussi testés sur CXCR7 afin de s'assurer de leur sélectivité.

Selon ce point de vue, le mode d'interaction des ligands serait alors similaire sur les deux récepteurs. Or, nos résultats démontrent que leurs effets ne le sont pas.

#### **4.2. Effets opposés du Tc14012 sur CXCR4 et CXCR7**

Tc14012 agit comme agoniste sur CXCR7, mais comme antagoniste sur CXCR4. Effectivement, T140 est décrit comme un agoniste inverse de CXCR4 (Zhang *et al.*, 2002). AMD3100 induit lui aussi le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7, mais non

à CXCR4 (Kalatskaya *et al.*, 2009). Les effets opposés du Tc14012 et de l'AMD3100 sur CXCR4 et CXCR7 indiquent un mécanisme d'activation différentiel du recrutement de la  $\beta$ -arrestine des deux récepteurs. En d'autres mots, des interactions entraînent des effets opposés. Nous avons identifié le corps du récepteur comme déterminant des ces effets opposés. Les résultats obtenus avec les récepteurs chimères montrent que c'est le corps de CXCR7 qui est déterminant pour l'activité agoniste du Tc14012 et de l'AMD3100 : tout comme CXCR7, le récepteur chimère CXCR7-CtermX4 recrute la  $\beta$ -arrestine suite à sa stimulation par les composés synthétiques. En revanche, CXCR4 et le récepteur chimère CXCR4-CtermX7 en sont incapables. Ceci laisse supposer que le corps de CXCR7 subit des réarrangements conformationnels suite à la liaison de ces ligands qui sont différents de ceux subis par CXCR4, et responsables de l'effet agoniste observé.

Ces résultats étaient inattendus puisqu'il a été montré que la partie C-terminale des deux récepteurs est un facteur de régulation des voies activées par la  $\beta$ -arrestine et même qu'elle pourrait être déterminante pour le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Ces éléments seront discutés dans la section suivante.

### **4.3. Rôle du C-terminal pour la puissance de la réponse à SDF-1**

Nos résultats montrent que la puissance avec laquelle la chimiokine SDF-1 induit le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR4 est faible (soit de 242nM). En revanche, la puissance de la réponse de CXCR7 induite par SDF-1 est beaucoup plus forte (30nM, soit 8 fois plus que pour CXCR4). Effectivement, la puissance de la réponse du chimère CXCR4-CtermX7 est similaire à celle de CXCR7 (soit 56nM et 30nM respectivement), et la puissance de la chimère CXCR7-Cterm4 est faible (200 nM) de manière similaire à CXCR4. Ainsi, nos résultats suggèrent que la partie C-terminale des récepteurs détermine leur puissance de recrutement de la  $\beta$ -arrestine.

Ces données sont en accord avec la description des C-terminaux de CXCR4 et CXCR7, respectivement, comme régulateurs du recrutement de la  $\beta$ -arrestine. En effet, pour CXCR4 il a été montré que la phosphorylation spécifique de certaines sérines (Ser346/8 et Ser351/2) par la kinase GRK3, est déterminante pour son recrutement de la  $\beta$ -arrestine2 (Busillo *et al.*, 2010). D'autre part, pour CXCR7, Zabel *et al.*, ont montré qu'une délétion des acides aminés 319 à 362, soit de sa partie C-terminale entière, résulte en une perte complète d'internalisation de CXCR7, ce que les auteurs interprètent comme une perte du recrutement de la  $\beta$ -arrestine (Zabel *et al.*, 2009). Cette interprétation est basé sur le fait que le recrutement de la  $\beta$ -arrestine aux récepteurs 7TM serait nécessaire pour le recrutement de partenaires responsables de l'endocytose tels les clathrines (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

#### **4.4. Rôle du recrutement de la $\beta$ -arrestine à CXCR7 pour sa fonction biologique**

Historiquement, le rôle biologique de la  $\beta$ -arrestine a été, dans un premier temps, largement limité à l'arrêt de la signalisation des protéines G hétérotrimériques, ainsi qu'à l'internalisation du récepteur. La vision du rôle biologique de CXCR7, et de l'implication de la  $\beta$ -arrestine dans ce contexte, sont largement influencées par cette perspective.

