

Université de Montréal

Étude de la relation entre les conformations et la signalisation des 7TMRs

Par

Yamina A. Berchiche

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Doctorat en Biochimie

Décembre 2010

© Yamina A. Berchiche (2010)

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude de la relation entre les conformations et la signalisation des 7TMRs

Présentée par :
Yamina A. Berchiche

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Michel Bouvier
Président-rapporteur

Dr Nikolaus Heveker
Directeur de recherche

Dr Jana Stankova
Membre du jury

Dr Ali Salahpour
Membre externe du jury

Dr Guy Rousseau
Représentant du doyen

Remerciements

Tout d'abord un grand merci au Dr Nikolaus Heveker pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie pour sa disponibilité, ses encouragements perpétuels.

Ce périple n'aurait pas été le même sans les Drs Michel Bouvier et Terry Hébert, membres de mon comité de thèse. Merci pour les discussions enrichissantes.

J'aimerais remercier mes collègues de travail, anciens et présents pour l'aide qu'ils m'ont apporté ainsi que pour leur support. Un merci tout particulier au Dr Yann Percherancier qui aura été le mentor m'ayant appris les règles du parfait petit BRET-teur.

Merci aux merveilleuses personnes ressources au Département de Biochimie de l'Université de Montréal, en particulier Sylvie Beauchemin, et au Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine.

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude envers les généreux organismes subventionnaires qui m'ont accordé des bourses.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

J'aimerais aussi souligner l'importance de ma famille et de mes amis sans qui je n'aurais pas pu évoluer de cette façon

Je dédie cette thèse à Attila.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des sigles et abréviations	v
Introduction	1
1. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires.....	1
1.1 Classification des récepteurs.....	2
1.2 Signalisation induite par les 7TMRs	4
1.2.2 Transmission et arrêt du signal par les protéines G	8
1.2.3 La beta-arrestine:.....	10
1.2.4 Atténuation de la signalisation par les protéines G.....	12
1.2.5 Autres partenaires d'interaction / signalisation possible.....	16
1.3 Motifs et résidus importants des récepteurs de la famille R (rhodopsine)...	17
1.3.1 Le motif E/DRY	18
1.3.2 Le motif N(L/F)YSS	20
2. Interactions des ligands avec les récepteurs.....	21
2.1 Ligands des 7TMRs	21
2.2 Propriétés pharmacologiques des ligands	24
3. Activation des 7TMRs	26
3.1 Le récepteur vu comme un interrupteur- Marche/Arrêt.....	26
3.2 Conformations intermédiaires du récepteur	28
3.3 L'espace conformationnel et la vision probabiliste des récepteurs.....	31
3.3.1 La sélectivité fonctionnelle	32
4. Les chimiokines et leurs récepteurs	35
4.1 Les chimiokines	35
4.1.1 Structure générale	35
4.1.2 Classification et nomenclature	36
4.2 Les récepteurs de chimiokine.....	37
4.2.1 Classification.....	38
4.2.2 Propriétés	38
4.2.3 Les contacts récepteur/chimiokine.....	39
4.2.4 Oligomérisation des récepteurs de chimiokines.....	39
5. CXCR4.....	40
5.1 Signalisation.....	41

5.2 Expression et rôles	42
5.3 Mobilisation et domiciliation des cellules souches hématopoïétiques.....	43
5.4 Dissémination des métastases dans les cancers épithéliaux.....	45
6. CXCR7.....	48
6.1 Récepteur alternatif de la chimiokine SDF-1.....	48
6.2 Signalisation atypique de CXCR7	49
6.3 Expression cellulaire et tissulaire.....	51
6.4 CXCR7 et le cancer.....	52
6.5 Le rôle de CXCR7 par rapport à CXCR4	53
6.5.1 Rôle de CXCR7 comme récepteur «decoy»	53
6.5.2 CXCR7 comme « régulateur direct » de CXCR4	55
7. Inhibiteurs synthétiques de CXCR4.....	56
7.1 AMD3100 / Mozobil / Plerixafor.....	57
7.2 Les peptides T22/T140/TC14012	59
8. Ligands synthétiques de CXCR7	62
9. Interaction récepteur/chimiokine	64
10. CCR2.....	65
10.1 Signalisation.....	66
10.2 Ligands naturels de CCR2	67
10.3 Le récepteur CCR2 et ses 7 ligands naturels.....	68
Objectifs de la thèse	71
Résultats	73
Article 1.....	74
Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(α)(i) activation.....	74
Article 2.....	95
Different effects of the different natural CC-chemokine receptor 2B (CCR2B) ligands on β -arrestin recruitment, G α _i signalling, and receptor internalization.....	95
Article 3.....	138
AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties.....	138
Discussion	167
Conclusion	186
Perspectives.....	188

Références 190

Liste des tableaux

Tableau I. Les protéines G hétérotrimériques et leurs principaux effecteurs.	5
Tableau II Promiscuité récepteur/chimiokine	65

Liste des figures

Figure 1 Représentation schématique d'un récepteur	2
Figure 2 La protéine G hétérotrimérique.	7
Figure 3 Le cycle classique de la protéine G hétérotrimérique.....	9
Figure 4 La beta-arrestine	10
Figure 5 Rôles de la beta-arrestine.....	12
Figure 6 Interaction récepteur/beta-arrestine.	15
Figure 7 Le motif E/DRY.	19
Figure 8 Propriétés des ligands	23
Figure 9 Ligands allostériques et orthostériques.....	24
Figure 10 Paramètres pharmacologiques	26
Figure 11 Modèles pharmacologiques classiques de l'activation des récepteurs	28
Figure 12 Modèle de liaison séquentielle et de la sélection conformationnelle	29
Figure 13 Le paysage conformationnel du récepteur.....	31
Figure 14 Représentation schématique de la sélectivité fonctionnelle	32
Figure 15 Représentation schématique d'une chimiokine.	36
Figure 16 Classification des chimiokines et leurs récepteurs	37
Figure 17 Domiciliation des cellules souches hématopoïétiques.....	44
Figure 18 L'axe CXCR4/SDF-1 dans la dissémination de métastases du cancer du sein	47
Figure 19 Structure de l'AMD3100	57
Figure 20 Séquences des peptides T122 et de ces analogues T140 et TC14012	60

Résumé

L'interaction d'un ligand avec un récepteur à sept domaines transmembranaires (7TMR) couplé aux protéines G, mène à l'adoption de différentes conformations par le récepteur. Ces diverses conformations pourraient expliquer l'activation différentielle des voies de signalisation. Or, le lien entre la conformation et l'activité du récepteur n'est pas tout à fait claire. Selon les modèles classiques pharmacologiques, comme le modèle du complexe ternaire, il n'existe qu'un nombre limité de conformations qu'un récepteur peut adopter.

Afin d'établir un lien entre la structure et la fonction des récepteurs, nous avons choisi dans un premier temps, le récepteur de chimiokine CXCR4 comme récepteur modèle. Ce dernier, est une cible thérapeutique prometteuse, impliqué dans l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles et dans la dissémination de métastases cancéreuses. Grâce au transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) nous pouvons détecter les changements conformationnels des homodimères constitutifs de CXCR4 dans les cellules vivantes. En conséquence, nous avons mesuré les conformations de mutants de CXCR4 dont les mutations affecteraient sa fonction. Nous montrons que la capacité des mutants à activer la protéine G α i est altérée suite au traitement avec l'agoniste SDF-1. Notamment, ces mutations altèrent la conformation du récepteur à l'état basal ainsi que la réponse conformationnelle induite suite au traitement avec l'agoniste SDF-1, l'agoniste partiel AMD3100 ou l'agoniste inverse TC14012. Ainsi, différentes conformations de CXCR4 peuvent donner lieu à une activation similaire de la protéine G, ce qui implique une flexibilité des récepteurs actifs qui ne peut pas être expliquée par le modèle du complexe ternaire (Berchiche et al. 2007).

Également, nous nous sommes intéressés au récepteur de chimiokine CCR2, exprimé à la surface des cellules immunitaires. Il joue un rôle important dans l'inflammation et dans des pathologies inflammatoires telles que l'asthme. CCR2 forme des homodimères constitutifs et possède différents ligands naturels dont la redondance fonctionnelle a été suggérée. Nous avons étudié le lien entre les conformations et les activations d'effecteurs (fonctions) de CCR2. Notre hypothèse

est que les différents ligands naturels induisent différentes conformations du récepteur menant à différentes fonctions. Nous montrons que les réponses de CCR2 aux différents ligands ne sont pas redondantes au niveau pharmacologique et que les chimiokines CCL8, CCL7 et CCL13 (MCP-2 à MCP-4) sont des agonistes partiels de CCR2, du moins dans les systèmes que nous avons étudiés. Ainsi, l'absence de redondance fonctionnelle parmi les chimiokines liant le même récepteur, ne résulterait pas de mécanismes complexes de régulation *in vivo*, mais ferait partie de leurs propriétés pharmacologiques intrinsèques (Berchiche et al. 2011).

Enfin, nous nous sommes intéressés au récepteur de chimiokine CXCR7. Récemment identifié, CXCR7 est le deuxième récepteur cible de la chimiokine SDF-1. Cette chimiokine a été considérée comme étant capable d'interagir uniquement avec le récepteur CXCR4. Notamment, CXCR4 et CXCR7 possèdent un patron d'expression semblable dans les tissus. Nous avons évalué l'effet de l'AMD3100, ligand synthétique de CXCR4, sur la conformation et la signalisation de CXCR7. Nos résultats montrent qu'AMD3100, tout comme SDF-1, lie CXCR7 et augmente la liaison de SDF-1 à CXCR7. Grâce au BRET, nous montrons aussi qu'AMD3100 seul est un agoniste de CXCR7 et qu'il est un modulateur allostérique positif de la liaison de SDF-1 à CXCR7. Aussi, nous montrons pour la première fois le recrutement de la beta-arrestine 2 à CXCR7 en réponse à un agoniste. L'AMD3100 est un ligand de CXCR4 et de CXCR7 avec des effets opposés, ce qui appelle à la prudence lors de l'utilisation de cette molécule pour l'étude des voies de signalisation impliquant SDF-1 (Kalatskaya et al. 2009).

En conclusion, nos travaux amènent des évidences qu'il existe plusieurs conformations actives des récepteurs et appuient les modèles de structure-activité des récepteurs qui prennent en considération leur flexibilité conformationnelle.

Mots-clés : 7TMR, récepteur de chimiokine, CXCR4, CXCR7, CCR2, BRET, SDF-1, TC14012, AMD3100, beta-arrestine, homodimère, protéine G.

Abstract

Ligand binding to 7TMRs is thought to induce conformational changes within the receptor that translate into activation of downstream effectors. The link between receptor conformation and activity is still poorly understood, as current models of receptor activation fail to take an increasing amount of experimental data into account. Classical pharmacological models such as the ternary complex model are based on the concept that receptors can only adopt a limited number of conformations.

To clarify structure-function relationships in 7TMRs, first we studied chemokine receptor CXCR4. This receptor is an important drug target, involved in HIV-1 entry and cancer metastasis. Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) allows us to directly probe conformational changes within pre-formed CXCR4 homodimers in live cells. Using BRET, we measured the conformation of CXCR4 mutants and we also monitored their function by measuring their ability to induce G α i activation. The analyzed mutants had substitutions in locations which are pivotal molecular switches for receptor conformation and activation. We show that agonist induced G α i activation is altered for most mutants. These mutations also alter CXCR4's conformation at basal conditions (in absence of ligand) and in the presence of the agonist, SDF-1, the partial agonist, AMD3100 and the inverse agonist, TC14012. Moreover, different conformations of active receptors were detected in the presence of SDF-1, suggesting that different receptor conformations are able to trigger G α i activity. These data provide biophysical evidence for different active receptor conformations, that cannot be explained by classical models of receptor function (Berchiche et al. 2007).

Furthermore, the second part of our work focused on chemokine receptor CCR2. Mainly expressed on immune cells, CCR2 is involved in many inflammatory and vascular diseases. This receptor binds seven natural ligands that have been referred to as redundant. We set out to explore whether the different chemokine ligands of CCR2 receptor induce different conformational changes leading to different functional consequences. Our results show that the different natural ligands

of CCR2 are not pharmacologically redundant. Moreover, chemokines CCL8, CCL7 and CCL13 (MCP-2 to MCP-4) are partial agonists of CCR2, at least in the systems we used. Our results support the validity of models for receptor-ligand interactions in which different ligands stabilize different receptor conformations also for endogenous receptor ligands, demonstrating that these natural ligands are not pharmacologically and functionally redundant (Berchiche et al. 2011).

As the third part of this work, we studied chemokine receptor CXCR7, the alternative receptor for SDF-1. Until recently, CXCR4 was the only receptor known to bind SDF-1. Moreover, the expression patterns are similar for receptors CXCR4 and CXCR7. Therefore, we investigated the conformational and functional consequences of the synthetic inhibitor of CXCR4, AMD3100, on CXCR7. We show that AMD3100 also binds the alternative SDF-1 receptor, CXCR7. SDF-1 or AMD3100 alone trigger beta-arrestin recruitment to CXCR7, which we identify as a previously unreported signalling pathway of CXCR7. In addition, AMD3100 has positive allosteric effects on SDF-1 binding to CXCR7, on SDF-1-induced conformational rearrangements in the receptor dimer as measured by BRET, and on SDF-1-induced beta-arrestin recruitment to CXCR7. The finding that AMD3100 not only binds CXCR4, but also to CXCR7, with opposite effects on the two receptors, call for caution in the use of this compound as a tool to dissect SDF-1 effects on the respective receptors *in vitro* and *in vivo*.

Finally, these data provide biophysical evidence for different active receptor conformations, and support models of 7TMR structure-activity relationships that take conformational heterogeneity into account.

Keywords: 7TMR, chemokine receptor, CXCR4, CXCR7, CCR2, BRET, SDF-1, AMD3100, TC14012, beta-arrestin, receptor homodimer, G protein

Liste des sigles et abréviations

7TM	Sept domaines transmembranaires
A	Alanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	3,5-adénosine monophosphate
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
CAM	Mutant constitutivement actif
CHO	Chinese hamster ovaries
CSH	Cellule souche hématopoïétique
C-terminale	Carboxy-terminale
CTX	Cholera toxin
D	Acide aspartique
E	Acide glutamique
ERK	Extracellular signal regulated kinase
F	Phenylalanine
G	Glycine
GABA	γ -aminobutyric acid
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GRK	G-protein couple receptor kinase
GSK	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine triphosphate
HEK293	Human embryonic kidney
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
ITAC	Interferon-inducible T cell α chemoattractant
JAK	Janus kinase
K	Lysine
L	Leucine
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCP	Monocyte chemoattractant protein

MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein 1 α
MMP	Matrix metalloprotease
N	Asparagine
NF κ B	Nuclear factor κ B
N-terminale	Amino-terminale
pbFRET	Photobleaching Fluorescence Resonance Energy transfer
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-kinase
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PP2A	Protein phosphatase 2A
PTX	Pertussis toxin
Q	Glutamine
R	Arginine
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RGS	Regulators of G-protein signalling
Rluc	Renilla luciférase
S	Sérine
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
Src	Steroid receptor coactivator
STAT	Signal transducer and activator of transcription
V2R	Récepteur V2 de la vasopressine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
Y	Tyrosine
YFP	Yellow fluorescent protein
γ IP10	γ interferon inducible protein 10

Introduction

1. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires (7TMR) sont la cible de près de la moitié des médicaments prescrits, tandis qu'ils représentent de 3% à 4% du génome humain (Flower 1999; Foord 2002). Ils sont exprimés à la surface de tous les types cellulaires et gouvernent ainsi une pléthore de phénomènes physiologiques (Overington et al. 2006). Les 7TMRs sont responsables de la transduction de signaux intracellulaires suite à la reconnaissance de molécules extracellulaires nommées ligands. Les ligands des récepteurs sont très variés et peuvent être des acides aminés, des nucléotides, des hormones, des peptides, des photons, des molécules odorantes, et même des ions (Wess 1998; Flower 1999; Muller 2000; Lin and Civelli 2004).

Les récepteurs sont constitués de sept hélices alpha hydrophobes séparés par trois boucles hydrophiles respectivement intracellulaires (i_1 , i_2 et i_3) et extracellulaires (e_1 , e_2 et e_3). Ils possèdent une partie amino-terminale (N-terminale) extracellulaire ainsi qu'une partie carboxy-terminale (C-terminale) intracellulaire (Gether 2000; Muller 2000) (Figure 1). La partie N-terminale et les boucles extracellulaires forment l'interface d'interaction avec le milieu extracellulaire. À l'opposé, les boucles intracellulaires et la partie C-terminale sont essentielles à l'interaction avec des partenaires comme les protéines G hétérotrimériques, et sont la cible de kinases comme les GRK (*G Protein Receptor Kinase*) (Oldham 2006).

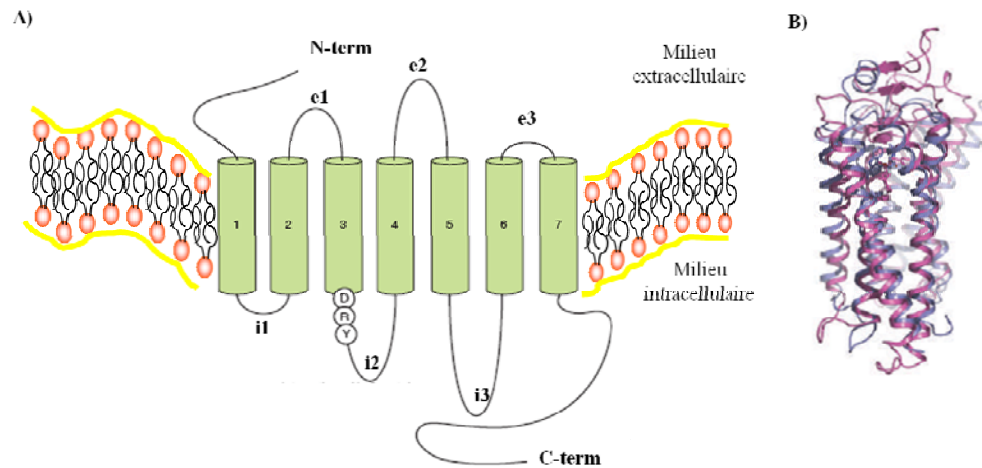


Figure 1 Représentation schématique d'un récepteur

A) Le récepteur possède sept domaines transmembranaires (vert), des boucles extracellulaires (e1 à e3) et intracellulaires (i1 à i3), un motif DRY ainsi qu'une partie N- et une partie C-terminale. Adapté à partir de Stanfield et al. (Stanfield 2006). B) La structure de la rhodopsine bovine (mauve) est superposée à la structure du récepteur β 2-adrénergique (bleu), les récepteurs sont positionnés dans le même sens que la représentation en A). Tiré de Rosenbaum et al. (Rosenbaum et al. 2009).

1.1 Classification des récepteurs

Dans un premier temps, les 7TMRs ont été classés en trois grandes classes : A, B et C, selon leur similarité de séquence, soit respectivement les récepteurs *rhodopsine like*, *glucagon/clacitonine like* et *glutamate like*. Ces récepteurs peuvent aussi être nommés récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), mais l'utilisation de cet acronyme RCPG n'est pas toujours approprié. Il existe des récepteurs qui signalisent de façon indépendante de la protéine G, comme le récepteur de chimiokine CXCR7 (Thelen and Thelen 2008) et le récepteur AT1 (Rajagopal et al. 2005). Un nouveau système de classification proposé regroupe les 7TMRs dans cinq grandes familles de récepteurs dont l'acronyme est **GRAFS**, soit glutamate, rhodopsine, adhésion, frizzled/taste2 et sécrétime (Schioth and Fredriksson 2005).

- La famille de récepteurs glutamate (G), correspondant à l'ancienne classe C, regroupe huit récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), les deux récepteurs GABA (γ -aminobutyric acid), le récepteur sensible au calcium (CaSR) ainsi que les récepteurs de goût de type 1 (TAS1) (Gether 2000; Schioth and Fredriksson 2005). Ces récepteurs possèdent une longue partie N-terminale très structurée importante pour la liaison du ligand (Hermans 2003).

- La famille de récepteurs rhodopsine (R), correspondant à l'ancienne classe A, est la plus grande famille de 7TMRs avec près de 700 membres. La plupart de ces récepteurs possèdent des séquences d'acides aminés conservés comme le motif NPxxY dans le septième domaine transmembranaire (TMVII) et le motif E/DRY situé à la jonction de la boucle i_2 et le TMIII. Contrairement à la famille des récepteurs glutamate, les récepteurs rhodopsine possèdent une partie N-terminale courte. Cela suggère que le ligand s'installe dans la cavité formée par les domaines TM du récepteur, avec l'exception des récepteurs fixant des protéines, tels que les récepteurs de chimiokine et les récepteurs aux glycoprotéines (Crump et al. 1997; Gether 2000; Fredriksson et al. 2003; Schioth and Fredriksson 2005; Oldham 2006; Oldham and Hamm 2008). À cette famille appartiennent, entre autres, les récepteurs adrénergiques, les récepteurs de chimiokines ainsi que les récepteurs opioïdes (Gether 2000).

- La famille de récepteurs d'adhésion (A) comprend une trentaine de récepteurs, avec des membres très particuliers mais peu caractérisés tels que les récepteurs GPR97, GPR110 (Fredriksson et al. 2003). Ils possèdent de longues parties N-terminales riches en résidus sérine et thréonine qui sont souvent O- et N-glycosylés, et impliquées dans l'adhésion cellulaire (Schioth and Fredriksson 2005).

- La famille de récepteurs frizzled/taste 2 (F) est constituée de 11 récepteurs frizzled et une trentaine de récepteurs de goût de type 2 (Taste 2). Les récepteurs frizzled sont impliqués, entre autres, dans le développement. Ils possèdent une longue partie N-terminale riche en résidus cystéine hautement conservés. Quant aux récepteurs de goût de type 2, ils sont exprimés sur la langue et à la surface des

cellules épithéliales du palais et seraient impliqués dans le goûter des composés amers (Fredriksson et al. 2003; Schioth and Fredriksson 2005) .

- La famille de récepteurs sécrétines (S), correspondant à l'ancienne classe B, comprend des récepteurs comme le récepteur de la sécrétine, la calcitonine (CTR), le glucagon et le récepteur de l'hormone parathyroïde (PTHrP). Les membres de cette famille de récepteurs possèdent une longue partie N-terminale riche en ponts disulfures et ont des ligands peptidiques (Schioth and Fredriksson 2005; Oldham and Hamm 2008).

1.2 Signalisation induite par les 7TMRs

La liaison du ligand au récepteur permet d'enclencher différentes voies de signalisation interdépendantes ou indépendantes les unes des autres. Dans le cadre de cette introduction, nous nous attarderons aux protéines G hétérotrimériques et à la beta-arrestine comme partenaires impliqués dans la signalisation des 7TMRs, car ils sont au centre de notre travail.

1.2.1 Les protéines G hétérotrimériques

Les protéines G hétérotrimériques agissent comme un relais moléculaire en activant une cascade de signalisation intracellulaire en réponse aux stimuli externes. Elles sont composées d'une sous-unité α dotée d'une activité GTPase, et d'un dimère $G\beta\gamma$. $G\beta$ et $G\gamma$ sont considérées comme une unité fonctionnelle, car elles sont associées en permanence (Milligan and Kostenis 2006). En absence de stimulus, la sous-unité catalytique $G\alpha$ est liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate).

Il existe une grande diversité de protéines G, soit 23 différentes sous-unités $G\alpha$, 7 sous-unités $G\beta$ et 12 sous-unités $G\gamma$ (Oldham 2006; Oldham and Hamm 2008; McIntire 2009) (Tableau I). Les sous-unités $G\alpha$ sont généralement divisées en quatre sous-classes selon leur homologie de séquence. Ces quatre sous-classes sont : $G\alpha_s$, $G\alpha_i/o$, $G\alpha_q/11$ et $G\alpha_{12/13}$ (Hermans 2003; Vauquelin and Van Liefde 2005; Oldham 2006; Oldham and Hamm 2008).

Famille	Sous-type	Principaux effecteurs
<i>Gαs</i>	<i>Gαs₁₂</i>	↑ Adénylate cyclase (<i>Gαs</i> , <i>Gαs₁₂</i> , <i>Gαo1f</i>)
	<i>Gαs₁₃</i>	↑ Canal maxi K ⁺ (<i>Gαs</i>)
	<i>Gαs₁₄</i>	↑ Tyrosines kinases de type Src (<i>Gαs</i>)
	<i>Gαo1f</i>	↑ GTPase de la tubuline (<i>Gαs</i>)
<i>Gαi/o</i>	<i>Gαo₁</i>	↓ Adénylate cyclase (<i>Gαi/o/z</i>)
	<i>Gαo₂</i>	Rap1-GAP1 dépendant
	<i>Gαi₁₋₃</i>	↑ ERK/MAPkinase (<i>Gαi</i>)
	<i>Gαz</i>	↑ Canaux Ca ²⁺ , Canaux K ⁺ (<i>Gαi/o/z</i>)
	<i>Gαt_{1/2}</i>	↑ cGMP-PDE (<i>Gαt</i>)
	<i>Gαgust</i>	↑ Tyrosines kinases de type Src (<i>Gαi</i>)
<i>Gαq/11</i>	<i>Gαq</i>	↑ Isoformes de la Phospholipase C β
	<i>Gα11</i>	↑ P63-Rho GEF (<i>Gαq/11</i>)
	<i>Gα14</i>	↑ Tyrosine kinase de Britton (<i>Gαq/11</i>)
	<i>Gα15</i>	↑ Canaux K ⁺ (<i>Gαq</i>)
	<i>Gα16</i>	
<i>Gα12/13</i>	<i>Gα12</i>	↑ Phospholipases D/ C α
	<i>Gα13</i>	↑ Rho-GEF (p115, PDZ)
<i>G$\beta$$\gamma$</i>	β ₁₋₅	↑ Phospholipases B
	γ ₁₋₁₂	↑ Adénylate cyclase II, IV et VII ↓ Canaux Ca ²⁺ de types N-, P/Q et R ↑ PI-3 kinase

Tableau I. Les protéines G hétérotrimériques et leurs principaux effecteurs.

Adapté à partir de Milligan et al. (Milligan and Kostenis 2006). Les flèches désignent la stimulation ↑ ou l'inhibition ↓ des principaux effecteurs.

La résolution par cristallographie des structures des protéines G hétérotrimériques telles que *G α i1 β 1 γ 2* a permis de mieux comprendre leur fonctionnement (Lambright et al. 1996; Oldham 2006). La structure de la sous-unité *G α* montre qu'elle est composée d'un domaine hélice et d'un domaine GTPase conservés chez tous les membres de la famille des protéines G. Ce domaine GTPase hydrolyse le GTP (guanosine triphosphate) en GDP, et comprend aussi la surface d'interaction avec les sous-unités *G β γ* , les 7TMRs, ainsi que les effecteurs intracellulaires. Le domaine GTPase possède trois hélices flexibles respectivement

nommées *Switch* I à III (Figure 2) (Oldham and Hamm 2008). Quant au domaine hélical, unique aux protéines $G\alpha$, il est composé de six hélices alpha. Elles sont structurées de façon à former un «couvercle» au dessus de la poche de liaison du nucléotide enfouis au centre.

Notamment la sous-unité $G\beta$ est composée de sept feuillets β formant une structure de « β -propeller» et d'une hélice α du côté N-terminal. L'hélice α permet de former une superhélice «coiled-coil» essentielle pour l'interaction avec la sous-unité $G\gamma$. Les membres de la famille des sous-unités $G\gamma$ sont de petites protéines composées de deux hélices α connectées par une boucle. La partie N-terminale des protéines $G\gamma$ interagit avec la partie N-terminale de la sous-unité $G\beta$ (Figure 2). Les dimères $G\beta\gamma$ forment des unités fonctionnelles qui ne peuvent être dissociées que par dénaturation (Oldham 2006).

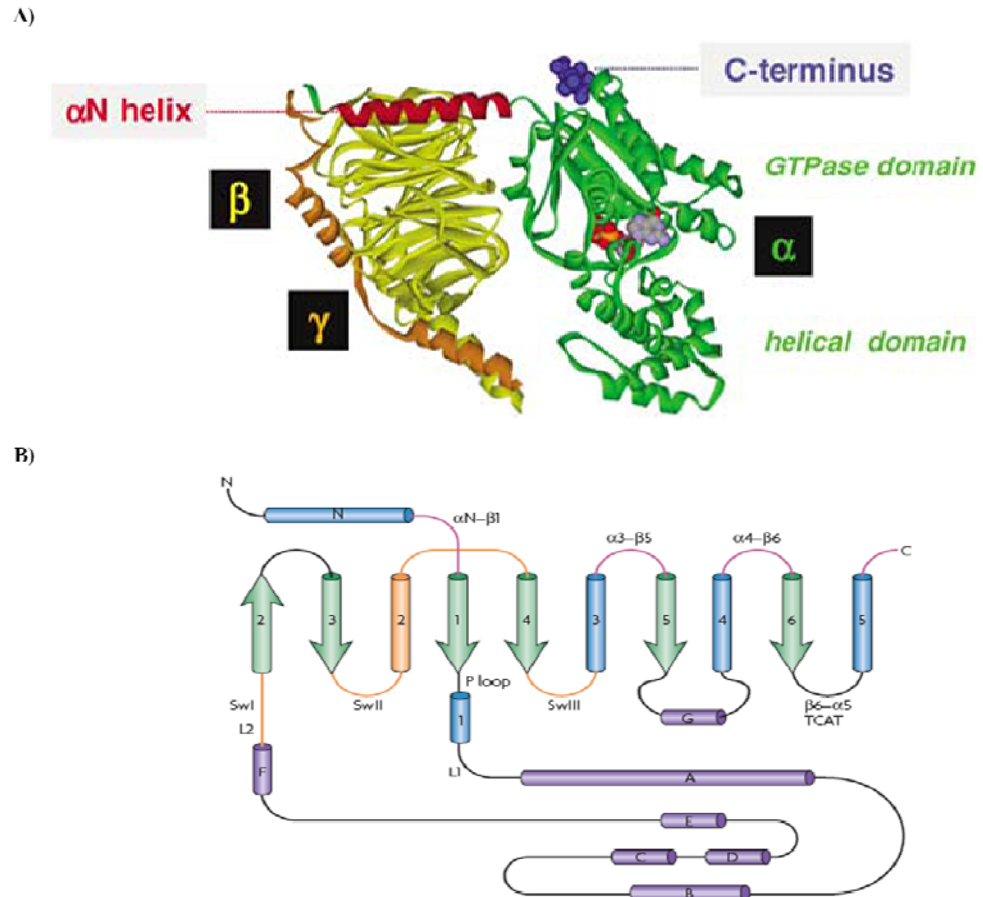


Figure 2 La protéine G hétérotrimérique.

A) Représentation de la protéine G hétérotrimérique $G\alpha i1\beta1\gamma2$ à l'état inactif. La molécule de GDP est située dans la sous-unité $G\alpha$ (vert) entre le domaine hélical et le domaine GTPase de la protéine. L'hélice alpha N (en rouge) est nécessaire pour l'interaction avec les sous-unités $G\beta\gamma$. Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ sont respectivement représentées en jaune et orange. Tiré de Milligan et al. (Milligan and Kostenis 2006).

B) Structure secondaire de la protéine $G\alpha$. Les cylindres représentent les hélices alpha tandis que les flèches désignent les feuillets beta. Le domaine hélical est constitué de sept hélices alpha désignées par les lettres (mauve). Les régions linkers L1 et L2 connectent le domaine hélical au domaine GTPase de la protéine. Les régions Switch (orange) ainsi que les sites de contacts avec le récepteur (rose) sont aussi mis en évidence. Tiré d'Oldham et al. (Oldham and Hamm 2008).

Presque toutes les sous-unités $G\beta$ peuvent s'associer avec la plupart des sous-unités $G\gamma$ et différents dimères $G\beta\gamma$ peuvent interagir avec la même protéine $G\alpha$. La combinaison des protéines G hétérotrimériques dépend de leur expression tissulaire différentielle, de leur localisation cellulaire, mais aussi des modifications post-traductionnelles qu'elles subissent (Oldham 2006). Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles à leur fonction. En général, la partie N-terminale des protéines $G\alpha$ est palmitoylée et les protéines $G\alpha_i$ sont aussi myristoylée en position N-terminale (Oldham and Hamm 2008). Toutes les sous-unités $G\gamma$ sont isoprénylées de façon post-traductionnelle par l'ajout d'un groupement fonctionnel farnésyl ou géranylgeranyl à leur partie C-terminale (Oldham 2006).

Durant des années, la conception était qu'un récepteur possède une spécificité pour une seule classe, voire une protéine G particulière. Cependant le fait qu'un 7TMRs peut être couplé à plusieurs protéines G devient un concept de plus en plus accepté (Hermans 2003).

1.2.2 Transmission et arrêt du signal par les protéines G

La liaison du ligand induit des changements conformationnels au sein du récepteur menant à l'activation de la protéine G hétérotrimérique. La molécule de GDP est alors échangée pour une molécule de GTP dans la sous-unité α , car le récepteur activé agit comme un facteur d'échange de la guanine (*GEF-guanine nucleotide exchange factor*). Cela induit un changement de conformation dans la protéine G, permettant l'activation d'autres effecteurs tels que des enzymes cytosoliques ou membranaires par les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ (Hermans 2003; Kendall and Luttrell 2009). L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité $G\alpha$ mène ensuite à l'hydrolyse du GTP en GDP, terminant le cycle d'activation, qui pourra alors recommencer (Figure 3). Selon la vision classique, l'activation entrainerait la dissociation de la protéine G en sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Or, des observations récentes suggèrent que les protéines G hétérotrimériques ainsi que des effecteurs sont pré-couplés avec le récepteur, formant ainsi un complexe de signalisation (Nobles et al. 2005; Dupre and Hebert 2006; Gales et al. 2006; Quirk et al. 2007). Lors de la liaison du ligand au récepteur, ce complexe subirait des changements de

conformation plutôt qu'un cycle d'association/dissociation tel que suggéré par le modèle classique.

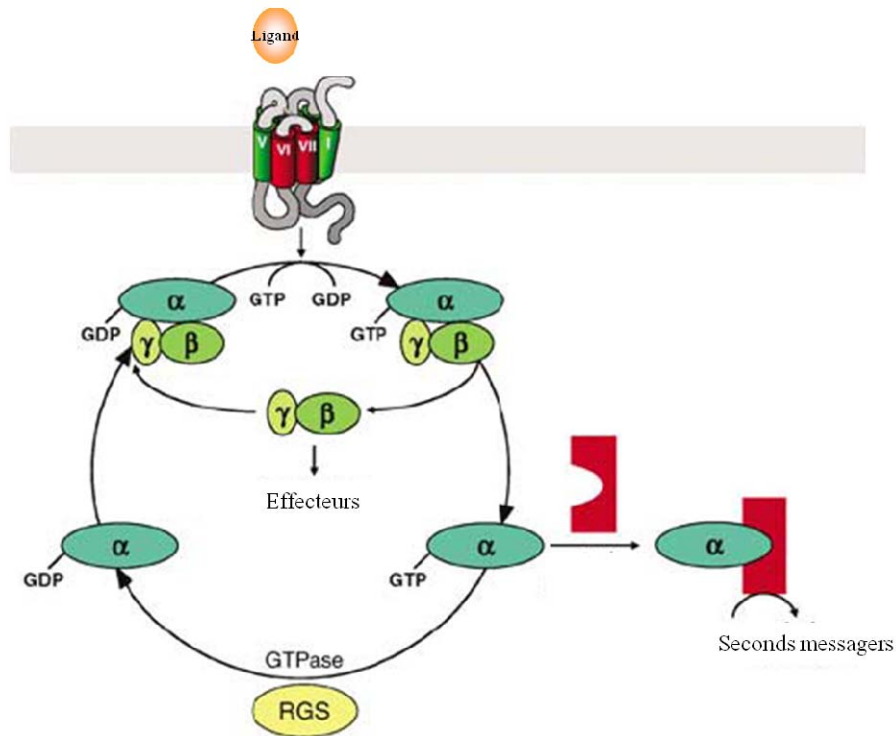


Figure 3 Le cycle classique de la protéine G hétérotrimérique.

Adapté à partir d'Oldham et al. (Oldham and Hamm 2008)

La durée du signal transmis par les protéines G est limitée à plusieurs niveaux. Premièrement, les seconds messagers produits suite à l'activation sont rapidement dégradés. Ensuite, l'activité de la protéine G hétérotrimérique est limitée par son activité GTPase. Cette dernière est régulée par les protéines régulatrices RGS (*Regulators of G Protein Signaling*) qui agissent en tant que protéines GAP (*GTPase Activating Proteins*) en stimulant l'hydrolyse du GTP en GDP. Enfin, la phosphorylation des résidus sérine et thréonine de la partie C-terminale ou de la boucle i3 du récepteur par les kinases GRK₁₋₇ (*G Protein Coupled Receptor kinase*)

classiquement a comme conséquence de découpler définitivement le récepteur de la protéine G hétérotrimérique et induit le recrutement de la beta-arrestine au récepteur. Cette phosphorylation par la GRK, augmente l'affinité du récepteur pour la beta-arrestine. À titre d'exemple, la phosphorylation du récepteur β 2-adrénérique par GRK 2 augmente de 10 à 30 fois l'affinité de la beta-arrestine 2 pour ce récepteur (Lohse et al. 1992).

1.2.3 La beta-arrestine:

La protéine d'échafaudage beta-arrestine interagit avec le récepteur par ses domaines N- et C-terminaux. La beta-arrestine 1 et la beta-arrestine 2 sont les deux formes pertinentes à ce travail (Figure 4) (Kendall and Luttrell 2009).

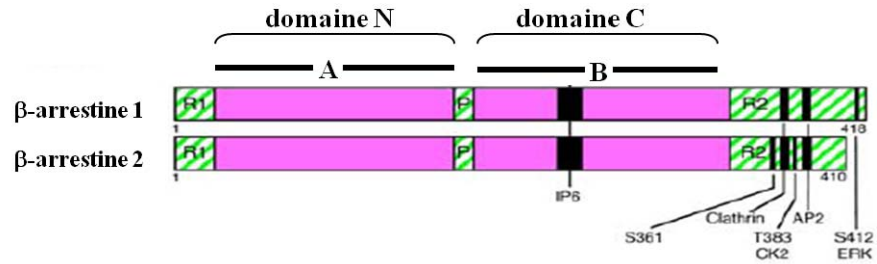


Figure 4 La beta-arrestine

Représentation schématique des deux isoformes non-visuels de l'arrestine. Les domaines globulaires N et C sont montrés (mauve). Le domaine de reconnaissance du phosphate est représenté par la lettre P, tandis que les domaines terminaux R1 et R2 possèdent des fonctions régulatrices. Sont aussi indiquées les domaines de liaison de l'inositol 6-phosphate (IP6), de la clathrine, de la protéine AP2, en plus des sites de phosphorylation de la caséine kinase 2 (CK2) et des ERK. Adapté à partir de Kendall et al. (Kendall and Luttrell 2009).

La beta-arrestine permet le recrutement d'une grande variété d'enzymes dans un complexe de signalisation multi-protéique (Kendall and Luttrell 2009). La caractérisation de plusieurs de ces partenaires permet d'avancer que le recrutement de la beta-arrestine au récepteur activé ne représente pas la fin de la signalisation en générale, mais plutôt le début d'une deuxième vague de signalisation indépendante des protéines G (Figure 5) (DeWire et al. 2007). La voie de signalisation dépendante de l'arrestine la mieux caractérisée est celle des sérine/thréonine kinases MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Cette famille possède plusieurs membres dont ERK 1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinases*), les isoformes de la kinase p38, et JNK (c-Jun N-terminal Kinase). Les effecteurs des MAPK contrôlent la transcription de gènes cibles, la progression du cycle cellulaire, le remodelage du cytosquelette, et l'apoptose (DeWire et al. 2007). La cascade des MAPK ERK1/2 est composée des MAP kinase kinases (multiples isoformes de Raf), des MAP kinase kinases MEK1/2, et finalement des MAP kinases ERK1/2. La beta-arrestine agirait en tant que protéine d'échafaudage rassemblant à la fois les trois composantes de la cascade ERK1/2 (Kendall and Luttrell 2009). Ainsi, l'activation du récepteur par son ligand recrute le complexe préformé beta-arrestine-Raf-MEK-ERK à la membrane plasmique et induit alors l'activation localisée des ERK1/2 (Shenoy et al. 2007). La signalisation ERK1/2 de façon dépendante de la beta-arrestine est montrée pour plusieurs 7TMRs, dont le récepteur de chimiokine CXCR4 et les récepteurs β -adrénergiques (Chen et al. 2002; Shenoy et al. 2006; Gesty-Palmer et al. 2009; Kovacs et al. 2009).

En plus des MAPK, la beta-arrestine joue le rôle de protéine d'échafaudage pour d'autres complexes de protéines comme celui composé de la protéine phosphatase 2A (PP2A), la kinase AKT et la glycogène synthase kinase 3 β (GSK 3 β) (Kendall and Luttrell 2009). D'ailleurs, ce complexe beta-arrestine 2/PP2A/AKT/GSK3 β est important dans la réponse comportementale au lithium tel que montrée dans la souris (Beaulieu et al. 2008). Le lithium est utilisé pour traiter des troubles mentaux comme la schizophrénie, les troubles bipolaires ainsi que la dépression. Beaulieu et al. étudient le récepteur D2 de la dopamine et montrent que le lithium affecte le comportement des souris de façon dépendante de la beta-arrestine 2 (Beaulieu et al. 2008). En effet, ils montrent que le lithium empêche

l'association du complexe beta-arrestine2/PP2A/AKT/GSK3 β . En revanche, il ne semble pas affecter les autres fonctions de la beta-arrestine 2 (Beaulieu et al. 2008).

Somme toute, la grande variété de partenaires d'interaction/signalisation de la beta-arrestine suggère que son rôle est d'entreprendre une deuxième vague de signalisation intracellulaire (Kendall and Luttrell 2009).

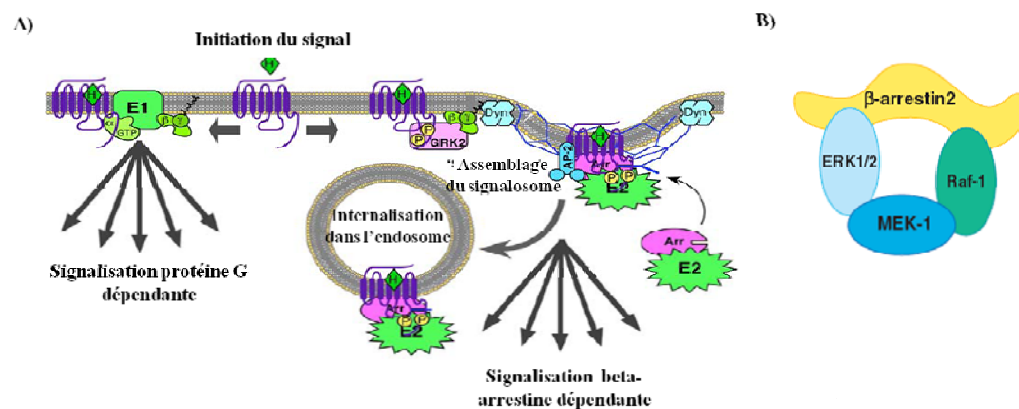


Figure 5 Rôles de la beta-arrestine.

A) Le récepteur activé stimule la protéine G hétérotrimérique ce qui permet d'activer les effecteurs, dépendant des protéines G (E1). L'internalisation du récepteur implique le recrutement de la beta-arrestine qui peut recruter des effecteurs dépendants de l'arrestine (E2). La beta-arrestine est importante pour l'internalisation du récepteur mais sert aussi de protéine d'échaffaudage. Adapté à partir de Kendall et al. (Kendall and Luttrell 2009). B) Exemple de complexe de signalisation impliquant la beta-arrestine 2 et des enzymes de la cascade classique des MAPK (Raf-1, MEK-1 ainsi que ERK1/2). Tiré de DeWire et al. (DeWire et al. 2007).

1.2.4 Atténuation de la signalisation par les protéines G

Toutefois, le rôle classique attribué à la beta-arrestine est celui de désensibiliser et internaliser le récepteur activé. La phosphorylation des résidus de la partie C-terminale ou de la 3^e boucle intracellulaire du récepteur par les kinases GRK₁₋₇ a comme conséquence de découpler définitivement le récepteur de la protéine G hétérotrimérique.

Néanmoins, le rôle des différentes GRK semble être plus complexe et ne se résumerait pas uniquement à découpler le récepteur de la protéine G. En effet, ces kinases joueraient un rôle dans le déclenchement d'une seconde vague de signalisation (Kohout et al. 2003; Kim et al. 2005). Les travaux de Kim et al. montrent que les conséquences fonctionnelles de l'interaction de la beta-arrestine avec le récepteur AT1-R sont déterminées par la GRK qui phosphoryle le récepteur. En effet, l'inhibition de l'expression des kinases GRK2, 3, 5 et 6 grâce aux siRNA montre que les kinases GRK2 et GRK3 sont majoritairement responsables de la phosphorylation du récepteur ce qui permet le recrutement de la beta-arrestine et l'endocytose du récepteur dans des cellules HEK293 (Kim et al. 2005). À l'opposé, l'activation de la voie ERK1/2 dépendante de la beta-arrestine n'est activée que lorsque le récepteur AT1-R est phosphorylé par GRK5 ou GRK6. La fraction des récepteurs AT1-R phosphorylés par ces deux kinases ainsi que le recrutement de la beta-arrestine qui en découle est petite. Toutefois, en absence de GRK5 et GRK6 la stimulation des voies ERK1/2 dépendante de la beta-arrestine est presque abolie (Kim et al. 2005). Ces résultats suggèrent que les fonctions des kinases GRK ne sont pas redondantes dans ce cas et que leur rôle dans la signalisation des 7TMRs ne se résumerait pas uniquement à atténuer la signalisation des protéines G.