CXCR7 a été étiqueté comme «*scavenger receptor*» par Boldajipour *et al.*, indiquant que son seul rôle biologique serait d'éliminer des dépôts extracellulaires de SDF-1 afin de permettre la maintenance de gradient de cette chimiokine (Boldajipour *et al.*, 2008). Dans leur article, les auteurs montrent que, durant l'embryogenèse, la présence de CXCR7 sur des cellules mésenchymateuses, tout au long du trajet des cellules migrantes, est requise pour assurer la directionnalité de la migration. Ici, les cellules migrantes expriment CXCR4, mais ne co-expriment pas CXCR7. Cette définition de CXCR7 comme «*scavenger receptor*» s'inspire d'autres récepteurs de chimiokine atypiques, tels que le récepteur D6, qui exercent cette fonction. Le récepteur D6 est

exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques et interagit avec les chimiokines inflammatoires de type CC en induisant rapidement leur internalisation. Comme CXCR7, D6 ne semble pas signaler par les protéines G hétérotrimériques. En revanche, le récepteur D6 interagit de façon constitutive avec la  $\beta$ -arrestine et cette interaction serait essentielle pour son internalisation rapide (Galliera *et al.*, 2004).

Cependant, nos résultats montrent que CXCR7 n'interagit pas constitutivement avec la  $\beta$ -arrestine. En revanche, ceci fut le cas de la chimère CXCR7-CtermX4 qui en absence de ligand interagit de façon spontanée avec la  $\beta$ -arrestine. Pour D6, le recrutement constitutif de la  $\beta$ -arrestine résulte en une internalisation rapide de ce récepteur (Galliera *et al.*, 2004). Nous n'avons, dans le cadre de ce mémoire, pas étudié l'internalisation de CXCR7 ou du mutant CXCR7-CtermX4. Or, nos résultats de cytométrie en flux indiquent que le mutant CXCR7-CtermX4, interagissant constitutivement avec la  $\beta$ -arrestine, n'est pas moins (ou plutôt plus) exprimé à la surface cellulaire. Cette observation jette un doute sur le caractère impératif du lien entre endocytose et recrutement de la  $\beta$ -arrestine.

Effectivement, la chimère CXCR7-CtermX4 est plutôt plus exprimée à la surface cellulaire que le récepteur CXCR7. Cette différence d'expression en surface pourrait être interprétée de plusieurs manières. Tout d'abord, il se pourrait que la partie C-terminale du récepteur CXCR4 mène à une plus grande stabilité en surface de cette chimère, de sorte qu'elle s'accumulerait à la surface cellulaire. D'autre part, l'expression plus forte à la surface cellulaire de la chimère CXCR7-CtermX4 pourrait aussi être interprétée de la sorte que l'acheminement en surface de cette chimère est beaucoup plus rapide que le récepteur CXCR7. Aussi, il se pourrait que le mécanisme de recyclage de la chimère CXCR7-CtermX4 vers la membrane cellulaire soit plus rapide que celui du récepteur CXCR7. Il n'est pas non plus exclu que la combinaison des trois mécanismes contribue à une expression plus élevées en surface de la chimère CXCR7-CtermX4. De façon intéressante, cette chimère interagit constitutivement avec

la  $\beta$ -arrestine, mais son expression en surface demeure plutôt élevée comparativement aux autres récepteurs étudiés (figure 3.7 p.63). Il est possible que, dans ce contexte, la  $\beta$ -arrestine serait plus une protéine de signalisation plutôt qu'une protéine d'échafaudage servant à recruter les partenaires d'interactions nécessaires pour l'endocytose de la chimère. Toutefois, il n'est pas exclu que la  $\beta$ -arrestine soit requise, mais pas suffisante pour induire, à elle seule, l'endocytose.