Classiquement, la phosphorylation du récepteur par la kinase GRK induit le recrutement de la beta-arrestine au récepteur et permet de recruter, par interaction directe avec les composantes de la machinerie d'endocytose, la clathrine et la protéine AP-2 (Adaptor Protein-2). Cette liaison mène à l'internalisation de la beta-arrestine liée au récepteur dans les puits tapissés de clathrine, qui formeront des endosomes lorsque dissociées de la membrane plasmique. Une fois dans les endosomes, le récepteur peut être recyclé à la membrane plasmique, ou dirigé vers les lysosomes pour dégradation. Il a été suggéré que le devenir du récepteur est principalement déterminé par la stabilité du complexe récepteur/beta-arrestine, qui lui dépend de l'affinité de leur interaction (DeWire et al. 2007). Ainsi, la plupart des 7TMRs ont été distribués dans une de deux classes (A ou B) selon leur cinétique d'interaction avec la beta-arrestine (Figure 6) (Kendall and Luttrell 2009).

D'une part, les récepteurs de classe A qui possèdent une plus grande affinité pour la beta-arrestine 2 comparativement à la beta-arrestine 1 (Kendall and Luttrell

2009). Les récepteurs de cette classe interagissent avec la beta-arrestine 2 de façon transitoire, et les complexes formés se dissocient rapidement suite à l'internalisation du récepteur. C'est le cas du récepteur β 2-adrénérique qui suite à la stimulation avec son ligand est rapidement désensibilisé, déphosphorylé et recyclé à la membrane plasmique (DeWire et al. 2007; Kendall and Luttrell 2009). À l'opposé, les récepteurs de classe B ont des affinités équivalentes pour les deux beta-arrestines. Cette interaction récepteur/ beta-arrestine est plus forte, plus longue et le recyclage des récepteurs à la membrane plasmique a lieu plus lentement que pour les récepteurs de classe A (Kendall and Luttrell 2009).

Également, les fonctions des deux beta-arrestines sont interchangeable dans certains cas, comme il est démontré dans des systèmes d'animaux *knock out*, mais le *knock out* des deux beta-arrestine est létal (DeWire et al. 2007). Cependant, les beta-arrestine 1 et 2 ne sont pas toujours fonctionnellement redondantes. En effet, la beta-arrestine 2 mène à l'internalisation du récepteur β 2-adrénérique mais pas à celle du récepteur PAR1 (*Protease-Activated Receptor 1*), dont la désensibilisation dépend de beta-arrestine 1. En revanche, le récepteur AT1_AR (angiotensine II de type 1A) est quant à lui sensible aux deux isoformes de la beta-arrestine.

Suite à l'endocytose, le sort du complexe récepteur/beta-arrestine dépend entre autres de son ubiquitination. Lorsque le récepteur interagit avec la beta-arrestine, cette dernière peut être ubiquitinée par mdm2, une E3 ubiquitine ligase, avec laquelle la beta-arrestine interagit directement (Marchese et al. 2008). Cette ubiquitination a pour effet de stabiliser le complexe récepteur/beta-arrestine ce qui est nécessaire à l'internalisation. Dans le cas des récepteurs de classe A, la beta-arrestine est dé-ubiquitinée suite à l'internalisation du complexe, ce qui semble être nécessaire pour la dissociation du complexe récepteur/beta-arrestine. Par contre, la beta-arrestine en complexe avec les récepteurs de classe B ne subit pas de dé-ubiquitination, ce qui augmente la stabilité du complexe récepteur/beta-arrestine (DeWire et al. 2007; Kendall and Luttrell 2009).

Par ailleurs, l'ubiquitination du récepteur lors de l'internalisation dépend de la beta-arrestine, mais n'est pas nécessaire pour l'endocytose. Elle déterminerait

plutôt le sort définitif du récepteur (dégradation ou recyclage à la membrane plasmique). Par exemple, l'ubiquitination de la boucle i3 du récepteur de la vasopressine V2 ou de la partie C-terminale du récepteur β 2-adrénergique mène à leur dégradation (Marchese et al. 2008). C'est aussi le cas du récepteur de chimiokine CXCR4, dont des résidus lysine de sa partie C-terminale sont ubiquitinés avant que le récepteur ne soit dirigé vers la dégradation (Marchese et al. 2008; Bhandari et al. 2009; Marchese 2009).

Cela dit, la beta-arrestine est une protéine adaptatrice qui permet non seulement de désensibiliser et d'acheminer le récepteur vers des vésicules d'endocytose (Figure 6), mais aussi d'enclencher une deuxième vague de signalisation indépendante de la protéine G, en permettant la formation de complexes multi-protéiques (Figure 5).

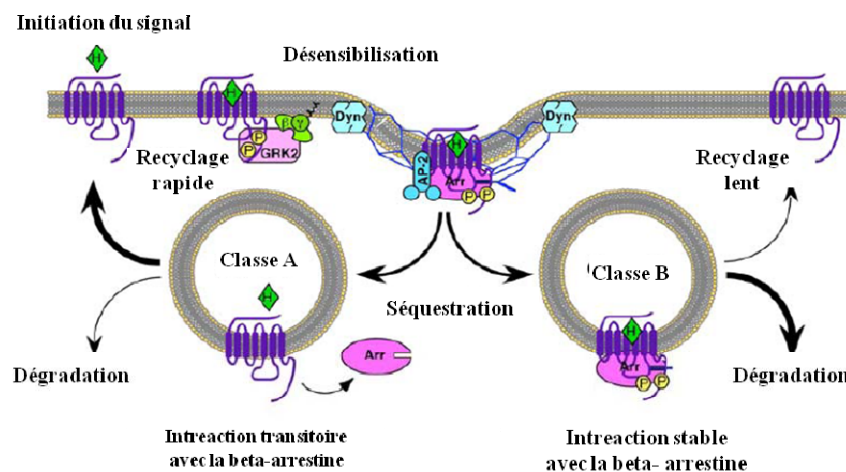


Figure 6 Interaction récepteur/beta-arrestine.

La stabilité de l'interaction entre le récepteur et la beta-arrestine détermine le sort du récepteur suite à son internalisation. Le récepteur activé et phosphorylé par la GRK interagit avec la beta-arrestine. Elle induit la séquestration du récepteur grâce au recrutement des protéines AP-2 et de la clathrine. Suite à l'internalisation, les récepteurs de classe A se dissocient de la beta-arrestine, sont déphosphorylés et rapidement recyclés à la membrane plasmique. Par contre, les récepteurs de classe B forment des complexes plus stables avec la beta-arrestine qui sont dirigés vers les endosomes. Ainsi, les récepteurs pourront soit être lentement recyclés à la membrane plasmique ou seront dégradés. Adapté à partir de Kendall et al. (Kendall and Luttrell 2009).

1.2.5 Autres partenaires d'interaction / signalisation possible

Dans le cadre de ce travail nous focaliserons sur les protéines G hétérotrimériques ainsi que sur la beta-arrestine en tant que partenaires d'interaction avec les 7TMRs. Toutefois, outre la beta-arrestine et les protéines G, les récepteurs peuvent interagir avec une multitude de protéines regroupées sous le nom de protéines interagissant avec les récepteurs couplés aux protéines G (GIP- *GPCR Interacting Prtoeins*). Ces GIP peuvent moduler les propriétés pharmacologiques du récepteur, sa signalisation suite à la liaison du ligand, ainsi que la biosynthèse et l'adressage du récepteur à la membrane plasmique (Ritter and Hall 2009). À titre d'exemple, les GIP peuvent être d'autres 7TMRs qui modulent la fonction grâce à l'homo- ou l'hétérodimérisation, des canaux ioniques, des protéines solubles contenant un domaine PDZ, ainsi que des protéines ayant un domaine transmembranaire telles que les RAMP (*Receptor Activity Modifying Protein*) (Ritter and Hall 2009).

Un grand nombre de travaux ont montré que les 7TMRs peuvent former des homo- ou des hétérodimères ou même des oligomères (Jordan and Devi 1999; Angers et al. 2000; McVey et al. 2001; Mellado et al. 2001; Ayoub et al. 2002; Mercier et al. 2002; Terrillon et al. 2004; Berthouze et al. 2005; Percherancier et al. 2005). C'est grâce à des techniques comme la co-immunoprécipitation, au transfert d'énergie par résonance, aux études de trans-complémentation fonctionnelle et à l'utilisation de mutants trans-dominants négatifs que la dimérisation des récepteurs est mise en évidence dès les années 1990. Notamment, des études montrent l'importance de la dimérisation pour la biosynthèse, la fonction ainsi que la diversification pharmacologique des récepteurs (Hebert et al. 1998; Galvez et al. 2001; El-Asmar et al. 2005). Toutefois, l'importance de la dimérisation pour l'activation des récepteurs est un sujet de débat, l'activation d'un protomère du dimère étant suffisante dans certains cas pour l'activation de la protéine G. Aussi, des monomères de récepteurs isolés dans des membranes lipidiques ou à de faibles concentrations de détergent sont montré comme étant aptes à activer la protéine G (Whorton et al. 2007; Whorton et al. 2008; Kuszak et al. 2009). La mise au point de méthodes permettant de discriminer entre les unités fonctionnelles du récepteur

(monomère ou un dimère) sont nécessaires. Néanmoins, l'existence des dimères de récepteurs reste un fait largement accepté dans la communauté scientifique.

1.3 Motifs et résidus importants des récepteurs de la famille R (rhodopsine)

Les résultats présentés et discutés dans cette thèse traitent de 7TMRs de la famille R (rhodopsine). La plupart des récepteurs membres de cette famille possèdent des motifs clé importants pour les rapports structure-fonction du récepteur. Ces résidus ont été mis en évidence grâce aux structures tridimensionnelles obtenues suite à la cristallisation des 7TMRs. La première structure obtenue est celle du récepteur visuel rhodopsine qui a permis de déduire l'arrangement des récepteurs en général. Il est difficile d'obtenir des structures cristallines des récepteurs à cause de leur flexibilité de conformation en absence de ligand. Ainsi, après plusieurs années d'essais et d'évolution des technologies, la structure tridimensionnelle de cinq récepteurs de la famille R est désormais connue (Rosenbaum et al. 2009). Il est maintenant possible de comparer les structures en trois dimension des récepteurs : de la rhodopsine (Palczewski et al. 2000) et β 2-adrénérique (Cherezov et al. 2007; Rasmussen et al. 2007), β 1-adrénérique (Warne et al. 2008), le récepteur A_{2A} adénosine (Jaakola et al. 2008) ainsi que le récepteur de chimiokine CXCR4 (Wu et al. 2010).

L'activation des récepteurs nécessiterait l'interruption d'interactions intramoléculaires qui favorisent une conformation inactive du récepteur (Alewijns et al. 2000; Zhang et al. 2002). La liaison de l'agoniste permettrait de défaire ces liens et stabiliserait une conformation permettant l'activation du récepteur (Gether et al. 1997). Il est aussi possible que les récepteurs adoptent spontanément des conformations actives et inactives, et que le ligand interagisse de façon préférentielle avec une conformation donnée du récepteur (Gether et al. 1997; Gether 2000; Vauquelin and Van Liefde 2005).

1.3.1 Le motif E/DRY

Les informations tirées à partir des cristaux des 7TMRS, en combinaison avec des études biochimiques et biophysiques, ont permis de mieux caractériser des motifs clé des récepteurs, dont le motif E/DRY. Situé à la jonction du domaine TM III et de la boucle i2 de la plupart des récepteurs de la famille rhodopsine, ce motif est important pour les changements de conformation des récepteurs lors de leur activation (Figure 7) (Rovati et al. 2007).

E/DRY est aussi connu sous le nom de «cadenas ionique» et occupe les positions 3.49 à 3.51 selon l'assignation de Ballesteros et Weinstein (Ballesteros and Weinstein 1995). Le résidu arginine (R) 3.50 du motif formerait un double pont salin avec l'acide aspartique ou glutamine (E/D) 3.49 et/ou un autre résidu chargé, présent à la position 6.30 dans l'hélice six. Ce pont salin maintiendrait le récepteur sous forme inactive et serait défait lors de l'activation (Rovati et al. 2007). Ainsi, la mutation du résidu E/D donnerait lieu à des mutants adoptant une conformation active, comme cela a été montré par exemple pour la rhodopsine (Cohen et al. 1993; Acharya and Karnik 1996), les récepteurs α_{1B} -adrénergique (Scheer et al. 1996), β_2 -adrénergique (Rasmussen et al. 1999), et vasopressine V2 (Morin et al. 1998). Ces mutants possèdent des activités basales (en absence de ligand) augmentées et sont nommées des mutants constitutivement actifs (CAM). Or, la mutation du résidu E/D 3.49 donne lieu à des mutants constitutivement inactifs (CIM) pour d'autres récepteurs, tels les récepteurs de la vasopressine V1, α_{2A} -adrénergique, le récepteur de chimiokine CCR5, et les récepteurs muscarinique M1 et M5. Le phénotype résultant de la mutation E/D 3.49 ne peut pas être généralisé. Toutefois, les résultats suggèrent fortement l'implication du résidu E/D 3.49 dans la stabilisation de la conformation du récepteur.

Rovati et al. suggèrent de classer les récepteurs mutés au résidus E/D 3.49 ayant un phénotype CAM ou CIM en deux classes, soit respectivement P1 et P2 (Rovati et al. 2007). La substitution du résidu arginine (R) 3.50 des récepteurs mutés de type P2 (CIM) affecte généralement le couplage à la protéine G hétérotrimérique et leur affinité pour le ligand est aussi altérée (Wilbanks et al. 2002). À l'opposé, l'affinité et le couplage à la protéine G des mutants R3.50 des récepteurs de type P1

(CAM) reste inchangée. Ces mutants possèdent de multiples phénotypes et seraient constitutivement désensibilisés donc moins présents à la membrane plasmique (Wilbanks et al. 2002). Notamment, les mutations naturelles du résidu R3.50 sont impliquées dans des pathologies comme le diabète insipide (Rovati et al. 2007).

Quant au résidu tyrosine (Y) 3.51, c'est le résidu le moins conservé parmi les 7TMRs. Il est souvent remplacé par des résidus sérine, cystéine ou histidine. Lorsque présent, le résidu Y3.51 du motif E/DRY serait un site de phosphorylation important pour la signalisation du récepteur (Mellado et al. 1998). À titre d'exemple, Mellado et al. montrent que la mutation du résidu Y3.51 en phénylalanine (F) au sein du récepteur de chimiokine CCR2 l'empêche de signaler de façon dépendante et indépendante de la protéine G (Mellado et al. 1998). Or, la mutation n'affecte ni l'expression du récepteur à la membrane plasmique ni son affinité pour son ligand.

Ainsi, les mutations du motif E/DRY affectent l'activation des récepteurs, ce qui suggère que le motif est nécessaire mais peut-être pas suffisant pour que le récepteur adopte les changements conformationnels nécessaires à son activation.

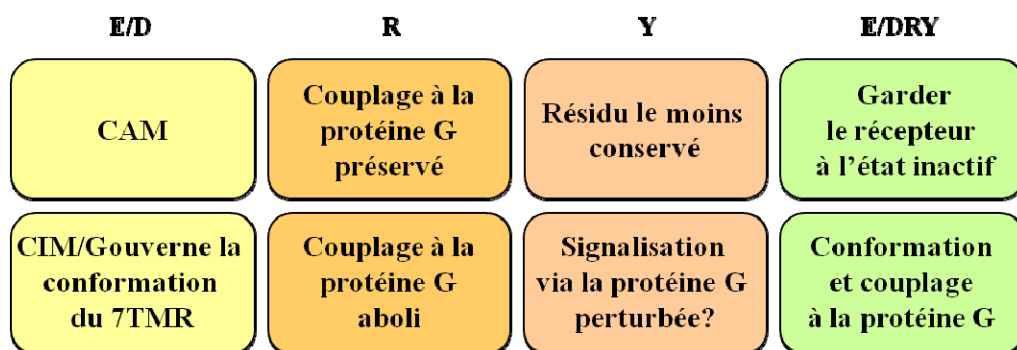


Figure 7 Le motif E/DRY.

Effet des mutations et le rôle proposé d'E/DRY au sein des 7TMRs. Adapté de Rovati et al. (Rovati et al. 2007).

1.3.2 Le motif N(L/F)YSS

Le motif N(L/F)YSS est conservé, entre autres, à travers les récepteurs de chimiokine, dont nous discuterons plus loin dans cette thèse. Le résidu asparagine N3.35 présent dans le domaine TMIII serait important dans les changements conformationnels permettant au récepteur de chimiokine de type CXC d'interagir avec la protéine $G\alpha$ (Zhang et al. 2002). Zhang et al. montrent que la substitution du résidu N119 (3.35) du récepteur CXCR4 affecte sa fonction (Zhang et al. 2002). En effet, la substitution du résidu N119 par une alanine (A) ou une sérine (S) donne lieu à un récepteur CXCR4 CAM, tandis que la substitution avec un résidu lysine (K) ou un résidu d'acide aspartique (D) donnent respectivement lieu à un récepteur inactif ou de phénotype sauvage. Les auteurs suggèrent que la liaison du ligand au récepteur induit un changement conformationnel, tel que les domaines hydrophobes et cytoplasmiques adoptent une orientation permettant de former un complexe ternaire de grande affinité avec la protéine $G\alpha$ (Ghanouni et al. 2001). En considérant la structure cristalline de la rhodopsine, ce résidu se trouverait à distance égale entre les parties extracellulaires et cytoplasmiques du domaine TMII du récepteur CXCR4 (Palczewski et al. 2000). En conséquence, le résidu N119 de CXCR4 est important pour le maintien de la conformation de base du récepteur et lors du réarrangement conformationnel menant à son activation (Zhang et al. 2002).

Cette asparagine N3.35 est aussi importante pour le maintien de la conformation du récepteur AT1R de l'angiotensine II. En effet, Auger-Messier et al. montrent que les mutants N111A et N111G acquièrent une activité constitutive, du moins pour la voie de la phospholipase C (PLC) tandis que les mutants N111Q et N111W perdent leur capacité à activer la PLC (Auger-Messier et al. 2003). Aussi, les mutants CAM, N111A et N111G, possèdent une affinité à l'angiotensine II semblable au récepteur de type sauvage. En absence d'angiotensine II, l'activité constitutive du mutant N111G atteint 40% de l'activité maximale du récepteur de type sauvage tel que mesurée par l'activation de la protéine $G\alpha_q/11$. En présence de l'angiotensine II, l'activité maximale du mutant N111G atteint celle du récepteur de type sauvage (Auger-Messier et al. 2003). Contrairement au récepteur de type sauvage, ce mutant ne co-immunoprécipite pas avec la protéine $G\alpha_q/11$ suite à la

stimulation avec l'angiotensine II. Cela suggère que la conformation du mutant N111G est différente du récepteur de type sauvage stimulé. Ainsi, la haute affinité du mutant N111G pour l'agoniste ferait partie de ses propriétés intrinsèques et ne dépendrait pas de son interaction avec la protéine $G\alpha_q/11$ (Auger-Messier et al. 2003).

Par ailleurs, Auger-Messier et al. montrent aussi que les mutants N111G et N111W, respectivement constitutivement actif et inactif, induisent de façon faible et transitoire la mobilisation du calcium intracellulaire en réponse à l'agoniste. Ces résultats suggèrent que le résidu N111 du récepteur AT1R est un résidu clé dans le maintien de la conformation du récepteur, car sa substitution module l'activité du récepteur (Feng et al. 1998; Auger-Messier et al. 2003). Ces observations permettent aussi d'envisager qu'il existe plusieurs états conformationnels menant aux conformations actives.

2. Interactions des ligands avec les récepteurs

2.1 Ligands des 7TMRs

Il existe une grande variété de 7TMRs et une toute aussi grande diversité des ligands fixant ces derniers. Les récepteurs possèdent un ou plusieurs ligands naturels dans les conditions physiologiques. Toutefois, étant donné que les récepteurs constituent une excellente cible pharmacologique, une multitude de ligands synthétiques ont été développée. Dans la majorité des cas, les ligands synthétiques ont été développés pour agir en bloquant la fonction du récepteur et constituent d'excellents outils pour étudier les 7TMRs. La caractérisation pharmacologique des ligands permet de mieux comprendre leur mode d'action. Nous discuterons des différents paramètres pharmacologiques décrivant le comportement des ligands, comme l'affinité et la puissance, plus loin. Dans un premier temps, nous élaborerons sur leurs différents effets.

Les ligands peuvent avoir différents effets sur leurs récepteurs respectifs (Figure 8). Un agoniste est défini comme un ligand qui induit une réponse

biologique et augmente l'activité du récepteur (Neubig et al. 2003). L'agoniste est dit complet lorsqu'il induit une réponse maximale dans un système cellulaire ou tissulaire précis. Un agoniste est dit partiel lorsqu'il a un effet moins important que l'agoniste complet, sur le même récepteur dans des conditions identiques. L'effet de l'agoniste partiel est inférieur à celui de l'agoniste complet même lorsque la concentration de l'agoniste partiel arrive à saturation. Un agoniste peut être complet dans un système mais partiel dans un autre système cellulaire ou tissulaire (Neubig et al. 2003). L'effet d'un agoniste, complet ou partiel, dépend non seulement de la quantité de récepteur qu'il lie mais aussi des composantes cellulaires impliquées dans la signalisation.

Notamment, un ligand peut aussi se comporter comme un agoniste inverse. Cette propriété peut-être observée lorsque les récepteurs possèdent une activité constitutive de base, en absence de ligand. Cette activité constitutive est souvent augmentée dans des systèmes où l'expression du récepteur et/ou des effecteurs tels que les protéines G est augmentée. L'agoniste inverse réduit cette activité constitutive de façon dose dépendante (Neubig et al. 2003; Kenakin 2009). L'activité constitutive est montrée pour plusieurs récepteurs dans des tissus ainsi que des cellules primaires. L'activité d'agoniste inverse requiert une activité constitutive du récepteur. En absence de cette dernière, l'agoniste inverse ne perd pas son effet mais agit plutôt comme un simple antagoniste. Par définition, un antagoniste est un ligand qui interfère dans l'interaction récepteur/agoniste afin de bloquer l'activation du récepteur. (Neubig et al. 2003).

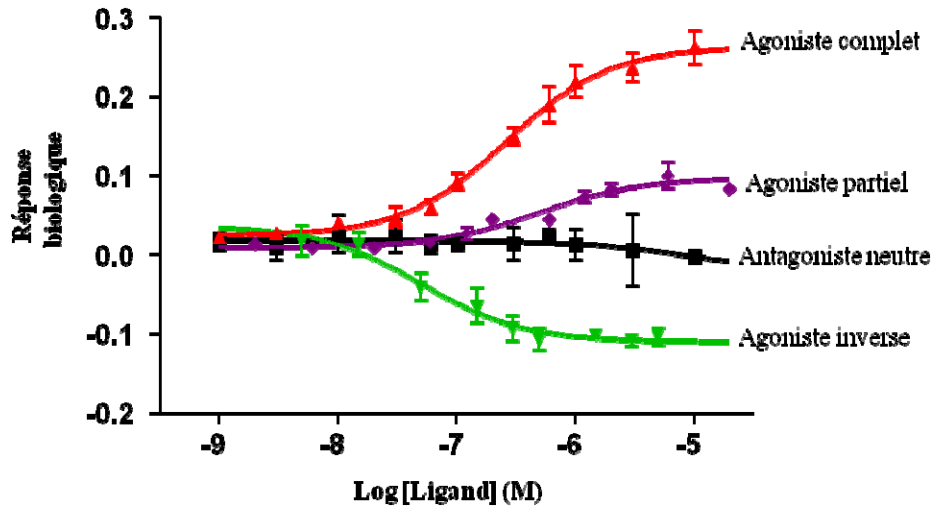


Figure 8 Propriétés des ligands

Exemple illustrant l'effet de différents ligands sur la réponse du récepteur. L'agoniste complet (rouge) augmente la réponse, l'agoniste partiel (mauve) n'atteint pas la réponse maximale obtenue avec l'agoniste complet, l'antagoniste neutre (noir) seul n'induit pas de réponse tandis que l'agoniste inverse (vert) diminue l'activité constitutive. Adapté de Percherancier et al. (Percherancier et al. 2005).

Il existe deux classes de ligands. D'abord, les ligands orthostériques dont le site de liaison est le même que celui du ligand endogène. Ensuite, les ligands allostériques dont le site d'interaction avec le récepteur est distinct du site de liaison du ligand endogène. Le mode d'action des ligands sur le récepteur peut être direct ou indirect. En effet, certains ligands sont des ligands compétitifs dont le site de liaison est le même que celui du ligand orthostérique (exemple, un antagoniste peut-être compétitif ou non compétitif). Par contre, il existe des ligands allostériques qui sont non compétitifs car l'effet de la molécule allostérique sur le ligand endogène n'est pas dû à une compétition stérique directe, mais passe plutôt par le récepteur, dont elle change l'affinité pour le ligand endogène (Kenakin 2009). Les molécules allostériques peuvent ainsi moduler les propriétés pharmacologiques des ligands endogènes, ainsi que leurs effets, mais elles peuvent aussi avoir des effets de signalisation intrinsèque (en absence de ligands orthostériques) (Figure 9) (Kenakin 2009).

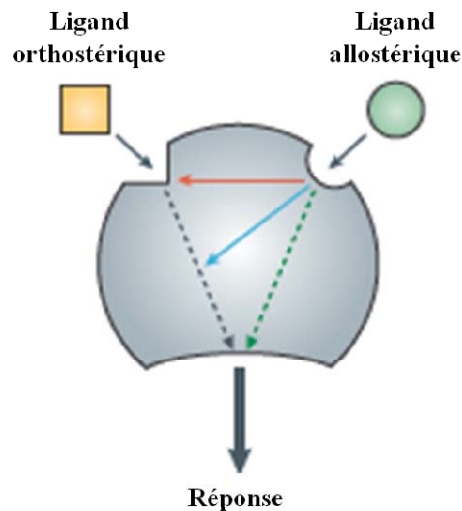


Figure 9 Ligands allostériques et orthostériques.

Les ligands allostériques interagissent avec le récepteur à des sites distincts des ligands orthostériques. Les molécules allostériques peuvent moduler l'affinité (flèche rouge) ou l'efficacité (flèche bleue) des ligands orthostériques. Certains ligands allostériques peuvent directement activer des effecteurs (flèche verte). Adapté de Conn et al. (Conn et al. 2009).

2.2 Propriétés pharmacologiques des ligands

Nous allons introduire les paramètres pharmacologiques qui servent à caractériser les ligands des récepteurs, principalement les concepts d'affinité, d'efficacité et de puissance (Figure 10).

- L'affinité est la force d'interaction d'un ligand en solution qui s'associe à un récepteur (Neubig et al. 2003; Kenakin 2009). Les forces contrôlant l'affinité du ligand pour le récepteur sont de type thermodynamiques. La distance entre les deux partenaires d'interaction agit sur les forces chimiques impliquées. Ces dernières sont de type électrostatique, hydrophobe et impliquent aussi des ponts hydrogènes ainsi que des forces de Van der Waals. La combinaison de ces forces fait que le ligand occupe une position particulière à son site de liaison au récepteur à un point où l'énergie libre est à son minimum. Toutefois, le ligand ne réside pas à une position uniforme de façon statique. Le ligand s'associe et se dissocie du récepteur en

fonction de la variation de l'énergie dans le système. Ce concept devient important lorsque deux ligands compétitionnent pour un même site de liaison au récepteur. Ainsi, la probabilité qu'une molécule (ligand) soit au niveau d'énergie minimale au sein de la poche de liaison du récepteur est une fonction de sa concentration ainsi que de la force des interactions, donc de son affinité. (Neubig et al. 2003; Kenakin 2009).

- L'efficacité est la propriété qui mesure la capacité d'un ligand à induire un changement dans le récepteur, comme par exemple une réponse cellulaire dans un système expérimental (Kenakin 2009). Il s'agit d'un terme numérique qui à l'origine a été introduit afin de décrire le degré auquel deux agonistes produisent des réponses variées lorsqu'ils occupent la même portion du récepteur (Neubig et al. 2003) (Kenakin 2009).

Notamment, des courbes dose-réponse montrent l'effet de différentes concentrations d'un ligand sur la réponse dans le système expérimental. Le graphique de cette réponse en fonction de la concentration du ligand donne lieu à une courbe sigmoïdale qui permet de déterminer la réponse maximale et la puissance de la réponse qu'un ligand induit dans un système expérimental (voir ci-dessous) (Kenakin 2009).

- La réponse maximale est l'effet maximal qu'un ligand produit dans une cellule ou un tissu suite à son interaction avec un récepteur sous des conditions expérimentales précises. Cette réponse décrit l'efficacité du ligand ainsi que de l'efficacité du système expérimental à produire une réponse (Neubig et al. 2003) (Kenakin 2009).

- La puissance est la concentration nécessaire pour produire une réponse. Elle varie en fonction du système cellulaire utilisé. La puissance est souvent décrite par l'EC₅₀ qui est la concentration de ligand nécessaire pour produire 50% de la réponse maximale, peu importe qu'il s'agisse d'un effet inhibiteur ou activateur (Neubig et al. 2003; Kenakin 2009).

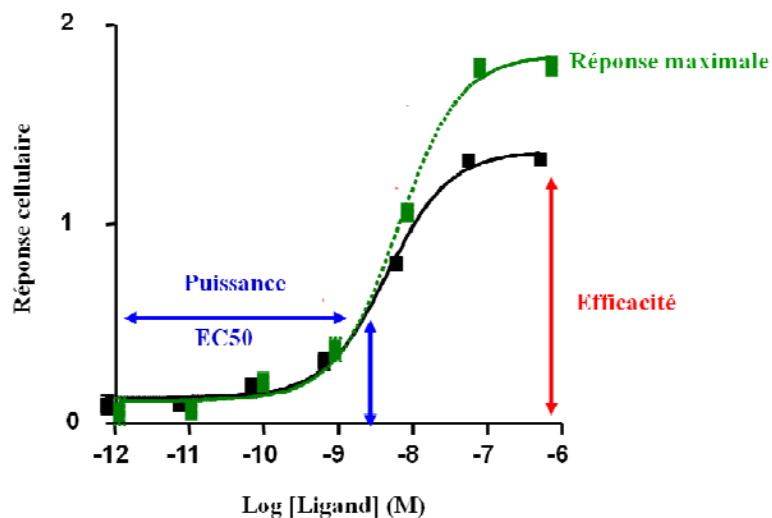


Figure 10 Paramètres pharmacologiques

Un ligand peut induire une réponse cellulaire et la courbe dose réponse permet de déterminer son efficacité (rouge) et sa puissance (EC50) qui lui sont propre dans le système étudié. Il peut aussi générer une réponse maximale (vert) qui dépend du système expérimental.

3. Activation des 7TMRs

Des modèles pharmacologiques ont été proposés très tôt afin d'expliquer l'effet des ligands sur les récepteurs. Ces modèles ont subi des modifications afin d'accommoder les observations notées au laboratoire. Nous allons présenter les principaux modèles pharmacologiques, allant des classiques aux plus récents.

3.1 Le récepteur vu comme un interrupteur- Marche/Arrêt

Le modèle du complexe ternaire et ses dérivés sont basés sur l'existence de deux conformations qu'un récepteur peut adopter (Figure 11). Dans le modèle le plus simple, le récepteur fonctionnerait alors comme un interrupteur qui ne peut adopter que deux positions (arrêt ou marche), traduites par une conformation **R** inactive et une conformation **R*** active (Kenakin 1996). Le modèle du complexe ternaire, propose que le récepteur, la protéine G ainsi que les effecteurs sont des entités

séparées qui diffusent librement dans la membrane plasmique (De Lean et al. 1980). L'activation de la protéine G, requiert la présence de l'agoniste car elle dépend de la fréquence de collisions entre le complexe agoniste-récepteur avec la protéine G (Figure 11) (De Lean et al. 1980; Vauquelin and Van Liefde 2005).

Samama et al. modifient le modèle du complexe ternaire afin d'expliquer l'activité dite constitutive des récepteurs, qui est mesurée en absence d'agoniste dans des systèmes cellulaires recombinants (Figure 11) (Samama et al. 1993). Cette version modifiée du modèle permet aussi d'expliquer l'effet des agonistes inverses qui inhibent l'activité constitutive des récepteurs de manière dose-dépendante (Kenakin 1996). Selon ce modèle, le récepteur avec une activité constitutive oscillerait entre un état inactif et un état actif en absence d'agoniste, et l'ajout de l'agoniste inverse augmenterait la proportion des récepteurs inactifs. Plus tard, ce modèle est encore modifié et devient le modèle du complexe ternaire cubique, car il permet d'inclure l'observation que le récepteur et la protéine G peuvent former un complexe en absence de l'agoniste (Figure 11) (Weiss et al. 1996).

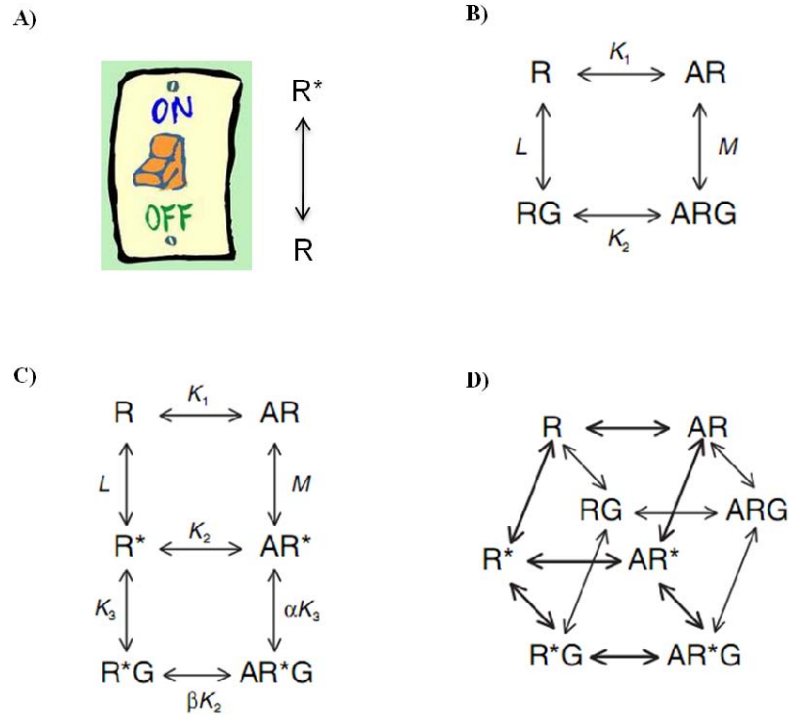


Figure 11 Modèles pharmacologiques classiques de l'activation des récepteurs

(A) Le récepteur vu comme un interrupteur, qui peut adopter deux positions, la conformation inactive R et la conformation active R^* . (B) Le modèle du complexe ternaire proposé par De Lean et al. (De Lean et al. 1980). R représente le récepteur, qui en présence de l'agoniste forme le complexe AR . Ce dernier, peut d'interagir avec la protéine G afin de former les complexes ternaires ARG actif. (C) Le modèle du complexe ternaire modifié par Samama et al. (Samama et al. 1993). Le récepteur à l'état inactif R doit adopter une conformation active R^* afin d'interagir et d'activer la protéine G. Cette transition peut être spontanée mais elle est favorisée par le ligand. (D) Modèle cubique du complexe ternaire proposé par Weiss et al. (Weiss et al. 1996). Dans ce modèle, le récepteur inactif peut aussi interagir avec la protéine G. Les constantes d'équilibre de dissociation sont désignées par les lettres $K1$, $K2$, L et M . Tiré de Vauquelin, G. et al. (Vauquelin and Van Liefde 2005).

3.2 Conformations intermédiaires du récepteur

Plus tard, le modèle de liaison séquentielle et de sélection conformationnelle est proposé afin d'expliquer l'existence de conformations intermédiaires des récepteurs (Ra' et Ra'') (Figure 12) (Gether et al. 1997; Gether 2000). Dans ce modèle, les récepteurs peuvent adopter différentes conformations actives et inactives

entre lesquelles ils oscillent spontanément. La liaison de l'agoniste, et l'activation du récepteur qui s'en suit, serait un processus séquentiel. En effet, suite à l'interaction initiale entre l'agoniste et le récepteur, une série d'interactions se forment afin d'atteindre la conformation active finale du récepteur en passant par différentes conformations intermédiaires (Gether et al. 1997). Ce modèle suggère aussi que l'interaction entre le récepteur et certains groupes chimiques des agonistes stabiliseraient des états conformationnels du récepteur menant à des réponses fonctionnelles distinctes.

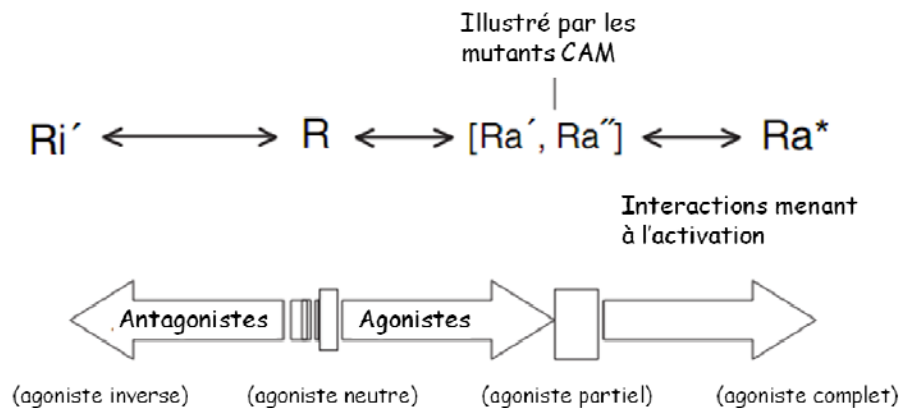


Figure 12 Modèle de liaison séquentielle et de la sélection conformationnelle

Dans ce modèle, le récepteur adopte spontanément des conformations actives et inactives. Son activation suite à la liaison de l'agoniste est séquentielle (Gether et al. 1997; Gether 2000). La conformation R du récepteur à l'état basal est stabilisée par des antagonistes neutres. **Ra*** correspond au récepteur à l'état actif. Les états intermédiaire/préactivés sont désignées par **Ra'** et **Ra''**. Les mutants constitutivement actifs (CAM) adoptent aussi des conformations **Ra'** et **Ra''**. Ils peuvent être stabilisés par des agonistes partiels, ce qui mènerait à la conformation **Ra***. Enfin, **Ri'** représente les conformations inactives du récepteur qui sont stabilisées par des agonistes inverses. Adapté de Vauquelin, G. et al. (Vauquelin and Van Liefde 2005).

L'existence de conformations intermédiaires des 7TMRs est appuyée, par les études de spectroscopie de fluorescence, qui ont permis de mesurer plusieurs conformations intermédiaires en présence d'agoniste et cela en temps réel (Gether et al. 1997; Gether 2000). À titre d'exemple, Swaminath et al. mesurent les changements conformationnels induits par les catécholamines sur des récepteurs β 2-adrénergiques purifiés. Ils montrent que des agonistes, comme la norépinephrine, induisent des changements dans le récepteur qui mènent à deux états conformationnels cinétiquement distinguables (rapide et lent) et dont les conséquences sont fonctionnellement différentes. En effet, la stimulation des récepteurs avec la dopamine induit uniquement des changements conformationnels rapides qui se traduisent par l'activation de la protéine $G_{\alpha s}$, mais non pas par l'internalisation des récepteurs. Par contre, des changements conformationnels rapides et lents sont mesurés suite à la stimulation avec la norépinephrine ou l'épinephrine, et se traduisent par l'activation de la protéine $G_{\alpha s}$ et l'internalisation des récepteurs (Swaminath et al. 2004).

Également, la caractérisation de mutants de récepteurs montre l'importance de résidus, tels que ceux des motifs E/DRY et N(L/F)YSS dans le maintien du récepteur dans une conformation inactive, et appuie aussi l'existence de conformations intermédiaires (Kjelsberg et al. 1992; Hulme et al. 1999; Gether 2000; Parnot et al. 2000). En effet, la substitution de ces résidus clés peut induire une activité constitutive dans plusieurs récepteurs (Hulme et al. 1999; Gether 2000; Parnot et al. 2000). Le premier exemple est celui du récepteur α 1B-adrénergique (Kjelsberg et al. 1992). La substitution du résidu alanine à la position 293 par les 19 autres acides aminés dans la boucle i3 du récepteur le rend constitutivement actif. L'activité constitutive du récepteur peut atteindre jusqu'à 50% de l'activité du récepteur de type sauvage en présence de l'agoniste (Kjelsberg et al. 1992). De façon comparable, la substitution du résidu asparagine à la position 111 (Asn111), du récepteur AT1, par un résidu glycine, alanine ou sérine, donne lieu à une gamme de mutants avec des activités constitutives différentes. L'activité des mutants est davantage augmentée par l'agoniste et atteint l'activité maximale du récepteur de type sauvage (Le et al. 2002; Le et al. 2003).

Enfin, le modèle de liaison séquentielle et de sélection conformationnelle permet aussi d'envisager que le récepteur peut adopter des conformations inactives distinctes. Cela permet d'expliquer la capacité d'agonistes inverses à protéger les récepteurs β 2-adrénergiques contre la protéolyse et la dénaturation due à l'augmentation de la température (Kobilka 1990; Gether et al. 1997). Ce modèle permet notamment d'expliquer l'action des agonistes partiels qui stabiliseraient de façon préférentielle des conformations intermédiaires du récepteur et facilitent ainsi le passage vers l'état actif (Gether et al. 1997).

3.3 L'espace conformationnel et la vision probabiliste des récepteurs

Les modèles classiques identifient le ligand, le récepteur et la protéine G, dans le but d'expliquer la relation entre ces différentes protéines. Ces modèles restent simples et ne permettent pas d'expliquer des phénomènes plus complexes tels que la sélectivité fonctionnelle (discutée plus loin). La vision probabiliste suggère que le récepteur occupe un espace conformationnel, un paysage énergétique contenant une collection de conformations du récepteur (Figure 13) (Kenakin 2009; Kenakin 2010; Vaidehi and Kenakin 2010).

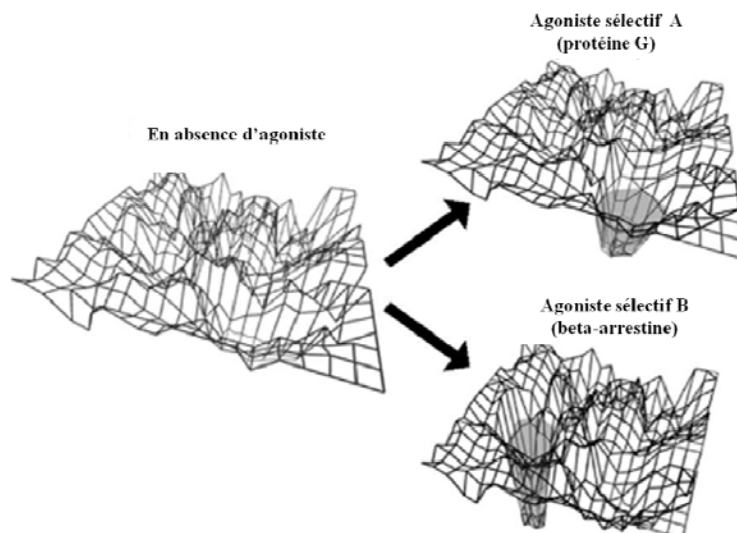


Figure 13 Le paysage conformationnel du récepteur

En absence d'agoniste, le récepteur occupe un espace conformationnel particulier. L'ajout de l'agoniste A sélectionne une conformation qui mène à l'activation de la protéine G tandis que l'agoniste B favorise le recrutement de la beta-arrestine. Adapté de Kenakin (Kenakin 2010).

3.3.1 La sélectivité fonctionnelle

L'observation que différents agonistes peuvent activer différentes réponses fonctionnelles, dépendantes ou indépendantes des protéines G, ouvre la voie à une nouvelle façon de concevoir les 7TMRs (Figure 14). Cette observation peut être expliquée par un concept aux noms multiples, appelé sélectivité fonctionnelle, trafic de liaison dirigé par le ligand, agonisme dirigé ou encore l'efficacité dirigée par le ligand (respectivement *functional selectivity*, *ligand-directed trafficking of receptor signalling*, *biased agonism*, *ligand-biased efficacy*) (Galandrin et al. 2007; Urban et al. 2007). Théoriquement, un agoniste peut induire une conformation active unique du récepteur qui lui est spécifique, ce qui mène à l'idée qu'un récepteur peut adopter un nombre de conformations illimitées (Kenakin 1995; Perez and Karnik 2005). Néanmoins, il est possible que certaines de ces conformations ne soient pas physiologiquement pertinentes.

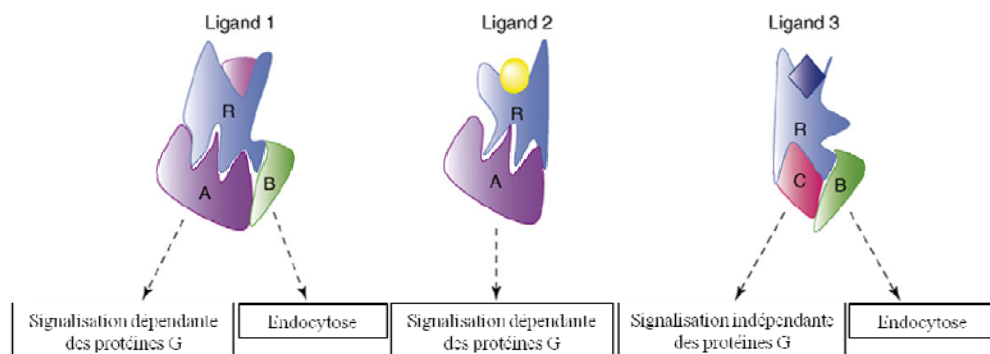


Figure 14 Représentation schématique de la sélectivité fonctionnelle

Sont représentés, trois différents ligands qui peuvent induire et/ou stabiliser différentes conformations du récepteur. Ces différentes conformations permettent d'activer des effecteurs distincts avec des efficacités distinctes. Adapté à partir de Galandrin et al. (Galandrin et al. 2007).