Cependant, à ce jour, rien n'est connu sur le mécanisme d'endocytose de CXCR7. Si le recrutement de la  $\beta$ -arrestine et l'internalisation d'un récepteur 7TMR coïncident souvent, il est maintenant clair que les mécanismes d'internalisation des 7TMR's ne dépendent pas nécessairement de la  $\beta$ -arrestine. En effet, les mécanismes d'internalisation des 7TMR's peuvent être arrestine-clathrine dépendantes, arrestine-dépendante mais clathrine-indépendante et même arrestine-clathrine indépendantes. (Gurevich and Gurevich, 2006). Plutôt, le rôle de la  $\beta$ -arrestine peut être, comme dit dans l'introduction, celle d'une protéine de signalisation en amont d'autres cascades, telles que les MAPKinases. L'impact du recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 pour cette dernière voie a par ailleurs été confirmé (Rajagopal *et al.*, 2010).

Nous pensons que l'identité de CXCR7 comme exclusivement « récepteur silencieux » n'est pas suffisamment supporté par les données, mais dérive plutôt d'idées préconçues résultant d'anciens modèles du rôle biologique de la  $\beta$ -arrestine. À titre d'exemple, Zabel *et al.* montrent que l'élimination de la partie C-terminale de CXCR7 abolit l'endocytose de la chimiokine SDF-1. Ils interprètent leurs données comme démontrant un lien causal entre recrutement de la  $\beta$ -arrestine et l'endocytose de CXCR7. Or, les données montrent seulement un lien entre la partie C-terminale du récepteur et de son endocytose. À titre d'exemple pour d'autres implications de la  $\beta$ -arrestine, cette dernière est déterminante pour le recyclage du récepteur FPR en surface cellulaire et non pas pour son internalisation (Wagener *et al.*, 2009).

## 4.5. Perspectives

Le concept de promiscuité des chimiokines envers leurs récepteurs est une marque de commerce des ligands naturels des récepteurs de chimiokines (Proudfoot *et al.*, 2010). La redondance supposée des chimiokines les unes par rapport aux autres résulte du fait qu'une chimiokine peut lier plus qu'un récepteur et un récepteur peut lier plus qu'une chimiokine (Murphy *et al.*, 2000). Ainsi, le manque de sélectivité des chimiokines envers leurs récepteurs représente un problème lors du développement de nouvelles molécules thérapeutiques ayant pour cible les récepteurs de chimiokines. Jusqu'à maintenant, la présence d'effets opposés sur deux récepteurs de chimiokines différents induite par un même ligand synthétique, comme nous l'avons trouvé pour Tc14012, n'a jamais été rapportée dans la littérature (à l'exception de l'AMD3100 (Kalatskaya *et al.*, 2009)). Cependant, l'activité inverse sur deux récepteurs différents existe parmi des ligands naturels des récepteurs de chimiokine. En effet, la chimiokine, éotaxine-1, anciennement considérée comme exclusive pour le récepteur CCR3, a été identifiée comme liant aussi les récepteurs CCR2 et CCR5. Or, éotaxine-1 induit l'internalisation des récepteurs CCR3 et CCR5, mais non celle du récepteur CCR2. Ainsi, l'éotaxine-1 agit comme agoniste sur CCR3 et CCR5, et comme antagoniste sur CCR2 (Ogilvie *et al.*, 2001).

Le fait d'agir comme agoniste sur un récepteur et antagoniste sur un autre récepteur peut représenter un avantage. À titre d'exemple, l'activation simultanée du récepteur  $\mu$ -opioïde (MOR) et l'inhibition du récepteur  $\delta$ -opioïde (DOR) réduisent les effets secondaires de certains analgésiques (ex. morphine) en ce qui concerne la tolérance et la dépendance (Schiller, 2009).

CXCR7 et CXCR4 sont impliqués dans le cancer. Nous pensons que l'activation de CXCR7 et l'inhibition de CXCR4 pourrait représenter un avantage dans le développement de molécules thérapeutiques pour le traitement du cancer. L'inhibition de CXCR4 représenterait un avantage à différentes étapes dans le

développement du cancer. Celles-ci incluent la prolifération cellulaire et la dissémination métastatique (Miller *et al.*, 2008).