Il existe dans la littérature un grand nombre d'exemples de sélectivité fonctionnelle des 7TMRs. Parmi les premières études montrant que différents ligands naturels donnent lieu à différents effets fonctionnels est celle portant sur le récepteur PACAP (*type-1 pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide*). Les auteurs montrent que les agonistes, PACAP-27 et PACAP-38 induisent l'activité de l'adénylate cyclase avec une puissance comparable, mais que seul PACAP-38 induit la production d'inositols phosphates en stimulant la phospholipase C (PLC) (Spengler et al. 1993). Également, la sélectivité fonctionnelle est aussi mise en évidence grâce à l'étude de mutants de 7TMRs. L'une des première études publiées à ce sujet est l'analyse de la mutation de cystéine en phénylalanine dans le domaine TMIII du récepteur α_{1b} -adrénergique. Cette mutation donne lieu à un récepteur constitutivement actif, mais activant sélectivement la voie de la phospholipase C, et non celle de la phospholipase A₂ (Perez et al. 1996; Perez and Karnik 2005).

La sélectivité fonctionnelle est un phénomène documenté dans le cas de ligands naturels tout comme pour des ligands synthétiques. En effet, le récepteur de chimiokine CCR7 possède deux ligands naturels, les chimiokines CCL19 et CCL21. L'internalisation de CCR7 dépend du ligand appliqué. En effet, l'internalisation induite par CCL21 est quatre fois moins efficace que celle induite par CCL19. Aussi, en présence de CCL21, l'internalisation du récepteur est indépendante de la beta-arrestine ce qui n'est pas le cas de l'endocytose suite au traitement avec CCL19. Ainsi, en absence de beta-arrestine, la migration des cellules en réponse à CCL19 est bloquée (Byers et al. 2008). Notamment, les travaux de Zidar et al. montrent que l'activation différentielle des GRK en réponse aux chimiokine CCL19 et CCL21 mène à des conséquences fonctionnelles dépendantes du ligand appliqué. Le récepteur peut-être phosphorylé par les GRK3 et GRK6 en réponse à CCL19 tandis qu'en présence de CCL21 seule la GRK6 phosphoryle le récepteur. Malgré que le recrutement de la beta-arrestine en réponse aux deux chimiokines a lieu, seule la réponse induite par CCL19 mène à la redistribution de la beta-arrestine 2 fusionnée à la protéine fluorescente verte (GFP) dans les vésicules d'endocytose et à la désensibilisation classique du récepteur (Zidar et al. 2009).

Le dernier exemple de sélectivité fonctionnelle que nous présentons est celui du récepteur de la dopamine D2. Gay et al. ont étudié l'effet de cinq ligands, respectivement SNAP (S-propylnorapomorphine), RNPA (R-propylnorapomorphine), DHX (dihydréxidine), DNS (dinapsoline) ainsi que le NDX (dinoxyline), sur trois fonctions du récepteur, (1) l'inhibition de la production d'AMPc, (2) la phosphorylation des MAPK, et (3) l'activation de canaux potassiques de type GIRK (G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels) (Gay et al. 2004). Les cinq différents ligands agissent différemment sur les trois voies de signalisation et lorsque comparés entre eux et à l'agoniste prototype du récepteur D2, QP (quinpirole), ces ligands possèdent des ordres de puissances et d'efficacités qui dépendent de la voie de signalisation étudiées. En regardant la phosphorylation des MAPK, les ligands DHX, DNS, DNX et RNPA possèdent des efficacités similaires au QP et SNAP est un agoniste partiel. L'ordre de puissance des ligands est le suivant : RNPA > QP = DNX > DHX > DNS = SNAP. Par contre, en regardant l'activation des canaux GIRK, seul DNX possède une efficacité comparable au ligand QP, tandis que DHX et DNS se comportent comme des agonistes partiels et RNPA ainsi que SNAP n'active pas ces canaux potassiques (Gay et al. 2004). Ces résultats mettent en évidence les différentes propriétés fonctionnelles des différents ligands du récepteur D2 et appuient le concept de sélectivité fonctionnelle. En effet, une caractéristique de la sélectivité fonctionnelle est l'inversion des ordres relatifs de puissance ou d'efficacité d'un groupe de ligands dans différentes voies de signalisation qui ne peut pas être expliquée par les modèles linéaires d'activation.

En résumé, le modèle probabiliste permet d'estimer la probabilité des différentes conformations adoptées par le récepteur en présence de différents ligands et supporte ainsi le concept de sélectivité fonctionnelle (Kenakin 2009; Kenakin 2010).

4. Les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines sont des protéines d'environ 8 à 12kDA. Membres de la famille des cytokines, ce sont des cytokines chimiotactiques dont le principal rôle est d'orienter les cellules dans l'organisme de façon dirigée. Les chimiokines agissent en liant des récepteurs de chimiokine appartenant à la famille des 7TMRs. Ces cytokines chimiotactiques font partie des ligands de récepteur les plus complexes à cause de leur grand nombre et leur spécificité croisée pour leurs récepteurs. Jusqu'à présent environ 50 différentes chimiokines ont été identifiées (Springael et al. 2005).

4.1 Les chimiokines

4.1.1 Structure générale

Les chimiokines possèdent des structures tertiaires semblables mais une homologie de séquence située entre 20% à 90%. Elles ont un domaine N-terminal de 6 à 10 acides aminés peu structuré qui est important pour leur activité. Le domaine N-terminal est suivi par une longue boucle nommée «boucle N», des déterminants de liaison invariables, trois feuillets β anti-parallèles et une hélice C-terminale.

La partie N-terminale des chimiokines semble être indispensable pour l'interaction avec le récepteur de chimiokine et l'activation de ce dernier (Figure 15). En effet, les chimiokines dont la partie N-terminal a été tronquée se comportent pour la plupart comme des antagonistes ou des agonistes partiels (Murphy et al. 2000). Enfin, les chimiokines possèdent d'un à trois ponts disulfures grâce aux résidus cystéines présent dans leur partie N-terminale (Allen et al. 2007). Ces ponts disulfures se forment entre le premier et le quatrième résidu cystéine ainsi qu'entre la deuxième et troisième cystéine. Ils sont indispensables pour la structure de la protéine (Springael et al. 2005).

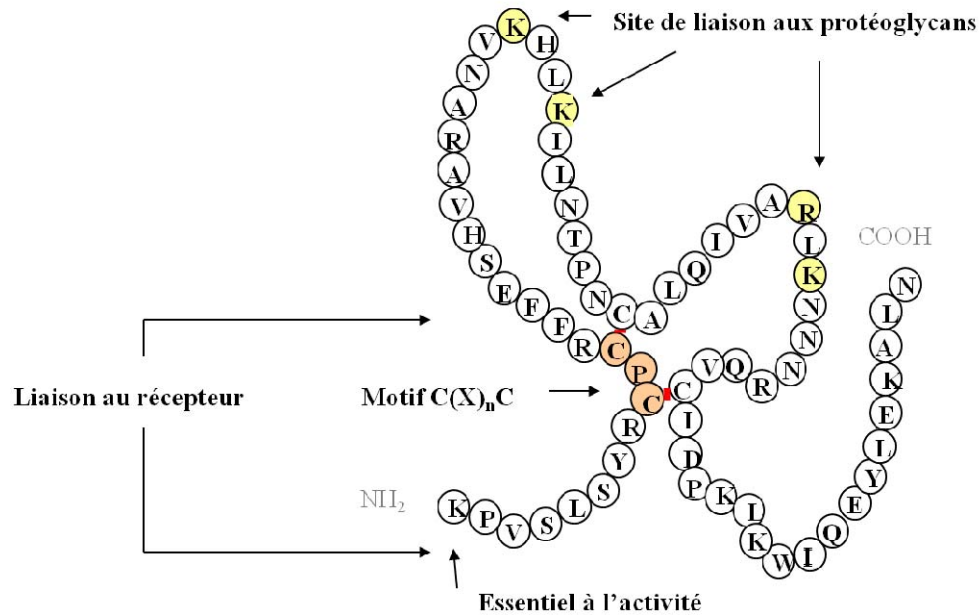


Figure 15 Représentation schématique d'une chimiokine.

Les résidus important pour la fonction et la structure de la chimiokine sont désignés par les différentes flèches.

4.1.2 Classification et nomenclature

Les chimiokines peuvent être classées dans quatre grandes familles selon le motif à deux résidus cystéines conservés dans leur partie N-terminale. Ainsi, ces cytokines chimiotactiques sont réparties dans les familles CXC, CC, C et CX3C où la lettre X désigne un acide aminé quelconque (Murphy et al. 2000; Allen et al. 2007). Les chimiokines des familles CXC, CC possèdent quatre résidus cystéines conservés, contrairement à celles de la famille C qui ne possèdent que deux cystéines conservées. La majorité des chimiokines appartiennent soit à la famille CXC ou CC. La lymphotactine humaine α et β ainsi que la fractalkine sont de rares chimiokines qui appartiennent respectivement aux familles C et CX3C (Murphy et al. 2000; Springael et al. 2005) (Figure 16).

Le système de nomenclature mis en place permet de systématiser la dénomination des chimiokines ainsi que leurs récepteurs. Ainsi, chaque ligand est identifié par la classe à laquelle il appartient (CC, CXC... etc.); la lettre L

pour «ligand» et un chiffre sont attribués à chaque chimiokine. Par exemple, la chimiokine MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) devient CCL2 car elle appartient à la famille CC des chimiokines. De façon générale, les récepteurs de chimiokines sont identifiés grâce à la lettre **R** pour «récepteur» et en fonction de la chimiokine qu'ils lient. Donc, le récepteur du ligand CCL2 est CCR2. Malgré l'introduction de ce système de nomenclature, l'ancienne nomenclature reste aussi fréquemment utilisée (Allen et al. 2007).

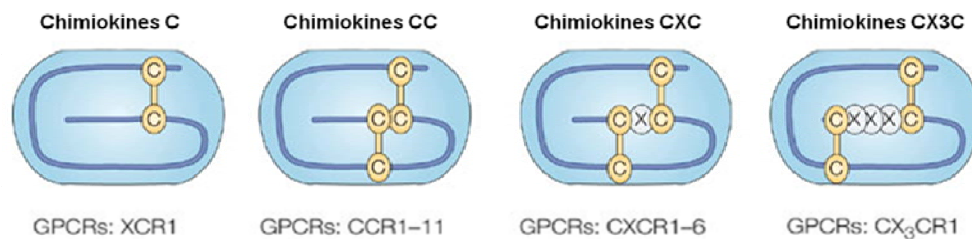


Figure 16 Classification des chimiokines et leurs récepteurs

Représentation schématique des quatre grandes familles de chimiokines et leurs récepteurs. Adapté à partir de Sodhi, A. et al. (Sodhi et al. 2004).

4.2 Les récepteurs de chimiokine

Les récepteurs de chimiokine sont des 7TMRs (Murphy et al. 2000). À ce jour, une vingtaine de récepteurs de chimiokine ont été identifiés (Springael et al. 2005). Les chimiokines et leurs récepteurs ont un rapport promiscuitif, car plusieurs chimiokines peuvent lier un ou plusieurs récepteurs et *vice versa* (discuté plus loin).

Les récepteurs et leurs chimiokines permettent aux cellules du système immunitaire de communiquer entre elles. Ils sont importants, entre autres, dans l'homéostasie de l'organisme ainsi que dans la réponse immune innée et acquise. En effet, la plupart des processus impliquant le déplacement des cellules du système immunitaire dépendent des chimiokines et de leurs récepteurs. Un dommage au système de chimiokines/récepteurs peut mener à des pathologies graves comme

l'arthrite rhumatoïde, l'asthme ainsi que des maladies immunitaires (Murphy et al. 2000).

4.2.1 Classification

Les récepteurs de chimiokines sont classés selon la ou les chimiokines qu'ils lient. Il existe sept membres de la famille des récepteurs CXCR, onze membres de la famille des récepteurs CCR, un membre dans chacune des familles XCR et CX3CR (Murphy et al. 2000; Springael et al. 2005). Certains des récepteurs de chimiokines possèdent un large patron d'expression. En effet, ils ne sont pas exclusifs aux cellules immunitaires mais sont aussi présents à la surface de multiples cellules telles que les cellules endothéliales; épithéliales; des neurones ainsi qu'à la surface des cellules gliales du cerveau (Murphy et al. 2000).

4.2.2 Propriétés

Les récepteurs de chimiokine possèdent les caractéristiques communes des 7TMR de la famille R (rhodopsine) mais possèdent aussi des caractéristiques propres. En effet, comme la plupart des récepteurs de la famille R, les récepteurs de chimiokines possèdent deux résidus cystéine conservés qui forment un pont disulfure entre les boucles extracellulaires e1 et e2. La particularité des récepteurs de chimiokines est qu'ils possèdent deux résidus cystéine additionnels qui formerait un deuxième pont disulfure entre la boucle e3 et la partie N-terminale du récepteur (Springael et al. 2005). Ces ponts disulfures sont importants dans repliement du récepteur; l'interaction avec le ligand et/ou la capacité d'activer les voies de signalisation intracellulaires (Tournamille et al. 1997; Blanpain et al. 1999; Ai and Liao 2002).

Notamment, la plupart des récepteurs de chimiokine possèdent un motif conservé TxP dans le domaine TMII. Des études de modélisation suggèrent que le résidu proline du motif TxP sert à introduire un angle dans le domaine TMII qui permettrait de rapprocher sa partie extracellulaire de façon à être en contact avec le domaine TMIII. Dans le cas du récepteur de chimiokine CCR5, le motif TxP joue un rôle dans la liaison du ligand et la signalisation du récepteur (Springael et al. 2005).

4.2.3 Les contacts récepteur/chimiokine

L'extrémité N-terminale et les boucles extracellulaires des récepteurs de chimiokine sont importantes pour leur interaction avec les chimiokines. Dans le cas des récepteurs de chimiokines CC, la deuxième boucle extracellulaire des récepteurs semble jouer un rôle important dans la spécificité de l'interaction avec leurs chimiokines (LaRosa et al. 1992; Blanpain et al. 2003; Springael et al. 2005). En effet, il est montré pour les récepteurs de chimiokine CCR2 et CCR5, que des anticorps monoclonaux dirigés contre leur deuxième boucle extracellulaire inhibent la liaison des ligands (Blanpain et al. 2003). Par ailleurs, l'extrémité N-terminale serait importante pour la spécificité de liaison des ligands. À titre d'exemple, le fait d'inter-changer les extrémités N-terminales des récepteurs CXCR1 et CXCR2 inverse aussi la spécificité de leurs ligands respectifs (LaRosa et al. 1992; Springael et al. 2005).

Le site d'interaction du récepteur avec la chimiokine est complexe. Il serait composé de plusieurs domaines non contigus et d'au moins deux sites d'interaction avec le ligand. La première interaction du ligand se ferait avec la partie N-terminale du récepteur. Ce premier contact permettrait d'établir la seconde interaction, c'est-à-dire celle de la chimiokine avec les boucles extracellulaires et l'extrémité des domaines TM (Monteclaro and Charo 1996; Crump et al. 1997; Blanpain et al. 2003).

4.2.4 Oligomérisation des récepteurs de chimiokines

Étant donné que les récepteurs de chimiokine sont des 7TMRs, ils peuvent former des homo- ou hétérodimère et même des oligomères. Cela a été montré grâce à de multiples études de co-immunoprécipitation ou de techniques de transfert d'énergie par résonance pour plusieurs récepteurs dont CCR2, CXCR4, CXCR7 et CCR5 (Benkirane et al. 1997; Rodriguez-Frade et al. 1999; Mellado et al. 2001; Issafras et al. 2002; Babcock et al. 2003; Hernanz-Falcon et al. 2004; El-Asmar et al. 2005; Percherancier et al. 2005; Springael et al. 2005).

La dimérisation des récepteurs de chimiokines, tout comme celle des autres 7TMRs, a été un sujet de débat pendant longtemps. En effet, les études de co-immunprécipitation montrent que les dimères de récepteurs tels que CCR2 et CCR5 ne se forment que suite au traitement avec leurs ligands (Vila-Coro et al. 2000; Mellado et al. 2001). Par contre, les nouvelles méthodes biophysiques, qui permettent d'étudier les récepteurs de chimiokines dans les cellules vivantes, montrent que les récepteurs de chimiokine peuvent former des dimères constitutifs (Issafras et al. 2002; Babcock et al. 2003; Percherancier et al. 2005). À titre d'exemple, Percherancier et al. montrent grâce au transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) que les récepteurs CXCR4 et CCR2 forment des homodimères ainsi que des hétérodimères constitutifs. Notamment, le traitement avec les ligands permet de mesurer les changements conformationnels induits par ces ligands au sein des homo- et hétérodimères constitutifs (Percherancier et al. 2005).

5. CXCR4

Le récepteur de chimiokine CXCR4 est un 7TMR directement impliqué dans une multitude d'événements tant physiologiques que pathologiques. Cela fait que ce polypeptide de 352 acides aminés est l'un des récepteurs de chimiokine les plus étudiés (Busillo and Benovic 2007). Il possède comme seul ligand naturel, la chimiokine SDF-1 (*Stromal Cell Derived Factor 1*), aussi nommée CXCL12. La relation CXCR4/SDF-1 a pendant longtemps été cataloguée comme étant exclusive, cela jusqu'à la mise en évidence que SDF-1 est aussi un ligand du récepteur CXCR7 (présenté plus loin) (Balabanian et al. 2005; Burns et al. 2006). Dans cette partie, nous discuterons uniquement des principales conséquences de signalisation de la liaison de SDF-1 à CXCR4. Nous nous attarderons également à l'expression et aux rôles de ce récepteur. Nous illustrerons ces derniers, grâce à deux exemples concrets montrant son importance physiologique et pathologique. Nous traiterons respectivement, de l'implication de CXCR4 dans la migration des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ainsi que la dissémination des métastases dans les cancers épithéliaux.

5.1 Signalisation

La liaison de SDF-1 à CXCR4 permet d'activer une multitude de voies de signalisation menant à diverses réponses physiologiques. Ce récepteur peut activer la signalisation via les protéines $G\alpha_i$, sensibles à la PTX (Di Salvo et al. 2000), ainsi que par la protéine $G\alpha_q$ (Rochdi and Parent 2003). L'activation de la protéine $G\alpha_i$ inhibe l'adénylate cyclase diminuant la production d'AMPc et active les tyrosines kinases de type Src. Le dimère $G\beta\gamma$ active la phospholipase C β (PLC β) ainsi que la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) qui sont importantes dans la chimiotaxie, dans l'adhésion cellulaire ainsi que la transcription de gènes cibles (Ottoson et al. 2001; Fischer et al. 2004; Busillo and Benovic 2007). CXCR4 est aussi responsable de changements dans le cytosquelette des cellules, comme la polymérisation d'actine lors de la chimiotaxie, car il active les petites protéines G dont Rho, Rac et Cdc 42 (Ganju et al. 1998; Nishita et al. 2002; Vicente-Manzanares et al. 2002). La stimulation de CXCR4 par SDF-1 active aussi la protéine kinase C (PKC) qui à son tour induit la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP) essentielles à la migration dirigée des cellules (Lapidot 2001). Également, l'activation de CXCR4 induit l'activation des intégrines sur les cellules immunitaires, aussi importantes dans la chimiotaxie (Ley et al. 2007). Les intégrines sont des protéines à un domaine transmembranaire qui jouent un rôle important dans les contacts cellule-cellule (Ley et al. 2007).

Par ailleurs, l'activation de la signalisation par CXCR4 peut aussi être indépendante des protéines G. Tel que rapporté dans la littérature, CXCR4 peut activer la voie JAK/STAT (Ganju et al. 1998; Vila-Coro et al. 1999). En effet, la stimulation avec SDF-1 induit l'association transitoire de JAK2 et 3 à CXCR4 qui est nécessaire à l'activation et à la translocation au noyau des protéines STAT (Ganju et al. 1998; Vila-Coro et al. 1999). Néanmoins, au lieu d'avoir un effet inhibiteur, le pré-traitement avec la PTX stabilise l'association de JAK à CXCR4. Des études suggèrent ainsi que la protéine G serait impliquée dans le recyclage du complexe JAK/STAT plutôt que dans l'activation de cette voie de signalisation (Ganju et al. 1998; Vila-Coro et al. 1999). Également, CXCR4 peut induire la transcription de gènes cible grâce à l'activation des MAPK de façon dépendante de la beta-arrestine (Ganju et al. 1998). Suite à son activation, le récepteur est

phosphorylé par les protéines GRK, telles que GRK2 et GRK6, importantes pour le recrutement de la beta-arrestine (Cheng et al. 2000; Orsini et al. 2000). Il est rapporté que les deux variants de la beta-arrestine sont impliqués dans l'internalisation de CXCR4. Les deux beta-arrestines stimulent l'activation des voies ERK1/2, tandis que seule la beta-arrestine 2 est impliquée dans l'activation de la voie MAPK-p38 ainsi que dans la chimiotaxie induite par CXCR4 (Cheng et al. 2000; Sun et al. 2002).

5.2 Expression et rôles

CXCR4 est présent à la surface d'une grande variété de cellules, telles que les cellules hématopoïétiques, incluant neutrophiles, monocytes, lymphocytes B et leurs précurseurs, les cellules souches de la moelle osseuse ainsi que les cellules dendritiques dérivées du sang (Bermejo et al. 1998; Aiuti et al. 1999; Gupta et al. 1999; Franitza et al. 2002). Il est aussi présent à la surface des cellules de Langerhans, des macrophages, et des cellules T matures et immatures dans le thymus (Bleul et al. 1997; Zaitseva et al. 1997; Zaitseva et al. 1998). CXCR4 est également exprimé à la surface des cellules endothéliales vasculaires et des neurones dans le système nerveux, central et périphérique, en plus des microglies et des astrocytes (Bleul et al. 1997; He et al. 1997; Zaitseva et al. 1997; Volin et al. 1998; Zaitseva et al. 1998).

CXCR4 et son ligand SDF-1 jouent un rôle important dans une pléthore d'évènements physiologiques et cela très tôt dans le développement. En effet, les souris CXCR4^{-/-} ou SDF-1^{-/-} possèdent un phénotype semblable car ces souris meurent durant la période périnatale à cause de défauts dans la formation des sceptres ventriculaires du cœur (Ma et al. 1998; Tachibana et al. 1998; Zou et al. 1998). Les souriceaux ont aussi des défauts de vascularisation gastrique, du développement du cerveau, de myélopoïèse dans la moelle osseuse, de maturation des cellules B et de lymphopoïèse. Notamment, CXCR4 est important dans l'hématopoïèse, la réponse immunitaire, la migration des cellules souches hématopoïétiques (CSH), l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles, les maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde ainsi que la dissémination de métastases dans les cancers épithéliaux (Feng et al. 1996; Bradstock et al. 2000;

Muller et al. 2001; Bartolome et al. 2004; Cabioglu et al. 2005; Dar et al. 2006; Zlotnik 2006; Zlotnik 2006). Tel que mentionné précédemment, nous avons choisi d'illustrer deux fonctions spécifiques de CXCR4 car elles sont pertinentes dans le cadre de cette thèse.

5.3 Mobilisation et domiciliation des cellules souches hématopoïétiques

La migration des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la circulation sanguine, à travers l'endothélium, vers différents organes ainsi que dans la moelle osseuse définit la domiciliation (Figure 17). Elle est requise notamment dans l'embryogénèse, la réparation tissulaire ainsi que dans le contexte clinique de la transplantation. Suite à la domiciliation des CSH transplantées dans la moelle osseuse, les cellules doivent s'y établir de façon permanente afin qu'il y ait prise de greffe et ainsi repopulation de la moelle osseuse. À l'opposé, lors de la mobilisation, les CSH sont recrutées de la moelle osseuse vers la circulation sanguine en réponse à un signal, induit par un stress ou un agent mobilisant qui interrompt l'interaction entre SDF-1 et le récepteur CXCR4 (Miller et al. 2008). Malgré cela, la migration (domiciliation et mobilisation) des CSH reste un processus actif, rapide et coordonné qui nécessite plusieurs étapes. La signalisation CXCR4/SDF-1 y est impliquée, car elle régule la rétention des CSH, leur domiciliation, ainsi que leur mobilisation dans des conditions physiologiques et pathologiques (Lapidot et al. 2005; Chute 2006).

Les CSH possèdent le potentiel d'auto-renouvellement et de repopulation car elles peuvent se différencier en cellules immunes et sanguines (Lapidot et al. 2005; Chute 2006). Chez l'adulte la moelle osseuse, aussi nommée niche ou microenvironnement, constitue le réservoir des CSH. Elle est composée de différents types cellulaires comme les cellules stromales, qui sécrètent SDF-1, des fibroblastes, des ostéoclastes ainsi que des ostéoblastes. Grâce aux contacts cellule-cellule ainsi qu'aux différentes molécules sécrétées, la moelle osseuse procure un environnement propice aux CSH (Lapidot et al. 2005; Chute 2006). Cette niche est un environnement hypoxique favorisant l'expression de SDF-1 et CXCR4, qui sont sous le contrôle du facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia Induced Factor 1 α*) (Ceradini et al. 2004).

CXCR4 est exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires de la niche, dont les CSH immatures et ceux en cours de maturation (Lapidot 2001; Lapidot et al. 2005). De façon générale, lors de la domiciliation, les CSH exprimant CXCR4 migrent vers un gradient de SDF-1, présent abondamment dans la moelle osseuse (Miller et al. 2008). Dans ce contexte, l'expression de CXCR4 est très dynamique. L'augmentation de son expression à la surface des cellules CSH mène à l'augmentation de la migration de ces cellules en réponse à SDF-1, de leur domiciliation et la repopulation de la moelle osseuse *in vivo* (Lapidot et al. 2005). Un environnement riche en SDF-1, induit l'internalisation de CXCR4 ainsi que la survie cellulaire et la quiescence des CSH, tandis que de faibles concentrations de SDF-1 favorisent la motilité, la prolifération ainsi que leur migration (Lapidot 2001; Lapidot et al. 2005).

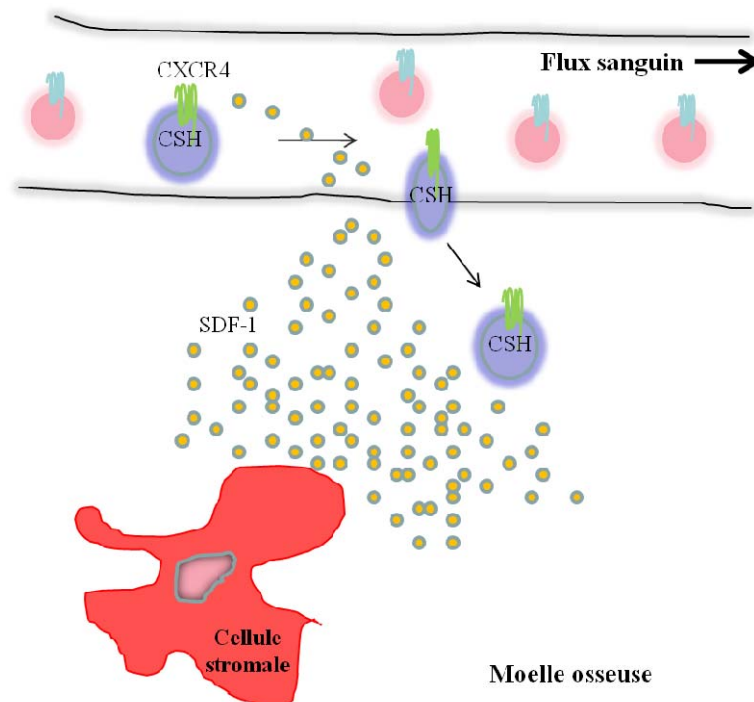


Figure 17 Domiciliation des cellules souches hématopoïétiques

Représentation schématique simplifiée. Les cellules souches (mauve) exprimant CXCR4 (vert) migrent vers la moelle osseuse riche en SDF-1 (cercles oranges). SDF-1 est sécrété par des cellules telles que les cellules stromales (rouge).

Plusieurs composantes de la signalisation cellulaire, induites par l'interaction de SDF-1 avec CXCR4, sont importantes pour la migration des CSH dans la moelle osseuse. Notamment, la PKC ξ cytoplasmique qui suite à la stimulation avec SDF-1, est relocalisée à la membrane plasmique. Elle favorise la migration des CSH en stimulant la sécrétion de la métalloprotéase matricielle MMP-9, une enzyme de dégradation de la matrice extracellulaire. Cette PKC augmente l'activité et l'expression des molécules d'adhésion (sélectines et intégrines). Ces dernières sont essentielles à la motilité cellulaire (Lapidot et al. 2005; Chute 2006). Cela dit, l'inhibition de la PKC ξ prévient la repopulation de la moelle osseuse *in vivo* ainsi que la migration des CSH *in vitro* sans toutefois affecter leur domiciliation. Par contre, l'inhibition de façon non spécifique des PKC en général inhibe complètement la domiciliation des CSH, ce qui montre leur rôle important dans ce phénomène (Lapidot et al. 2005).

Notamment, la petite protéine G Rac1 co-localise avec CXCR4 suite à la stimulation avec SDF-1 dans des compartiments de la membrane plasmique (*lipid raft*). La co-localisation de Rac1 avec CXCR4 est rapportée dans la littérature comme étant aussi essentielle dans la migration des CSH et la repopulation de la moelle osseuse (Lapidot et al. 2005). Une autre étude montre que l'activation de la protéine G α i est aussi importante dans la domiciliation des CSH, car l'incubation des CSH humaines avec la PTX, inhibiteur de l'activation de la protéine G α i, empêche la domiciliation de ces cellules *in vivo* en réponse à SDF-1 dans un modèle murin (Shen et al. 2001). Ainsi, l'axe CXCR4/SDF-1 est important dans la migration des cellules CSH (Chute 2006).

5.4 Dissémination des métastases dans les cancers épithéliaux

Le récepteur CXCR4 est présent à la surface d'un grand nombre de cellules cancéreuses d'origines variées (Muller et al. 2001; Kato et al. 2003; Spano et al. 2004; Cabioglu et al. 2005; Gelmini et al. 2009; Hassan et al. 2009; Uchida et al. 2009). Lorsque CXCR4 est exprimé à la surface de cellules saines, tel que les cellules hématopoïétiques mais son expression est généralement augmentée à la surface des variantes cancéreuses de ces même cellules (Burger et al. 2003; Helbig et

al. 2003). Cependant, l'expression de CXCR4 peut aussi être induite dans des cellules cancéreuses qui à l'origine n'exprimaient que peu ou pas ce récepteur. Plusieurs facteurs contribuent à l'augmentation de l'expression de CXCR4 dans les cellules cancéreuses (Helbig et al. 2003; Ceradini et al. 2004; Aman and Piotrowski 2008). L'un des facteurs qui accroît cette expression est le facteur de transcription HIF-1 α , qui est activé dans des conditions hypoxiques apparaissant lors de la progression tumorale. Rappelons que l'expression de SDF-1 est aussi augmentée dans des conditions hypoxiques (Ceradini et al. 2004). Notamment, la forte expression de CXCR4 pourrait aussi être causée par l'altération de sa régulation post-traductionnelle, telle que son ubiquitination. Il est rapporté dans la littérature que l'inhibition de l'ubiquitination de CXCR4, augmente son expression dans la lignée de cellules du cancer du sein, Her2/neu (Li et al. 2004). Aussi, le facteur de croissance vasculaire endothélial VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ainsi que l'activation de la voie NF- κ B régulent à la hausse l'expression de CXCR4 (Bachelder et al. 2002; Helbig et al. 2003).

Par ailleurs, une métastase est une tumeur secondaire développée à un site éloigné de la tumeur primaire. La dissémination des métastases est le résultat de plusieurs étapes, hautement régulées, non aléatoires et sélectives pour l'organe « accueillant » la tumeur secondaire (Muller et al. 2001). CXCR4 est non seulement important dans le développement de la tumeur primaire mais semble indispensable pour la migration dirigée des cellules cancéreuses et l'invasion des organes secondaires (Muller et al. 2001; Busillo and Benovic 2007). En effet, l'activation de CXCR4 par SDF-1 stimule la production des MMP, ce qui permet aux cellules cancéreuses de quitter la tumeur primaire. L'activation de CXCR4 mène aussi à l'activation des intégrines, essentielles à la migration dirigée des cellules cancéreuses une fois dans la circulation (Burger et al. 2003). Pour plusieurs cancers, notamment celui du sein, de la thyroïde et des neuroblastomes, les cellules cancéreuses migrent vers un gradient de SDF-1 et sont « domiciliées » dans les organes riches en SDF-1 (Figure 18). Les métastases du cancer du sein se nichent principalement dans la moelle osseuse, le foie, les ganglions lymphatiques ainsi que les poumons, des organes riches en SDF-1 (Muller et al. 2001). L'inhibition de CXCR4, par exemple

avec des anticorps ciblant CXCR4, inhibe la dissémination métastatique des cellules cancéreuses du sein (Muller et al. 2001).

Les cellules cancéreuses exploitent le système de chimiokine (CXCR4/SDF-1) qui leur permet non seulement de proliférer, mais est nécessaire, dans plusieurs types de cancers à la dissémination des métastases. Ainsi, ces cellules se comportent comme des cellules du système immunitaire ou même des cellules souches hématopoïétiques, qui migrent de façon dirigée, grâce à CXCR4, vers un site riche en SDF-1 (Muller et al. 2001; Darash-Yahana et al. 2004; Li et al. 2004; Spano et al. 2004; Uchida et al. 2009).

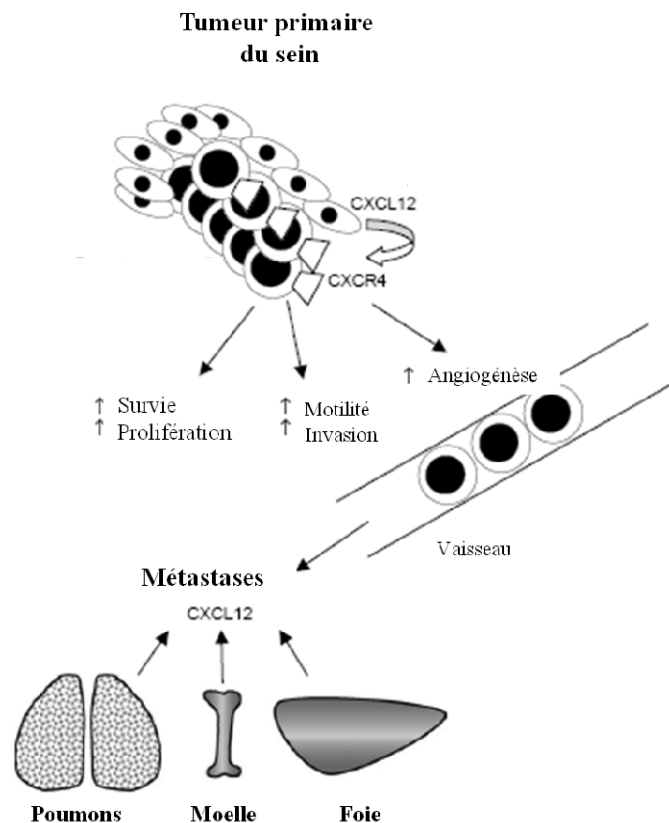


Figure 18 L'axe CXCR4/SDF-1 dans la dissémination de métastases du cancer du sein

Les cellules cancéreuses exprimant CXCR4 deviennent motiles et sont dirigées vers les sites riches en SDF-1 comme les poumons, la moelle osseuse et le foie, les principaux sites métastatiques. Adapté à partir de Luker et al. (Luker and Luker 2006)

6. CXCR7

CXCR7 est connu depuis le début des années 1990. Il a été cloné à partir d'une librairie d'ADNc de chien. Anciennement nommé RDC1 (*Receptor Dog cDNA*), plus tard il est classé en tant que membre de la famille des récepteurs de chimiokine (Balabanian et al. 2005; Burns et al. 2006). CXCR7 possède comme ligand SDF-1, jusqu'ici présumée ligand sélectif de CXCR4, ainsi que la chimiokine ITAC (*Interferon-inducible T-cell Alpha Chemoattractant*), qui est aussi un ligand naturel du récepteur CXCR3.

6.1 Récepteur alternatif de la chimiokine SDF-1

L'observation que SDF-1 n'est pas le ligand exclusif de CXCR4 incite à réviser le rôle de CXCR4 dans les effets physiologiques et pathologiques de SDF-1 (Thelen and Thelen 2008; Maksym et al. 2009). Effectivement, l'interprétation des effets biologiques de SDF-1 doit désormais prendre en considération non seulement CXCR4 mais aussi CXCR7. La découverte que SDF-1 est un ligand de CXCR7 est alors un événement majeur qui soulève les questions suivantes :

- 1- Quel récepteur est responsable de chacun des effets rapportés de SDF-1?
- 2- Est-ce les axes SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 agissent l'un sur l'autre? Si oui, par quel mécanisme?
- 3- Est-ce que les fonctions respectives de CXCR4 et CXCR7 peuvent être disséquées par des inhibiteurs spécifiques, ou est-ce que les inhibiteurs ciblant CXCR4 ont aussi un effet sur CXCR7?

Avant de discuter de l'implication de CXCR7 dans les rôles et fonctions de SDF-1 et CXCR4, il est important de mieux connaître ce récepteur.

6.2 Signalisation atypique de CXCR7

Bien que CXCR7 fasse partie de la famille des récepteurs de chimiokine, il ne signale pas de façon classique. Les récepteurs de chimiokine signalent via les protéines G α i, inhibitrices de l'adénylase cyclase, sensibles à la PTX. En revanche, l'activation de CXCR7 ne permet pas d'inhiber l'adénylase cyclase, même si une interaction directe avec la protéine G α i a été montrée (Levoye et al. 2009). La stimulation de CXCR7 n'induit pas non plus des flux calciques intracellulaires, qui peuvent être induits par la protéine G α q ou des sous-unités G β γ des protéines G (Odemis et al. 2010). L'implication de CXCR7 dans la migration dirigée des cellules reste elle aussi sujet de débat. Selon les travaux de l'équipe du Dr Schall (Burns et al. 2006) et Grymula et al. (Grymula et al. 2010), CXCR7 n'induit pas la chimiotaxie, contrairement aux résultats de Balabanian et al. (Balabanian et al. 2005). Les raisons de ces comportements inattendus ne sont pas entièrement claires.

Notamment, la plupart des récepteurs de chimiokine possèdent un motif DRYLAIV dans leur boucle i2 qui semble être nécessaire mais pas suffisant pour l'activation de la protéine G. Dans CXCR7, cette séquence est altérée en DRYLSIT, et il a été proposé que cette divergence soit la cause des particularités de CXCR7. Cependant, cette altération ne permet pas de les expliquer, car les récepteurs CXCR6 et de la lymphotactine XCR1 possèdent eux aussi ces altérations, mais signalent de façon classique, dépendante des protéines G et sensible à la PTX (Yoshida et al. 1998; Chandrasekar et al. 2004).

Malgré que CXCR7 ne semble pas activer la signalisation cellulaire de façon classique, plusieurs équipes montrent que l'interaction SDF-1/CXCR7 induit l'internalisation du récepteur (Balabanian et al. 2005; Boldajipour et al. 2008). Nos travaux montrent pour la première fois que la stimulation de CXCR7 induit le recrutement de la beta-arrestine 2 au récepteur (Kalatskaya et al. 2009). Depuis, ce résultat a été reproduit, et nous montrons également que ce recrutement mène à l'activation des voies MAPK ERK 1/2 (Zabel et al. 2009; Gravel et al. 2010; Rajagopal et al. 2010). Ces observations supportent l'hypothèse que CXCR7 n'est pas un récepteur entièrement silencieux, mais qu'il induit bien une signalisation

intracellulaire, malgré qu'elle soit atypique comparativement à la signalisation classique attribuée aux récepteurs de chimiokine.

L'activation de ERK 1/2, ainsi que Akt, a aussi été démontrée par plusieurs équipes (Sierro et al. 2007; Wang et al. 2008; Grymula et al. 2010). Grymula et al montrent que la phosphorylation des ERK peut être atténuée suite à un traitement avec la PTX dans des cellules embryonnaires RMS (Rhabdomyosarcoma). Les cellules RMS utilisées dans ses expériences expriment fortement CXCR7, peu de CXCR4, et pas du tout le récepteur CXCR3 (le récepteur d'ITAC). Les auteurs attribuent l'activation des ERK1/2 et la sensibilité à la PTX à CXCR7 (Grymula et al. 2010). Les observations de Grymula et al pourraient être expliquées comme suit : la phosphorylation des ERK1/2 dépendrait de CXCR7 tandis que la sensibilité à la PTX serait causée par la présence, même faible, de CXCR4. Aussi, Grymula et al. exclue l'implication de CXCR4 dans la signalisation observée, lorsque les cellules sont stimulées par SDF-1, car ils utilisent deux ligands synthétiques, le T140 et l'AMD3100, développés à l'origine comme inhibiteurs spécifiques de CXCR4. Or, les travaux que nous présentons dans le cadre de cette thèse montrent qu'AMD3100 est aussi un ligand de CXCR7 et qu'il stimule le recrutement de la beta-arrestine 2 au récepteur (Kalatskaya et al. 2009).

Notamment, selon les travaux de Rajagopal et al., la phosphorylation des MAPK ERK via CXCR7 est induite par la beta-arrestine 2, de façon indépendante de la protéine G α i (Rajagopal et al. 2010). Dans un premier temps, un système de cellules recombinantes HEK293 est utilisé par Rajagopal et al. pour montrer que le traitement de CXCR7 avec SDF-1 ou ITAC induit le recrutement de la beta-arrestine 2 et la phosphorylation des MAPK ERK (Rajagopal et al. 2010). Ensuite, les auteurs de ce travail utilisent des cellules du muscle vasculaire lisse de rat (VSMC- *Vascular Smooth Muscle Cells*) qui expriment de façon endogène les récepteurs CXCR7 et CXCR4 mais pas CXCR3, le récepteur alternatif de la chimiokine ITAC. La stimulation des cellules VSMC avec SDF-1 induit l'activation des protéines G α i, probablement grâce à CXCR4, contrairement au traitement avec ITAC.

Afin d'évaluer directement l'implication de CXCR7 sur la migration des cellules VSMC, les auteurs focus la suite du travail sur le couple CXCR7/ITAC. Ainsi, en réponse à ITAC, les cellules VSMC migrent de façon dirigée. Le traitement avec la molécule CCX733 dirigée contre CXCR7 ou l'utilisation d'un siRNA (*Short Interfering RNA*) dirigé contre la beta-arrestine 2 bloque la migration des cellules VSMC contrairement à la molécule T487 dirigée contre CXCR3 et à l'AMD3100 dirigé contre CXCR4, qui ne montrent aucun effet sur la migration. Les auteurs concluent qu'en réponse à ITAC, CXCR7 induit le recrutement de la beta-arrestine 2, la phosphorylation des MAPK ERK ainsi que la migration des cellules VSMC de façon indépendante des protéines G α i (Rajagopal et al. 2010). Or, il est rapporté dans la littérature que CCX733 et AMD3100 peuvent aussi induire le recrutement de la beta-arrestine 2 à CXCR7 (Kalatskaya et al. 2009; Luker et al. 2009; Zabel et al. 2009). Cette observation ne remet pas en question les résultats de Rajagopal et al., mais appelle à la prudence lors de l'utilisation de ces molécules afin de disséquer les rôles de CXCR7.

En résumé, la signalisation de CXCR7 est caractérisée comme étant atypique en comparaison aux récepteurs de chimiokine mais malgré cela plusieurs résultats montrent que CXCR7 induit une signalisation intracellulaire. Cette réponse au ligand pourrait dépendre des effecteurs présents dans les cellules exprimant CXCR7.

6.3 Expression cellulaire et tissulaire

CXCR7 est exprimé dans plusieurs cellules hématopoïétiques telles les neutrophiles, les lymphocytes T et B et leurs précurseurs (Balabanian et al. 2005; Infantino et al. 2006; Sierro et al. 2007). Le niveau d'ARN messager de CXCR7 est élevé et la protéine elle-même est fortement exprimée dans les monocytes et les cellules pré-B (Infantino et al. 2006). Son expression est finement régulée au cours du développement et de la différenciation des cellules pré-B. Les travaux d'Infantino et al montrent que dans les cellules B mémoires l'expression de CXCR7 corrèle avec la capacité des cellules à se différencier en cellules plasmiques (Infantino et al. 2006). Les auteurs suggèrent que l'expression de CXCR7 pourrait être utilisée comme marqueur de maturation des cellules B mémoires sécrétrices d'anticorps. Ce

même groupe rapporte aussi que l'expression de CXCR7 à la surface des cellules dendritiques immatures est faible, mais qu'elle est augmentée rapidement lors de la maturation de ces cellules (Infantino et al. 2006).

CXCR7 est aussi présent dans des tissus non-hématopoïétiques. En effet, il est exprimé à la surface des cellules endothéliales tôt dans le développement embryonnaire (Burns et al. 2006) et il est aussi retrouvé dans les tissus neuronaux (Levoye et al. 2009). CXCR7 joue un rôle important dans le développement du système cardiovasculaire, car son absence cause la malformation des valves cardiaques dans des souris *knockout* CXCR7^{-/-}. Gerrits et al. (Gerrits et al. 2008) montrent que 75% des souris CXCR7^{-/-} meurent dans la première semaine après la naissance. Cela coïncide avec l'expression de CXCR7 dans les cellules vasculaires endothéliales et les cardiomyocytes. Ces souris possèdent des cœurs plus larges et montrent des signes de dégénérescence du myocarde (Gerrits et al. 2008). Ainsi, CXCR7 est impliqué dans le développement du cœur. Les souris CXCR7^{-/-} générées par Sierro et al. et Gerrits et al. possèdent un système hématopoïétique normal, et aucun organe ne semble être affecté par l'absence du récepteur (Sierro et al. 2007; Gerrits et al. 2008).

Les tissus sains non-transformés expriment peu de CXCR7, mais son ARN messager est abondant dans des cellules cardiaques; de foie; de poumons; de muscles squelettiques; des îlots de Langerhans, les cellules de la rate, et des ovaires (Maksym et al. 2009).

6.4 CXCR7 et le cancer

Un grand nombre de cellules cancéreuses expriment le récepteur CXCR7 et cela à des niveaux considérablement supérieurs que leurs variantes non transformées (Burns et al. 2006). L'expression de CXCR7 à la surface des cellules du cancer du sein et du poumon corrèle positivement avec le potentiel de ces cellules à proliférer, induire la vascularisation et à former des métastases (Miao et al. 2007). Aussi, les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs expriment CXCR7 contrairement aux vaisseaux normaux (Burns et al. 2006). La surexpression de CXCR7 dans le cancer est aussi associée à la croissance des

tumeurs (Burns et al. 2006). En effet, Miao et al. montrent que l'injection de cellules cancéreuses du sein ou de poumon forme de larges tumeurs dans des souris immunodéficientes (Miao et al. 2007). L'inhibition de l'expression de CXCR7 grâce à des siRNA a pour effet de diminuer la taille de ces tumeurs (Miao et al. 2007). Burns et al montrent, qu'en surexprimant CXCR7 dans des cellules cancéreuses, leur potentiel de croissance et leur adhésion sont grandement augmentés, ce qui aurait pour conséquence, d'augmenter leur potentiel métastatiques (Burns et al. 2006). Similairement, des expériences effectués sur des lignées cancéreuses de la prostate ont montrés que CXCR7 augmente leur survie, adhésion et chimiotaxie, ce qui par conséquent augmenterait leur dissémination métastatique et donc l'agressivité du cancer (Wang et al. 2008). L'équipe du Dr Schall montre aussi que, curieusement, dans ces cellules l'expression de CXCR7 corrèle avec l'activation de CXCR4 (Wang et al. 2008). Par ailleurs, l'expression de CXCR7 est aussi augmentée à la surface de cellules tumorales cervicales, du colon et les sarcomes (Maksym et al. 2009).

6.5 Le rôle de CXCR7 par rapport à CXCR4

Comme mentionné plus haut, l'indentification de CXCR7 comme récepteur alternatif de SDF-1 soulève un questionnement quant au rôle de CXCR7 par rapport à celui de CXCR4. En effet, l'une des questions soulevées est : est-ce les axes SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 agissent l'un sur l'autre? Si oui, par quel mécanisme? Des travaux ont adressé cette question dans deux situations différentes. Une fois lorsque CXCR7 et CXCR4 sont exprimés dans des cellules différentes, et lorsqu'ils sont co-exprimés dans les mêmes cellules. Cela donne lieu à deux visions différentes du rôle de CXCR7 par rapport à CXCR4, mais ces visions ne se contredisent pas.

6.5.1 Rôle de CXCR7 comme récepteur «decoy»

Étant donné la difficulté de montrer que CXCR7 active une signalisation intracellulaire «classique» des récepteurs de chimiokine, et que l'affinité de SDF-1 pour CXCR7 (0.4 ± 0.1 nM (Balabanian et al. 2005; Burns et al. 2006) est rapportée

comme étant supérieure à celle pour CXCR4 ($3.6 \pm 1.6\text{nM}$, Crump et al. 1997), certaines équipes postulent que CXCR7 n'aurait pas d'effet direct en soi.

L'hypothèse selon laquelle CXCR7 serait un récepteur « *decoy* » est basée sur une série d'observations. Notamment, dans le poisson zébré la migration des cellules primordiales germinales (PGC- *Primordial Germinal Cells*) dépend de SDF-1 et de CXCR4. Boldijapour et al. montrent que CXCR7 n'est pas exprimé sur les cellules PGC, mais plutôt sur les cellules les entourant (Boldajipour et al. 2008). Le rôle de CXCR7 serait alors de séquestrer la chimiokine et de permettre ainsi le maintien du gradient de SDF-1, essentiel à la migration dirigée des cellules PGC. Ils montrent notamment, qu'en absence de CXCR7 dans les embryons, cette migration est perturbée. De façon analogue, CXCR7 exprimé sur des cellules endothéliales, agirait comme récepteur « *decoy* » ce qui aurait comme conséquence le maintien du gradient de SDF-1 et ainsi de la migration de cellules exprimant CXCR4.

Il existe plusieurs récepteurs de chimiokine de type « *decoy* » tels que les récepteurs Duffy, D6, DARC ainsi que CCX-CKR (Borroni et al. 2008). Ces récepteurs peuvent interagir avec plusieurs chimiokines. Toutefois, ces interactions n'induisent pas de signalisation, ou du moins pas celle menant à la migration dirigée des cellules (Locati et al. 2005; Borroni et al. 2008). Ces récepteurs « *decoy* » sont aussi nommés des récepteurs « silencieux », dont la fonction est de lier leurs chimiokines cibles, ce qui induit leur internalisation et la dégradation de la chimiokine. Cela permettrait de maintenir un gradient de chimioattractant dans le milieu extracellulaire. Ce gradient est nécessaire afin de guider les cellules vers un endroit précis. À titre d'exemple, le récepteur D6 peut lier avec une grande affinité la grande majorité des chimiokines inflammatoires, mais il est constitutivement internalisé, rapidement recyclé à la membrane plasmique et cela même en absence de ligand (Comerford and Nibbs 2005; Locati et al. 2005). En présence de ligand, D6 est co-internalisé avec la chimiokine, mais l'affinité du récepteur pour le ligand est diminuée dans les endosomes, ce qui permet leur dissociation, le recyclage du récepteur et la dégradation de la chimiokine (Comerford and Nibbs 2005; Locati et al. 2005).

De façon similaire au récepteur D6, il est rapporté dans la littérature que CXCR7 peut-être constitutivement internalisé et recyclé à la membrane plasmique en absence et en présence de ligand, entre autres dans des lignées de cellules B-lymphoblastoïdes de type Daudi et Raji, la lignée de monocyte de type THP-1 ainsi que dans des cellules du cancer du sein (Luker et al. 2010; Naumann et al. 2010).

6.5.2 CXCR7 comme « régulateur direct » de CXCR4

Il est pourtant difficile à voir comment l'hypothèse que CXCR7 est un récepteur « *decoy* » s'appliquerait à des cellules qui coexpriment CXCR4 et CXCR7, telles que les cellules hématopoïétiques.

À cet effet, Levoye et al. montrent grâce au transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET), que CXCR7 et CXCR4 peuvent former des hétérodimères lorsque coexprimés. L'étude montre aussi que CXCR7 interagit avec la protéine G α i de façon constitutive, et SDF-1 induit des changements conformationnels mesurables au sein du complexe CXCR7/protéine G α i, mais n'active pas de signalisation dépendante de la protéine G α i. Par contre, la présence de CXCR7 inhibe l'activation de la protéine G α i et la mobilisation de calcium intracellulaire induite par CXCR4 (Levoye et al. 2009). Notamment, les résultats suggèrent que des hétérodimères CXCR4/CXCR7 sont aussi formés dans des lymphocytes T primaires et régulent la chimiotaxie des cellules en réponse à SDF-1. Les observations de Levoye et al. amènent à un autre niveau de complexité le rôle de CXCR7 et suggèrent que son rôle serait de moduler directement les fonctions de CXCR4 (Levoye et al. 2009).

Pourtant, Hartmann et al montrent que les lymphocytes T expriment peu de CXCR7 à la surface cellulaire. Les auteurs montrent que l'expression de CXCR7 est intracellulaire et qu'il est présent dans les endosomes sous la membrane plasmique (Hartmann et al. 2008). En conséquence, la question suivante demande réponse : comment agirait directement CXCR7 sur CXCR4 s'ils ne sont pas tous les deux présents à la membrane plasmique? Malgré que cette question reste sans réponse pour l'instant, il est possible d'envisager qu'il y ait un lien entre les fonctions de

CXCR4 et CXCR7. Cette hypothèse est supportée notamment par les travaux de Wang et al. et Maksym et al. En effet, Wang et al. montrent que l'expression à la membrane plasmique de CXCR7 est régulée par l'expression à la membrane plasmique de CXCR4 (Wang et al. 2008). Pareillement, l'expression de CXCR7 semble être perturbée dans les souris CXCR4^{-/-} (Maksym et al. 2009).

Également, Haraldsen et al. proposent que CXCR7 serait fonctionnel lorsqu'il forme un hétérodimère avec un autre récepteur de chimiokine comme CXCR4 (Haraldsen and Rot 2006). Toutefois, l'hypothèse de Haraldsen et al. contredit les résultats de Levoe et al. qui montrent que CXCR7 peut interagir constitutivement avec la protéine G α_i , et le complexe subit des changements conformationnel en réponse à SDF-1. Malgré que Levoe et al. ne rapporte aucun effet de CXCR7 sur la signalisation dépendante de la protéine G α_i , ces résultats suggèrent aussi que CXCR7 pourrait interagir et induire la signalisation intracellulaire grâce à d'autres protéines G non classiques en réponse à SDF-1. Cela n'exclue pas un lien entre les fonctions de CXCR7 et CXCR4.

Cela dit, les rôles de CXCR7, notamment le lien entre CXCR4 et CXCR7 demandent clarification. L'utilisation d'inhibiteurs ciblant spécifiquement chacun des récepteurs permettrait de disséquer les fonctions respectives de ces deux récepteurs. Toutefois, étant donné que SDF-1 n'est pas sélectif pour CXCR4, il devient important de déterminer si les inhibiteurs ciblant CXCR4 ont un effet sur CXCR7. Dans ce qui suit, nous présentons une série d'inhibiteurs développés afin de cibler CXCR4 ou CXCR7.

7. Inhibiteurs synthétiques de CXCR4

Plusieurs molécules ont été développées afin de cibler CXCR4, notamment afin de bloquer l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles. À cet effet, plusieurs anticorps anti-CXCR4 comme le prototype 12G5 (Endres et al. 1996) ainsi que d'autres molécules comme les peptides dérivés de SDF-1 (Heveker et al. 1998; Loetscher et al. 1998), les peptides synthétiques T134 et T140 (Tamamura et al. 1998) et le bicyclam AMD3100 ont été développés (Schols et al. 1997; Donzella et

al. 1998; Bridger et al. 1999). Cependant, il est rapporté dans la littérature que ces molécules ne sont pas toutes sélectives et qu'elles bloquent l'activité physiologique de CXCR4, ce qui ne permet pas leur utilisation à long terme. Dans le contexte de cette thèse, nous présentons deux molécules ciblant CXCR4, soit AMD3100 ainsi que TC14012.

7.1 AMD3100 / Mozobil / Plerixafor

L'AMD3100, un bicyclam composé de deux anneaux cyclames séparés par un pont aromatique (Figure 19), a été développé à l'origine pour bloquer la réplication du virus de l'immunodéficience (Vihinen et al. ; De Clercq 2010). Sa cible directe s'est avéré d'être le récepteur de chimiokine CXCR4 (Schols et al. 1997) dans sa fonction de cofacteur à l'entrée virale. L'AMD3100 n'est pas toxique et il est sélectif envers CXCR4. L'effet antiviral de l'AMD3100 a suscité le plus grand intérêt lorsque son effet anti-HIV a été montré *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficientes humanisé (SCID-*Severe Combined Immunodeficiency*) (Datema et al. 1996). Des essais cliniques de phase II ont permis de montrer que l'AMD3100 administré par voie intraveineuse inhibe la réplication virale chez des patients traités sur une période de 11 jours (De Clercq 2010).

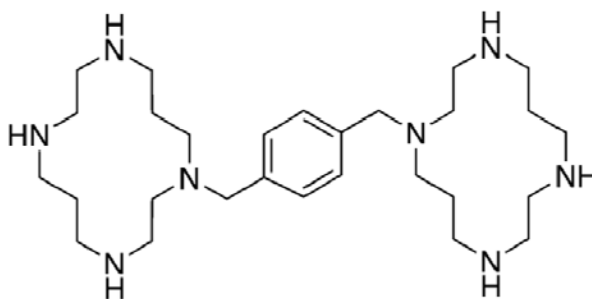


Figure 19 Structure de l'AMD3100

L'AMD3100 est composé de deux anneaux cyclames séparés par un pont aromatique. Tiré de Tamamura et al. (Tamamura and Fujii 2005).

Toutefois, l'administration de l'AMD3100 provoque la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques CD34+ (CSH) de la moelle osseuse vers la circulation sanguine avec un pic d'action 6 à 9 heures suite à son injection. Rappelons que les CSH sont des cellules qui ont la capacité de s'auto-renouveler et le potentiel de se différencier en cellules hématopoïétiques. La raison pour laquelle AMD3100 mobilise les CSH est qu'elles expriment le récepteur CXCR4 et que la moelle osseuse est riche en SDF-1 (Lympéri et al. 2010). L'interaction CXCR4/SDF-1 retient les cellules souches dans la moelle osseuse et l'AMD3100 bloque cette interaction récepteur/chimiokine (De Clercq 2010). À cet effet, les inhibiteurs de CXCR4, comme l'AMD3100, ne peuvent pas être administrés à long terme. La mobilisation des CSH dans la circulation sanguine à long terme n'est pas envisageable car elle abolirait les contacts CSH-niche essentiels (Lympéri et al. 2010). Par contre, à court terme, cet effet «secondaire» peut-être exploité dans des cas précis.

La mobilisation à court terme des CSH grâce à l'AMD3100 peut-être exploitée à des fins thérapeutiques, car une fois dans la circulation sanguine les CSH sont accessibles plus facilement que par ponction osseuse. La compagnie Genzyme commercialise l'AMD3100 sous le nom de Mozobil pour sa capacité à mobiliser les CSH dans la circulation sanguine. Aux États-Unis, la FDA (*Food and Drug Administration*) et en Europe la EMEA (European Medicines Evaluation Agency) ont approuvé sa commercialisation depuis 2009 pour la transplantation autologue de CSH de patients atteints de lymphomes ou de myélomes multiples (Duarte et al. 2010).

Dans ces cas précis, suite au traitement des patients au Mozobil, leurs CSH sont récupérées par cytophérèse. Ces patients subissent des chimiothérapies/radiothérapies, suite auxquelles leurs CSH sont par la suite réintroduites afin de repeupler leur moelle osseuse et leur système de cellules sanguines «saines». Toutefois, il n'est pas exclu que des cellules cancéreuses ne soient présentes dans la moelle osseuse. Le traitement à l'AMD3100 mobiliserait ces cellules en plus des CSH et elles seraient aussi réintroduites, ce qui pourrait éventuellement causer une rechute du patient (Duarte et al. 2010).

La présence de cellules cancéreuses dans la moelle peut-être expliquée par le fait qu'elles expriment souvent le récepteur de chimiokine CXCR4 à leur surface. Comme la moelle osseuse est riche en SDF-1, les cellules cancéreuses peuvent s'y installer. Se trouvant dans la niche, elles sont exposées aux mêmes signaux que les CSH. Il est envisageable que les cellules cancéreuses se dédifférencient en cellules souches cancéreuses. Cela implique qu'elles deviennent silencieuses, ne se divisent pas, mais qu'elles possèdent un potentiel de différenciation semblable aux CSH (Lymperi et al. 2010). Les cellules cancéreuses dans la niche de la moelle osseuse sont ainsi protégées des chimiothérapies/radiothérapies, car ces traitements ciblent surtout les cellules qui se divisent à un taux élevé.

À cet effet, l'utilisation de l'AMD3100/mozobil sur des patients atteints de cancers hématologiques avant leur chimiothérapie/radiothérapie est en cours d'évaluation (De Clercq 2010). Mobiliser les cellules cancéreuses souches, de la moelle osseuse vers la circulation sanguine permettrait aux agents thérapeutiques de les détruire. En traitant les patients avant leur thérapie avec l'AMD3100 augmenterait l'efficacité du traitement (Steinberg and Silva 2010). Étant donné qu'en plus des cellules souches cancéreuses, les CSH saines seraient aussi détruites, ces patients devront recevoir une greffe de cellules souches provenant d'un donneur sain. Il pourrait avoir été traité avec l'AMD3100 pour mobiliser ses CSH. D'ailleurs, des études précliniques sont en cours pour évaluer le potentiel d'AMD3100, dans la transplantation de cellules souches du cordon ombilical, une autre source de CSH (De Clercq 2010).

L'utilisation de l'AMD3100 comme agent mobilisant des CSH dans d'autres situations cliniques, comme la transplantation d'organes solides, est en cours d'évaluation (De Clercq 2010). Cette molécule reste aussi un excellent outil de recherche surtout depuis l'identification du récepteur CXCR7.

7.2 Les peptides T22/T140/TC14012

Le peptide T22, ainsi que ses analogues dont le T140 et TC14012, sont le résultat de la modification de peptides aux propriétés antibactériales et antivirales, respectivement isolés à partir de limule japonaise (*Japanese horseshoe crab*-

Tachypleus tridentatus) et américaine (American horseshoe crab- *Limulus polyphemus*) (Figure 20). Les peptides originaux, tachyplesine et polyphemusine, possèdent respectivement 17 et 18 acides aminés. L'équipe du Dr Fujii étudie l'effet antagoniste de ces peptides sur les fonctions du récepteur CXCR4, et l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles aura été le premier point de focus du groupe. Ces derniers montrent que le peptide T22, et son analogue plus court T140, composé de 14 acides aminés, sont spécifiques à CXCR4, qu'ils inhibent l'entrée du VIH-1 ainsi que la mobilisation de calcium intracellulaire médiée par l'interaction entre SDF-1 et CXCR4 (Tsutsumi et al. 2007). Le T140 forme un feuillet β anti-parallèle dont la structure est maintenue par un pont disulfure entre deux résidus cystéine (Tamamura and Fujii 2005; Tsutsumi et al. 2007). Le maintien de l'activité antivirale de T140 dépend de 4 acides aminés, soit de l'arginine à la position 2 du peptide, la L-3-(2-naphtyl) alanine à la position 3 ainsi que des résidus tyrosine et arginine respectivement aux positions 5 et 14 du peptide (Figure 20) (Tsutsumi et al. 2007). Notamment, l'apparition de souches virales résistantes au T140 dans les expériences *in vitro* est ralentie, ce qui a mené au développement d'analogues T140 avec l'objectif de cibler ces souches résistantes (Tamamura and Fujii 2005; Tsutsumi et al. 2007).

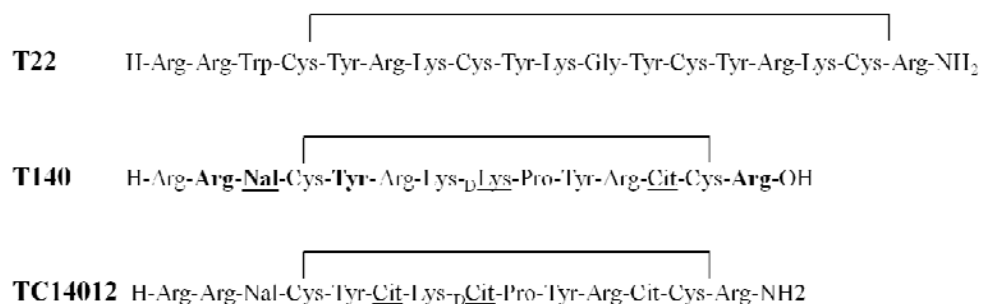


Figure 20 Séquences des peptides T122 et de ces analogues T140 et TC14012
 Les acides aminés remplacés sont soulignés. Nal – L3-(2-naphtyl)alanine, Cit- L-Citrulline. Les résidus du T140 en caractère gras sont responsables de son activité antivirale. Adapté de Tamamura et al. (Tamamura et al. 2001).

Le T140 n'est pas stable dans du sérum murin ou félin ni dans de l'homogénat de foie de rat à cause du clivage du résidu arginine 14 situé à la partie C-terminale qui est indispensable pour l'activité anti-VIH du T140 (Tsutsumi et al. 2007). Des modifications ont été apportées aux parties N- et C-terminales des analogues du T140 ce qui a permis d'obtenir des peptides avec une grande stabilité biologique tout en gardant une bonne efficacité antivirale allant jusqu'à doubler celle du T140. Notamment, l'effet antagoniste du T140 et de ses analogues sur CXCR4 est aussi montré dans le contexte de différentes maladies impliquant le récepteur, dont les cancers du pancréas, du sein et d'arthrite rhumatoïde (Tamamura et al. 2003; Mori et al. 2004; Tamamura et al. 2004; Tamamura and Fujii 2005). En effet, la migration de cellules pancréatiques cancéreuses induites par SDF-1 *in vitro* est bloquée par les analogues de T140, ce qui appuie le rôle de SDF-1 et CXCR4 dans la dissémination des cellules cancéreuses du pancréas (Mori et al. 2004). Le potentiel anti-métastatique des analogues de T140 est aussi mis en évidence dans des expériences *in vivo* et *in vitro*, montrant qu'ils inhibent la dissémination métastatique des cellules cancéreuses du sein (Tamamura et al. 2003). L'analyse de l'activité *in vivo* de l'analogue TN14003 dans un modèle d'arthrite rhumatoïde murin montre que la molécule est biologiquement stable et qu'elle atténue plusieurs symptômes de l'arthrite comme par exemple l'enflure des chevilles et l'augmentation de la masse des membres (Tamamura et al. 2004).

Dans le premier travail présenté dans cette thèse (Berchiche et al. 2007), nous montrons, entre autres, l'effet de TC14012 sur la conformation de CXCR4. Cette molécule a été synthétisée suite à la modification du peptide TZ14004 qui diffère du T140 par son groupement amide ajouté à la partie C-terminale en remplacement de l'arginine. L'analogue TZ14004, est parfaitement stable dans le sérum félin contrairement à T140. Toutefois, cette modification diminue son activité anti-VIH et le pourvoit d'une grande cytotoxicité (Tamamura et al. 2001). Afin de réduire ces caractéristiques négatives, le TZ14004 a subi plusieurs modifications dont l'introduction de résidus citrulline dans sa séquence en remplacement des résidus chargés (lysine et arginine), ce qui a mené à la synthèse du TC14012 (Figure 20). La citrulline est un analogue d'acide aminé neutre (sans charge) avec un structure semblable à l'arginine (Tamamura et al. 2001). Le TC14012 ainsi obtenu, possède deux résidus citrullines, une partie C-terminale amidée et forme une structure de

feuille β tout comme le T140. Aussi, TC14012 est complètement stable dans du sérum félin et présente un excellent profil d'activité anti-VIH (Tamamura et al. 2001).

Cela dit, le T140 ainsi que ses analogues ont subi des modifications, une diminution de taille ainsi que la réduction de leur caractère peptidique dans le but de développer de nouvelles molécules, à faible poids moléculaire, ciblant CXCR4. La caractérisation de TC14012 montre que cet inhibiteur se comporte comme un agoniste inverse de CXCR4, et cela contrairement à l'AMD3100 qui est un agoniste partiel de CXCR4 (Zhang et al. 2002). Ces molécules sont des candidats de choix pour clarifier le rôle de CXCR4 dans de multiples contextes pathologiques. Leur utilisation dans un contexte clinique, à court terme, pourrait aussi être avantageuse mais appelle à la prudence étant donné le rôle physiologique crucial de CXCR4.

8. Ligands synthétiques de CXCR7

CCX451 ainsi que ses analogues (CCX754, CCX771, CX704 et CCX733) appartiennent à la compagnie pharmaceutique ChemoCentryx (Mountain View, CA, USA). Ce sont des molécules synthétiques à faible poids moléculaire dont la cible est le récepteur de chimiokine CXCR7. Elles sont identifiées et optimisées chimiquement suite au criblage d'une librairie de molécules en testant leur capacité à inhiber la liaison de SDF-1 ¹¹²⁵ radiomarqué à l'iode 125 aux cellules CEM (lignée cellulaire de lymphocyte) ou MCF-7 (lignée de cellules du cancer du sein). Leur structure est protégée par des brevets.

À l'origine, les dérivés CCX sont caractérisés comme étant des ligands antagonistes de CXCR7 (Burns et al. 2006). En effet, Burns et al. montrent que CCX451 et son analogue CCX754 sont spécifiques à CXCR7 (et donc ne lieraient pas CXCR4). Ces derniers inhibent, tout comme les anticorps monoclonaux produits par les hybridomes 11G8 et 6E10, la liaison des chimiokines radiomarquées SDF-1 ¹¹²⁵ et de I-TAC ¹¹²⁵ à CXCR7 (Burns et al. 2006). Les auteurs se concentrent sur CCX754 en particulier, car il possède une affinité de 5nM pour CXCR7, de meilleures caractéristiques pharmacocinétiques ainsi qu'une biodisponibilité

supérieure à celle de l'analogue CCX451. Cet analogue est un antagoniste de CXCR7 qui inhibe la liaison de SDF-1 et sa caractérisation a permis de montrer que CXCR7 est impliqué dans la survie cellulaire, l'adhésion ainsi que le développement tumoral (Burns et al. 2006). Notamment, Jin et al. montrent que le virus HTLV-1 (*Human T-lymphotropic Virus Type-1*), l'agent causant la leucémie des cellules T chez l'adulte, induit l'expression de CXCR7. Ce même travail montre l'implication de CXCR7 dans la prolifération et la survie des cellules T immortalisées par HTLV-1 (Jin et al. 2009). De façon similaire, Ödemis et al. utilisent l'analogue CCX754 dans leur travaux et mettent en évidence l'importance de CXCR7 dans la signalisation médiée par SDF-1 dans les cellules de Schwann et les astrocytes, qui sont des cellules gliales du système nerveux (Odemis et al. 2010).

Malgré la signalisation atypique de CXCR7, plusieurs travaux montrent que les chimiokines SDF-1 et I-TAC induisent le recrutement de la beta-arrestine 2 au récepteur (Kalatskaya et al. 2009; Luker et al. 2009; Zabel et al. 2009). De façon similaire, CCX754 et CCX733 induisent aussi le recrutement de la beta-arrestine 2 à CXCR7 (Luker et al. 2009). Également, Zabel et al. montrent que l'analogue CCX771 est spécifique à CXCR7, et tout comme les autres analogues CCX caractérisés, il induit le recrutement de la beta-arrestine 2 au récepteur et cela avec une efficacité et une puissance supérieures à celles des chimiokines naturelles (Zabel et al. 2009).

En conclusion, la famille des molécules CCX permettent d'étudier les fonctions de CXCR7 (Burns et al. 2006; Zabel et al. 2009). Anciennement caractérisées comme étant des antagonistes du récepteur, des études approfondies montrent que certains analogues induisent le recrutement de la beta-arrestine 2 au récepteur de façon comparable voir plus efficace que les agonistes naturels de CXCR7 (Zabel et al. 2009). À la lumière de cette information, il serait utile de revoir les conclusions des études de Burns et al., Jin et al. ainsi que Ödemis et al. utilisant ces composés de type CCX.

9. Interaction récepteur/chimiokine

La promiscuité récepteur chimiokine est un caractère prévalent, mais non exclusif, aux chimiokines et aux récepteurs inflammatoires de type CC (Murphy et al. 2000; Colobran et al. 2007). Plusieurs récepteurs peuvent lier différentes chimiokines et en contrepartie différentes chimiokines peuvent interagir avec plusieurs récepteurs. Cette propriété des chimiokines et leur récepteurs est importante (Tableau II), et requise afin de justifier le choix de CCR2 comme récepteur modèle (voir objectifs de la thèse).

Anciennement, il a été suggéré que de la liaison de différentes chimiokines à un même récepteur résulterait en une redondance fonctionnelle et cela malgré les différents effets des chimiokines sur un même récepteur observés *in vivo* (Murphy et al. 2000; Colobran et al. 2007). Notamment, les cellules primaires expriment plusieurs récepteurs de chimiokine, ce qui rend difficile, et même impossible, d'étudier l'effet de différents ligands sur un récepteur en particulier. Pourtant, les chimiokines et leurs récepteurs sont de précieuses cibles pharmacologiques, et il est important de caractériser et comprendre les mécanismes pharmacologiques qui influencent les effets de différents ligands sur un même récepteur.

Récepteur	Ligands
CCR1	CCL3,CCL5,CCL7,CCL13,CCL14,CCL15,CCL16,CCL23
CCR2	CCL2,CCL7,CCL8,CCL13,CCL16
CCR3	CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL15,CCL16,CCL24,CCL26,CCL28
CCR4	CCL17,CCL22
CCR5	CCL3,CCL4,CCL5,CCL8,CCL11,CCL14,CCL16
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19,CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27,CCL28
CXCR1	CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR2	CXCL1,CXCL2,CXCL3,CXCL5,CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR3-A	CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR3-B	CXCL4,CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL12
XCR1	XCL1,XCL2
CX ₃ CR1	CX ₃ CL1
CCX-CKR	CCL19,CCL21,CCL25
D6	CCL2,CCL3L1,CCL4,CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL17, CCL22
DARC/Duffy	CCL2,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL16,CCL17,CXCL1,CXCL5, CXCL6,CXCL7,CXCL8,CXCL9,CXCL11,CXCL13

Tableau II Promiscuité récepteur/chimiokine

Plusieurs chimiokines peuvent interagir avec plusieurs récepteurs. Pour le récepteur CCR2, ce tableau n'inclue pas tous ses ligands. Adapté à partir de Allen et al. (Allen et al. 2007).

10. CCR2

Le récepteur de chimiokine CCR2 et ses différents ligands naturels, font l'objet de la dernière étude présentée dans le cadre de cette thèse. Les résultats de ce travail seront discutés suite à celle sur les mutants du récepteur CXCR4.

Il existe deux variants de CCR2, les variants A et B, qui sont le résultat d'un épissage alternatif du même gène. Les deux variants se distinguent par des différences dans leurs parties C-terminales (Charo et al. 1994). Dans le cadre de cette thèse, nous allons traiter de CCR2B, la forme retrouvée majoritairement dans les

monocytes. À des fins de simplification, nous allons nous référer à CCR2B comme étant CCR2.

CCR2 est un 7TMR dont l'intérêt clinique est grandissant car il est impliqué dans les maladies inflammatoires, dont l'arthrite rhumatoïde et l'asthme (Pease and Horuk 2009; Pease and Horuk 2009). Un rôle dans le cancer, la perception de la douleur, l'obésité, et le diabète est aussi suggéré (Szabo et al. 2002; Mine et al. 2006; Lu and Kang 2009; Xia and Sui 2009; Zeyda et al. 2010). CCR2 possède un large patron d'expression. En effet, l'ARN messenger de CCR2 est présent dans les monocytes, les cellules dendritiques dérivées du sang, ainsi que dans les cellules NK. Notamment, les cellules T mémoire activée, les cellules B, les monocytes, les cellules endothéliales ainsi que les microglies dérivées de la moelle osseuse expriment le récepteur CCR2 fonctionnel (Frade et al. 1997; Rabin et al. 1999; Weber et al. 1999; Murphy et al. 2000; Zhang et al. 2007).

10.1 Signalisation

Classiquement, CCR2 est couplé à la protéine G α i. L'activation de CCR2 peut mener à la mobilisation de calcium, l'activation des voies ERK1/2 et Akt, l'inhibition de l'adénylate cyclase ainsi qu'à la chimiotaxie (Myers et al. 1995; Murphy et al. 2000). Par ailleurs, la stimulation de CCR2 avec la chimiokine CCL2 mène à son internalisation (Aragay et al. 1998; Garcia Lopez et al. 2009). Les travaux d'Aragay et al. montrent que cette internalisation requiert la phosphorylation du récepteur par GRK2 ce qui mène à la formation d'un complexe composé de CCR2, GRK2 ainsi que de la beta-arrestine 1 (Aragay et al. 1998). Les travaux plus récents de Garcia-Lopez et al. montrent aussi que la stimulation avec la chimiokine CCL2 mène à l'internalisation de CCR2, et mettent en évidence que le récepteur est rapidement dirigé vers la dégradation dans les lysosomes. Ces auteurs montrent aussi que l'internalisation de CCR2 peut avoir lieu de façon dépendante et indépendante de la clathrine. Aussi, l'activation subséquente des voies ERK1/2 dépend de la présence de la dynamine, importante dans la formation des vésicules d'endocytose (Garcia Lopez et al. 2009). Cela suggère que l'activation des ERK1/2 pourrait être

indépendante de la protéine G, et serait le résultat d'une deuxième vague de signalisation dépendante de la beta-arrestine.

10.2 Ligands naturels de CCR2

Plusieurs chimiokines sont rapportés dans la littérature comme étant des ligands de CCR2, soit respectivement CCL2, CCL8, CCL7, CCL13, et CCL11, CCL24, et CCL26 (aussi respectivement nommées MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, Eotaxine-1, Eotaxine-2, et Eotaxine-3) (Combadiere et al. 1995; Myers et al. 1995; Berkhout et al. 1997; Godiska et al. 1997; Gong et al. 1997; Martinelli et al. 2001; Ogilvie et al. 2001; Ogilvie et al. 2003; Parody and Stone 2004). Ces différentes chimiokines peuvent aussi interagir avec d'autres récepteurs (Tableau II). Toutefois nous nous concentrerons uniquement sur le récepteur CCR2.

La chimiokine CCL2 (*MCP-1- monocyte chemoattractant protein-1*) est, comme son nom l'indique, la chimiokine prototype qui attire les monocytes vers le site d'inflammation (Handel and Domaille 1996). CCL2 induit l'expression et l'activation des intégrines, requise pour l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. CCL2 est aussi importante pour l'adhésion ferme des monocytes à l'endothélium vasculaire lors de la transmigration de ces cellules vers le site enflammé (Gerszten et al. 1999; Weber et al. 1999). Dans un modèle de souris de *CCL2 knockout*, les souris ont des défauts dans le recrutement des monocytes vers le site d'inflammation (Van Coillie et al. 1999). Les fonctions biologiques de CCL2 influencent aussi les fonctions des lymphocytes T, les macrophages et des cellules NK (Chensue et al. 1995; Handel and Domaille 1996; Gonzalo et al. 1998).

Du point de vue de structure, les chimiokines CCL2, CCL8, CCL7 ainsi que CCL13 (respectivement MCP-1, MCP-2, MCP-3 et MCP-4) sont souvent considérées comme étant un sous-groupe de la famille des chimiokines de type CC. Ce groupe comprend aussi la chimiokine CCL11 (Eotaxine-1). Les gènes codant pour ces cinq chimiokines sont localisés sur le chromosome 17 et sont exprimées sous forme de précurseur dont le peptide signal, formé des 23 premiers acides aminés dans la partie N-terminale, doit être clivé afin que la chimiokine mature et

active puisse être sécrétée (Van Coillie et al. 1999). Les similarités de séquence entre ces chimiokines varient entre 50 et 71 % (Van Coillie et al. 1999).

Par ailleurs, ces chimiokines possèdent un très large patron d'expression tant dans des conditions physiologiques que pathologiques et qui n'est pas «limité» aux cellules du système immunitaire. À titre d'exemple, les cellules endothéliales saines, et les fibroblastes expriment CCL2, CCL8, CCL13 et CCL11 (Larsen et al. 1989; Cushing et al. 1990; Van Damme et al. 1994; Godiska et al. 1997). Aussi, CCL2 et CCL7 sont co-exprimés dans des monocytes (Van Damme et al. 1992; Minty et al. 1993). Les chimiokines CCL2 et CCL13 sont aussi exprimés par les cellules du muscle lisse et les cellules épithéliales (Standiford et al. 1991; Schmoder et al. 1993; Garcia-Zepeda et al. 1996; Berkhout et al. 1997; Godiska et al. 1997). Notamment, plusieurs cellules cancéreuses expriment à leur surface CCR2 de façon constitutive (Graves et al. 1989; Yoshimura et al. 1989; Takeya et al. 1991; Van Coillie et al. 1999).

Quant aux chimiokines CCL24, CCL26 (Eotaxine-2 et -3) ainsi que CCL11 (Eotaxine-1), elles sont connues pour induire le mouvement dirigé des éosinophiles et des basophiles (Rothenberg 1999). Malgré cette caractéristique commune, CCL24 et CCL26 ont peu de similarités avec CCL11. En effet, ces deux chimiokines ne possèdent qu'environ 35% de similarité de séquence avec les chimiokines de type MCP et CCL11, et les gènes codant pour ces chimiokines ont une localisation distincte (Rothenberg 1999). CCL24 est exprimé par des cellules hématopoïétiques et non- hématopoïétiques (Ponath et al. 1996; Dulkys et al. 2001; Stubbs et al. 2010), tandis que l'expression de CCL26 est décrite dans les cellules non- hématopoïétiques ainsi que dans les monocytes. L'expression de CCL26 est principalement induite suite à la stimulation des cellules avec l'interleukine 4 (Stubbs et al. 2010).

10.3 Le récepteur CCR2 et ses 7 ligands naturels

CCL2 est la première chimiokine de type MCP découverte et la mieux caractérisée qui a servi de ligand prototype pour un grand nombre de travaux sur CCR2. De ce fait, la grande partie des défauts pathologiques rapportés dans la littérature sont associés au couple CCR2/CCL2 (Deshmane et al. 2009). La

découverte des autres ligands de CCR2 a mené à une série d'études ayant comme objectif de comprendre l'effet des ces différentes chimiokines sur la fonction de ce récepteur. Dans cette partie, nous allons survoler les principaux travaux effectués sur le sujet.

Ces différentes chimiokines ont été clonées durant les années 1990 et le début des années 2000 (Combadiere et al. 1995; Myers et al. 1995; Berkhout et al. 1997; Godiska et al. 1997; Gong et al. 1997; Martinelli et al. 2001; Ogilvie et al. 2001; Ogilvie et al. 2003; Parody and Stone 2004). La première série de travaux montre, grâce à des expériences de radiolisation dans différentes cellules de type monocyte/macrophage, que ces chimiokines sont des ligands de CCR2 et possèdent pour la plupart des affinités dans l'ordre du nanomolaire pour ce récepteur (Combadiere et al. 1995; Myers et al. 1995; Berkhout et al. 1997; Godiska et al. 1997; Gong et al. 1997; Martinelli et al. 2001; Ogilvie et al. 2001; Ogilvie et al. 2003; Parody and Stone 2004).

Les travaux qui ont suivi avaient comme but d'étudier l'effet des les ligands naturels de CCR2 du point de vue fonction de signalisation. Grâce aux cellules de la lignée monocyttaire THP-1, Martinelli et al. montrent que CCL2 et CCL7 induisent une mobilisation de calcium et la chimiotaxie des cellules robuste comparativement à CCL8 et CCL13, suggérant que ces deux chimiokines sont des agonistes partiels de CCR2. Dans ce travail, CCL11 est caractérisé comme étant un agoniste partiel de CCR2, car il induit la chimiotaxie des cellules THP-1 à une concentration de $1\mu\text{M}$ (Martinelli et al. 2001). Cette concentration de chimiokine est très élevée, car au niveau physiologique des concentrations dans l'ordre du nanomolaire suffisent pour induire la chimiotaxie. Par contre, Ogilvie et al. rapportent que CCL11 est un antagoniste de CCR2 car il inhibe la mobilisation de calcium et la chimiotaxie des monocytes humains stimulées par CCL2 (Ogilvie et al. 2001). Plus tard, cette même équipe montre que la stimulation de cellules murines pré-B exprimant de façon stable CCR2 humain avec CCL2 ou CCL11, induit l'activation des voies ERK1/2. La réponse induite par CCL11 ne représente qu'environ la moitié de celle induite par CCL2. Ces résultats suggèrent que comparativement à CCL2, la chimiokine CCL11 serait un agoniste partiel de CCR2 (Ogilvie et al. 2004). Par ailleurs, Ogilvie et al. se

sont aussi intéressés à la chimiokine CCL26 et montrent qu'elle n'induit ni la mobilisation de calcium intracellulaire ni la phosphorylation des ERK1/2. Néanmoins, CCL26 induit une faible chimiotaxie de monocytes humains (Ogilvie et al. 2003).

La majorité des travaux cités ont été effectués dans des lignées cellulaires qui expriment aussi d'autres récepteurs de chimiokine qui pourraient soit dimériser avec CCR2 ou être la cible des chimiokines étudiées. Ainsi, il devient difficile d'exclure que les résultats ne sont pas influencés par l'expression de récepteurs de chimiokines autres que CCR2. À cet effet, Parody et al. ont généré des fibroblastes d'ovaire de hamster CHO (*Chinese hamster ovary*) qui expriment CCR2 humain de façon stable. Les auteurs montrent que CCL11 est un agoniste tandis que CCL24 et CCL26 sont des antagonistes de CCR2 quand leurs capacités à générer un flux calcique intracellulaire et cela comparativement à la chimiokine prototype CCL2 (Parody and Stone 2004). Dans le dernier travail dont nous faisons mention, la signalisation des différentes chimiokines de type MCP est étudiée dans des cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) exprimant CCR2 de façon stable (O'Boyle et al. 2007). Ainsi, le couplage à la protéine G, l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase et l'activation des voies Akt et ERK1/2 y sont étudiées. Les auteurs montrent que les différents ligands ont des réponses signalétiques distinctes qui sont spécifiques aux différentes chimiokine (O'Boyle et al. 2007).

En conclusion, la majorité de ces études évaluent l'effet des chimiokines sur CCR2 grâce à des tests de mobilisation de calcium intracellulaire et/ou de chimiotaxie dans des cellules physiologiquement pertinentes mais qui expriment d'autres récepteurs de chimiokines. L'utilisation de cellules exprimant CCR2 de façon stable (CHO et HEK293) a aussi permis de distinguer l'effet des différentes chimiokines sur CCR2 et de montrer que ces chimiokines ne sont pas fonctionnellement redondantes. Malgré cela, il n'est pas connu si le concept de sélectivité fonctionnelle peut-être appliqué à CCR2 et ses ligands. Notamment, les propriétés pharmacologiques, comme l'efficacité et la puissance, de CCR2 en présence des différents ligands ne sont pas connus. Cela dit, l'effet des différents ligands sur la conformation de CCR2 et les conséquences sur l'activation d'effecteurs distincts doivent être étudiés.

Objectifs de la thèse

Nous avons adressé deux principaux objectifs à l'aide de trois travaux. Premièrement, étudier directement la conformation et l'activité des récepteurs modèles, CXCR4 et CCR2, afin d'établir un lien entre la conformation adoptée par le récepteur et l'activation d'effecteurs. Dans le travail portant sur CXCR4, nous avons utilisé différents mutants du récepteur tandis que dans le travail portant sur CCR2, nous avons étudié l'effet de différents ligands naturels sur CCR2 de type sauvage. En deuxième lieu, nous avons déterminé si l'inhibiteur AMD3100 affecte la conformation et la fonction du troisième récepteur modèle CXCR7. Le but de ce dernier travail étant de montrer que l'AMD3100 n'est pas spécifique au récepteur CXCR4, mais qu'il est aussi un ligand de CXCR7.

Objectifs spécifiques

1) Mesure directe de la conformation de mutants de CXCR4 révèle un lien complexe entre la structure du récepteur et l'activation de la protéine G (alpha)(i) : Introduire des mutations ponctuelles dans les motifs E/DRY et N(L/F)YSS, résidus clé pour les changements conformationnels menant à l'activation des récepteurs. Mesurer directement la conformation des mutants du récepteur de chimiokine CXCR4 grâce au BRET en absence et en présence de différents ligands. Étudier le lien entre les conformations mesurées et l'activité G (alpha)(i) des mutants CXCR4.

2) Effet des différents ligands naturels du récepteur de chimiokine CCR2B sur le recrutement de la beta-arrestine, la signalisation de la protéine G(alpha)(i) et l'internalisation du récepteur : Étudier l'effet des différents ligands naturels du récepteur de chimiokine CCR2 de type sauvage sur le recrutement de la beta-arrestine, la signalisation de la protéine G(alpha)(i), l'internalisation du récepteur ainsi que sur la conformation de CCR2.

3) L'AMD3100 est un modulateur allostérique agoniste du récepteur CXCR7 : Déterminer si l'AMD3100, un inhibiteur synthétique de CXCR4, est aussi un ligand de CXCR7. Déterminer si la stimulation de CXCR7 avec SDF-1 induit le recrutement de la beta-arrestine. Notamment, étudier l'effet de l'AMD3100 sur le

recrutement de la beta-arrestine à CXCR7, en absence et en présence de la chimiokine SDF-1.

Résultats

Article 1

Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation.

Mesure directe de la conformation de mutants de CXCR4 révèle un lien complexe entre la structure du récepteur et l'activation de la protéine G(alpha)(i).

Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, Leduc M, Percherancier Y, Fujii N, Tamamura H, Bachelerie F et Heveker N.

J Biol Chem. 2007 Feb 23;282(8):5111-5.