De plus, des ligands synthétiques et sélectifs pour CXCR7, nommés CCX451, CCX754 et CCX771 réduisent la prolifération tumorale (Burns *et al.*, 2006) (Zabel *et al.*, 2009). Or, le ligand CCX771 s'est avéré être un agoniste pour le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7 (Zabel *et al.*, 2009). C'est alors l'activation de CXCR7 par CCX771, et non pas son inhibition qui aurait pour effet de réduire la prolifération tumorale. Ainsi, l'inhibition de CXCR4 et l'activation de CXCR7, simultanées, est potentiellement intéressante pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement du cancer.

## **5. CONCLUSION**



## **CONCLUSION :**

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous avons présentés l'interaction d'un autre antagoniste synthétique du récepteur de chimiokine, CXCR4, TC14012 sur le récepteur CXCR7. Tout comme pour AMD3100, un antagoniste anciennement considéré sélectif pour CXCR4, TC14012 induit, lui aussi, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7, mais non pas à CXCR4. Basé sur ces données, il est clair que deux antagonistes de CXCR4 agissent comme agonistes sur le récepteur CXCR7, du moins en ce qui concerne le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. Or, malgré le fait que la  $\beta$ -arrestine soit recrutée en partie C-terminale des récepteurs à sept passages transmembranaires, nos résultats indiquent que cette dernière n'est pas responsable de l'effet agoniste des antagonistes synthétiques de CXCR4 sur CXCR7. En revanche, cela indique que c'est, plutôt, le réarrangement spatial de la structure composant le corps du récepteur qui est responsable de ce tel effet.

Bref, AMD3100 et TC14012 sont deux molécules synthétiques qui ne sont pas sélectifs pour CXCR4. En effet, leur interaction sur CXCR7 ne permette pas de déceler les effets respectifs de SDF-1 sur CXCR4. Ainsi, lors du développement de nouvelles molécules synthétiques ciblant CXCR4, il serait alors nécessaire d'en évaluer leur sélectivité, et leurs effets en les testant aussi sur CXCR7.

En perspective, nous avons démontré que les déterminants de l'effet agoniste des inhibiteurs de CXCR4 sur le récepteur CXCR7 résident dans la structure du corps du récepteur, et non pas au niveau de la partie C-terminale. La prochaine étape serait l'identification, dans la structure du corps de CXCR7, des résidus responsables de l'effet agoniste des inhibiteurs de CXCR4 et ce, par modélisation moléculaire. Ces modélisations devraient être confirmées par l'analyse de mutants correspondants de CXCR7. Suite à l'identification des résidus clés dans la structure de CXCR7, il serait possible de développer des antagonistes ou des agonistes sélectifs à l'un ou l'autre des deux récepteurs et d'en évaluer leur potentiel thérapeutique dans le cancer.

Aussi, rien n'est encore connu sur le mécanisme d'internalisation du récepteur CXCR7. La  $\beta$ -arrestine peut permettre l'internalisation d'un 7TMR's, mais peut ne pas être suffisante à son internalisation. En effet, les mécanismes d'internalisation des 7TMR's peuvent être arrestine-clathrine dépendantes, arrestine-dépendante mais clathrine-indépendante et même arrestine-clathrine indépendantes. (Gurevich and Gurevich, 2006).

En revanche, la  $\beta$ -arrestine peut aussi être une molécule de signalisation engendrant l'activation de voies de signalisation telles que la voie MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), la voie AKT ou PKB, les PI3 kinases, la voie NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*), la voie JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) et même l'activation de Mdm2, une E3 ubiquitine ligase, qui aura pour effet de cibler le récepteur par le protéasome ce qui sera nécessaire pour sa dégradation (Shenoy and Lefkowitz, 2003) (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Ainsi, une autre étape essentielle à ce travail sera d'étudier l'activation de ces voies par la  $\beta$ -arrestine via le récepteur CXCR7.

D'ailleurs, une étude récente a montré que CXCR7 interagit de façon constitutive avec la sous-unité G $\alpha$ i sans toutefois engendrer son activation (Levoye *et al.*, 2009). Ainsi, il se pourrait que CXCR7 soit couplé à des sous-unités G $\alpha$ i atypiques ou non-canoniques, telles que la G $\alpha_{12-16}$ , ce qui pourrait permettre ainsi, leur activation (Offermanns, 2003).