Ce travail a été publié dans le Journal of Biological Chemistry
Copyright© 2007 the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

**Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between
receptor structure and G α i activation**

Yamina A. Berchiche, Ken Y. Chow, Bernard Lagane, Martin Leduc, Yann
Percherancier, Nobutaka Fujii, Hirokazu Tamamura, Françoise Bachelerie, and
Nikolaus Heveker

Running Title: Conformation of CXCR4 mutants

ABSTRACT :

Ligand binding to G-protein coupled receptors (GPCRs) is thought to induce changes in receptor conformation that translate into activation of downstream effectors. The link between receptor conformation and activity is still insufficiently understood, as current models of GPCR activation fail to take an increasing amount of experimental data into account. To elucidate structure-function relationships in GPCR activation we used BRET to directly assess the conformation of mutants of the chemokine receptor CXCR4. We analyzed substitutions in the arginine cage DRY motif and in the conserved asparagine N(3.35)119, which are pivotal molecular switches for receptor conformation and activation. G α i activation of the mutants was either similar to wildtype CXCR4 (D133N, Y135A and N119D), or resulted in loss of activity (R134A and N119K). Mutant N119S was constitutively active but further activated by agonist. BRET analysis suggested no simple correlation between conformational changes in response to ligand binding and activation of G α i by the mutants. Different conformations of active receptors were detected (for wildtype CXCR4, D133N, and N119S) suggesting that different receptor conformations are able to trigger G α i activity. Several conformations were also found for inactive mutants. These data provide biophysical evidence for different receptor conformations being active with respect to a single readout. They support models of GPCR structure-activity relationships that take this conformational flexibility of active receptors into account.

INTRODUCTION:

GPCR activation is commonly seen as the consequence of conformational rearrangements occurring in the receptor upon ligand binding. The classical ternary complex model of GPCR activation and its derivatives postulate a limited number of defined receptor conformations, representing inactive, active, and some intermediate states of activation. However, the link between receptor conformation and activity is not entirely clear, and limitations of this model are beginning to emerge (Urban et al. 2006).

Receptor mutants have often been used to derive conformational models of receptor activation indirectly from pharmacological and biochemical data. Energy

transfer techniques have significantly advanced our capacity to directly assess receptor conformation and conformational responses to ligand binding in live cells (Ayoub et al. 2002; Percherancier et al. 2005). However, to date only few reports directly measured single mutant GPCR conformations (Tateyama et al. 2004; Vilardaga et al. 2005).

CXCR4 is a chemokine receptor involved in multiple diseases such as HIV infection, spreading of tumors, and inflammatory diseases. Its sole natural agonist is the chemokine CXCL12. CXCR4/CXCL12 are essential during development, hematopoiesis and immune system organization. The potential importance of CXCR4 also in the adult organism, where the receptor is expressed on a plethora of different cell types (Murdoch 2000), calls for more subtle therapeutic interventions than simple inhibition of the receptor by antagonists. This may be particularly important in long term treatments, such as required for antiretroviral therapy. Better understanding of the link between CXCR4 conformation and activation is therefore warranted.

We set out to directly measure the conformations of CXCR4 mutants bearing substitutions at positions that potentially affect receptor function. For this purpose, we used a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) conformational sensor in live cells based on CXCR4 homodimers. Chemokine receptor homodimers form constitutively and remain associated upon ligand binding, as previously shown by ourselves and others (Issafras et al. 2002; El-Asmar et al. 2005; Percherancier et al. 2005; Springael et al. 2006). Of note, our CXCR4 system uses C-terminal BRET donor (RLuc) and acceptor (YFP) fusions of the receptors that preserve receptor activity and do not require receptor overexpression above physiological levels (Percherancier et al. 2005).

MATERIAL AND METHODS

Plasmids

The substitution mutants were introduced into CXCR4 by the Kunkel method, and subcloned into CXCR4-YFP and CXCR4-RLuc. The cloning of CXCR4-YFP and CXCR4-RLuc has been described previously (Issafras et al. 2002).

Reagents

Recombinant CXCL12 was purchased from R&D systems and synthetic CXCL12 was a gift from Dr F. Baleux, Institut Pasteur, Paris; no difference in activity was observed between the preparations. AMD3100 was obtained from the NIH AIDS Research & Reference Reagent Program. TC14012, a T140 analogue with similar biological properties was synthesized as previously described (Tamamura et al. 2001).

Cell culture and transfection

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 units/ml penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine (Invitrogen). Transfections were performed in 6-well dishes using the polyethylenimine method (Boussif et al. 1995). Receptor expression was tested by flow cytometry using the anti-CXCR4 monoclonal antibody 12G5 as described (Percherancier et al. 2005).

GTP γ S binding

[³⁵S]-GTP γ S binding experiments were carried out on crude membrane preparations from transfected cells, as previously described (Lagane et al. 2005). Briefly, 10 μ g of membrane proteins were incubated in 96-well microplates for 15 min at 30°C in assay buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, containing 100 mM NaCl, 10 μ g/mL saponin, 3 mM MgCl₂, 1 μ M GDP) in the presence of indicated concentrations of CXCL12. [³⁵S]-GTP γ S (Amersham Biosciences) at 0.1 nM was added to membranes, which were further incubated for 30 min at 30°C. Following centrifugation at 4°C and removal of supernatants, microplates were counted in a Wallac 1450 Microbeta Trilux.

Adenylyl cyclase activity

cAMP was determined by radioimmunoassay using the Amersham cAMP assays system, following the manufacturer's instructions.

BRET measurements

Usually 0.01 μ g - 0.2 μ g RLuc constructs were cotransfected with increasing quantities of the corresponding YFP- tagged construct, completed to 2 μ g with empty vector. Transfected cells were seeded in 96 well white clear bottom plates treated with poly-D-lysine and left in culture for 24h. For BRET measurements, cells were washed once with PBS and Coelenterazine H (Nanolight Technology) added to a final concentration of 5 μ M in PBS. Readings were collected using a MITHRAS LB940 reader (Berthold) by sequential integration of the signals detected in the 480 \pm 20 nm (for Luciferase) and 530 \pm 20 nm (for YFP) windows. The BRET signal is determined by calculating the ratio of the Receptor-YFP over the Receptor-RLuc emission. The values were corrected to net BRET by subtracting the background BRET signal detected when the receptor-RLuc constructs was expressed alone. Ligands were incubated in presence of 0.1% BSA (Sigma) with the cells at 37°C for five minutes before the addition of coelenterazine H and BRET reading.

For BRET titration experiments, net BRET ratios were expressed as a function of the [acceptor]/[donor] ratio (Mercier et al. 2002). Total fluorescence (excitation filter at 485nm and emission filter at 535nm) and luminescence (measured 10 minutes after the addition of coelenterazine in the absence of emission filter) were used as a relative measure of total expression of the acceptor and donor proteins, respectively. Ligand-induced BRET changes were monitored by transfecting DNA ratios that yielded maximal BRET (BRET_{max}), and it was controlled that BRET_{max} did not depend on the quantity of transfected RLuc or YFP fusion plasmids.

Data analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 4.0 software. GTP γ S binding was analyzed using nonlinear regressions applied to a sigmoidal dose-response model (variable slope). Statistical significance of the net BRET differences between the different mutants and conditions were calculated using one-way ANOVA analysis of variance with Tukey post-test for p value less than 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION:

We constructed substitution mutants D133N, R134A and Y135A in the conserved DRY motif (residues (3.49), (3.50) and (3.51) following the assignment of Ballesteros and Weinstein (Ballesteros and Weinstein 1995)), which is a pivotal conformational switch for ligand-induced rearrangements leading to receptor activation (Cotecchia et al. 2003). In addition, we constructed substitution mutants N119D, N119K and N119S of Asparagine-119 (N119, or (3.35)), a key residue in which replacements change receptor activity as a function of the size of their lateral chain (Feng et al. 1998; Zhang et al. 2002; Hunyady et al. 2003). Surface expression of mutants D133N and R134A was somewhat reduced, whereas the remaining substitutions (Y135A, N119K, N119S and N119D) did not show important differences of surface expression compared to wildtype CXCR4 (Figure 1a).

To analyze activation properties of the mutants, we measured G protein activation using a GTP γ S binding assay (Figures 1b to 1d). D133N displayed no apparent reduction of agonist-induced G protein activation, whereas R134A activity was strongly reduced. GTP γ S binding of the Y135A mutant resembled that of wildtype CXCR4. Replacement of the N119 (N3.35) residue by lysine, serine or aspartic acid resulted in the phenotypes previously reported by Zhang et al (Zhang et al. 2002). As expected, N119K leads to loss of activity, whereas constitutive activity is seen with the N119S mutant. GTP γ S binding of the N119S mutant is further increased in the presence of agonist, resulting in maximal activity identical to wildtype CXCR4. The N119D substitution does not change the activity of the receptor relative to wildtype CXCR4. These observations were substantiated by measurement of G α i-mediated inhibition of forskolin-induced adenylyl cyclase activity at a single maximal dose of 200 nM of CXCL12, which is close to the maximum activity achievable with wild type CXCR4 (Percherancier et al. 2005) (Figure 1e), and which corresponds to the concentrations used in the BRET assays (below). The results obtained in both assays are in good agreement, suggesting that GTP γ S binding is indeed due to G α i activation. Taken together, our mutant panel comprises receptors which display either a constitutive G protein activation that can be further activated by agonist (N119S), activity similar to that of wild type CXCR4 (Y135A, D133N, N119D), or a drastically reduced or no G protein-dependent

activation (N119K and R134A). The loss of activity of N119K and R134A is not due to loss of CXCL12 binding, since the chemokine outcompetes binding of the monoclonal antibody 12G5 to all mutants (data not shown).

We then set out to monitor the conformation of the CXCR4 mutant homodimers. We used a BRET sensor system that measures the relative distance and orientation of an energy donor (*Renilla* luciferase, RLuc) and acceptor (yellow fluorescent protein, YFP) fused to the C-terminal of CXCR4. Coexpression of the respective constructs leads to the constitutive formation of homodimers and permits measurement of conformational changes that alter orientation/distance of the fused fluorophores, for example such as those brought about by ligand binding to the dimeric receptor (Percherancier et al. 2005). Of note, under our experimental conditions, transient CXCR4 expression does not exceed levels that are observed in cells that endogenously express the receptor, and the YFP and RLuc fusions do not interfere with G protein activation (Percherancier et al. 2005).

Energy acceptor over donor titrations demonstrated that most mutants retained BRET₅₀ values (the YFP/RLuc ratio at which halfmaximal BRET is obtained) in the same range as wildtype CXCR4 (Figure 2a), and observed differences are not statistically significant. BRET₅₀ has been interpreted as a receptor's propensity to dimerize (Mercier et al. 2002; Ramsay et al. 2002). The maximal BRET varied between wildtype and mutant CXCR4 with the exception of N119D. These BRET_{max} differences were significant, as were the differences between several mutants (Figure 2b). Lower BRET results from greater distance between energy donor and acceptor, or altered orientation, which is likewise indicative of conformational change. For the constitutively active N119S mutant, this conclusion is in line with evidence presented by Zhang et al. as a result of receptor modeling, which suggested conformational differences between wildtype CXCR4 and this mutant (Zhang et al. 2002). Of note, it is improbable that the mutations directly modify the orientation of the fused fluorophores since they are in TM3 of the receptor and adjacent residues. We therefore conclude that the observed differences in BRET_{max} are due to overall conformational changes within the receptor.

We next measured BRET in the presence of the natural CXCR4 agonist CXCL12, the weak agonist AMD3100, or the inverse agonist TC14012. We have previously demonstrated that these ligands induce distinct conformational changes in CXCR4 homodimers without affecting BRET₅₀ values (Percherancier et al. 2005).

Acceptor over donor titration analyses performed with the constitutively active mutant N119S and the inactive mutant N119K in absence and presence of ligands revealed no significant changes of BRET₅₀, suggesting that ligand binding also to mutant CXCR4 does not change their propensity to dimerize (N119S at basal condition: 4.01 ± 1.31 , in presence of CXCL12: 7.93 ± 4.32 , in presence of TC14012: 5.99 ± 2.43 , and N119K at basal condition: 4.85 ± 1.73 , in presence of CXCL12: 3.33 ± 1.36 , and in presence of: TC14012 5.57 ± 2.46 , n=4). Figure 3a shows the observed ligand-induced BRET changes of the CXCR4 mutants, expressed as % change relative to the respective BRET_{max} in the absence of ligand. The relative responses to the agonist CXCL12 of the mutants were different. Although these differences did not reach statistical significance between wildtype CXCR4 and the mutants, the differences between mutant Y135A and mutants D133N, R134A, N119K and N119S were significant ($p < 0.05$). The relative BRET increase observed in response to AMD3100 is higher in the mutants than the very weak response of wildtype CXCR4, with the notable exception of R134A. In addition, there are significant differences among the mutant responses, the N119K response being more important than that of D133N and N119D. The differences between wildtype and mutant CXCR4 responses to TC14012 do not reach statistical significance, with the exception of D133N, which does not respond.

The differences in ligand-induced BRET changes yield information about relative differences between basal and ligand-bound receptor conformations of the mutants. For example, the weak BRET response of wildtype CXCR4 to AMD3100 indicates that either the wildtype receptor does not undergo important conformational changes in response to AMD3100, or that these changes do not translate into important BRET changes. In turn, the higher BRET responses of most mutants to AMD3100 suggest that the conformational changes which these mutants undergo upon AMD3100 binding are dissimilar from those of the wildtype receptor. This, in principle, might result from the different basal conformations. In order to directly compare the ligand-bound conformations of the mutants we plotted and compared net BRET_{max} values of the mutants in the presence of ligands as percent of wildtype CXCR4 BRET_{max} under basal conditions (Figure 3b, for a summary see Table 1). This comparison reveals that the mutations also alter receptor conformations in complex with ligand. In presence of CXCL12, only mutants Y135A and N119D have net BRET_{max} values similar to the wildtype, indicating that

different agonist-bound receptor conformations of the other mutants are different, including mutants D133N and N119S ($p < 0.05$), which nevertheless stimulates $G\alpha_i$ activity in the presence of 200 nM CXCL12. Differences in inactive conformations are suggested by the differences of R134A to N119K, and to CXCR4 in presence of inverse agonist ($p < 0.05$). Interestingly, despite the obvious functional differences between mutants N119K and N119S, almost identical BRET in presence and absence of ligands was measured. This suggests that, despite the recorded differences among many of the mutants, the technical limits of our method may not permit appreciation of subtle, but functionally paramount conformational differences.

$BRET_{max}$ values are average values of a given receptor population; it can therefore not be categorically ruled out that different BRET values represent different states of equilibrium between only two distinct conformations (for example one inactive and one active conformation). However, in our data there is no linear link between $BRET_{max}$ and G-protein activation (for example R134A with CXCL12 has lower BRET and higher activity than N119K with or without CXCL12, $p < 0.05$). Moreover, inactive and active receptors can have similar net BRET (like mutants N119K and N119S in presence of CXCL12). We therefore conclude that the differential net BRET rather corresponds to genuinely different receptor conformations, than to changes in equilibrium between active and inactive receptors.

We have shown that the introduction of point mutations into the CXCR4 sequence can alter the basal conformation of the resulting mutant receptor, and can also alter the conformational rearrangements induced by ligand binding. Conformational rearrangements of a given mutant in response to agonist are not predictive of G protein activation (for example, mutant N119K conformationally responds to CXCL12, yet fails to activate G proteins). It remains to be investigated whether conformational responses could be predictive for receptor activities other than G protein activation; we do however not believe that conformational response *per se* must be followed by functional responses (i.e. the inverse agonist TC14012 induces conformational response, but not activity). In turn, conformational differences between mutants in the presence of CXCL12 BRET do not necessarily correlate with gross differences in G protein activation. For instance, the N119S mutant and wildtype CXCR4 have different conformations in presence of CXCL12,

yet both activate G proteins. While it remains to be seen whether such mutants are functionally different with respect to other readouts, such differences would not affect our conclusion that distinct receptor conformations can mediate the same activity. Taken together, we detect important differences on both the functional and conformational level in our mutant panel, but the link between function and conformation eludes simplification.

Theoretical models that describe GPCR activation have been repeatedly amended to accommodate new experimental data (Kenakin 2002). The dominant ternary complex model and its derivatives assume the existence of a limited number of receptor conformations that derive from one another by conformational intermediates between the extremes of one active and one inactive conformation. This assumption is increasingly difficult to reconcile with accumulating pharmacological evidence that different receptor ligands can stabilize different receptor conformations, as deduced from different functional consequences, and further revision of current models may be warranted (Urban et al. 2006). In this context, direct measurement of receptor conformation offers an additional perspective, contributing independent evidence to the elucidation of structure-function relationships in GPCRs. To date, few studies using these methods have employed mutant receptors in live cells (Tateyama et al. 2004; Vilardaga et al. 2005). In addition, several studies made use of resonance energy transfer and fluorescence quenching on purified, detergent-solubilized wildtype β_2 -adrenergic receptor to follow ligand-induced conformational changes (Ghanouni et al. 2001; Ghanouni et al. 2001; Harikumar and Miller 2005; Yao et al. 2006).

Our data derived from a set of CXCR4 mutants with different signaling phenotypes provide biophysical evidence that active receptor conformations can have a degree of conformational diversity that was previously unappreciated, and that is consistent with multiple receptor conformations being able to perform the same activation step. This fits models that take conformational heterogeneity of receptors into account. Such models were initially forwarded to better describe allostery, and suppose that collections of receptor conformations make up functionally similar receptor subpopulations (Onaran and Costa 1997; Kenakin and Onaran 2002; Kenakin 2004). While it might be rightly argued that recombinant systems expressing receptor mutants in cell lines do not reflect what wildtype

receptors actually perform *in vivo*, such artificial test systems highlight aspects of the conformational plasticity of the active receptor, as they have previously permitted the accumulation of functional information.

In conclusion, we find that heterogeneous CXCR4 conformations can lead to similar G-protein activation, implying a flexibility of active receptors that is unaccounted for by the ternary complex model and its derivatives.

Our findings might also help to meet the conceptual challenges inherent to therapeutic targeting of CXCR4. The use of competitive inhibitors of CXCL12 binding to CXCR4 results in side effects that make the drug unsuitable for long term antiretroviral treatment in HIV infection. Our data suggest that non-competitive allosteric compounds, that modulate the receptor conformation rather than blocking ligand binding and thereby preserve some of the receptor's functions, may be compatible with the maintenance of vital CXCR4 signaling, but impinge on other properties such as the mediation of viral entry.

FOOTNOTES

* This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and scholarships of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Canadian Institutes of Health Research (Y.B. and N.H.). We are indebted to Isabelle Slight for expert technical assistance and Terry Hébert for critical reading of the manuscript.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1:

Mutant expression and G α i activation. **A:** Cell surface expression levels of CXCR4 mutants. **B and C:** CXCL12-induced [³⁵S]-GTP γ S binding to membranes from cells expressing wild-type CXCR4 or receptors mutated in the DRY motif (B) or with substitutions of the N119 residue (C). **D:** ΔE , that is maximal activation versus basal binding of GTP γ S. Results are percentage of basal binding to membranes from wild-type CXCR4-expressing cells and are representative of four to five independent experiments performed in duplicate. **E:** Inhibition of cAMP production by CXCR4 mutants. Results are expressed as % adenylyl cyclase inhibition; background was subtracted from the data. Data are mean \pm SEM from three independent experiments.

FIGURE 2:

[Acceptor]/[Donor] titrations of wildtype and mutant CXCR4. **A:** [Acceptor]/[Donor] titration curves of CXCR4 mutants (black straight line) in comparison with wildtype CXCR4 (grey dotted line). One representative experiment out of at least three per mutant is shown - the data except for D133N derive from the same experiment. (BRET₅₀ CXCR4: 2.83 ± 0.28 , D133N: 3.08 ± 0.50 , R134A: 4.91 ± 0.28 , Y135A: 2.321 ± 0.15 , N119D: 4.013 ± 0.47 , N119K: 2.57 ± 0.29 , N119S: 3.54 ± 1.09) **B:** BRET_{max} values for wildtype and mutant CXCR4. Data are from six to eight independent experiments per mutant. P-values: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Differences of R134A with all mutants were significant ($p < 0.001$).

FIGURE 3:

Ligand induced BRET changes. A: Relative BRET changes induced by the CXCR4 agonist CXCL12 (200nM) (n=4), the weak agonist AMD3100 (1µg/ml) (n=4) and the inverse agonist TC14012 (1µg/ml) (n=2), with respect to basal BRET of each mutant. Statistical significance: $p < 0.05$ for CXCL12 responses of D133N, R134A, N119K and N119S with respect to Y135A; $p < 0.05$ for AMD3100 responses between CXCR4 and mutants N119K and N119S, D133A and N119K, R134A and Y135A, N119D, N119K and N119S, and N119D and N119K; $p < 0.05$ for TC14012 responses between wildtype CXCR4 and D133N, and D133N and mutants Y135A and N119S. **B:** The same values expressed on a scale relative to wildtype CXCR4 net BRET in the absence of ligands (set as 100%). The bars represent the mean and S.E.M. of four independent experiments (except for TC14012 where two independent experiments were performed). ANOVA one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison test of all data found for 115 out of 378 comparisons significant differences ($p < 0.05$), the most appealing ones being between inactive wildtype CXCR4/basal and R134A/CXCL12, between active wildtype CXCR4/CXCL12 and N119S/basal, D133N/CXCL12 and N119S/CXCL12, and between active N119D/CXCL12 and N119S/CXCL12. Comparison of selected inactive receptors found significant differences between R134A/basal and N119K/basal, and between R134A basal and wildtype CXCR4/TC14012.

TABLE 1:

Summary: The table summarizes the signaling properties of the mutants, as well as the $BRET_{max}$ values in presence and absence of CXCL12.

REFERENCES

1. Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B. K., Weinstein, H., Javitch, J. A., Roth, B. L., Christopoulos, A., Sexton, P., Miller, K., Spedding, M., and Mailman, R. B. (2006) *J Pharmacol Exp Ther*
2. Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., and Jockers, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(24), 21522-21528
3. Percherancier, Y., Berchiche, Y. A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005) *J Biol Chem* **280**(11), 9895-9903
4. Tateyama, M., Abe, H., Nakata, H., Saito, O., and Kubo, Y. (2004) *Nat Struct Mol Biol* **11**(7), 637-642
5. Vilardaga, J. P., Steinmeyer, R., Harms, G. S., and Lohse, M. J. (2005) *Nat Chem Biol* **1**(1), 25-28
6. Murdoch, C. (2000) *Immunol Rev* **177**, 175-184
7. Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M., and Marullo, S. (2002) *J Biol Chem*
8. El-Asmar, L., Springael, J. Y., Ballet, S., Andrieu, E. U., Vassart, G., and Parmentier, M. (2005) *Mol Pharmacol* **67**(2), 460-469
9. Springael, J. Y., Le Minh, P. N., Urizar, E., Costagliola, S., Vassart, G., and Parmentier, M. (2006) *Mol Pharmacol* **69**(5), 1652-1661
10. Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Gotoh, K., Kanamoto, T., Xu, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Hattori, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., Otake, A., and Fujii, N. (2001) *Bioorg Med Chem Lett* **11**(14), 1897-1902
11. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16), 7297-7301
12. Lagane, B., Ballet, S., Planchenault, T., Balabanian, K., Le Poul, E., Blanpain, C., Percherancier, Y., Staropoli, I., Vassart, G., Oppermann, M., Parmentier, M., and Bachelier, F. (2005) *Mol Pharmacol* **67**(6), 1966-1976
13. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J Biol Chem* **277**(47), 44925-44931
14. Ballesteros, J., and Weinstein, H. (1995) *Methods Neurosci* **25**, 366-428

15. Cotecchia, S., Fanelli, F., and Costa, T. (2003) *Assay Drug Dev Technol* **1**(2), 311-316
16. Zhang, W. B., Navenot, J. M., Haribabu, B., Tamamura, H., Hiramatu, K., Omagari, A., Pei, G., Manfredi, J. P., Fujii, N., Broach, J. R., and Peiper, S. C. (2002) *J Biol Chem* **277**(27), 24515-24521
17. Hunyady, L., Vauquelin, G., and Vanderheyden, P. (2003) *Trends Pharmacol Sci* **24**(2), 81-86
18. Feng, Y. H., Miura, S., Husain, A., and Karnik, S. S. (1998) *Biochemistry* **37**(45), 15791-15798
19. Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., Rees, S., and Milligan, G. (2002) *Biochem J* **365**(Pt 2), 429-440
20. Kenakin, T. (2002) *Nat Rev Drug Discov* **1**(2), 103-110
21. Ghanouni, P., Steenhuis, J. J., Farrens, D. L., and Kobilka, B. K. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11), 5997-6002
22. Ghanouni, P., Gryczynski, Z., Steenhuis, J. J., Lee, T. W., Farrens, D. L., Lakowicz, J. R., and Kobilka, B. K. (2001) *J Biol Chem* **276**(27), 24433-24436
23. Yao, X., Parnot, C., Deupi, X., Ratnala, V. R., Swaminath, G., Farrens, D., and Kobilka, B. (2006) *Nat Chem Biol* **2**(8), 417-422
24. Harikumar, K. G., and Miller, L. J. (2005) *J Biol Chem* **280**(19), 18631-18635
25. Onaran, H. O., and Costa, T. (1997) *Ann N Y Acad Sci* **812**, 98-115
26. Kenakin, T., and Onaran, O. (2002) *Trends Pharmacol Sci* **23**(6), 275-280
27. Kenakin, T. (2004) *Trends Pharmacol Sci* **25**(4), 186-192

Figure 1

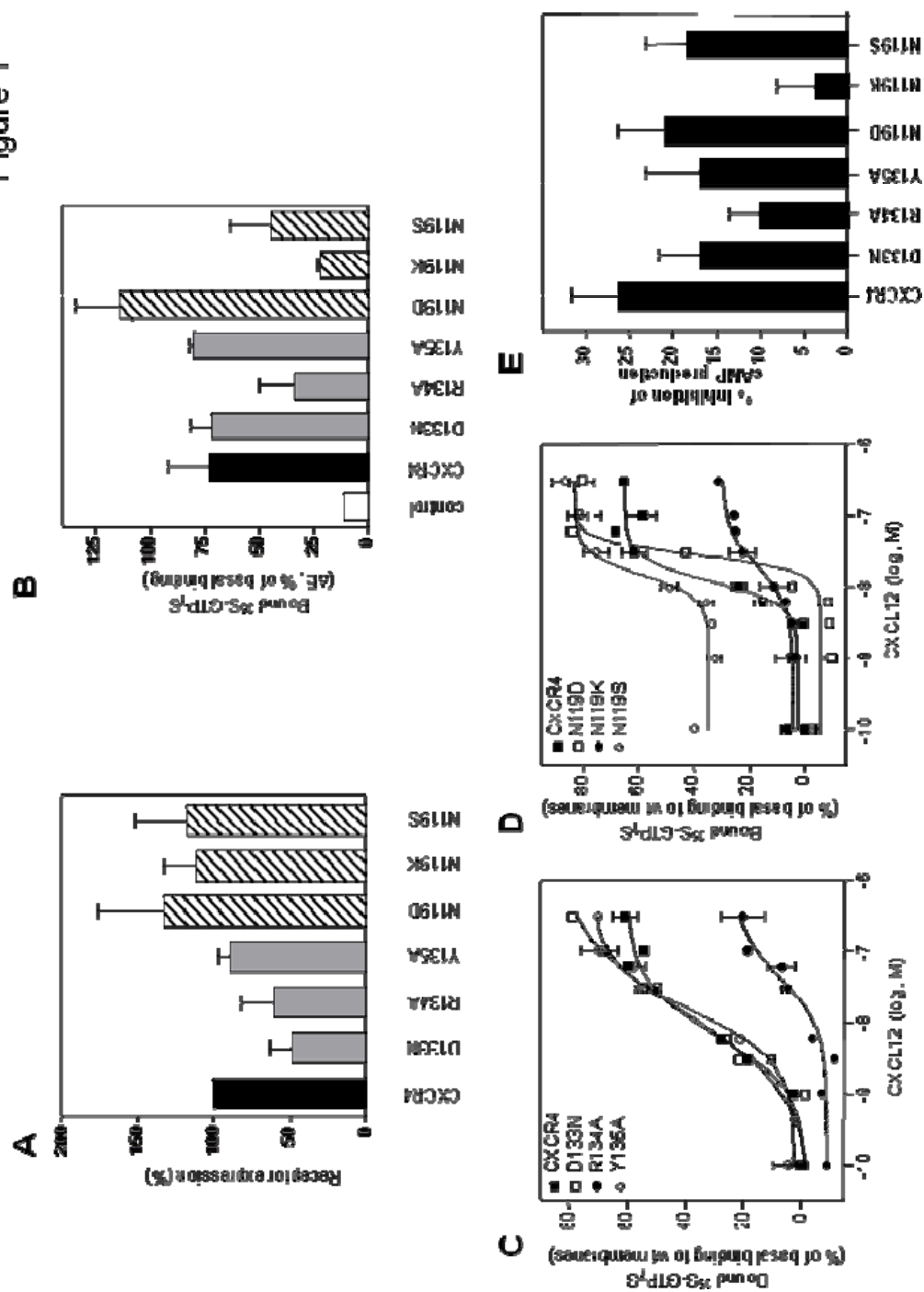


Figure 2A

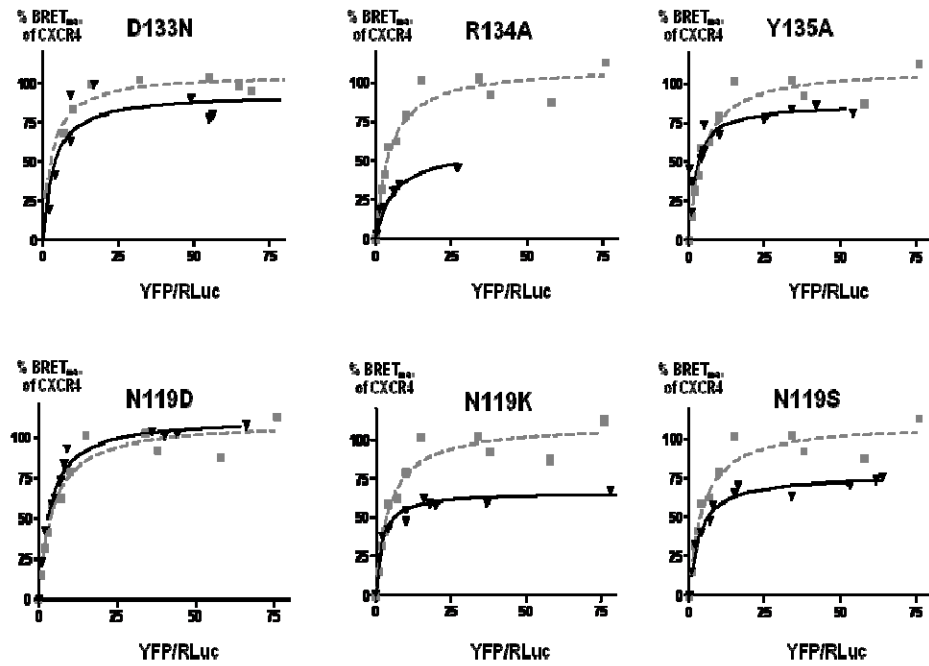


Figure 2B

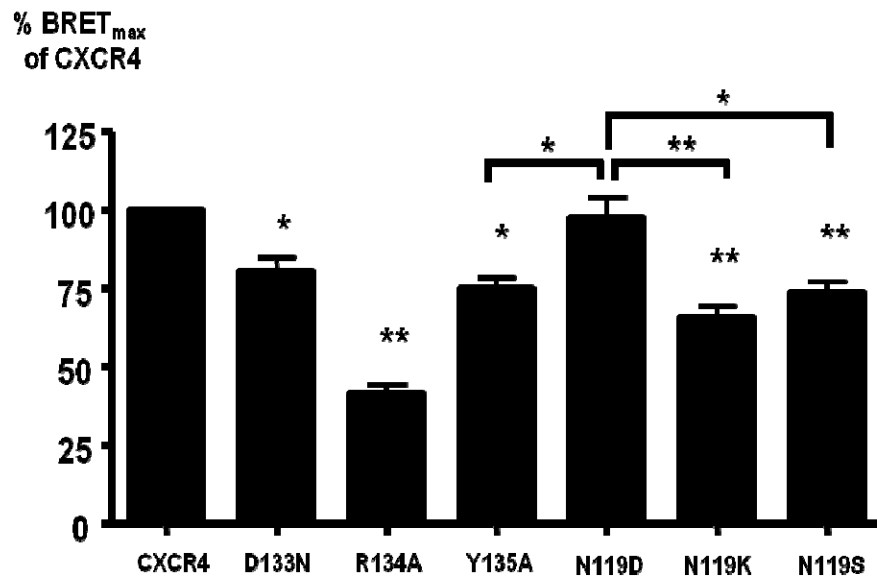


Figure 3A

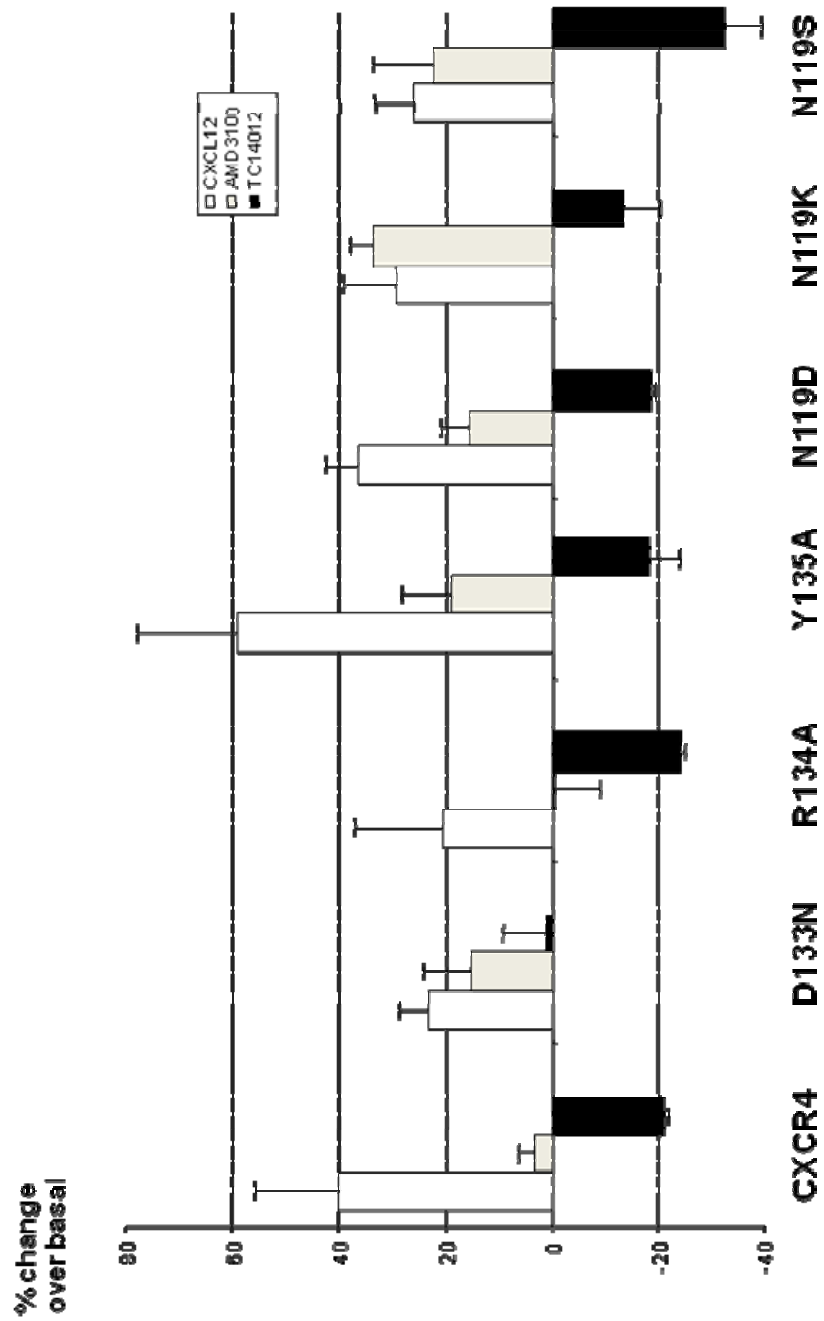


Table 1: Overview: mutant Gal activation and BRET_{max} in absence and presence of SDF-1

Receptor	G α _i activation	basal BRET _{max} (relative to wildtype CXCR4)	BRET _{max} with SDF-1 (relative to basal wildtype CXCR4)
CXCR4	yes	100	139 ± 15
D135N	yes	76 ± 12	94 ± 3
R134A	no	41 ± 7	49 ± 7
Y135A	yes	74 ± 12	119 ± 19
W119D	yes	101 ± 15	137 ± 3
W119K	no	68 ± 16	87 ± 8
W119S	constitutive, further activated by agonist	75 ± 13	95 ± 5

Article 2**Different effects of the different natural CC-chemokine receptor 2B (CCR2B) ligands on β -arrestin recruitment, $G\alpha_i$ signalling, and receptor internalization.**

Effet des différents ligands naturels du récepteur de chimiokine CCR2B sur le recrutement de la β -arrestine, la signalisation de la protéine $G(\alpha)_i$ et l'internalisation du récepteur.

Berchiche YA, Gravel S, Pelletier ME, St-Onge G et Heveker N.

Mol Pharmacol. 2011 Mar;79(3):488-98.

Réimprimé avec la permission de la American Society for
Pharmacology and Experimental Therapeutics. Tous droits réservés.
Copyright© 2010 American Society for Pharmacology and Experimental
Therapeutics

**Different effects of the different natural CC chemokine receptor 2B (CCR2B)
ligands on β -arrestin recruitment, G α i signalling, and receptor internalization**

Yamina A. Berchiche, Stéphanie Gravel, Marie-Eve Pelletier, Geneviève
Saint-Onge and Nikolaus Heveker

Running Title: β -arrestin recruitment to CCR2

Non-standard abbreviations: BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer); YFP (Yellow Fluorescent Protein); RLuc (*Renilla luciferase*);

Footnote

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant number HOP-79210). Y.A.B. was supported by a CIHR fellowship; S.G. acknowledges a fellowship from the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine. N.H. is a CIHR New Investigator.

Abstract:

The chemokine receptor CCR2, which has been implicated in a variety of inflammatory, auto-immune and cardiovascular conditions, binds several natural chemokine ligands. Here, we assessed the recruitment of β -arrestin to CCR2 in response to these ligands using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) technology. Compared to CCL2, which was considered as a full agonist, other CCR2 ligands were partial agonists with reduced efficacy and potency. Agonist potencies were not a function of their affinity for CCR2. Efficacy of arrestin recruitment matched that of agonist-induced CCR2 internalization. Although the potency and efficacy rank orders of the ligands in arrestin recruitment were similar to those observed for $G\alpha_i1$ activation, arrestin recruitment was at least in part resistant to $G\alpha_{i/o}$ -inactivating pertussis toxin, suggesting partial independence from $G\alpha_{i/o}$. The degree of pertussis toxin resistance of arrestin recruitment was different between the chemokines. Moreover, qualitative differences between the arrestin responses to the different ligands were identified in the stability of the response: while CCL7-induced arrestin recruitment had a half-life of less than 15 minutes, CCL8 and CCL13 induced stable CCR2-arrestin interactions. Finally, the ligands stabilized different conformations of the CCR2 homodimer. Our results support the validity of models for receptor-ligands interactions in which different ligands stabilize different receptor conformations also for endogenous receptor ligands, with corresponding implications for drug development targeting CCR2.

Introduction:

Receptor-ligand promiscuity is a hallmark of the inflammatory CC-chemokine/receptor system, where most ligands bind more than one receptor, and most receptors bind more than one ligand. Initially, different chemokines binding the same receptor were referred to as functionally redundant, although differences between their effects *in vivo* were early recognized. Pharmacologic mechanisms that may in part account for these differences are difficult to assess on primary cells and in *in vivo* systems due to the presence of alternative receptors and the confounding variety of regulatory mechanisms of the chemokine response. For example, binding

preferences and activity of a given chemokine are modulated by proteoglycan binding, protease processing, and oligomerization of chemokines as well as chemokine receptors, adding several layers of complexity. However, the description of the non-redundant pharmacology of ligands to a given receptor in defined *in vitro* systems, and thus in the absence of most of the confounding *in vivo* mechanisms, is of prime interest for drug development, which has indeed been hampered by the complexity of the chemokine system. Knowledge about intrinsically different effects of different chemokines on the same receptor should help to better direct drug developing efforts targeting chemokine-receptors.

The chemokine receptor CCR2 is of significant clinical interest, due to its implication in inflammatory and cardiovascular disease. Moreover, potential roles of CCR2 in cancer and pain perception have emerged. The receptor is best investigated in cells of the monocyte/macrophage lineage, although it is also expressed on a variety of other immune cells and different tissues. In the human system, CCR2 has been reported to bind seven natural ligands in recombinant systems, namely the chemokines CCL2, CCL8, CCL7, CCL13, and CCL11, CCL24, and CCL26 (also called MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, Eotaxin-1, Eotaxin-2, and Eotaxin-3, respectively) (Combadiere et al. 1995; Myers et al. 1995; Berkhout et al. 1997; Gong et al. 1997; Ogilvie et al. 2001; Ogilvie et al. 2003; Parody and Stone 2004). An additional CCR2-binding chemokine, CCL12 (or mMCP-5), seems to be specific to the murine system, and to have no human ortholog (Murphy et al. 2000), which may be indicative of the limited conservation of some CC chemokine/receptor systems across species (Proudfoot et al. 2010). On the molecular level, CCR2 has been demonstrated to couple adenylate cyclase inhibiting $G\alpha_i$ subunits of heterotrimeric G-proteins. Moreover, the activation of kinase cascades including erk 1/2 and Akt, as well as intracellular calcium signalling have been reported.

Surprisingly, β -arrestin recruitment to CCR2 by its ligands has to date found little attention. β -arrestins (β -arrestin 1 and β -arrestin 2, also termed arrestin 2 and arrestin 3, respectively) were initially described as molecules that terminate G-protein-coupled receptor (GPCR) signalling by uncoupling the receptor from heterotrimeric G-proteins and by promoting receptor internalization. However, it became clear that the β -arrestins also initiate a second round of signalling, functioning as a scaffold protein with links to a confounding number of downstream

pathways (Kendall and Luttrell 2009). Moreover, it appears now that for some receptor-ligand combinations β -arrestin recruitment can be independent from the activation of heterotrimeric G-proteins. Therefore, arrestin emerges as a signalling hub in its own right. The advent of quantitative proximity assays Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) technology to measure β -arrestin recruitment, traditionally detected by microscopy through cytosol to plasma membrane translocation, permits now to quantify the pharmacological parameters of this signalling axis.

We here set out to investigate the recruitment of β -arrestin to CCR2 induced by its different natural ligands. We also investigate $G\alpha_i$ signalling and its link to β -arrestin recruitment, and explore CCR2 homodimer conformations induced by the different chemokines. By using a recombinant HEK293 system, we isolate the pharmacologic properties of the different ligands and thus circumvent difficulties in data interpretation encountered in more natural systems. We find that most of the natural CCR2 ligands qualify as partial agonists, with similar efficacies in the tested readouts. Nevertheless, β -arrestin recruitment is only in part inhibited by pertussis toxin, suggesting $G\alpha_{i/o}$ -independent mechanisms of β -arrestin recruitment. The stability of the receptor- β -arrestin interaction depends on the tested CCR2-ligands, suggesting that they induce qualitatively different responses, in line with the concept of functional selectivity.

Materials and methods :

Materials. Recombinant chemokines were from PeproTech Inc (Rocky Hill, NJ). Coelenterazine h (for BRET¹ experiments) was from NanoLight Technology, Pinetop, AZ), and coelenterazine 400A (for BRET² experiments) from Biotinium, Hayward, CA. Pertussis toxin (PTX) was from Calbiochem, forskolin from Sigma, and the anti-CCR2 monoclonal antibody (clone 48607) directly coupled to phycoerythrin from R&D Systems.

Plasmids. The cloning of CCR2b-Rluc and CCR2b-YFP was described previously (Percherancier et al. 2005). β -arrestin 2-Rluc, Rluc- β -arrestin 1, $G\alpha_i$ 1-91Rluc, $G\alpha_i$ 1-

122-Rluc and G α _i1-60Rluc and the cAMP Epac BRET sensor were gifts of Michel Bouvier (Université de Montréal).

Cell culture and transfection. HEK293 (passage number ~ 10-30, Invitrogen, Carlsbad, CA) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium, 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen), and 10% fetal bovine serum (Wisent). Transient transfections were performed in six well plates using the polyethylenimine method; the total amount of transfected DNA was kept constant for all transfections by adding empty vector. Surface CCR2 quantities were determined by flow cytometry, using Quanti-Brite standardization beads (BD Biosciences), and typically reached around 2000-4000 antibody binding sites/cell.

Binding studies. Cells were transiently transfected with 1 μ g unfused CCR2b cDNA or 1 μ g of empty vector per well. 24 h after transfection the medium was removed, the cells washed twice with PBS, resuspended in binding buffer (HEPES 50mM pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, 0.2% BSA), and seeded in 96 well plates in the presence of increasing concentrations of unlabeled competitor ligand. The competition studies were carried out at 4°C for 4 hours using 60 pM of I¹²⁵-CCL2 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) as a tracer. A combi cell harvester was used to wash the excess tracer and capture samples on glass fiber filter paper (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Binding was measured using a gamma counter (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA). Experiments were carried out in duplicate.

BRET Measurements. Transfected cells were seeded in 96 well, white, clear-bottom microplates (View Plate, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) pre-treated with 0.1 % poly-D-lysine (Sigma) 24 hours after transfection and left in culture for another 24 hours. 48 hours after transfection the culture medium was replaced by BRET buffer (PBS, 0.1% bovine serum albumin, 0.5mM MgCl₂) at room temperature. Coelenterazine h, or coelenterazine 400A was added at the final concentration of 5 μ M, and fluorescence and luminescence reading were collected using the Mithras LB940 (Berthold Technologies) as described previously (Percherancier et al. 2005; Berchiche et al. 2007; Leduc et al. 2009). All BRET experiments were performed while the cells remained attached to the 96 well

plates. To assess ligand-induced changes of the BRET¹ signal, we first established the assay conditions by performing BRET¹ titration experiments to determine the BRET_{max} ratio for each co-transfected -eYFP and -Rluc fusion protein, as previously described (Berchiche et al. 2007; Kalatskaya et al. 2009). For dose-response experiments, cells expressing the -eYFP and -Rluc fusion proteins at BRET_{max} ratios, were stimulated for 5 min at 37°C with increasing concentrations of the indicated ligand before the addition of the substrate, unless specified otherwise. The values were corrected to net BRET by subtracting the background BRET signal detected when the -RLuc construct was expressed alone.

Arrestin Recruitment. β -arrestin recruitment was measured by BRET¹ as described previously (Kalatskaya et al. 2009). Briefly, the BRET signal of cells co-transfected with 1.5 μ g CCR2-eYFP and 0.02 μ g β -arrestin 2-Rluc or 0,003 μ g Rluc- β -arrestin 1 completed to 2 μ g with empty vector per well was measured. The β -arrestin recruitment kinetics was assessed by adding the ligands 10 minutes after the addition of coelenterazine h. The β -arrestin decay kinetics were assessed by incubating 10 min RT for and for various periods at 37°C, followed by BRET readings.

Adenylyl Cyclase Activity. cAMP was determined using Rluc3-Epac-GFP10, a BRET² reporter, as described previously (Leduc et al. 2009). Briefly, 1 μ g of unfused CCR2b cDNA and 0.03 μ g of the Epac reporter were transiently co-transfected. Cells were stimulated with ligands in the presence of 20 μ M forskolin at room temperature for 10 minutes, immediately after the addition of coelenterazine 400A. For experiments with PTX, the cells were treated for 16h with 100 ng/ml PTX at 37°C prior to stimulation with forskolin and chemokines.

Endocytosis and Flow Cytometry. CCR2b expressing HEK293 cells were incubated with 100 nM of each ligand at 37°C with gentle shaking. The reaction was stopped by removing aliquots on ice. Surface-bound chemokine was removed with acid washing (50 mM Glycine buffer pH 2.7, 150 mM NaCl), and the cells were subsequently washed 3 times with ice cold PBS. Labelling with phycoerythrin conjugated monoclonal anti-CCR2 antibody was done for 30 minutes on ice, followed by three PBS washes. CCR2 was quantified by flow cytometry on a

FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Surface expression of CCR2 after ligand incubation at 37°C was expressed in % of CCR2 expression compared to a sample drawn before addition of the ligands.

Data analysis. Data obtained were analyzed using Graphpad Prism 4.0 software. Statistical significance of the differences between the different conditions was determined using one-way analysis of variance with Tukey's post-test; when appropriate, multiple measures ANOVA was also used. IC₅₀s were determined with the Cheng-Prusoff equation using GraphPad. When indicated, differences of top or bottom values were also determined using simultaneous curve fitting. The intrinsic relative activities (RA_i) of CCL8, CCL7 and CCL13 were estimated using the formula $E_{\max_B}EC_{50_A}/E_{\max_A}EC_{50_B}$ (equation 17 in (Ehlert 2008)), and relative efficacies using the formula $K_B E_{\max_B}EC_{50_A}/K_A E_{\max_A}EC_{50_B}$, equation 19 in (Ehlert 2008).

Results

Radioligand displacement. To establish the binding characteristics of the reported CCR2 ligands to CCR2 in our assays system, we performed radioligand displacement assays using ¹²⁵I-CCL2 as a probe (Figure 1). The affinity of CCL2 was in the 0.2 nM range, as expected (Myers et al. 1995), while CCL8, CCL7, CCL13 and CCL11 displaced ¹²⁵I-CCL2 with IC₅₀s in the nanomolar range (220 pM for CCL2, 4.2 nM for CCL8, 10 nM for CCL7, 5 nM for CCL13 and 11 nM for CCL11, Table 1), suggesting that they are specific CCR2 ligands. Of note, while we performed heterologous displacement assays, the observed IC₅₀s for CCL8 and CCL7 are nearly identical with those reported previously in homologous binding competitions (Sozzani et al. 1994; Combadiere et al. 1995; Gong et al. 1997), suggesting that they indeed represent the affinities of these chemokines for CCR2. For CCL11, our IC₅₀ is in agreement with that reported by Martinelli et al. (Martinelli et al. 2001), but at odds with that found by Ogilvie et al. (in the micromolar range) (Ogilvie et al. 2001). Moreover, we find high IC₅₀s for CCL24 and CCL26 (over 850 nM and 700 nM, respectively). While Ogilvie et al reported that CCL26 competed with the binding of ¹²⁵I-CCL2 on monocytes with an IC₅₀ in the 100 nM range, and on CCR2-transfected 300.19 murine pre-B cells with an IC₅₀

in the 20 nM range (Ogilvie et al. 2003), Parody et al report IC_{50} s against the same radioligand of 3 nM for CCL26 and 580 nM for CCL24 on CCR2-transfected COS-7 cells (Parody and Stone 2004). The reason for such discrepancies may lie in the different cell backgrounds used, especially considering potential effects of CCR2 heterodimerization with unidentified endogenous receptors of the competing chemokine (Springael et al. 2006). Indeed, cooperative effects could be inferred from the atypical competition slopes reported by these authors (Ogilvie et al. 2003; Parody and Stone 2004). The investigation of CCL24 and CCL26 has not been expanded in the present study, but they were ineffective in initial experiments in all experimental system used (not shown).

β -arrestin recruitment. To test β -arrestin recruitment to CCR2, we used a BRET-based proximity assays system, in HEK cells transiently coexpressing the BRET donor β -arrestin 2-Rluc and CCR2 fused to the BRET acceptor YFP. No basal BRET was detected, suggesting the absence of constitutive interaction of CCR2 with β -arrestin 2. Dose-response experiments revealed the following potency rank order of the chemokines: CCL2 < CCL8/CCL7 < CCL13 (EC_{50} of approximately 1 nM for CCL2, 55 nM for CCL8, 15 nM for CCL7, and over 140 nM for CCL13) (Figure 2A, Table 1). Similar observations were made using RLuc- β -arrestin 1 (Figure 2B, Table 1), with the exception of CCL13, which showed exceedingly low potency in recruiting beta-arrestin 1. CCL11 did not induce β -arrestin 2 recruitment. The efficacies of the BRET signals were also different among the chemokines (Figure 2C), with a rank order of CCL2 > CCL7/CCL13 > CCL8. Therefore, while CCL8 was a potent recruiter of β -arrestin to CCR2, it did so with low efficacy. CCL13 induced arrestin responses did not reach saturation even at highest chemokine doses, leaving some uncertainty about the EC_{50} values that were determined by curve fitting. However, the saturation for β -arrestin 1 recruitment is clearly less than for β -arrestin 2, and thus the underestimation of the true EC_{50} value for β -arrestin 1 recruitment by CCL13 is probably even stronger than for β -arrestin 2. This may indeed suggest a β -arrestin 2 over β -arrestin 1 bias of CCL13. No preferences for either arrestin were found with the other ligands.

The different BRET efficacies in this proximity assay might reflect quantitative differences in arrestin recruitment, for example owing to variations in affinity for

arrestin of the receptor-ligand complex. Alternatively, and perhaps more likely, they might reflect different conformations of the resulting receptor-arrestin complex, which result in different distances and/or orientations of the fluorophores and thus BRET efficiency. In both cases, we detect significant differences between the responses to the different chemokines. In general, the potency to recruit β -arrestins was much lower than ligand affinity (approximately 1 log, see Table 1), in line with the independence of both parameters. A notable exception in this respect was CCL7, for which the potency to recruit β -arrestin almost matched the affinity for CCR2, suggesting that CCL7 forms with CCR2 a receptor-ligand complex with a higher propensity to recruit β -arrestin, as compared to the other ligands.

To further explore CCR2 recruitment of β -arrestin in response to the different chemokines, we performed time-course experiments. Addition of chemokines led to very rapid arrestin recruitment at 37°C (not shown). In order to obtain higher resolution of the kinetics, these experiments were performed at room temperature, thus decelerating β -arrestin 2 recruitment to the receptor. Significant differences were seen when the rapidity of the response was considered: while CCL2 still reached 50% of the maximal response in less than 3 minutes, the response of CCL13 was considerably slower (Figure 3A). Overall, the rapidity of the response was CCL2>CCL7>CCL13>CCL8. We then investigated the stability of the β -arrestin 2 response over time. Indeed, while some GPCRs interact only transiently with β -arrestin 2 (also termed class A receptors), others show sustained interactions (also termed “class B receptors” (Kendall and Luttrell 2009)). To address this issue, cells were incubated for 10 minutes with the ligands at room temperature as before, followed by shifting to 37°C for the indicated periods and measurement of the remaining signal. As shown in Figure 3B, marked differences were seen between the chemokines. While the weak signal elicited by CCL8 was of great stability over time, the CCL7-elicited signal rapidly diminished and its decrease fitted one-phase exponential decay ($R^2 = 0.76$) with a half-life of less than 15 minutes. The CCL2 signal was somewhat more stable, with a half life of >20 minutes. The CCL13-elicited signal was clearly biphasic, showing a transient increase during the first 10 minutes at 37°C, followed by a stable signal. Similar observations were made with β -arrestin 1 (data not shown). In sum, CCL7, who had a particularly high potency to recruit arrestin (compared to its binding affinity), also showed the shorter half-life of

the signal. Inversely, CCL13, a weak arrestin recruiter, induced signals that were stable over time. It thus seems that CCR2 does not *per se* belong to class A or class B receptors, but can adopt different arrestin recruitment characteristics depending on the bound chemokine.

CCR2 internalization. The observed differences in arrestin recruitment may have impact on receptor endocytosis, since arrestins are key molecules for chemokine receptor endocytosis (Signoret et al. 2005). Indeed, a recent report finds that upon stimulation with CCL2, CCR2 colocalizes with β -arrestin 2 in endocytic compartments (Garcia Lopez et al. 2009), suggesting that receptor endocytosis is mediated by β -arrestin 2. We thus studied the effect of the chemokines on receptor internalization.

Cells were incubated with the respective ligands (100 nM) at 37°C, and aliquots placed on ice at different time points. After acid wash to remove surface-bound chemokines, remaining CCR2 receptor was quantified by flow cytometry. As shown in Figure 4, over 50% of the surface CCR2 was internalized during the first 10 minutes after incubation with CCL2. CCL7-induced internalization was somewhat slower, and did not reach the same extent as with CCL2. CCL8 and CCL13 induced even less CCR2 internalization. The plateau reached after 60 minutes of incubation with the chemokine is significantly different between CCL2 and CCL13, as well as between CCL7 and CCL8. These observations are compatible with the vision that CCR2 internalization is a function of arrestin recruitment.

Activation of G_{α_i} via CCR2 by its natural ligands. Given that the different chemokines showed different intrinsic properties in β -arrestin signalling, we asked whether this might reflect signalling events upstream of β -arrestin recruitment. To investigate the potential correlations between β -arrestin recruitment and G-protein signalling in CCR2, we measured CCR2- G_{α_i1} signalling, taking advantage of a previously described BRET-based assay (Gales et al. 2005; Gales et al. 2006). This system uses the receptor fused to YFP in combination with G_{α_i1} -RLuc constructs, where the BRET donor is fused at different permissive locations within the G_{α_i1} amino acid sequence (G_{α_i1} -RLuc-60, G_{α_i1} -RLuc-91, and G_{α_i1} -RLuc-122). Using this system, Galés et al demonstrated the existence of GPCRs in preformed

signalling complexes containing the receptor and heterotrimeric G-proteins. Moreover, they were able to detect ligand-induced BRET changes between various GPCRs and the $G\alpha_i$ subunit, indicating conformational changes within preformed signalling complexes that correlate with $G\alpha_i$ activation (Gales et al. 2005).

Using this system, we detected specific basal BRET signals between $G\alpha_i$ 1-RLuc fusions and CCR2-YFP, in line with the existence of preformed and persistent complexes, as has been described for a number of 7TMRs (Dupre et al. 2006). Overall, $G\alpha_i$ 1-RLuc122 yielded the strongest signal, but similar albeit weaker signals were also obtained with the $G\alpha_i$ 1-RLuc91 fusion, while $G\alpha_i$ 1-RLuc60 only yielded weak BRET (Figure 5A). Incubation with agonists led to strong decreases in BRET (>50%), regardless whether $G\alpha_i$ 1-RLuc122 or $G\alpha_i$ 1-RLuc91 were used. This is different from observations made in the α_{2A} -adrenergic receptor system, where BRET increases upon stimulation with $G\alpha_i$ 1-RLuc91, but decreases with $G\alpha_i$ 1-RLuc122 (Gales et al. 2006). Of note, the amplitude of ligand-induced BRET changes that we observe is much stronger than that reported with the α_{2A} -adrenergic receptor. These divergences likely reflect different the position of the $G\alpha_i$ subunit with respect to the receptor C-terminus of different receptors.

Experiments with various concentrations of the different ligands yielded sigmoidal dose-response curves (Figures 5A and 5B). In general, there was good agreement between the potencies measured with $G\alpha_i$ 1-RLuc91 and $G\alpha_i$ 1-RLuc122, while the different efficacies reported by $G\alpha_i$ 1-RLuc91 failed to reach statistical significance due to the weaker signal (Table 1). Overall, both potency and efficacy rank orders with $G\alpha_i$ 1 strikingly matched those observed in the arrestin readout. The potency rank order was again CCL2>CCL8=CCL7>CCL13 (EC_{50} with $G\alpha_i$ 1-RLuc122 and $G\alpha_i$ 1-RLuc91, respectively: 860 and 510 pM for CCL2, 9 and 20 nM for CCL8, 4.4 and 3.6 nM for CCL7, 30 and 55 nM for CCL13, and 1 nM with CCL11 (determined with $G\alpha_i$ 1-RLuc122 only)), while the efficacy ranking was again different from potency ranking, due to strikingly low efficacy of CCL8 (CCL2>CCL7>CCL13>CCL8, Figures 5D and 5E). Surprisingly, using the $G\alpha_i$ 1-RLuc122 sensor, CCL11 did yield weak, but significant BRET changes, which, while they did not exceed 10-15% of BRET reduction, were observed with high potency. Also, we observed again that EC_{50} s were higher than binding competition

IC₅₀s for all ligands except CCL7. This might be surprising given that the EC₅₀s of strong agonists (like CCL2) in functional assays lie normally below their affinity, reflecting that the activation of a fraction of the receptors is sufficient to saturate the response. However, the EC₅₀s revealed by the BRET assays, unlike functional assays, record the entirety of receptor/G-protein complexes, and saturation is therefore not expected before full receptor occupancy.

Importantly, Galés et al found that efficacies measured by BRET and cAMP production correlate (Gales et al. 2005). To confirm this conclusion, we conducted measurement of the generated cAMP levels using a BRET-Epac cAMP sensor (Jiang et al. 2007; Leduc et al. 2009). As shown in Figure 5F, dose-response experiment conducted with CCL2 and CCL8 revealed different maximal inhibition of forskolin-induced cAMP production by both chemokines ($63.5 \pm 1.3\%$ for CCL2 and $40.2 \pm 2.1\%$ for CCL8). This result supports that, indeed, the different CCR2 ligands lead to different changes in the receptor/G-protein complex that result in differences in the efficiency of G α_i 1 activation. These conclusion are in line with those drawn by Galés et al (Gales et al. 2005) and Nikolaev et al (Nikolaev et al. 2006) concerning the molecular basis of partial agonism.

Pertussis toxin sensitivity of arrestin recruitment. The agreement of potency and efficacy rank orders between G α_i 1 signalling and arrestin recruitment is striking, and compatible with a causal link between the two readouts. To further investigate this question, we tested their respective sensitivity to G $\alpha_{i/o}$ -inactivating pertussis toxin (PTX) treatment. Indeed, if dependent on G α_i signalling, it would be expected that β -arrestin 2 recruitment is PTX sensitive. To test this, transfectants for β -arrestin 2 and Epac BRET were incubated in parallel with PTX, and stimulated with the respective agonists. As shown in figure 6A, all ligands reduced forskolin-induced cAMP production, representing G α_i activation. This reduction was entirely abolished by PTX treatment. Intriguingly, in the presence of both chemokine and PTX, we consistently observed cAMP production levels superior to those observed with forskolin alone. Potentially, this might hint at adenylate cyclase stimulation *via* marginal G α_s activation by the chemokines, which would indeed be expected to be unaffected by PTX treatment. Simultaneous coupling to PTX-sensitive G α_i and PTX-insensitive G α_s pathways has been reported for several 7TMRs. For example,

$G\alpha_i$ coupling of the prostaglandin EP4 receptor initially eluded identification, since it was masked by simultaneous activation of $G\alpha_s$ (Fujino and Regan 2006; Leduc et al. 2009). Alternatively, the excess cAMP inhibition by PTX might result from inhibition of the basal activity of endogenous $G\alpha_s$ coupling GPCRs.

However, when evaluating β -arrestin 2 recruitment to CCR2, we found that recruitment induced by CCL2 was largely resistant to PTX (Figure 6B). This reinforces the conclusion that CCL2-induced endocytosis is arrestin dependent, as CCL2-induced endocytosis was also reported to be PTX resistant (Garcia Lopez et al. 2009). However, stronger PTX inhibition was observed with other chemokines, ranging from 45% (CCL7) to 60% (CCL13) of the β -arrestin 2 response. The CCL8-induced signal was too weak to permit meaningful analysis. Our results suggest that β -arrestin 2 recruitment to CCR2 by CCL2 (and in part by the other chemokines) is indeed G-protein independent. Alternatively, we can at preset not exclude that other, endogenous, $G\alpha$ subunits are also stimulated and play a role in β -arrestin recruitment. In sum, it seems that β -arrestin 2 recruitment is induced by a combination of different, simultaneously activated pathways, which are only in part $G\alpha_{i/o}$ -dependent. However, the proportions by which these pathways account for β -arrestin 2 recruitment by the different ligands are not alike.

Ligand-induced changes in CCR2 homodimer BRET. The observed differences in the effects of the different ligands suggest that they stabilize different CCR2 conformations, as has been shown for synthetic GPCR ligands. To directly assess this question, we used BRET within the CCR2 homodimer as a conformational sensor. We have indeed previously shown that CCR2 forms constitutive homodimers that can be detected by BRET signals between coexpressed CCR2-RLuc and CCR2-YFP as BRET donor and acceptor, respectively (Percherancier et al. 2005). Incubation of these dimers with CCL2 resulted in BRET changes, which we interpreted to reflect ligand-induced rearrangements in the CCR2 dimer conformation (Percherancier et al. 2005). Here, we compared in dose-response experiments BRET changes yielded by the different CCR2 ligands.

As depicted in Figure 7, only CCL2, CCL7, and CCL13 yielded appreciable changes in the constitutive CCR2 homodimer BRET. The changes induced by different chemokines show, indeed, different efficacies and potencies. The observed

EC₅₀s were 6 nM for CCL2, 25 nM for CCL7, and 180 nM for CCL13. Maximal changes observed with CCL7 and CCL13 are clearly different from those observed with CCL2 ($p < 0.0001$), but not from one another (although maximum levels with CCL13 were not attained at the chemokine doses used and had to be derived from curve fittings, Table 1). CCL8 and CCL11 did not induce changes even at highest doses (not shown). This could either mean that no changes in the CCR2 homodimer conformation is induced by these chemokines, or that such changes are not detected by this experimental system.

Perfect matches of radioligand displacement IC₅₀ with homodimer BRET EC₅₀ would be expected, if GPCR homodimer BRET changes directly reflected ligand binding associated conformational changes in the receptor dimer. Surprisingly, however, the potencies of the responses of CCL2 and CCL13 did not correspond to IC₅₀ values of radioligand competitions, but were over 1 log higher for CCL2, whereas both values are approximately in keeping for CCL7. This discrepancy suggests that the conformational change of the CCR2 dimer does not only relate to conformational changes induced by the ligand/receptor interaction. Rather, ligand-induced BRET change seems to be the result of more complex events that relate to early signalling processes that affect receptor conformation. We envision that these events reflect rearrangements in the conformation and/or composition of receptor associated signalling molecules or scaffold proteins. Following this line of interpretation, it is intriguing that the potencies of ligand-induced BRET changes in the homodimer are approximately in keeping with those observed with G α_i1 and β -arrestin, and that this includes the observed unique match between IC₅₀ and EC₅₀ for CCL7. While this might suggest that the conformational changes observed in the CCR2 homodimer result from G-protein activation and/or arrestin recruitment, rather than preceding it, it could also be that homodimer BRET reflects other, yet unidentified events, related or unrelated to these readouts.

Discussion

CCR2 is a well studied chemokine receptor that meets considerable clinical interest. Yet, few studies have been investigating recruitment of β -arrestin to CCR2, with CCL2 as the sole analyzed CCR2 ligand (Aragay et al. 1998; Garcia Lopez et al.

2009). Thus, we report the first study dedicated to the investigation of the effects of different CCR2 ligands on β -arrestin recruitment. We demonstrate that the effects of different CCR2 ligands on β -arrestin recruitment to the receptor are quantitatively and qualitatively distinct from one another. Differences were found in recruitment efficacy, identifying CCL7, CCL8, and CCL13 as partial agonists, with submaximal responses despite full receptor occupancy. Comparing β -arrestin 1 or 2, we found potential bias towards β -arrestin 2 of CCL13 and CCL8, overall weak β -arrestin recruiters. Experiments addressing the decline of the CCR2/ β -arrestin interaction over time revealed striking differences between the ligands. While CCL7-induced β -arrestin recruitment had the shortest half life (<15 minutes), CCL2-induced responses were longer lived, and CCL8 and CCL13 yielded β -arrestin recruitment that remained stable over 90 minutes. Our findings with CCL2 are in agreement with those reported for this chemokine (Aragay et al. 1998) (Garcia Lopez et al. 2009). Garcia Lopez et al. concluded that the stability of the signal places CCR2B in the class B receptor group that only slowly recycles. However, we show that the characteristics of the CCR2/arrestin interaction depend on the investigated ligand. Together with similar observations made in the CCR7 and CXCR7 systems (Kohout et al. 2004; Rajagopal et al. 2010), our data suggest that chemokine receptors may not *per se* belong to class A or B, but adopt different characteristics depending on the bound agonist. Of note, the efficacies of ligands in CCR7 endocytosis and β -arrestin recruitment correlate (Kohout et al. 2004; Byers et al. 2008).

The correlation of β -arrestin recruitment efficacy with maximally achieved endocytosis suggests that CCR2 endocytosis is an arrestin-dependent process. Our observation that CCL2-induced β -arrestin recruitment is PTX resistant, as is CCL2-induced CCR2 endocytosis (Garcia Lopez et al. 2009), supports this conclusion. While GPCR endocytosis has initially always been related to β -arrestin, more recent data have revealed that there are exceptions to this rule (van Koppen and Jakobs 2004). Rather, β -arrestins fulfil additional roles in chemokine receptor function as scaffolds for a variety of molecules regulating kinase signalling pathways (Kohout et al. 2004; Cheung et al. 2009). In this context, the observation that CCR2 chemokines induce distinct kinase signalling patterns (O'Boyle et al. 2007) is, in combination with our data on their distinct β -arrestin recruitment patterns, highly suggestive.

Despite the striking correlation between the respective efficacies in β -arrestin recruitment and $G\alpha_i$ activation, the PTX resistance of the CCL2 β -arrestin response leads to the conclusion that the former is not simply the consequence of the latter. Rather, in the case of CCL2, β -arrestin recruitment is either almost entirely G-protein independent, or due to the activation of alternative $G\alpha$ subunits. Indeed, CCR2 can couple to different $G\alpha$ subunits, and so far coupling of CCR2 to $G\alpha_q$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{16}$, has been reported. Given that β -arrestin 2 responses to the different ligands show various degrees of PTX sensitivity, it is tempting to speculate that different ligands have different preferences for CCR2 in association with different G-proteins. In support of this hypothesis, CCL8-induced chemotaxis was reported to be in part sensitive to cholera toxin (CTX), whereas chemotaxis induced by CCL2, CCL7 and CCL13 was not (Sozzani et al. 1994; O'Boyle et al. 2007).

We show that CCR2 binding chemokines other than CCL2 are partial agonists of CCR2 in the analyzed readouts. This is particularly striking for CCL8, a potent, but not very efficacious agonist in all studied readouts. To further describe the partial agonist properties of CCL8, CCL7, and CCL13, we estimated their intrinsic relative activity (RA_i) with respect to CCL2 (Table 2). Using the pIC_{50} determined by ^{125}I -CCL2 displacement (Figure 1, Table 1) as an independent measure of ligand affinity, relative efficacies were also determined (Table 2). While the obtained values reasonably reflect the observed differences in efficacy, it should be borne in mind that efficacy in BRET assays might indeed reflect quantitative differences in arrestin recruitment, but might also relate to qualitative parameters (the relative positioning of the fluorophores). In the latter case, no linear relationship between BRET and signalling efficacy can be expected. Therefore, the significance of the reported intrinsic relative activities might not be directly proportional to the respective ligand's effects. Nevertheless, this limitation might not be of great consequence in practice, as the resulting estimates of intrinsic relative activity are in good agreement with directly functional readouts (such as reported in figure 4 and 5F).

Of note, the functional implications of partial agonism will differ in different CCR2 expressing cell types, as they depend on receptor density and coupling efficiency, which in turn depend on the expression levels of the receptor and relevant downstream signalling molecules. CCR2 is mainly expressed at relatively low levels on monocytes (3-4000 molecules per cell, (Mine et al. 2006)), but can be drastically

increased on NK cells (Hanna et al. 2005) and T-cells (Amoura et al. 2003) in disease. Here we used transfected HEK293 cells expressing approximately 2000 receptors per cell as determined with fluorescent standardization beads (not shown). It is attractive to envision that the partial agonism of CCR2 ligands differentially affects different CCR2 expressing cells, as partial agonists can convert into full agonists if a larger receptor reserve exists. Indeed, a link between receptor expression levels and responses to different chemokines has been drawn in the different responses of Th1 and Th2 cells to the CCR4-binding chemokines CCL17 and CCL22 (D'Ambrosio et al. 2002).

While different equilibria between one active and one inactive conformation of the receptor might explain, in principle, partial agonism, the stabilization of intrinsically different receptor conformations by different ligands emerges as a new paradigm to explain partial agonism. Evidence for the latter model was for example presented for the α_2A -adrenergic receptor (Nikolaev et al. 2006). The model is also in line with the concept of functional selectivity, which postulates that distinct receptor conformations stabilized by different ligands can not only lead to different response efficacies, but to qualitatively different responses in different signalling pathways (Kobilka and Deupi 2007), (Kenakin 2007). While we did indeed observe different CCR2 conformations stabilized by the chemokine ligands, this was not directly due to the conformational effects of the sole receptor-ligand interaction, but involved also other components of the CCR2 signalling complex. A hallmark of functional selectivity is the reversal of relative rank orders of potency or efficacy of a set of ligands in different readouts. We have not found such rank order reversals. Moreover, our rank orders fit the efficacies reported in single-dose experiments for calcium signalling (Combadiere et al. 1995; Martinelli et al. 2001). Functional selectivity can thus not be inferred from the efficacy and potency rank orders of the CCR2 ligands. However, the differences in PTX sensitivity and decay rates of the β -arrestin response indeed point towards qualitative differences in CCR2 responses to the different chemokines. This conclusion is further supported by the atypical signalling profile of CCL11. CCL11 induced marginal G α_i activation that had eluded previous studies (Martinelli et al. 2001; Ogilvie et al. 2001; Ogilvie et al. 2004). However, CCL11 reportedly activates the mitogen activated protein kinase erk1/2 via recruitment of a p85/p110 PI3 kinase (unlike CCL2, which activates

PI3K γ) (Ogilvie et al. 2004). Our results suggest that these kinase cascade activations do not involve CCL11 recruitment of β -arrestin to the receptor.

Our data show that CCR2 responses to different ligands are not redundant on the pharmacological level. Similar observations have been reported in a reconstituted CCR5 system (Oppermann et al. 1999; Leach et al. 2007). Therefore, the absence of functional redundancy among chemokines binding the same receptor does not only result from complex *in vivo* regulatory mechanisms, but is also encoded in their intrinsic pharmacological properties. The investigation of only one natural “default”-ligand of chemokine receptors as a prototype agonist is thus insufficient. This is particularly relevant for drug screening campaigns that often rely on only one single agonist. Small molecules targeting chemokine receptors are likely to be allosteric, owing to the large size of the natural ligands, and the probe-dependent effects of such allosteric modulators are notorious (Kenakin 2004; Kenakin 2008). In consequence, CCR2-targeting small compounds might have given effects relative to one of its natural ligands, but different or no effects on the response to others. Whether this might be a disadvantage or rather a desired effect will depend on the implication of the different pathways activated by the different ligands in disease processes, and remains to be seen.

In sum, while much remains to be learned to fully characterize the functional differences of natural CCR2 ligands, our results provide further evidence that functional selectivity applies also to natural ligand/receptor combinations. Functional selectivity is now well-established as a drug phenomenon (Kenakin 2007). Our results strengthen the case for functional selectivity as a general mechanism of GPCR activity.

Acknowledgements

The authors thank Michel Bouvier and his laboratory for the gift of G α_i 1-, arrestin, and epac BRET expression plasmids.

References

- Amoura Z, Combadiere C, Faure S, Parizot C, Miyara M, Raphael D, Ghillani P, Debre P, Piette JC and Gorochov G (2003) Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. *Arthritis Rheum* **48**(12):3487-3496.
- Aragay AM, Mellado M, Frade JM, Martin AM, Jimenez-Sainz MC, Martinez AC and Mayor F, Jr. (1998) Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6):2985-2990.
- Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, Leduc M, Percherancier Y, Fujii N, Tamamura H, Bachelerie F and Heveker N (2007) Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. *J Biol Chem* **282**(8):5111-5115.
- Berkhout TA, Sarau HM, Moores K, White JR, Elshourbagy N, Appelbaum E, Reape RJ, Brawner M, Makwana J, Foley JJ, Schmidt DB, Imburgia C, McNulty D, Matthews J, O'Donnell K, O'Shannessy D, Scott M, Groot PH and Macphee C (1997) Cloning, in vitro expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of the monocyte chemotactic protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B. *J Biol Chem* **272**(26):16404-16413.
- Byers MA, Calloway PA, Shannon L, Cunningham HD, Smith S, Li F, Fassold BC and Vines CM (2008) Arrestin 3 mediates endocytosis of CCR7 following ligation of CCL19 but not CCL21. *J Immunol* **181**(7):4723-4732.
- Cheung R, Malik M, Ravyn V, Tomkowicz B, Ptasznik A and Collman RG (2009) An arrestin-dependent multi-kinase signaling complex mediates MIP-1beta/CCL4 signaling and chemotaxis of primary human macrophages. *J Leukoc Biol* **86**(4):833-845.
- Combadiere C, Ahuja SK, Van Damme J, Tiffany HL, Gao JL and Murphy PM (1995) Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B. *J Biol Chem* **270**(50):29671-29675.
- D'Ambrosio D, Albanesi C, Lang R, Girolomoni G, Sinigaglia F and Laudanna C (2002) Quantitative differences in chemokine receptor engagement generate diversity in integrin-dependent lymphocyte adhesion. *J Immunol* **169**(5):2303-2312.

- Dupre DJ, Robitaille M, Ethier N, Villeneuve LR, Mamarbachi AM and Hebert TE (2006) Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J Biol Chem* **281**(45):34561-34573.
- Ehlert FJ (2005) Analysis of allosterism in functional assays. *J Pharmacol Exp Ther* **315**(2):740-754.
- Ehlert FJ (2008) On the analysis of ligand-directed signaling at G protein-coupled receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377**(4-6):549-577.
- Fujino H and Regan JW (2006) EP(4) prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein. *Mol Pharmacol* **69**(1):5-10.
- Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE and Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**(3):177-184.
- Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H and Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**(9):778-786.
- Garcia Lopez MA, Aguado Martinez A, Lamaze C, Martinez AC and Fischer T (2009) Inhibition of dynamin prevents CCL2-mediated endocytosis of CCR2 and activation of ERK1/2. *Cell Signal* **21**(12):1748-1757.
- Gong X, Gong W, Kuhns DB, Ben-Baruch A, Howard OM and Wang JM (1997) Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 and CCR2B as its functional receptors. *J Biol Chem* **272**(18):11682-11685.
- Hanna J, Mussaffi H, Steuer G, Hanna S, Deeb M, Blau H, Arnon TI, Weizman N and Mandelboim O (2005) Functional aberrant expression of CCR2 receptor on chronically activated NK cells in patients with TAP-2 deficiency. *Blood* **106**(10):3465-3473.
- Jiang LI, Collins J, Davis R, Lin KM, DeCamp D, Roach T, Hsueh R, Rebres RA, Ross EM, Taussig R, Fraser I and Sternweis PC (2007) Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J Biol Chem* **282**(14):10576-10584.
- Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS and Heveker N (2009) AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol* **75**(5):1240-1247.
- Kenakin T (2004) G-protein coupled receptors as allosteric machines. *Receptors Channels* **10**(2):51-60.

- Kenakin T (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**(8):407-415.
- Kenakin T (2008) Functional assays as prismatic views of drug activity: relevance to new drug discovery. *J Recept Signal Transduct Res* **28**(1-2):109-125.
- Kendall RT and Luttrell LM (2009) Diversity in arrestin function. *Cell Mol Life Sci* **66**(18):2953-2973.
- Kobilka BK and Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **28**(8):397-406.
- Kohout TA, Nicholas SL, Perry SJ, Reinhart G, Junger S and Struthers RS (2004) Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem* **279**(22):23214-23222.
- Leach K, Charlton SJ and Strange PG (2007) Analysis of second messenger pathways stimulated by different chemokines acting at the chemokine receptor CCR5. *Biochem Pharmacol* **74**(6):881-890.
- Leduc M, Breton B, Gales C, Le Gouill C, Bouvier M, Chemtob S and Heveker N (2009) Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP(4) receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **331**(1):297-307.
- Martinelli R, Sabroe I, LaRosa G, Williams TJ and Pease JE (2001) The CC chemokine eotaxin (CCL11) is a partial agonist of CC chemokine receptor 2b. *J Biol Chem* **276**(46):42957-42964.
- Mine S, Okada Y, Tanikawa T, Kawahara C, Tabata T and Tanaka Y (2006) Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* **344**(3):780-785.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ and Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**(1):145-176.
- Myers SJ, Wong LM and Charo IF (1995) Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J Biol Chem* **270**(11):5786-5792.
- Nikolaev VO, Hoffmann C, Bunemann M, Lohse MJ and Vilaradaga JP (2006) Molecular basis of partial agonism at the neurotransmitter alpha2A-adrenergic receptor and Gi-protein heterotrimer. *J Biol Chem* **281**(34):24506-24511.

- O'Boyle G, Brain JG, Kirby JA and Ali S (2007) Chemokine-mediated inflammation: Identification of a possible regulatory role for CCR2. *Mol Immunol* **44**(8):1944-1953.
- Ogilvie P, Bardi G, Clark-Lewis I, Baggiolini M and Uguccioni M (2001) Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* **97**(7):1920-1924.
- Ogilvie P, Paoletti S, Clark-Lewis I and Uguccioni M (2003) Eotaxin-3 is a natural antagonist for CCR2 and exerts a repulsive effect on human monocytes. *Blood* **102**(3):789-794.
- Ogilvie P, Thelen S, Moepps B, Gierschik P, da Silva Campos AC, Baggiolini M and Thelen M (2004) Unusual chemokine receptor antagonism involving a mitogen-activated protein kinase pathway. *J Immunol* **172**(11):6715-6722.
- Oppermann M, Mack M, Proudfoot AE and Olbrich H (1999) Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J Biol Chem* **274**(13):8875-8885.
- Parody TR and Stone MJ (2004) High level expression, activation, and antagonism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR3 in Chinese hamster ovary cells. *Cytokine* **27**(1):38-46.
- Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M and Heveker N (2005) Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **280**(11):9895-9903.
- Proudfoot AE, Power CA and Schwarz MK (2010) Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert Opin Investig Drugs* **19**(3):345-355.
- Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C and Lefkowitz RJ (2010) Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(2):628-632.
- Signoret N, Hewlett L, Wavre S, Pelchen-Matthews A, Oppermann M and Marsh M (2005) Agonist-induced endocytosis of CC chemokine receptor 5 is clathrin dependent. *Mol Biol Cell* **16**(2):902-917.
- Sozzani S, Zhou D, Locati M, Rieppi M, Proost P, Magazin M, Vita N, van Damme J and Mantovani A (1994) Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. *J Immunol* **152**(7):3615-3622.

Springael JY, Le Minh PN, Urizar E, Costagliola S, Vassart G and Parmentier M (2006) Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol Pharmacol* **69**(5):1652-1661.

van Koppen CJ and Jakobs KH (2004) Arrestin-independent internalization of G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **66**(3):365-367.

Figure legends

Figure 1: ^{125}I -CCL2 displacement by reported CCR2 ligands on HEK293-CCR2B cells. CCL2: black squares, CCL7: black diamonds, CCL8: black circles, CCL11: black triangles, CCL13: open circles, CCL24: open pyramids, CCL26: open triangles. Specific binding was defined as that displaced by 1 μM CCL2. All points are pooled data of 4 (CCL2, CCL8, CCL7, CCL13 and CCL11) or 3 (CCL24 and CCL26) independent experiments performed in duplicate, \pm S.E.M. For IC_{50}s see Table 1. $\log\text{IC}_{50}$ for CCL24 was -6.06 ± 0.06 , and for CCL26 -6.15 ± 0.07 .

Figure 2: Dose-response experiments of arrestin recruitment to CCR2 using different CCR2 ligands. HEK293 cells transiently coexpressing CCR2-YFP and β -arrestin 2-Rluc or Rluc- β -arrestin 1 were incubated with indicated concentrations of ligand and resulting BRET measured after 10 minutes at room temperature. CCL2: black squares, CCL8: black circles, CCL7: black diamonds, CCL13: open circles, CCL11 black triangles. A): β -arrestin 2-Rluc, B): Rluc- β -arrestin 1. Data are means of 5 (β -arrestin 2-RLuc) or 3 (Rluc- β -arrestin 1) independent experiments performed in triplicate \pm S.E.M. C) maximal BRET values obtained with β -arrestin 2-RLuc. Statistical significance of the differences between the maxima: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.001$ (repeated measures ANOVA with Tukey's multiple comparison test). Similar results were obtained with Rluc- β -arrestin 1, without reaching statistical significance (except with CCL8, not shown). For curve fitting parameters, see Table 1.

Figure 3: Time-course experiments of β -arrestin-2 recruitment to CCR2 using different CCR2 ligands. CCL2: black squares, CCL8: black triangles, CCL7: black diamonds, CCL13: open circles, no ligand: open triangles. **3A)**: time-course of β -arrestin 2 recruitment. HEK293 cells transiently coexpressing CCR2-YFP and β -arrestin 2-Rluc were incubated with 100 nM of the indicated ligand and resulting BRET measured after 10 minutes at room temperature. Data are means of 5 independent experiments performed in triplicate \pm S.E.M **3B)**: stability of the CCR2-YFP/ β -arrestin 2-RLuc signal over time. After 10 minutes of incubation with 100 nM of the indicated ligand, plates were shifted at 37°C, and BRET measured after the indicated time. Data are means of 4 (CCL2 and CCL8) or 3 (CCL7 and CCL13) independent experiments performed in duplicate \pm S.E.M. The decrease of the signal induced by CCL7 fitted one-phase exponential decay ($R^2 = 0.76$, with a half-life of 12 minutes), whereas the decay curves of the other ligands did not. **3C)**: Remaining signal after 60 minutes of incubation expressed as percentage of the respective maximal signal. The strong decrease of the signal induced by CCL7 was significantly different from all other ligands ($p < 0.05$ against CCL2, and $p < 0.01$ against CCL8 and CCL13, by repeated measures ANOVA with Tukey's multiple comparison test). Similar results as in 2D-F were obtained in pilot experiments with Rluc- β -arrestin 1 (data not shown).

Figure 4: CCR2 internalization induced by different CCR2 ligands. HEK293-CCR2B cells were incubated with 100nM of the indicated ligand at 37°C, and aliquots removed on ice at the indicated times. Surface-bound ligand was removed by acid washing, and remaining surface CCR2 measured by flow cytometry. CCL2: black squares, CCL8: black circles, CCL7: black diamonds, CCL13: open circles. Data are means of 7 independent experiments \pm S.E.M, and curve fitting follows a one-phase exponential decay (R^2 0.66-0.8). The differences of the plateaus are significant between CCL2 and CCL8 ($p < 0.01$) and CCL13 ($p < 0.05$), and between CCL7 and CCL8 ($p < 0.05$).

Figure 5: BRET CCR2-YFP with different $G\alpha_i$ -RLuc constructs, and modulation of the BRET signal by chemokines. **5A)**: Dose-response experiments with CCL2 showing the responsiveness of the different $G\alpha_i$ -RLuc constructs. Filled

squares: $G\alpha_i1$ -RLuc-122, filled circles: $G\alpha_i1$ -RLuc91, open circles: $G\alpha_i1$ -RLuc60. Data are means of 3 independent experiments conducted in triplicate \pm S.E.M. **5B) and 5C)**: BRET CCR2-YFP with $G\alpha_i1$ -RLuc-122 (5B) or $G\alpha_i1$ -RLuc91 (5C). CCL2: black squares, CCL8: black circles, CCL7: black diamonds, CCL13: open circles, CCL11: open diamonds. Data are means of 3 independent experiments conducted in triplicate \pm S.E.M. For curve fitting parameters, see Table 1. **5D) and 5E)**: maximal BRET change induced by CCR2 ligands between CCR2-YFP and $G\alpha_i1$ -RLuc-122 (5D) and $G\alpha_i1$ -RLuc91 (5E). 4D: differences between all columns are statistically significant. 4E: only the differences between CCL2 and CCL8, as well as CCL7 and CCL8 reach significance (repeated measures ANOVA with Tukey's multiple comparison test). **5F)**: Inhibition of forskolin-induced cAMP production by CCL2 and CCL8. To determine if the different maxima observed in Figures 2D and 2E corresponded indeed to different maxima in adenylate cyclase inhibition, forskolin-induced cAMP levels were measured in the presence of indicated concentrations of CCL2 (black squares) or CCL8 (open circles). The black triangle indicates the response to forskoline in the absence of chemokine. cAMP levels were determined using a previously described Epac cAMP BRET sensor (Jiang et al. 2007; Leduc et al. 2009). Pooled data of two independent experiments performed in triplicate \pm S.E.M. are shown. Maximal inhibition of cAMP production is $63.5 \pm 1.3\%$ for CCL2 and $40.2 \pm 2.1\%$ for CCL8. Upon simultaneous curve fitting, curve maxima of CCL2 and CCL8 were significantly different ($p < 0.001$, for each experiment separately as well as across the two experiments).

Figure 6: Sensitivity to pertussis toxin (PTX) of $G\alpha_i$ and arrestin responses.

HEK293 cells coexpressing either CCR2 and the Epac BRET sensor, or CCR2-YFP and β -arrestin 2-RLuc, were incubated overnight with 100 ng/ml PTX. The results represent pooled data of four independent parallel experiment conducted in triplicate \pm S.E.M. **6A)**: Percent of the remaining forskolin-induced cAMP production in the presence of 100 nM of the indicated chemokine is shown, in the absence (black bars) and presence (grey bars) of PTX. The cAMP production in the absence of chemokines or PTX was set as 100%. **6B)**: β -arrestin 2 recruitment to CCR2 by the ligands in the absence (black bars) and presence (grey bars) of PTX. Significant inhibition of the β -arrestin 2 response was observed for all chemokines ($p < 0.05$)

except CCL8. The remaining β -arrestin 2 response was $82.7 \pm 5.2\%$ for CCL2, $55.6 \pm 8.8\%$ for CCL7, and $40.4 \pm 6.7\%$ for CCL13, and the difference between remaining response to CCL2 and CCL7 and CCL2 and CCL13 was significant (paired t test, $p < 0.01$ and < 0.05 , respectively).

Figure 7: Dose-response experiments of CCR2 homodimer BRET using different CCR2 ligands. HEK293 cells transiently coexpressing CCR2-YFP and CCR2-RLuc were incubated with indicated concentrations of ligand and resulting BRET measured after 10 minutes at room temperature. CCL2: black squares, CCL7: black diamonds, CCL13: open circles. CCL8 and CCL11 did not yield BRET changes (not shown). Data are means of 3-5 independent experiments performed in triplicate \pm S.E.M. maximally achieved BRET changes are significantly different between CCL2 and CCL8 and CCL13, respectively. For curve fitting parameters, see Table 1.

Table 1: Summary of the fitted curve parameters

Summary of the curve fitting parameters of the experiments shown in Figures 1 (radioligand displacement), 2 (arrestin recruitment), 5 (G-protein activation) and 7 (CCR2 homodimer BRET). pIC_{50} (radioligand displacement) and pEC_{50} (arrestin recruitment, G-protein activation, and homodimer BRET) values are given. Maximal responses are also given, in absolute (arrestin recruitment, homodimer BRET) or relative (G-protein activation) units. Some values are theoretical, since the experimental curves did not reach saturation, and are indicated by an asterisk (*). Errors are standard error of the mean (SEM). ND = not determined.