## **6. RÉFÉRENCES**

## RÉFÉRENCES

- Autelitano D. J. (1998) Cardiac expression of genes encoding putative adrenomedullin/calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 689-693.
- Ayoub M. A. & Pflieger K. D. (2010) Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 44-52.
- Azzi M., Charest P. G., Angers S., Rousseau G., Kohout T., Bouvier M. & Pineyro G. (2003) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11406-11411.
- Balabanian K., Lagane B., Infantino S., Chow K. Y., Harriague J., Moepps B., Arenzana-Seisdedos F., Thelen M. & 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.
- Berchiche Y. A., Chow K. Y., Lagane B., Leduc M., Percherancier Y., Fujii N., Tamamura H., Bachelier F. & Heveker N. (2007) Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. *J Biol Chem* **282**, 5111-5115.
- Bleul C. C., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark-Lewis I., Sodroski J. & Springer T. A. (1996a) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**, 829-833.
- Bleul C. C., Fuhlbrigge R. C., Casasnovas J. M., Aiuti A. & Springer T. A. (1996b) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* **184**, 1101-1109.
- Boldajipour B., Mahabaleswar H., Kardash E., Reichman-Fried M., Blaser H., Minina S., Wilson D., Xu Q. & Raz E. (2008) Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* **132**, 463-473.
- Boulais P. E., Dulude D., Cabana J., Heveker N., Escher E., Lavigne P. & Leduc R. (2009) Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site. *Biochem Pharmacol* **78**, 1382-1390.
- Bouvier M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 274-286.
- 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. & 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.
- Busillo J. M., Armando S., Sengupta R., Meucci O., Bouvier M. & Benovic J. L. (2010) Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem* **285**, 7805-7817.
- Busillo J. M., Armandooffermanns S., Sengupta R., Meucci O., Bouvier M. & Benovic J. L. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically

- regulated by multiple kinases and results G-proteins as transducers in differential modulation of CXCR4 signaling transmembrane signalling. *J Prog Biophys Mol Biol Chem*.
- Cheng Y. & Prusoff W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**, 3099-3108.
- Cueille C., Pidoux E., De Vernejoul M. C., Ventura-Clapier R. & Garel J. M. (2002) Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 340-346.
- 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., Yamamoto N., Pauwels R., Baba M., Schols D., Nakashima H., Balzarini J., Debyser Z., Murrer B. A., Schwartz D. & Et Al. (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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5286-5290.
- De Lean A., Stadel J. M. & Lefkowitz R. J. (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **255**, 7108-7117.
- De Vreese K., Van Nerum I., Vermeire K., Anne J. & De Clercq E. (1997) Sensitivity of human immunodeficiency virus to bicyclam derivatives is influenced by the three-dimensional structure of gp120. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2616-2620.
- Dewire S. M., Ahn S., Lefkowitz R. J. & Shenoy S. K. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**, 483-510.
- Fredriksson R., Lagerstrom M. C., Lundin L. G. & Schioth H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272.
- Gales C., Rebois R. V., Hogue M., Trieu P., Breit A., Hebert T. E. & Bouvier M. (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**, 177-184.
- Gales C., Van Durm J. J., Schaak S., Pontier S., Percherancier Y., Audet M., Paris H. & Bouvier M. (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 778-786.
- Galliera E., Jala V. R., Trent J. O., Bonecchi R., Signorelli P., Lefkowitz R. J., Mantovani A., Locati M. & Haribabu B. (2004) beta-Arrestin-dependent constitutive internalization of the human chemokine decoy receptor D6. *J Biol Chem* **279**, 25590-25597.
- Gether U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**, 90-113.
- Grymula K., Tarnowski M., Wysoczynski M., Drukala J., Barr F. G., Ratajczak J., Kucia M. & 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*.
- Gurevich V. V. & Gurevich E. V. (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **110**, 465-502.
- Hamdan F. F., Audet M., Garneau P., Pelletier J. & Bouvier M. (2005) High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* **10**, 463-475.
- Haraldsen G. & Rot A. (2006) Coy decoy with a new ploy: interceptor controls the levels of homeostatic chemokines. *Eur J Immunol* **36**, 1659-1661.
- Hartmann T. N., Grabovsky V., Pasvolksy R., Shulman Z., Buss E. C., Spiegel A., Nagler A., Lapidot T., Thelen M. & 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.
- Horuk R. (2001) Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 313-335.
- Infantino S., Moepps B. & Thelen M. (2006) Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol* **176**, 2197-2207.
- Jin Z., Nagakubo D., Shirakawa A. K., Nakayama T., Shigeta A., Hieshima K., Yamada Y. & Yoshie O. (2009) CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. *Int J Cancer* **125**, 2229-2235.
- Kalatskaya I., Berchiche Y. A., Gravel S., Limberg B. J., Rosenbaum J. S. & Heveker N. (2009) AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol* **75**, 1240-1247.
- Kenakin T. (2007) Allosteric agonist modulators. *J Recept Signal Transduct Res* **27**, 247-259.
- Kenakin T. (2009) Quantifying Biological Activity in Chemical Terms: A Pharmacology Primer to Describe Drug Effect. *ACS Chem Biol*.
- Kenakin T. P. (2010) Ligand detection in the allosteric world. *J Biomol Screen* **15**, 119-130.
- Lefkowitz R. J. & Shenoy S. K. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**, 512-517.
- Levoye A., Balabanian K., Baleux F., Bachelier F. & Lagane B. (2009) CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* **113**, 6085-6093.
- Li M. & Ransohoff R. M. (2008) Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* **84**, 116-131.
- Libert F., Parmentier M., Lefort A., Dinsart C., Van Sande J., Maenhaut C., Simons M. J., Dumont J. E. & Vassart G. (1989) Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* **244**, 569-572.