Table 1 (continued)

	<i>Ligand</i>				
	CCL2	CCL8	CCL7	CCL13	CCL11
<i>¹²⁵I-CCL2 displacement</i>					
<i>n</i>	4	4	4	4	4
IC ₅₀ (nM)	0.22	4.17	9.69	5.22	11.12
pIC ₅₀ ±SEM	-9.66 ± 0.09	-8.38 ± 0.05	-8.01 ± 0.07	-8.28 ± 0.08	-7.95 ± 0.08
<i>β-arrestin 2-RLuc</i>					
<i>n</i>	5	5	5	5	3
EC ₅₀ (nM)	1.32	54.25	14.57	141.1 *	ND
pEC ₅₀ ±SEM	-8.88 ± 0.06	-7.27 ± 0.18	-7.84 ± 0.09	-6.85 ± 0.09 *	ND
BRET _{max} ±SEM	0.228 ± 0.005	0.063± 0.005	0.177 ± 0.007	0.185 ± 0.01 *	ND
<i>RLuc-β-arrestin 1</i>					
<i>n</i>	3	3	3	3	ND
EC ₅₀ (nM)	1.68	31.02	42.41	1102 *	ND
pEC ₅₀ ±SEM	-8.72 ± 0.07	-7.51 ± 0.50	-7.37 ± 0.13	-5.96 ± 0.12*	ND
BRET _{max} ±SEM	0.143 ± 0.004	0.010 ± 0.002	0.085 ± 0.005	0.075 ± 0.01 *	ND
<i>Gα_{il-122}-RLuc</i>					
<i>n</i>	3	3	3	3	3
EC ₅₀ (nM)	0.86	8.74	4.40	29.76	1.3
pEC ₅₀ ±SEM	-9.07 ± 0.10	-8.06 ± 0.25	-8.36 ± 0.12	-7.53 ± 0.20	8.88 ± 0.30
E _{max} ± SEM (%)	56 ± 3	24 ± 3	47 ± 3	37 ± 1	13 ± 1

<i>Gαi1-91-RLuc</i>					
<i>n</i>	3	3	3	3	3
EC ₅₀ (nM)	0.51	19.3	3.60	54.8	ND
pEC ₅₀ ±SEM	-9.30± 0.13	-7.71 ± 0.21	-8.44 ± 0.15	-7.25 ± 0.19	ND
E _{max} ± SEM (%)	59 ± 2	32 ± 5	52 ± 5	49 ± 3	ND
<i>Homodimer BRET</i>					
<i>n</i>	3	5	3	4	ND
EC ₅₀ (nM)	6.39	ND	23.6	181.2*	ND
pEC ₅₀ ±SEM	-8.20 ± 0.13	ND	-7.62 ± 0.22	-6.74 ± 0.42*	ND
BRET _{max} ±SEM	0.10 ± 0.002	ND	0.087 ± 0.002	0.080 ± 0.004*	ND

Table 2: Intrinsic relative activity (RA_i) and relative efficacies of the partial agonist CCR2 ligands

The intrinsic relative activity (RA_i) was estimated, using the formula $E_{\max_B}EC_{50_A}/E_{\max_A}EC_{50_B}$ (equation 25 in (Ehlert 2005) and equation 17 in (Ehlert 2008)). Using the pIC₅₀ determined by heterologous displacement of ¹²⁵I-CCL2 (Figure 1, Table 1) as an independent measure of ligand affinity, relative efficacies were also determined (using the formula $K_B E_{\max_B} EC_{50_A} / K_A E_{\max_A} EC_{50_B}$, equation 19 in (Ehlert 2008)). For the analysis of Gα_{i1}- signaling, the data obtained with Gα_{i1}-122-RLuc have been used.

	<i>Ligand</i>		
	CCL8	CCL7	CCL13
<i>β-arrestin 2</i>			
RA _i	0.34	0.88	1.05
relative efficacy	0.29	0.73	0.90
<i>β-arrestin 1</i>			
RA _i	0.08	0.70	0.77
relative efficacy	0.07	0.58	0.66
<i>Gα_{i1}</i>			
RA _i	0.48	0.91	0.80
relative efficacy	0.42	0.76	0.68

Figure 1

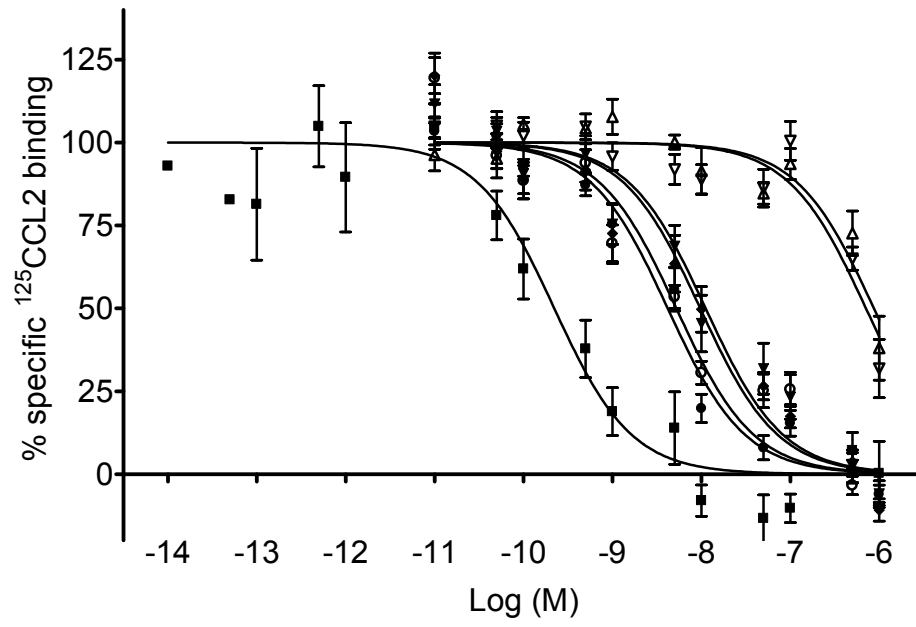


Figure 2 A

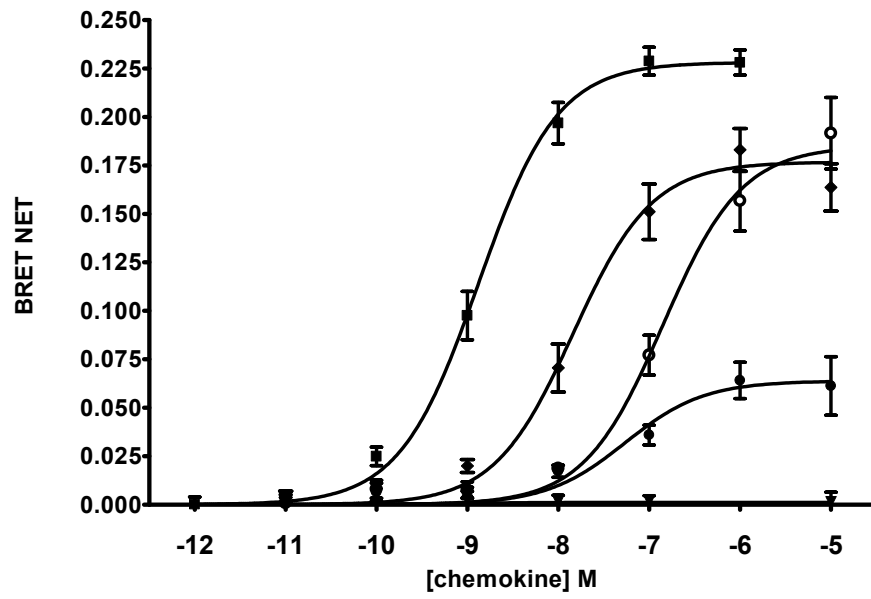


Figure 2 B

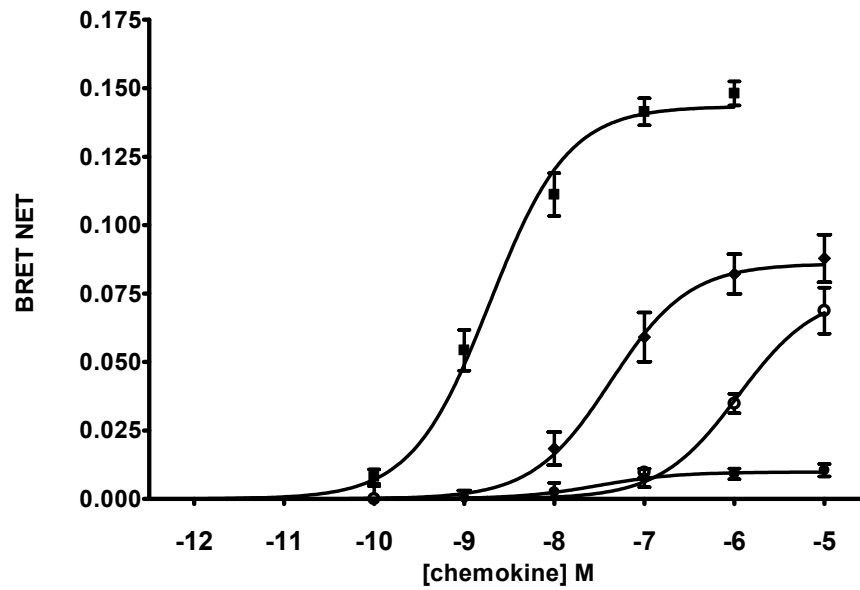


Figure 2 C

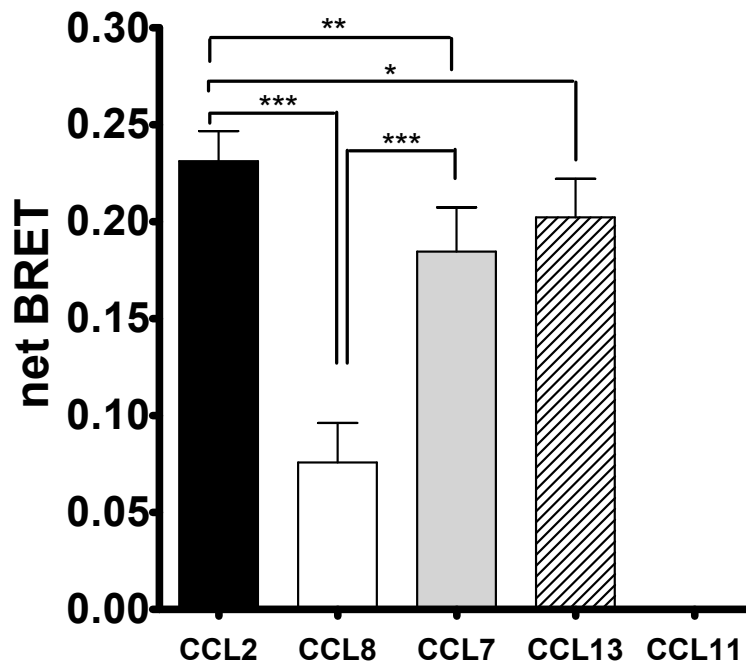


Figure 3 A

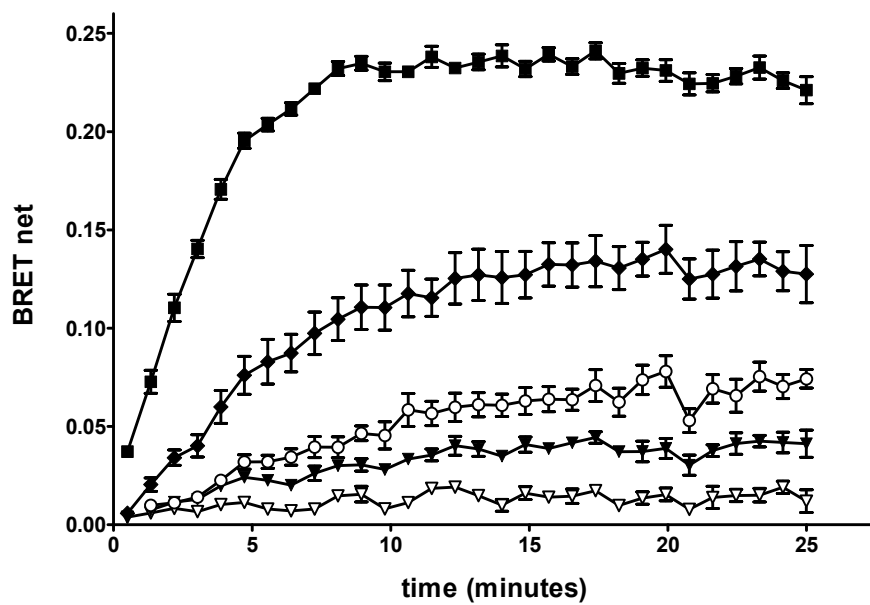


Figure 3 B

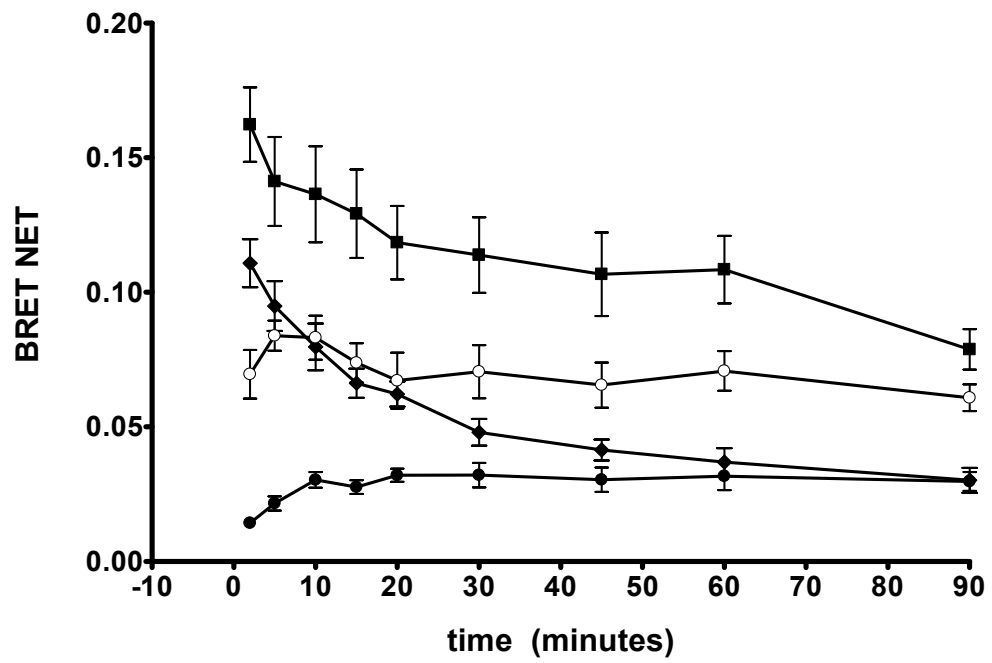


Figure 3C

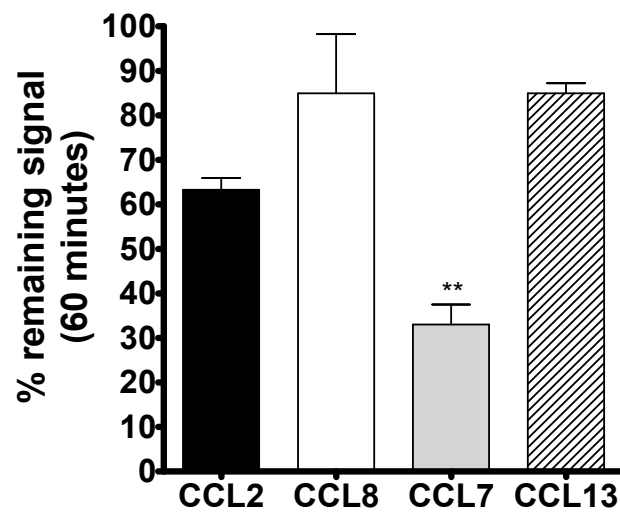


Figure 4

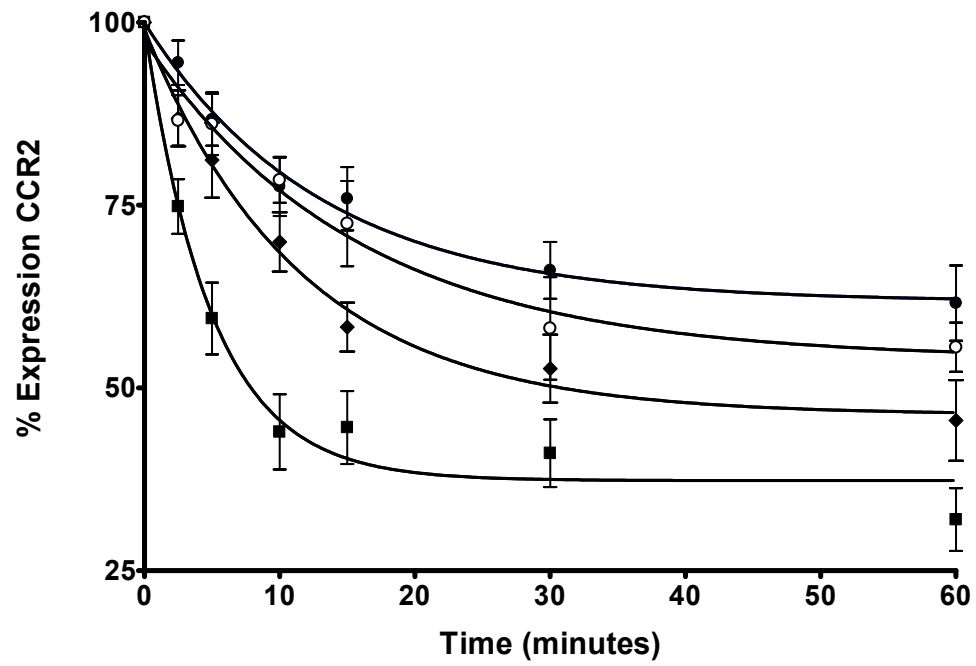


Figure 5A

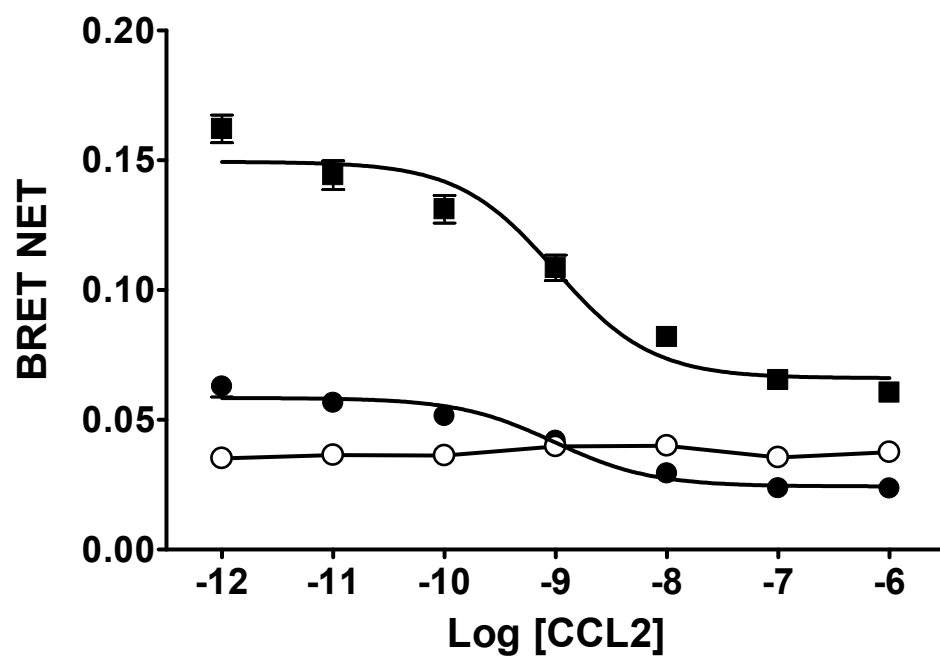


Figure 5B

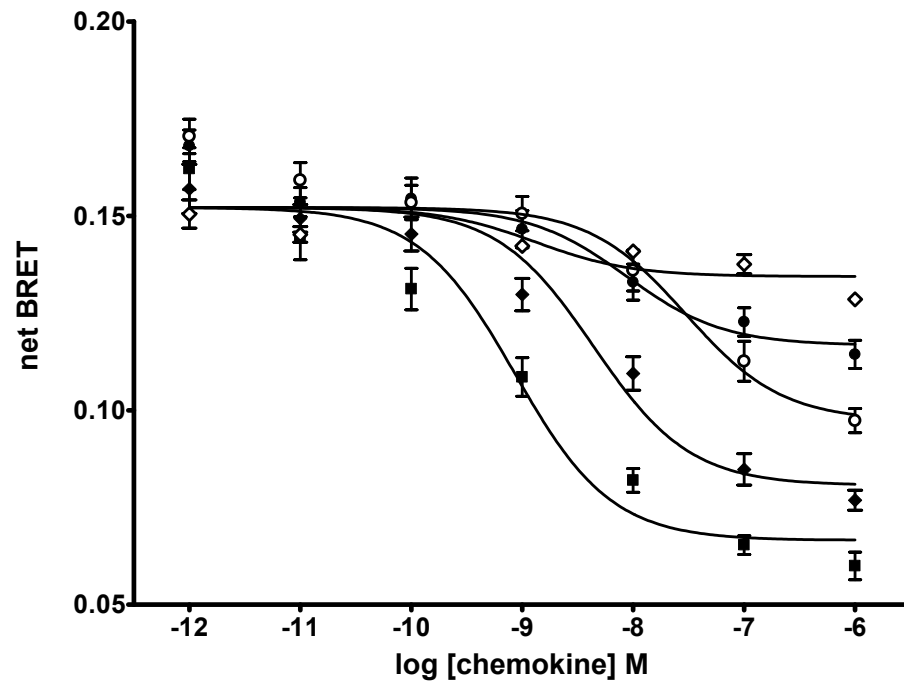


Figure 5C

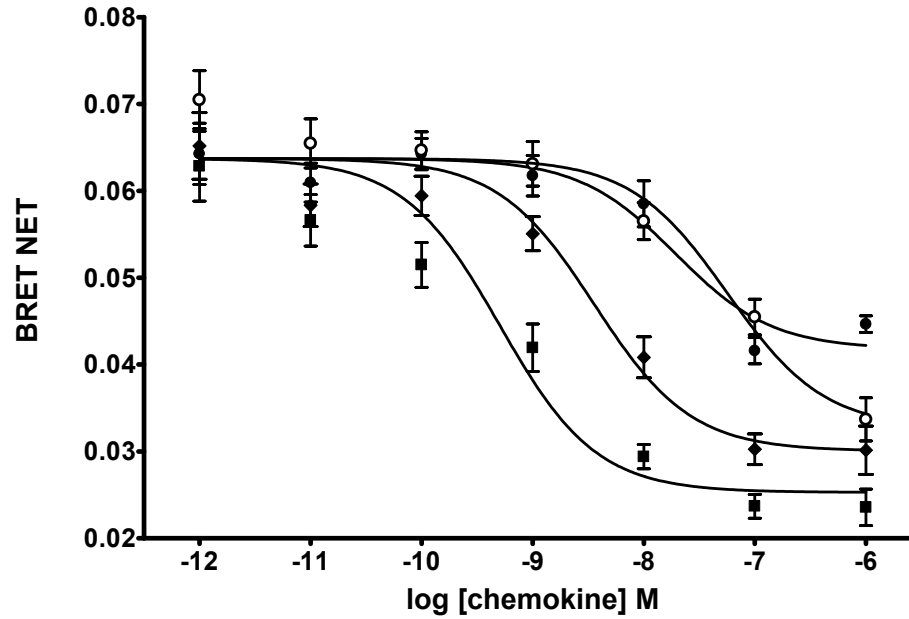


Figure 5D

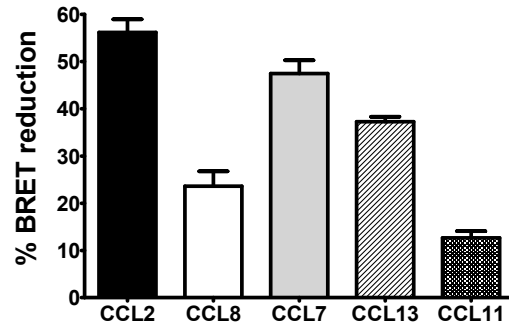


Figure 5E

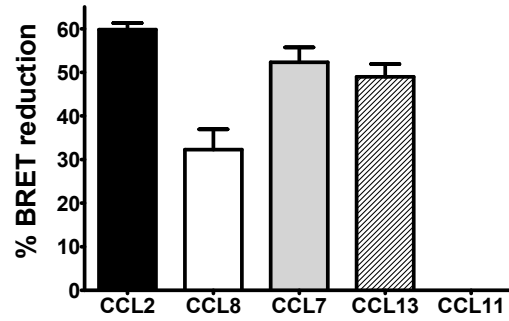


Figure 5F

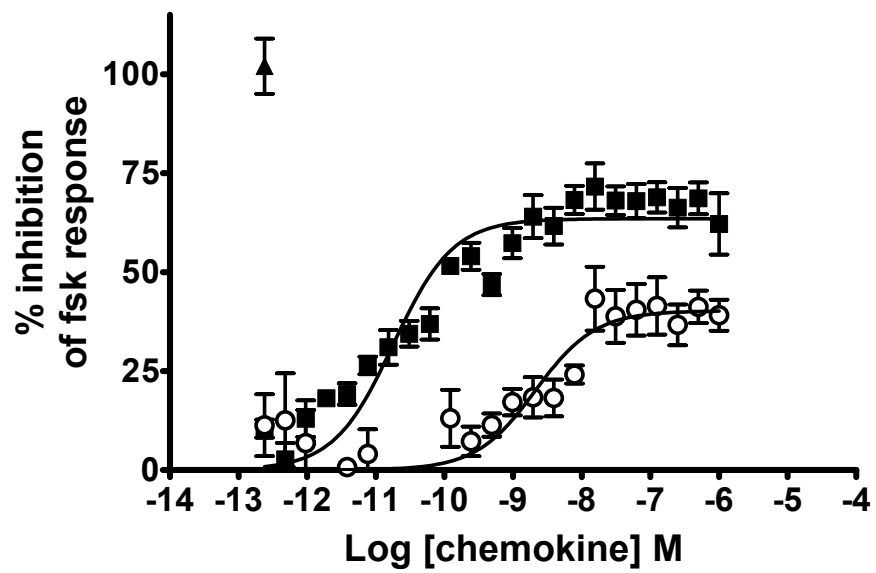


Figure 6A

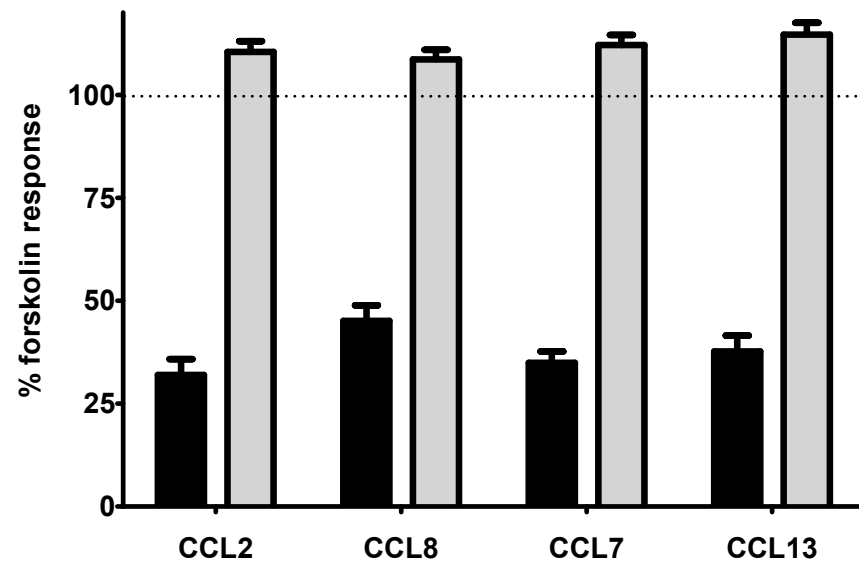


Figure 6B

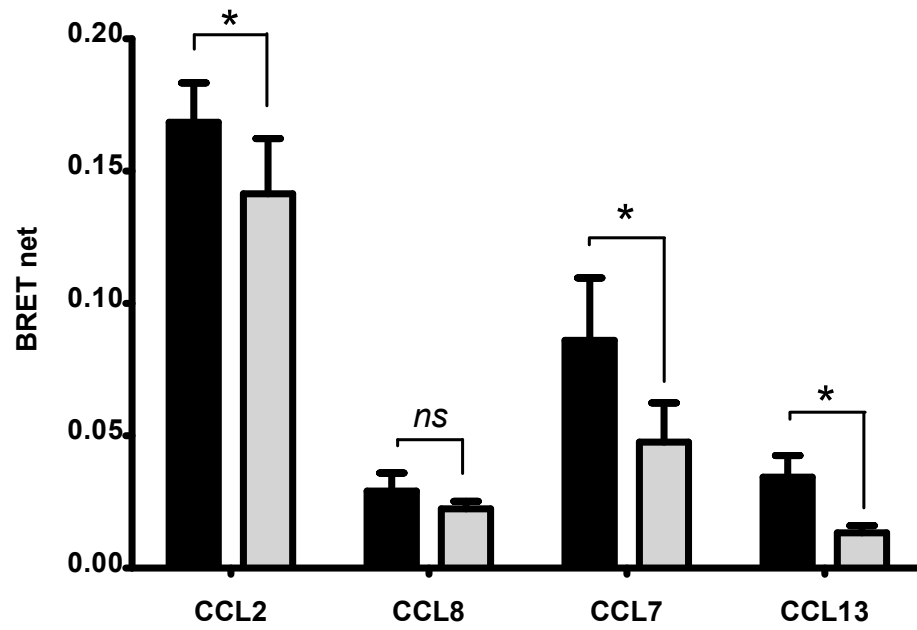
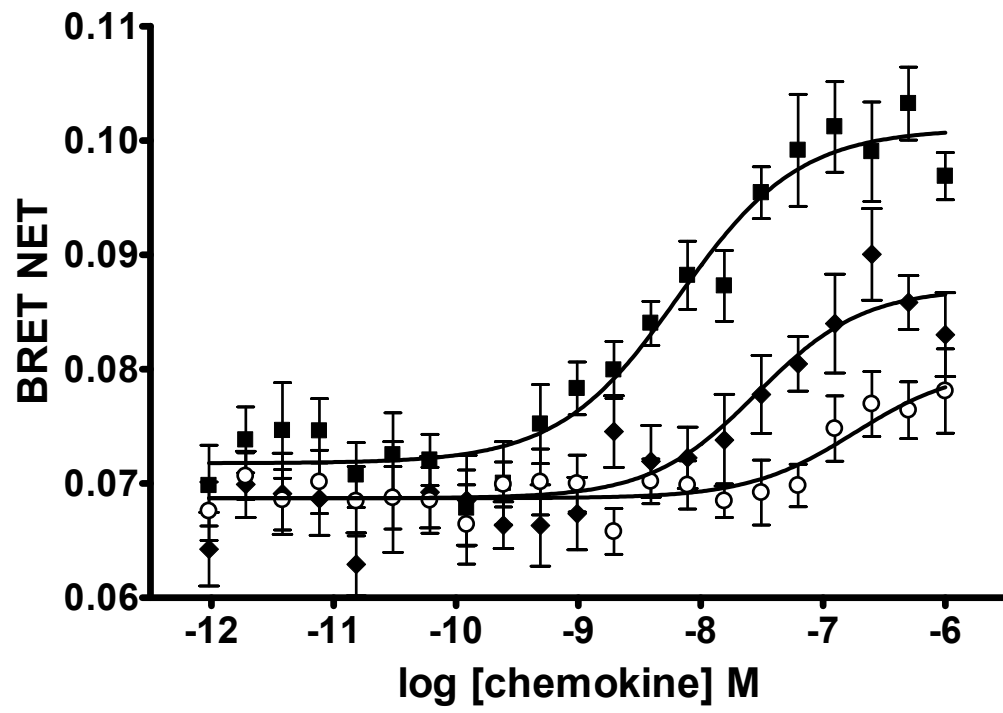


Figure 7



Article 3**AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties.**

L'AMD3100 est un modulateur allostérique agoniste du récepteur CXCR7.

Kalatskaya I*, **Berchiche YA***, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS et Heveker N.

Mol Pharmacol. 2009 May;75(5):1240-7

*Contribution : ces auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail. J'ai contribué au travail avec les figures 1, 2C et 3.

Réimprimé avec la permission de la American Society for
Pharmacology and Experimental Therapeutics. Tous droits réservés.
Copyright© 2010 American Society for Pharmacology and Experimental
Therapeutics

AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties

Irina Kalatskaya*, Yamina A. Berchiche*, Stéphanie Gravel, Brian J. Limberg, Jan
S. Rosenbaum, and Nikolaus Heveker

Running Title: AMD3100 is a CXCR7 ligand

Non-standard abbreviations: BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer); YFP (Yellow Fluorescent Protein); RLuc (*Renilla* luciferase); HSC (hematopoietic stem cell); HA (influenza virus hemagglutinin); PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride); HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid); V1Ra (vasopressin receptor 1a);

Abstract:

The bicyclam AMD3100 is known as a small synthetic inhibitor of the CXCL12-binding chemokine receptor CXCR4. Here we show that AMD3100 also binds to the alternative CXCL12 receptor CXCR7. CXCL12 or AMD3100 alone activate beta-arrestin recruitment to CXCR7, which we identify as a previously unreported signalling pathway of CXCR7. In addition, AMD3100 has positive allosteric effects on CXCL12 binding to CXCR7, on CXCL12-induced conformational rearrangements in the receptor dimer as measured by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), and on CXCL12-induced arrestin recruitment to CXCR7. AMD3100 concentrations required for the modulation of CXCL12-dependent effects on receptor dimer BRET and arrestin recruitment are in keeping, but do not correspond to those required to increase CXCL12 binding in radioligand binding assays, in line with the two-step model of chemokine-receptor interactions. The finding that AMD3100 not only binds CXCR4, but also to CXCR7, with opposite effects on the two receptors, call for caution in the use of the compound as a tool to dissect CXCL12 effects on the respective receptors *in vitro* and *in vivo*.

Introduction:

Chemokine receptors belong to the G-protein coupled receptor (GPCR) family. GPCR binding by ligands is believed to alter receptor conformation in a way that is transmitted to the cytoplasmic face of the receptor and triggers the activation of the heterotrimeric G-proteins, as well as that of other, G-protein independent effectors. While ligand-induced conformational change of the receptor has for long been deduced from functional data, the advent of new biophysical methods has eventually permitted direct measurement of such changes in native receptors present in the plasma membrane of live cells. Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) is one of the resonance energy transfer techniques used to show constitutive dimerization of chemokine receptors and other GPCRs (Terrillon and Bouvier 2004). Constitutively dimeric GPCR BRET couples can also be used to probe receptor conformation, since BRET depends on the distance between the luminescence donor (*renilla* luciferase, RLuc) and the acceptor (the yellow fluorescent protein YFP). For instance, the use of CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP dimers as sensors permitted the detection of differences in the conformation of a panel of CXCR4 mutants (Berchiche et al. 2007). Moreover, dimeric BRET sensors permit the measurement of ligand-induced conformational changes in the receptor dimer (Ayoub et al. 2002; Ayoub et al. 2004; Percherancier et al. 2005). These effects are not only observed for cognate agonists, but also for small synthetic ligands that may be orthosteric or allosteric modulators.

Allosteric modulation of receptor-ligand interactions results from binding of a second (allosteric) ligand to a distinct site on the receptor, in a way that does not directly compete with binding of the cognate (orthosteric) ligand. Binding of the allosteric ligand may decrease the affinity of the cognate ligand, resulting in negative allosteric modulation. Conversely, the presence of the allosteric modulator may increase binding of the cognate ligand, called positive allosteric modulation (May et al. 2007). Allosteric ligands may also have intrinsic activity on one or several signalling pathways. These are referred to as allosteric agonists (Langmead and Christopoulos 2006).

Chemokines are small secreted proteins. Their binding to cognate receptors is complex, and involves distinct binding and activation events (Ahuja et al. 1996). The chemokine receptor CXCR4 was first identified as one of the coreceptors that permit

entry of the Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) into target cells (Berger et al. 1999). Small antiviral molecules targeting CXCR4 have shown side effects due to the fact that they inhibit other essential functions of the receptor (Hendrix et al. 2004). Indeed, CXCR4 has turned out to be involved in numerous physiological and pathological processes, such as stem cell homing, angiogenesis and cancer metastasis dissemination (Salcedo and Oppenheim 2003; Zlotnik 2004; Ratajczak et al. 2006). In contrast to other chemokines, which often bind to more than one receptor, it was initially believed that the chemokine CXCL12 (also called SDF-1, for stromal cell-derived factor) binds only CXCR4. However, two recent reports showed that CXCL12 also binds to CXCR7 (Balabanian et al. 2005; Burns et al. 2006). To date, the CXCL12-CXCR7 interaction has not been shown to activate G-protein-mediated signal transduction (Burns et al. 2006; Proost et al. 2007; Boldajipour et al. 2008), and it has been speculated that the receptor may clear secreted CXCL12 from the extracellular environment and thereby help maintain defined CXCL12 gradients (Boldajipour et al. 2008). The high expression of CXCR7 on cancer cells suggests that CXCR7 might be responsible for some of the effects of CXCL12 on these cells, an issue that warrants re-examination (Miao et al. 2007; Wang et al. 2008).

AMD3100 is a small molecule of the bicyclam family, first identified by virtue of its antiretroviral effects and subsequently shown to bind CXCR4 (De Clercq 2003). Because of its established selectivity as an antagonist at the CXCR4 receptor AMD3100 has been widely used as a pharmacologic tool to demonstrate the involvement of CXCR4 in the action of CXCL12 and its derivatives in various settings (De Clercq 2005). In line with the role of CXCR4 in hematopoietic stem cell (HSC) homing, single administration of high doses of AMD3100 leads to massive release of such cells into the peripheral blood, and the compound now undergoes clinical testing as a drug facilitating access to the HSC compartment. In addition, derivatives of AMD3100 are under investigation for their effect on cancer cells (De Clercq 2005).

In view of the recent information that CXCR7 also binds CXCL12, this study set out to analyze the effects of CXCL12 and AMD3100 on CXCR7 using a homodimeric receptor BRET sensor. We find that AMD3100 is a ligand not only for CXCR4, but also for CXCR7, at concentrations that are used by investigators in *in vitro* studies. In contrast to its negative effect on the CXCR4/CXCL12 interaction, 10 μ M AMD3100 positively modulate CXCL12 effects and binding on CXCR7. In

addition, AMD3100 alone recruits beta-arrestin to CXCR7, but blocks beta-arrestin recruitment to CXCR4; AMD3100 therefore qualifies as an allosteric agonist of CXCR7.

Materials and Methods

Materials. [125 I]-CXCL12 (SDF-1 α) tracer was from GE-Healthcare Bio-sciences Corp (Piscataway, NJ). AMD3100 was synthesized in-house or from Sigma Corp. (St. Louis, MO), and CXCL12 (SDF-1 β) was acquired from R&D Systems (Minneapolis, MN).

BRET measurements. Each receptor was cloned into pCDNA3.1/Zeo+ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), modified with an N-terminal HA-Flag sequence (Guan et al. 1992). Tagged receptor sequences were subcloned to yield –YFP and –Rluc fusion proteins as described (Berchiche et al. 2007). HEK293T cells (ATCC) were transiently transfected in 6-well plates with HA-Flag-CXCR4-YFP and HA-Flag-CXCR4-RLuc or HA-Flag-CXCR7 cDNA using the polyethylenimine method (Boussif et al. 1995); the total amount of transfected DNA was kept constant for all transfections by adding empty vector. Transfected cells were seeded in 96-well white clear bottom plates treated with poly-D-lysine and left in culture for 24 h. At 48 h post-transfection, the culture medium was replaced by PBS supplemented with 0.1 % bovine serum albumin (Sigma) at room temperature (RT). Coelenterazine H (Nanolight technology) was added at a final concentration of 5 μ M, and fluorescence and luminescence readings were collected as previously described (Percherancier et al. 2005; Berchiche et al. 2007). All BRET experiments were performed while the cells remained attached to the plastic surface.

For BRET titration experiments, HEK293T cells were cotransfected with a constant amount of receptor-*Rluc* and increasing concentration of plasmids encoding *eYFP*-tagged receptors. The BRET signal is determined by calculating the ratio of the receptor-*eYFP* over the receptor-*RLuc* emission. The values were corrected to net BRET by subtracting the background BRET signal detected when the receptor-*RLuc* construct was expressed alone. Saturation curves were obtained by plotting net BRET values as a function of the [acceptor]/[donor] ratio. Total fluorescence and

luminescence were used as a relative measure of total expression of the acceptor and donor proteins, respectively. Experiments were carried out in triplicate.

To assess ligand-induced changes of the BRET signal, HEK293T cells expressing *-eYFP* and *-Rluc* fusion proteins at a ratio at $BRET_{max}$ were stimulated with the indicated ligands for 5 min at 37°C before the addition of the substrate. In dose-response experiments, BRET ratio was measured in cells after stimulation with increasing concentrations of CXCL12 in the presence or absence of 10 μ M AMD3100.

Competition Binding Studies. HEK293T cells (ATCC) were transiently transfected with HA-Flag-hCXCR4 or HA-Flag-CXCR7. Briefly, cells were transfected with Lipofectamine-2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) using 5 μ g HA-Flag-hCXCR4 or 5 μ g HA-Flag-CXCR7 cDNA per 100mm plate, allowed to transfect for 5 hours, then overlaid with 10ml of culture media (DMEM, 10%FBS, 1% Antimycotics, 1% Non-essential Amino Acids, Mediatech, Inc., Herndon, VA) and cultured overnight. The cells were then plated at 100,000 c/w for CXCR4 transfectants, and 50,000c/w for CXCR7 transfectants into 48-well plates coated with Poly-D-Lysine (Becton-Dickenson, Franklin Lakes, NJ) and cultured overnight for binding studies. Cells were plated 2 x 10⁶ cells/100mm plate for parallel analysis by flow cytometry. 18hrs after plating, competition binding studies were performed using 45-160pM [¹²⁵I]-CXCL12 (SDF-1 α) (Amersham Biosciences) and increasing doses of competitors. Briefly, cells were washed twice with 500 μ l ice cold binding buffer (0.2% de-lipidized BSA (Becton-Dickenson, Franklin Lakes, NJ), 50mM HEPES, 1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂) and then allowed to incubate for 1hr at 4°C. Buffer was replaced with 200 μ l of binding buffer containing protease inhibitor cocktail (10mM PMSF, 5 μ g/ml Aprotinin, 4 μ g/ml Leupeptin, 10nM Phosphoramidon), [¹²⁵I]-CXCL12, and increasing doses of AMD3100 or CXCL12 (SDF-1 β). Binding occurred at 4°C, for 4hr with gentle shaking. Tracer was removed with 3 washes of ice-cold wash buffer (0.5M NaCl, 50mM HEPES, 1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂). Cells were lysed with 150 μ l of 2% NP-40, collected, and binding was measured using a Perkin-Elmer (Wizard 1470) γ -counter.

Arrestin recruitment. Beta-arrestin recruitment was measured by BRET essentially as described (Hamdan et al. 2005). HEK293T cells were co-transfected in 6-well plates with 1 μg of receptor-eYFP construct with 0.05 μg arrestin2-luc (a generous gift of Michel Bouvier), completed to 2 μg with empty vector per well. After culture and transfer into 96-well plates as above, the cells were stimulated with indicated ligands. Beta-arrestin recruitment to CXCR7 was rapid, and was measured after 5 minutes, whereas beta-arrestin recruitment to CXCR4 followed a slower time course and was therefore measured after 30 minutes. BRET measurements were performed as described above.

Flow cytometric analysis. Receptor cell surface expression for both receptors was confirmed by flow cytometry. The following antibodies were used for staining: primary antibody, anti-FLAG M2 MAb (Sigma Corp., St. Louis, MO), followed by a secondary Donkey anti-mouse (Fab')₂ R-Phycoerythrin (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Cells were washed 3 times in cold PBS resuspended and incubated on ice with goat serum for one minute, after which they were stained with primary and secondary antibody for 30min at 4°C. After a final wash the cells were resuspended in 0.5% paraformaldehyde, incubated at 4°C for 10min, followed by analysis by EPICS ALTRA Flow Cytometer (Coulter).

Data analysis. Experimental data were treated using GraphPad Prism software (San Diego, CA). For BRET [acceptor]/[donor] titrations the data were fitted using the one-site binding equation for the determination of BRET₅₀ and BRET_{max}. For BRET CXCL12 dose-response experiments, all data sets were analyzed separately. Normalization was performed using the formula $(\text{net BRET} - \text{Bottom}_{\text{CXCL12 only curve}}) / (\text{Top}_{\text{CXCL12 only curve}} - \text{Bottom}_{\text{CXCL12 only curve}}) \times 100$, top and bottom of the CXCL12 only net BRET curve being derived from an initial curve fit of the data obtained in the absence of AMD3100. The normalized CXCL12 only curve was constrained between zero and 100, whereas the curve in the presence of AMD3100 was not constrained. Statistical significance was assessed using paired t test and data set comparison performed by assessing curve top, bottom and logEC₅₀ in simultaneous curve fittings. Binding data were analyzed by simultaneous comparison of 1-site vs. 2-site competition binding models, with statistical significance for the optimal model

determined by the F-test. Beta-arrestin recruitment data were analyzed using repeated measures ANOVA and Dunnett post test.