- Libert F., Passage E., Parmentier M., Simons M. J., Vassart G. & Mattei M. G. (1991) Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor. *Genomics* **11**, 225-227.
- Liles W. C., Broxmeyer H. E., Rodger E., Wood B., Hubel K., Cooper S., Hangoc G., Bridger G. J., Henson G. W., Calandra G. & Dale D. C. (2003) Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* **102**, 2728-2730.
- Liles W. C., Rodger E., Broxmeyer H. E., Dehner C., Badel K., Calandra G., Christensen J., Wood B., Price T. H. & Dale D. C. (2005) Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion* **45**, 295-300.
- Maksym R. B., Tarnowski M., Grymula K., Tarnowska J., Wysoczynski M., Liu R., Czerny B., Ratajczak J., Kucia M. & Ratajczak M. Z. (2009) The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol* **625**, 31-40.
- Mercier J. F., Salahpour A., Angers S., Breit A. & Bouvier M. (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277**, 44925-44931.
- Miao Z., Luker K. E., Summers B. C., Berahovich R., Bhojani M. S., Rehemtulla A., Klier C. G., Essner J. J., Nasevicius A., Luker G. D., Howard M. C. & Schall T. J. (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15735-15740.
- Miller R. J., Banisadr G. & Bhattacharyya B. J. (2008) CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *J Neuroimmunol* **198**, 31-38.
- Moepps B., Nuessler E., Braun M. & Gierschik P. (2006) A homolog of the human chemokine receptor CXCR1 is expressed in the mouse. *Mol Immunol* **43**, 897-914.
- Murphy P. M., Baggiolini M., Charo I. F., Hebert C. A., Horuk R., Matsushima K., Miller L. H., Oppenheim J. J. & Power C. A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 145-176.
- Odemis V., Boosmann K., Heinen A., Kury P. & Engele J. (2010) CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. *J Cell Sci* **123**, 1081-1088.
- 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. & Ugucioni M. (2001) Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* **97**, 1920-1924.

- Percherancier Y., Berchiche Y. A., Slight I., Volkmer-Engert R., Tamamura H., Fujii N., Bouvier M. & Heveker N. (2005) Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **280**, 9895-9903.
- Pin J. P., Neubig R., Bouvier M., Devi L., Filizola M., Javitch J. A., Lohse M. J., Milligan G., Palczewski K., Parmentier M. & Spedding M. (2007) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev* **59**, 5-13.
- Pineyro G. (2009) Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cell Signal* **21**, 179-185.
- Ponomaryov T., Peled A., Petit I., Taichman R. S., Habler L., Sandbank J., Arenzana-Seisdedos F., Magerus A., Caruz A., Fujii N., Nagler A., Lahav M., Szyper-Kravitz M., Zipori D. & Lapidot T. (2000) Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* **106**, 1331-1339.
- Proudfoot A. E., Power C. A. & Schwarz M. K. (2010) Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert Opin Investig Drugs* **19**, 345-355.
- Raggio C., Ruhl R., Mcallister S., Koon H., Dezube B. J., Fruh K. & Moses A. V. (2005) Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer Res* **65**, 5084-5095.
- Rajagopal S., Kim J., Ahn S., Craig S., Lam C. M., Gerard N. P., Gerard C. & 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.
- Schiller P. W. (2009) Bi- or multifunctional opioid peptide drugs. *Life Sci* **86**, 598-603.
- Schols D., Este J. A., Henson G. & De Clercq E. (1997) Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. *Antiviral Res* **35**, 147-156.
- Shenoy S. K. & Lefkowitz R. J. (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* **375**, 503-515.
- Shimizu N., Soda Y., Kanbe K., Liu H. Y., Mukai R., Kitamura T. & Hoshino H. (2000) A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **74**, 619-626.
- Shirozu M., Nakano T., Inazawa J., Tashiro K., Tada H., Shinohara T. & Honjo T. (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* **28**, 495-500.
- Shukla A. K., Violin J. D., Whalen E. J., Gesty-Palmer D., Shenoy S. K. & Lefkowitz R. J. (2008) Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9988-9993.
- 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. & Mackay F. (2007) Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14759-14764.
- Sodhi A., Montaner S. & Gutkind J. S. (2004) Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 998-1012.
- Stephenson R. P. (1956) A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* **11**, 379-393.
- Sun Y., Cheng Z., Ma L. & Pei G. (2002) Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **277**, 49212-49219.
- Tamamura H. & Fujii N. (2005) The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets* **9**, 1267-1282.
- Tamamura H., Omagari A., Hiramatsu K., Gotoh K., Kanamoto T., Xu Y., Kodama E., Matsuoka M., Hattori T., Yamamoto N., Nakashima H., Otaka A. & Fujii N. (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.
- Tamamura H., Xu Y., Hattori T., Zhang X., Arakaki R., Kanbara K., Omagari A., Otaka A., Ibuka T., Yamamoto N., Nakashima H. & Fujii N. (1998) A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 877-882.
- Thelen M. (2001) Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* **2**, 129-134.
- Thelen M. & Thelen S. (2008) CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* **198**, 9-13.
- Van Coillie E., Van Damme J. & Opdenakker G. (1999) The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* **10**, 61-86.
- Vandercappellen J., Van Damme J. & Struyf S. (2008) The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* **267**, 226-244.
- Vauquelin G. & Van Liefde I. (2005) G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundam Clin Pharmacol* **19**, 45-56.
- Wagener B. M., Marjon N. A., Revankar C. M. & Prossnitz E. R. (2009) Adaptor protein-2 interaction with arrestin regulates GPCR recycling and apoptosis. *Traffic* **10**, 1286-1300.
- Wang J., Shiozawa Y., Wang Y., Jung Y., Pienta K. J., Mehra R., Loberg R. & 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.
- Wang J. F., Park I. W. & Groopman J. E. (2000) Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* **95**, 2505-2513.
- Wei H., Ahn S., Shenoy S. K., Karnik S. S., Hunyady L., Luttrell L. M. & 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.

- 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. & 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.
- Zhang W. B., Navenot J. M., Haribabu B., Tamamura H., Hiramatu K., Omagari A., Pei G., Manfredi J. P., Fujii N., Broach J. R. & Peiper S. C. (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., Whalen E. J. & Lefkowitz R. J. (2009) Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9649-9654.
- Zlotnik A. & Yoshie O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127.