Results:

CXCR7 forms constitutive homodimers. To test whether CXCR7 forms constitutive homodimers that may serve as a BRET conformational sensor, we constructed the CXCR7-RLuc and CXCR7-YFP fusion proteins. Coexpression of BRET partners at different [acceptor]/[donor] ratios yield BRET curves that, if specific, reach saturation at maximal BRET (BRET_{max}) (Mercier et al. 2002; Bouvier et al. 2007). As shown in Figure 1, [acceptor]/[donor] titration of the CXCR7 BRET constructs results in saturation of the BRET signal, as does the previously reported constitutive CXCR4 homodimer, whereas titration of CXCR7-RLuc with V1Ra-YFP (vasopressin receptor V1Ra) as a control did not (data not shown) (Babcock et al. 2003; Percherancier et al. 2005). The CXCR7 BRET titration curve has a BRET₅₀ that is in the same range as that of CXCR4, albeit slightly higher (Table 1). BRET₅₀ has been described to characterize the propensity of receptors to form dimers (Mercier et al. 2002). The data shown in Figure 1 therefore suggest a similar predisposition of the two receptors to form constitutive homodimers. The maximal BRET values (BRET_{max}) are different for the two receptors, reflecting differences of distance and/or orientation between the C-terminal fluorophore fusions in the CXCR4 and CXCR7 homodimers. Indeed, maximal BRET of constitutive dimers does not represent their number or affinity (Bouvier et al. 2007).

The CXCR7 homodimer BRET is modulated by CXCL12 and AMD3100. BRET within a constitutive dimer depends on the distance between the fluorophores, which is a function of receptor dimer conformation. Ligand-induced changes of receptor conformation can therefore be picked up as changes in BRET. Ligand-induced BRET changes are also additional evidence that the BRET signal results from a specific dimer, and is not due to random collision of the BRET partners, which would be expected to be unaffected by ligand binding. Cells expressing the respective BRET partners at BRET_{max} [acceptor]/[donor] ratios were incubated with high doses of different CXCR4 and CXCR7 ligands (100nM for CXCL12 and 10μM

for AMD3100) (Figure 2). CXCL12, which is a cognate ligand of both CXCR4 and CXCR7 (Balabanian et al. 2005; Burns et al. 2006), increases BRET of both receptor dimers, as previously reported for CXCR4 (Percherancier et al. 2005). AMD3100 has only small effects on the CXCR4 dimer, as reported (Percherancier et al. 2005). Interestingly, AMD3100 also resulted in changes in BRET of the CXCR7 dimer, but not on non-specific bystander BRET between CXCR7-RLuc and V1Ra -YFP (not shown), suggesting that AMD3100 binds to CXCR7, and promotes a conformational change within the constitutive homodimer.

BRET changes induced by CXCL12 are modulated by AMD3100. To better quantify the ligand effects on the CXCR4 and CXCR7 homodimers, we performed dose-response experiments with CXCL12 on the respective BRET partners. Representative results of these experiments are shown in Figure 3. Table 2 shows that the average EC_{50} of CXCL12-induced BRET changes in the CXCR4 dimer is 5.34×10^{-8} M. The average EC_{50} of CXCL12 on the CXCR7 dimer is similar, at 1.60×10^{-8} M. To assess the modulation of the effect of CXCL12 on the different receptors by AMD3100, we combined the two ligands by adding $10 \mu\text{M}$ AMD3100 to the CXCL12 dose response experiment. The dose-response curve of CXCL12-induced BRET changes on CXCR4 was shifted by almost one log to the right by the presence of AMD3100, resulting in an increased EC_{50} of 5.10×10^{-7} M. However, the effect of $10 \mu\text{M}$ AMD3100 on the CXCL12-induced BRET changes in the CXCR7 dimer was the inverse: the dose-response curve was left-shifted, and the EC_{50} of CXCL12 was lowered two- to threefold to 5.67×10^{-9} M. This finding is best explained by an increase of the effect of CXCL12 on CXCR7 by AMD3100 by a positive allosteric mechanism. In addition, the maximal BRET change observed in the CXCR7 dimer in the presence of both CXCL12 and AMD3100 was significantly higher than that in the presence of CXCL12 alone (paired t test, $p= 0.0097$, see also Table 2). We interpret this difference as additional evidence for the allosteric mode of action of AMD3100 on CXCR7, the different maximal BRET changes reflecting distinct receptor conformations in the presence of both ligands *versus* CXCL12 alone.

AMD3100 increases [¹²⁵I]-CXCL12 binding to CXCR7 expressing cells. To substantiate our observations, we performed radioligand binding assays using radiolabelled CXCL12 tracer on HEK293T cells transiently expressing either CXCR4 or CXCR7. Fig 4A indicates that AMD3100 does not compete for CXCL12 binding to CXCR4 until very high concentrations of AMD3100 (average $K_i = 6.61 \times 10^{-4}$ M, N = 6, see Table 3), as would be expected for a negative allosteric modulator of CXCL12 binding to CXCR4. However, on CXCR7 expressing cells, increasing concentrations of AMD3100 lead to an increased binding of the radiolabelled chemokine to the cells, with an apparent average “ K_i ” of (3.15×10^{-5} M, N = 4) (Figure 4B, Table 3). This observation is consistent with the conclusion that AMD3100 is a CXCR7 ligand that potentiates CXCL12 binding to CXCR7, thereby qualifying as a positive allosteric modulator of CXCL12 binding to the receptor. While the quality of the effects of AMD3100 is in keeping between binding and homodimer BRET (positive effects on CXCR7, negative effects on CXCR4), there are differences in the concentrations of AMD3100 required in the two experimental systems to observe these effects (see discussion).

AMD3100 induces β -arrestin recruitment to CXCR7, and positively modulates the effect of CXCL12. We then investigated whether AMD3100 binding to CXCR7 was accompanied by functional consequences. Given that no G-protein signalling has been reported for this receptor, we studied recruitment of beta-arrestin as a signalling readout, which can be G-protein independent (Wei et al. 2003). β -arrestin is a scaffold protein that can be recruited to ligand-bound GPCRs independently of G-protein signalling, and that is linked to downstream enzyme effectors. To quantitatively measure arrestin recruitment, we used a previously described (Hamdan et al. 2005) BRET-based system. As shown in Figures 5A and 5B, we found that CXCL12 induces arrestin recruitment to CXCR7, thereby identifying arrestin recruitment as a previously unreported signalling pathway activated by CXCR7. Surprisingly, AMD3100 alone also induced arrestin recruitment to CXCR7, showing a substantial effect at 10 μ M, thereby qualifying as an agonist of this pathway. As a control, CXCL12 induced beta-arrestin recruitment also to CXCR4, but this effect was blocked in the presence of 10 μ M AMD3100 (Figure 5B). To evaluate whether the positive allosteric effect of AMD3100 on CXCR7 would relate to this signalling

readout, we performed a dose-response experiment with CXCL12 in the presence and absence of 10 μ M AMD3100 (Figure 5C). The resulting EC_{50} s indicate that AMD3100 increases the potency with which CXCL12 induces arrestin recruitment, to an extent that is in line with the observed BRET changes in CXCR7 (for CXCL12 alone the average EC_{50} is 16.0 nM in BRET, and 11.8 nM in arrestin recruitment, the average CXCL12 + AMD3100 EC_{50} is 5.67 nM in BRET, and 6.48 nM in arrestin recruitment, respectively (Tables 2 and 4)). Importantly, this effect is strongest at CXCL12 concentrations that are biologically relevant (1-10 nM).

Discussion:

We report here that the small bicyclam AMD3100, a known modulator of the CXCR4/CXCL12 interaction, is also a ligand for the alternative CXCL12 receptor CXCR7. We find that either CXCL12 or AMD3100 alone induce beta-arrestin recruitment to CXCR7. In addition, the CXCL12-CXCR7 interaction is positively modulated by AMD3100, leading to the conclusion that AMD3100 is an allosteric CXCR7 agonist.

Our data demonstrate the potential of the measurements of ligand-induced BRET-changes for the evaluation, and potentially the screening of receptor ligands in general, and allosteric modulators in particular. We interpret ligand-induced BRET changes as mirroring the conformational change in the receptor that is induced by the ligand (Percherancier et al. 2005). This parameter therefore relates to ligand-receptor interaction, but the exact link between ligand binding and BRET change remains to be determined. Chemokine interactions with their receptors are complex, and a two site binding mode for chemokines to their receptors was previously forwarded (Ahuja et al. 1996; Crump et al. 1997). Following this model, site I involves mainly residues in the receptor N-terminus, and is in itself insufficient for signalling. Site II involves the flexible N-terminus of the chemokine and a binding pocket formed by the central and transmembrane domains of the receptor. Interaction of the chemokine with site II is required for receptor activation. To complicate matters, site II also contributes to chemokine binding; whether this contribution results directly from site II interactions with the chemokine, or from indirect effects on site I, remains yet elusive. Indeed, conformational interdependence between site I and II has been

suggested (reviewed in (Rajagopalan and Rajarathnam 2006)). We do not know whether chemokine-induced BRET changes relate to site I or site II binding, or both. However, given that site II interaction, and not site I interaction, is thought to transduce the conformational rearrangements to the cytosolic face of the receptor that lead to its activation, it is probable that site II interactions are recorded by receptor dimer BRET. Indeed, this assumption is supported by the concordance of the doses required for the effects observed with the receptor dimer BRET sensor and in arrestin recruitment. That BRET mainly records site II interactions is also in agreement with AMD3100 having stronger effects on both CXCL12-induced BRET change and arrestin recruitment, on the one hand, than on radioligand binding involving site I, on the other hand. Indeed, in their work reporting CXCL12 binding to CXCR7, Burns et al found no effect of AMD3100 on the binding of radiolabelled CXCL12 tracer to CXCR7 (Burns et al. 2006). Our own binding data that find only little effect of 10 μ M AMD3100 on radiolabelled CXCL12 tracer binding to CXCR7 are in line with this report.

In contrast to what was observed with CXCR7, we did not observe any appreciable effect of AMD3100 on [¹²⁵I]-CXCL12 binding to CXCR4 until high concentrations (Figure 4A and Table 3), yet an effect of AMD3100 on the CXCL12-mediated BRET response through the CXCR4 homodimer was readily observed at 10 μ M (Figure 3, Table 2). The absence of correlation between AMD3100 exhibiting antagonistic effects through CXCR4 and competition with radiolabelled CXCL12 binding has been noted previously (Fricker et al. 2006), and four major studies find [¹²⁵I]-CXCL12-displacement IC₅₀s largely above EC₅₀s of inhibition of CXCR4-mediated functions (Gupta et al. 2001; Zhang et al. 2002; Gerlach et al. 2003; Fricker et al. 2006). It has been forwarded that this discrepancy relates to AMD3100 more strongly interferes with site II interactions (recorded by functional assays) than with site I interactions (as required for radioligand competition) (Gupta et al. 2001). Our data are in full agreement with this interpretation.

The mechanism by which AMD3100 interferes with CXCL12 binding to CXCR4 and CXCR4 activity is complex and a matter of debate. No homologous binding competition studies using radiolabelled AMD3100 are published, and there is considerable discrepancy between the data reported for CXCL12 radioligand competition by AMD3100. The reported IC₅₀s range from 74 and 106nM when the

receptor is expressed heterologously in COS-7 (Gerlach et al. 2001) or CHO cells (Zhang et al. 2002), to 651nM (Fricker et al. 2006) and 15 μ M (Gupta et al. 2001) when the receptor is found to be expressed endogenously in CCRF-CEM or HL-60 cells, respectively. Our own experiments resulted in an even higher IC₅₀ when the receptor was expressed heterologously in the HEK293T cell background. The reason for this discrepancy still remains unknown, and may lie in subtle differences in the experimental conditions used, as alluded to elsewhere (Fricker et al. 2006). Alternatively, it is possible that the reported conformational heterogeneity of CXCR4 in different cell backgrounds may play a role (McKnight et al. 1997; Baribaud et al. 2001). Taken together, these data suggest that AMD3100 interferes separately with CXCL12 binding and with receptor activation. While its effect is stronger on receptor activation (site II), high AMD3100 concentrations are required for effects on binding, at least in some cells. The nature (allosteric or orthosteric) of the interference with site II in CXCR4 can not be entirely clarified in the absence of site II specific probes for CXCR4 (Kenakin et al. 2006). However, the fact that AMD3100 appears to act as a positive allosteric modulator of site II in CXCR7 would point towards allosteric interaction also with CXCR4 site II as being the mechanism by which AMD3100 exerts its antagonistic effects at CXCR4.

The finding that AMD3100 binds CXCR7 warrants re-examination of the selectivity of the compound. Previous reports, including our own, have described AMD3100 as being highly selective for CXCR4 (Labrosse et al. 1998; Hatse et al. 2002). However, CXCR7 was not included in these studies. The late discovery of CXCR7 to be a receptor for CXCL12 implies that the conclusions drawn from many data relating to biological effects must be reassessed, as they have previously been routinely ascribed to CXCR4, the only known CXCL12 receptor. Blockade of either CXCR4 or CXCR7 with selective inhibitors will be useful for such reassessment, and AMD3100 was a candidate of choice, that is being used to demonstrate roles of CXCR4 (Cabioglu et al. 2005; Pattarozzi et al. 2008). Our findings call for special caution in the use of AMD3100 for the dissection of the respective roles of CXCR4 and CXCR7 as mediators of the biological effects of CXCL12.

References:

- Ahuja SK, Lee JC and Murphy PM (1996) CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct. *The Journal of biological chemistry* **271**(1):225-232.
- Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M and Jockers R (2002) Monitoring of Ligand-independent Dimerization and Ligand-induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* **277**(24):21522-21528.
- Ayoub MA, Levoye A, Delagrangé P and Jockers R (2004) Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared to MT2 homodimers. *Molecular pharmacology*.
- Babcock GJ, Farzan M and Sodroski J (2003) Ligand-independent Dimerization of CXCR4, a Principal HIV-1 Coreceptor. *J Biol Chem* **278**(5):3378-3385.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M and Bachelier F (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**(42):35760-35766.
- Baribaud F, Edwards TG, Sharron M, Brelot A, Heveker N, Price K, Mortari F, Alizon M, Tsang M and Doms RW (2001) Antigenically distinct conformations of CXCR4. *Journal of virology* **75**(19):8957-8967.
- Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, Leduc M, Percherancier Y, Fujii N, Tamamura H, Bachelier F and Heveker N (2007) Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. *The Journal of biological chemistry* **282**(8):5111-5115.
- Berger EA, Murphy PM and Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**:657-700.
- Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, Wilson D, Xu Q and Raz E (2008) Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration. *Cell* **132**(3):463-473.

- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B and Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16):7297-7301.
- Bouvier M, Heveker N, Jockers R, Marullo S and Milligan G (2007) BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better. *Nature methods* **4**(1):3-4; author reply 4.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC and Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine* **203**(9):2201-2213.
- Cabioglu N, Summy J, Miller C, Parikh NU, Sahin AA, Tuzlali S, Pumiglia K, Gallick GE and Price JE (2005) CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer research* **65**(15):6493-6497.
- Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD and Clark-Lewis I (1997) Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO journal* **16**(23):6996-7007.
- De Clercq E (2003) The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* **2**(7):581-587.
- De Clercq E (2005) Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem* **5**(9):805-824.
- Fricke SP, Anastassov V, Cox J, Darkes MC, Grujic O, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, Mosi RM, Nelson KL, Qin L, Santucci Z and Wong RS (2006) Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochemical pharmacology* **72**(5):588-596.
- Gerlach LO, Jakobsen JS, Jensen KP, Rosenkilde MR, Skerlj RT, Ryde U, Bridger GJ and Schwartz TW (2003) Metal ion enhanced binding of AMD3100 to Asp262 in the CXCR4 receptor. *Biochemistry* **42**(3):710-717.
- Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ and Schwartz TW (2001) Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *The Journal of biological chemistry* **276**(17):14153-14160.

- Guan XM, Kobilka TS and Kobilka BK (1992) Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide. *The Journal of biological chemistry* **267**(31):21995-21998.
- Gupta SK, Pillarisetti K, Thomas RA and Aiyar N (2001) Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1alpha: implications for development of selective CXCR4 antagonists. *Immunol Lett* **78**(1):29-34.
- Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J and Bouvier M (2005) High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen* **10**(5):463-475.
- Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E and Schols D (2002) Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS letters* **527**(1-3):255-262.
- Hendrix CW, Collier AC, Lederman MM, Schols D, Pollard RB, Brown S, Jackson JB, Coombs RW, Glesby MJ, Flexner CW, Bridger GJ, Badel K, MacFarland RT, Henson GW and Calandra G (2004) Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**(2):1253-1262.
- Kenakin T, Jenkinson S and Watson C (2006) Determining the potency and molecular mechanism of action of insurmountable antagonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **319**(2):710-723.
- Labrosse B, BreLOT A, Heveker N, Sol N, Schols D, De Clercq E and Alizon M (1998) Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *Journal of virology* **72**(8):6381-6388.
- Langmead CJ and Christopoulos A (2006) Allosteric agonists of 7TM receptors: expanding the pharmacological toolbox. *Trends in pharmacological sciences* **27**(9):475-481.
- May LT, Leach K, Sexton PM and Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* **47**:1-51.
- McKnight A, Wilkinson D, Simmons G, Talbot S, Picard L, Ahuja M, Marsh M, Hoxie JA and Clapham PR (1997) Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. *Journal of virology* **71**(2):1692-1696.

- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A and Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* **277**(47):44925-44931.
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC and Schall TJ (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(40):15735-15740.
- Pattarozzi A, Gatti M, Barbieri F, Wurth R, Porcile C, Lunardi G, Ratto A, Favoni R, Bajetto A, Ferrari A and Florio T (2008) 17beta-estradiol promotes breast cancer cell proliferation-inducing stromal cell-derived factor-1-mediated epidermal growth factor receptor transactivation: reversal by gefitinib pretreatment. *Molecular pharmacology* **73**(1):191-202.
- Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M and Heveker N (2005) Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *The Journal of biological chemistry* **280**(11):9895-9903.
- Proost P, Mortier A, Loos T, Vandercappellen J, Gouwy M, Ronsse I, Schutyser E, Put W, Parmentier M, Struyf S and Van Damme J (2007) Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood* **110**(1):37-44.
- Rajagopalan L and Rajarathnam K (2006) Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Bioscience reports* **26**(5):325-339.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W and Ratajczak J (2006) The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* **20**(11):1915-1924.
- Salcedo R and Oppenheim JJ (2003) Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* **10**(3-4):359-370.
- Terrillon S and Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**(1):30-34.

Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R and Taichman RS (2008) The Role of CXCR7/RDC1 as a Chemokine Receptor for CXCL12/SDF-1 in Prostate Cancer. *The Journal of biological chemistry* **283**(7):4283-4294.

Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM and Lefkowitz RJ (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**(19):10782-10787.

Zhang WB, Navenot JM, Haribabu B, Tamamura H, Hiramatsu K, Omagari A, Pei G, Manfredi JP, Fujii N, Broach JR and Peiper SC (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. *The Journal of biological chemistry* **277**(27):24515-24521.

Zlotnik A (2004) Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* **14**(3):181-185.

Footnotes

* This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to N.H., and by the CIHR Team in GPCR Allosteric Regulation (CTiGAR). I.K. acknowledges a fellowship from the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine, Y.A.B. was supported by a CIHR fellowship, N.H. is a CIHR New Investigator. The authors thank Michel Bouvier and his laboratory for the gift of the V1Ra-YFP and RLuc-arrestin2 constructs. B.J.L. and J.S.R. are employees of Procter & Gamble Pharmaceuticals, Inc.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: [acceptor]/[donor] titrations of CXCR4 (open circles) and CXCR7 homodimers (solid triangles), demonstrating constitutive homodimerization of both receptors. Figure 1 shows representative curves for each receptor (The fitted curve parameters for each curve of this representative experiment are $BRET_{max}$ 0.36 ± 0.02 and 0.12 ± 0.004 for CXCR4 and CXCR7, respectively, and $BRET_{50}$ 2.47 ± 0.64 and 2.95 ± 0.41 for CXCR4 and CXCR7, respectively). The errors are S.E.M. of the parameter estimate. The mean values obtained in repeated experiments are shown in table 1.

Figure 2: Changes in the BRET signal of CXCR4 or CXCR7 homodimers induced by AMD3100 and CXCL12. The changes are expressed in % of the basal BRET signal of the respective homodimer (in the absence of ligands). [acceptor]/[donor] ratios representing $BRET_{max}$ were employed. Bars represent mean and standard error, the data are derived from n=11 experiments (except AMD3100 on CXCR4 n=5); * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. basal BRET.

Figure 3: Dose-response curves of BRET changes induced in the CXCR4 and CXCR7 homodimers, expressed as % of the maximal change obtained at saturating CXCL12 concentration in the absence of AMD3100. Data obtained in the absence (solid squares) or presence (open circles) of $10\mu\text{M}$ AMD3100 from one representative experiment are shown (CXCR4 without AMD3100: $EC_{50} = 1.01 \times 10^{-7}\text{M}$, with AMD3100 $EC_{50} = 4.97 \times 10^{-7}\text{M}$, and CXCR7 without AMD3100: $EC_{50} = 1.93 \times 10^{-8}\text{M}$, with AMD3100 $EC_{50} = 0.59 \times 10^{-8}\text{M}$. On the CXCR7 dimer, the maximal BRET change of the curve with AMD3100 is 124% of that with CXCL12 alone).

Figure 4: Competition binding using 53pM [^{125}I]-CXCL12 and increasing doses of AMD3100 or CXCL12 as the competitor. Percent of control binding for each ligand was determined by normalizing the curves at each receptor to the percent binding range of the CXCL12 curve(s) (Figures 4A and 4C). One representative experiment is shown. Experiments were repeated with similar results (n=4-10), and the mean values obtained in repeated experiments are shown in table 3. Cell surface expression

for both CXCR4 and CXCR7 receptors were confirmed by flow cytometry (Figures 4B and 4D). The secondary antibody (α -mouse-phycoerythrin) was used as the negative control (black filled area). Positive expression was conferred using the primary (12G5 or α FLAG) + secondary antibodies (white filled area). Figure 4A: HEK293T cells transfected with HA-Flag CXCR4 conferring dose-dependant competition of [125 I]-CXCL12 tracer with CXCL12 (open circles) or AMD3100 (solid squares). The homologous CXCL12 competition of the representative experiment is best described by a two site model ($p < 0.0001$), where $K_{i,1} = 7.18 \times 10^{-11}$ M and $K_{i,2} = 3.75 \times 10^{-8}$ M, with 38.51% of the sites being in the high affinity state. The heterologous AMD3100 competition is best described by a one site model with a $K_i = 4.48 \times 10^{-2}$ M. Figure 4B: The 12G5 antibody was used to detect cell surface expression of CXCR4. Figure 4C: HEK293T cells transfected with HA-Flag CXCR7 conferring dose dependent competition of CXCL12 (open circles) and dose-dependent cooperative binding of AMD3100 (solid squares) in the presence of [125 I]-CXCL12. The homologous CXCL12 competition is best described by a two site model ($p < 0.0001$) where $K_{i,1} = 6.04 \times 10^{-11}$ M and $K_{i,2} = 1.35 \times 10^{-8}$ M with 32.06% of the sites being in the high affinity state. The AMD3100 data are best described by a one site model with a $K_i = 3.45 \times 10^{-5}$ M. Figure 4D: The α FLAG (M2) antibody was used to detect cell surface expression of CXCR7.

Figure 5: Effects of CXCL12 and AMD3100 on the recruitment of beta-arrestin. A: beta-arrestin recruitment to CXCR7 in the presence of indicated doses CXCL12 ($n=4$) or AMD3100 ($n=3$). (**) indicates statistical significance (repeated measures ANOVA, $p \leq 0.01$); B: As a control, beta-arrestin recruitment to CXCR4 induced by 100nM CXCL12, and its inhibition by 10 μ M AMD3100; C: dose-response curves of CXCL12 on arrestin recruitment to CXCR7, in the absence (open circles) or presence (solid squares) of 10 μ M AMD3100. One representative out of four experiments is shown. Arrestin recruitment was measured after 5 minutes (CXCR7) or 30 minutes (CXCR4) of incubation with ligands.

Table 1: Fitted curve parameters of homodimer [acceptor]/[donor] titration.

Summary of the curve parameters of homodimer [acceptor]/[donor] titrations, of 3-6 repeated experiments as shown in figure 1. The $BRET_{50}$ values indicate the propensity of acceptor and donor to interact; they are in the same range for CXCR4 and CXCR7, suggesting that they form constitutive homodimers with similar propensity. $BRET_{max}$ is a reproducible value intrinsic to each different receptor homodimer; the difference of $BRET_{max}$ between CXCR4 and CXCR7 reflects solely different distances/orientations of acceptor and donor in the CXCR4 and CXCR7 homodimers.

Receptor	$BRET_{50}$	$\log BRET_{50} \pm SEM$	$BRET_{max} \pm SEM$	n
CXCR4	2.37	0.36 ± 0.09	0.41 ± 0.03	3
CXCR7	4.08	0.60 ± 0.03	0.16 ± 0.01	6

Table 2: Fitted curve parameters of BRET changes.

Table 2 summarizes the analyses of CXCL12-induced BRET changes of CXCR4 (n=2) and CXCR7 (n=6). The difference of logEC₅₀ in presence and absence of AMD3100 of the CXCR7 curves is statistically significant (*) (paired t test, p= 0.0225). The maximal BRET changes induced by CXCL12, in the presence or absence of 10µM AMD3100, are also given, referring to the maximal change induced by CXCL12 alone as 100%. The difference is significant for CXCR7 (#) (paired t test, p= 0.0097). In addition, simultaneous curve fitting for each set of curves (±AMD3100) confirmed the statistical significance for the difference between the CXCR4 curves (p<0.001) and for 5/6 of the CXCR7 curves (p<0.05) with AMD3100 treatment.

Receptor	Ligands	EC ₅₀ (M)	logEC ₅₀ ±SEM	Top of curve ±SEM	n
CXCR4	CXCL12	5.34x10 ⁻⁸	-7.27±0.28	100	2
CXCR4	CXCL12 + AMD3100	5.10x10 ⁻⁷	-6.29±0.02	83.2±5.5	2
CXCR7	CXCL12	1.60x10 ⁻⁸	-7.80±0.21	100.2±0.9	6
CXCR7	CXCL12 + AMD3100	5.67x10 ⁻⁹	-8.25±0.11 (*)	135.6±9.1 (#)	6

Table 3: Summary of Receptor Binding Parameters at CXCR4 and CXCR7.

Binding was determined after over-expression of the individual receptors in HEK293T cells as described in the Methods section. The binding parameters were determined by fitting the data to a one- or a two-site binding models as described under Methods, and the fitted curve parameters from the optimal fits of the data are summarized. Percent inhibition in binding is defined relative to the magnitude of the specific [¹²⁵I]-CXCL12 signal in the absence of AMD3100 (100% indicating complete inhibition). The negative value for CXCR7 indicates an increase in CXCL12 binding relative to that observed in the absence of AMD3100 (p<0.0001).

Receptor	Ligands	logK _{isite1} ±SEM	logK _{isite2} ±SEM	K _{isite1} ±SEM	K _{isite2} ±SEM	% Inhibition of control ±SEM	n
CXCR4	CXCL12	-9.00±0.20	- 5.92±0.28	9.95x10 ⁻¹⁰	1.19x10 ⁻⁶	100±0.2	8
CXCR4	AMD3100	-3.17±0.14	-	6.61x10 ⁻⁴	-	100±0.61	6
CXCR7	CXCL12	- 10.31±2.00	- 7.96±0.06	4.92x10 ⁻¹¹	4.92x10 ⁻⁸	98±1.15	10
CXCR7	AMD3100	-4.49±0.05	-	3.15x10 ⁻⁵	-	-41±11.65	4

Table 4: Fitted curve parameters of beta-arrestin recruitment to CXCR7

Table 4 summarizes the analyses of CXCL12-induced recruitment of beta-arrestin to CXCR7 (n=4). The difference of logEC₅₀ in presence and absence of AMD3100 of the curves is statistically significant ([#]) (paired t test, p= 0.0049). In addition, simultaneous curve fitting for each set of curves (\pm AMD3100) confirmed the statistical significance for the difference between the curves in three out of four experiments (p<0.05).

Ligands	EC₅₀ (M)	logEC₅₀±SEM	n
CXCL12	1.18x10⁻⁸	-8.01 ± 0.16	4
CXCL12+ AMD3100	6.48x10⁻⁹	-8.30 ± 0.19 ^(#)	4

Figure 1

Net BRET

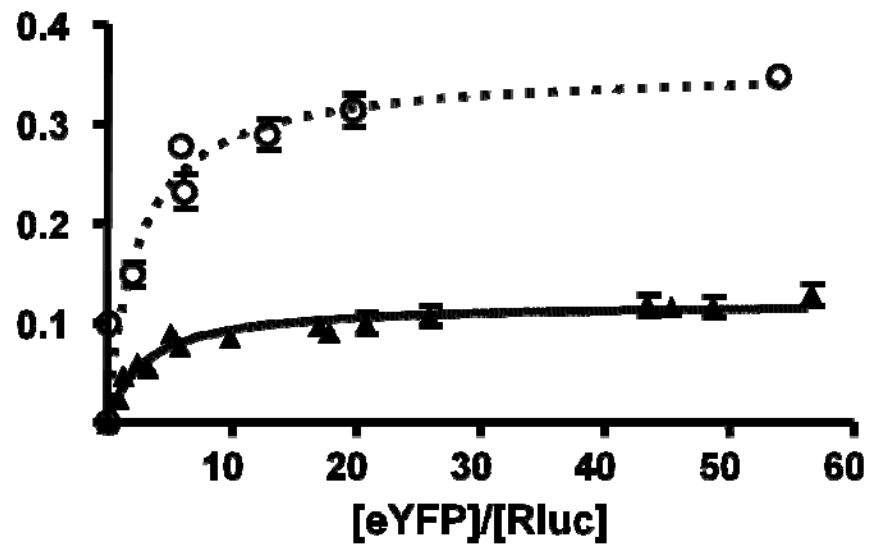


Figure 2

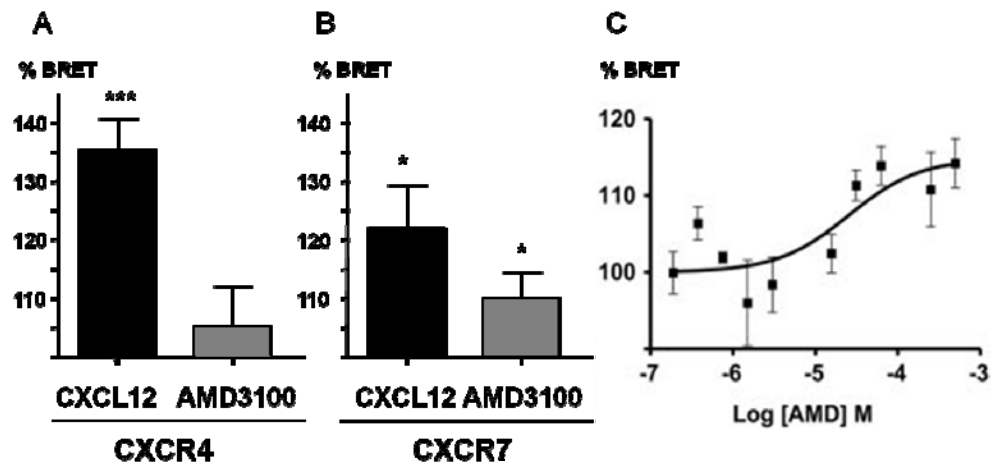


Figure 3

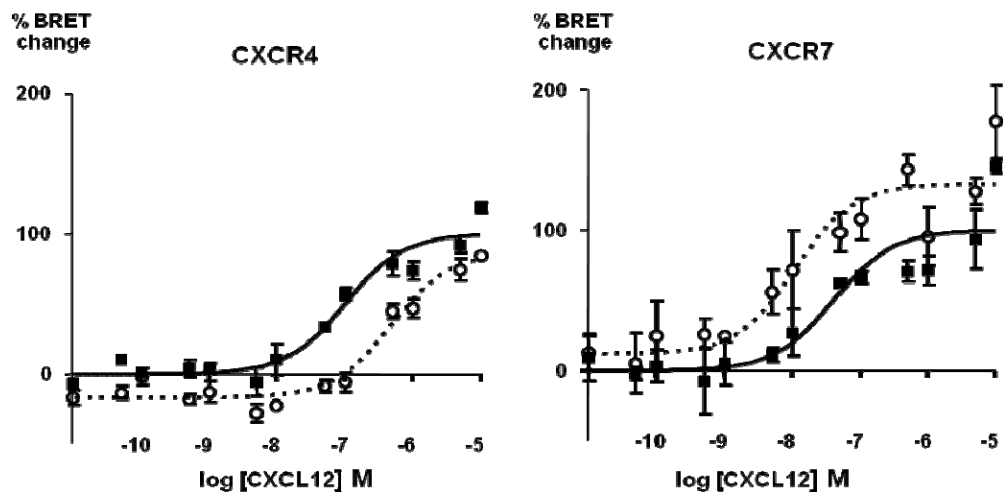


Figure 4

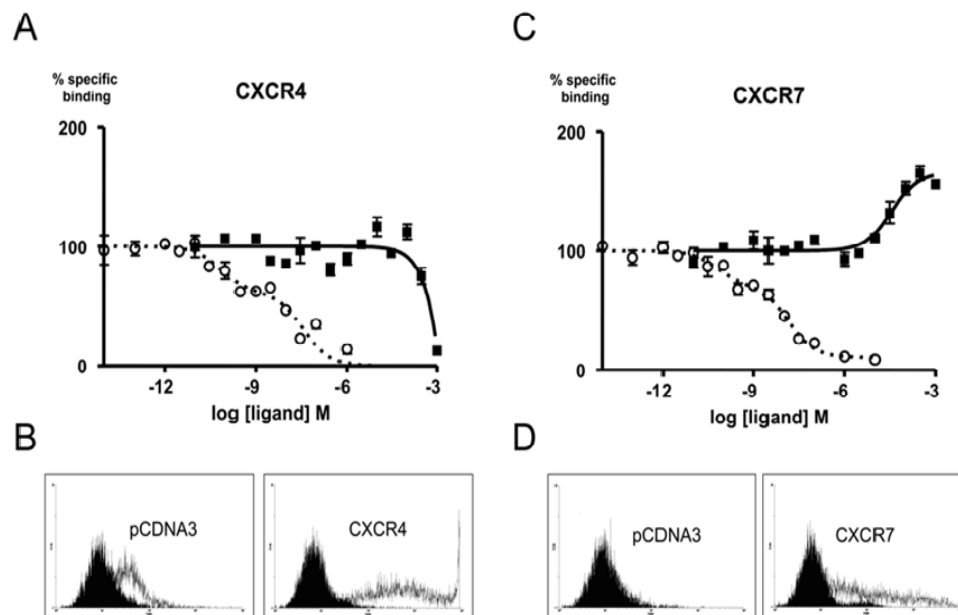
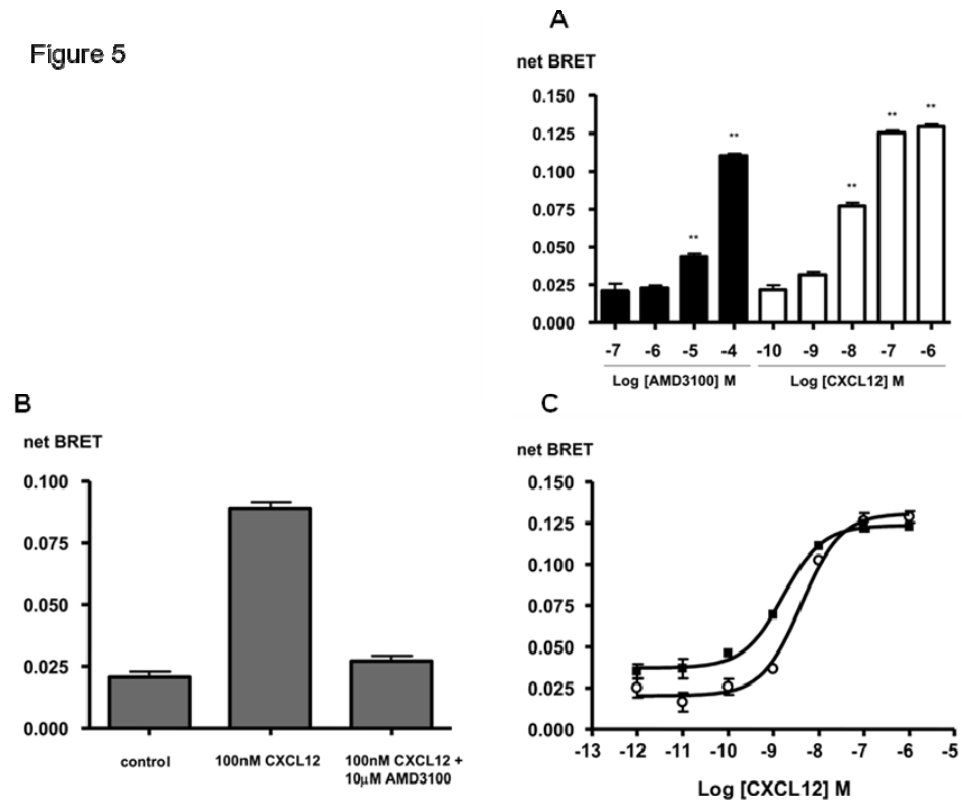


Figure 5



Discussion

Les modèles théoriques décrivant l'activation des 7TMRs ont été constamment modifiés afin d'accommoder les résultats expérimentaux (Kenakin 2002). Le modèle du complexe ternaire ainsi que ses dérivés suggèrent l'existence d'un nombre limité de conformations intermédiaires, qu'un récepteur peut adopter, entre un état actif et inactif. Ce modèle devient difficile à concilier avec le grand nombre de données pharmacologiques et fonctionnelles qui suggèrent qu'un ligand peut stabiliser différentes conformations d'un récepteur (Urban et al. 2007). Dans ce contexte, la mesure directe de la conformation de récepteur dans des cellules vivantes offre un moyen additionnel de mettre en évidence la relation entre la fonction et la conformation des 7TMRs.

À cet effet, nous discuterons dans un premier temps, de la corrélation entre l'activité G α i et les conformations des mutants du récepteur CXCR4, mesurées à l'état basal et en présence de ligands (Berchiche et al. 2007). Dans la deuxième partie de ce travail, nous discuterons la corrélation entre l'activité (G α i et beta-arrestine) et les conformations mesurées du récepteur CCR2 de type sauvage, suite au traitement avec différents ligands naturels (Berchiche et al. 2011). Enfin, le troisième travail présenté dans cette thèse s'inscrit dans un contexte quelque peu différent. Nous y montrons que l'agoniste partiel AMD3100 n'est pas sélectif pour CXCR4. En effet, ce bicyclame est aussi un agoniste allostérique positif du récepteur CXCR7 récemment identifié. Cette observation appelle à la prudence quant à l'utilisation d'inhibiteurs dits sélectifs pour CXCR4 identifié avant CXCR7 et invite à réévaluer les effets physiologiques et pathologiques anciennement attribués au couple CXCR4/SDF-1 (Kalatskaya et al. 2009).

Activité et conformation des mutants de CXCR4

Nous avons caractérisé six mutants (D133N, R134A, Y135A, N119D, N119K et N119S) de CXCR4. Des mutations ponctuelles ont été introduites dans le motif E/DRY de la boucle i2, respectivement aux positions 3.49, 3.50, 3.51, selon le système de nomenclature proposé par Ballesteros et Weinstein (Ballesteros and Weinstein 1995). Tel qu'introduit précédemment, ces résidus jouent un rôle

important dans les changements conformationnels lors de l'activation des récepteurs. Nous avons aussi muté le résidu asparagine (Asn-119 ou 3.35) du TMIII, rapporté comme étant important pour l'activité des récepteurs CXCR4 et de l'angiotensine II (Zhang et al. 2002; Hunyady et al. 2003).

Expression des mutants

À l'exception des mutants D133N et R134A, dont l'expression est diminuée, l'expression des mutants à la surface des cellules HEK293 est en général comparable à celle de CXCR4 de type sauvage (*Figure 1A*) (Berchiche et al. 2007). L'expression à la membrane plasmique des mutants E/DRY dépend souvent du résidu muté ainsi que du récepteur lui-même. À titre d'exemple, l'expression des récepteurs histamine H2 (Alewijns et al. 2000), α 2-adrénergique (Rasmussen et al. 1999), muscarinique M1 (Lu et al. 1997) et le récepteur α 1B-adrénergique (Scheer et al. 1997) est affectée par la substitution de résidus dans le motif E/DRY. Par contre, l'expression des mutants R126N et Y139F, respectivement des récepteurs de chimiokine CCR5 et CCR2, n'est pas affectée (Mellado et al. 1998; Lagane et al. 2005). L'expression plus faible des mutants D133N et R134A, pourrait être expliquée par un taux d'internalisation plus important comparativement aux autres mutants et au récepteur de type sauvage. Il est aussi possible que la mutation affecte la stabilité et cause une dégradation accrue de ces mutants, ou encore qu'il affecte l'acheminement du récepteur à la membrane plasmique.

Activité G α i des mutants

La fonction des mutants est déterminée en analysant l'activation de la protéine G α i grâce à un essai de radioliation de GTP γ -S¹³⁵ (*Figures 1B, 1C, 1D,*) (Berchiche et al. 2007). L'activité du mutant R134A, induite par l'agoniste SDF-1, est grandement affectée comparativement aux mutants D133N et Y135A ainsi qu'à CXCR4 de type sauvage. Les phénotypes des mutants N119D, N119K et N119S correspondent à ce qui a été préalablement décrit par Zhang et al. Ces derniers montrent l'activité des différents mutants grâce à des expériences d'activation de protéine G et de relâche de calcium intracellulaires en réponse à SDF-1 (Zhang et al.

2002). En effet, nous trouvons que le mutant N119D active la protéine G α i de façon similaire au récepteur de type sauvage, la mutation du résidu asparagine en lysine (N119K) rend le récepteur inactif, tandis que la substitution en sérine (N119S) donne lieu à un récepteur constitutivement actif (CAM). La liaison du GTP γ -S en présence du mutant N119S est augmentée suite à la stimulation avec l'agoniste SDF-1 et atteint une réponse maximale identique à CXCR4 sauvage. Nous avons aussi mesuré l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase, induite par la forskoline, suite à la stimulation des récepteurs avec une concentration saturante de l'agoniste SDF-1 (*Figure 1E*) (Berchiche et al. 2007). Ces résultats corrént avec ceux obtenus dans les expériences de liaison de GTP γ -S, ce qui suggère que la liaison du GTP γ -S serait la conséquence de l'activation de la protéine G α i.

Ainsi, les différents mutants peuvent être classés en trois catégories selon leur activité par rapport à CXCR4 sauvage. Les mutants D133N, Y135A et N119D possèdent une activité comparable à CXCR4 sauvage, le mutant N119S est constitutivement actif (CAM), tandis que les mutants R134A et N119K sont inactifs. Aussi, les mutations n'affectent pas l'affinité de la liaison de l'agoniste SDF-1 et donc la perte d'activité des mutants R134A et N119K n'est pas causée par la perte de liaison de SDF-1 (Zhang et al. 2002).

Mesure directe de la conformation

Grâce au transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET), nous avons précédemment montré que CXCR4 forme des homodimères constitutifs (Percherancier et al. 2005). Le BRET permet de mesurer la distance et l'orientation relative entre le donneur d'énergie (Rluc-*Renilla* luciférase) et l'accepteur (YFP-*yellow fluorescent protein*), chacun fusionnés à la partie C-terminale d'un protomère CXCR4. La coexpression des deux fusions mène à la formation d'homodimères constitutifs et permet de mesurer les changements conformationnels qui altèrent la distance et/ou l'orientation entre le donneur et l'accepteur suite à la liaison de ligand au récepteur dimérique (Percherancier et al. 2005). Nous avons utilisé ce même système afin de mesurer directement la conformation des homodimères des

récepteurs mutants en absence et en présence de l'agoniste naturel SDF-1, de l'agoniste inverse TC14012 et enfin de l'agoniste partiel AMD3100.

Conformations mesurées en absence de ligand

Dans un premier temps, nous avons tracé les courbes de titration d'accepteur sur donneur (YFP/RLuc) pour les différents homodimères mutants de CXCR4 (*Figure 2A*) (Berchiche et al. 2007). Ces courbes permettent de déterminer le BRET₅₀ pour les différents mutants. Le BRET₅₀ correspond au ratio YFP/RLuc permettant d'obtenir la moitié (50%) du signal maximal en BRET. Cette valeur de BRET₅₀ est interprétée comme étant la propension des récepteurs à former des dimères (Mercier et al. 2002; Ramsay et al. 2002). Les valeurs de BRET₅₀ pour les différents mutants, tirées des courbes de titration, sont comparables à celle de CXCR4 sauvage. Les mutants forment donc des homodimères constitutifs au même titre que le récepteur sauvage.

Toujours grâce aux courbes de titration, nous avons déterminé et comparé les valeurs de BRET maximum des différents récepteurs (*Figure 2B*) (Berchiche et al. 2007). Ces valeurs sont différentes pour plusieurs mutants entre eux et lorsque comparées à CXCR4. Seul N119D possède un BRET maximum comparable à CXCR4 sauvage. Ces différences en BRET maximum peuvent être expliquées par des différences dans la distance et/ou l'orientation des fluorophores qui seraient le résultat d'un changement de conformation au sein de l'homodimère. Ainsi, une diminution du BRET maximum résulterait de l'augmentation de la distance et/ou du changement de l'orientation entre le donneur et l'accepteur indiquant une modification de la conformation. Cela est supporté par les travaux de Zhang et al., qui montrent que CXCR4 et le mutant CAM (N119S) adopteraient différentes conformations actives (Zhang et al. 2002). Puisque les mutations introduites sont situées dans le domaine TMIII et sa région adjacente, il devient peu probable que ces mutations modifient directement l'orientation des fluorophores, ce qui supporte la conclusion que les différents BRET maximums mesurés sont occasionnés par les différentes conformations globales des mutants de CXCR4.

Effet des ligands sur la conformation des homodimères

Dans un travail précédent, nous avons montré que l'agoniste SDF-1, l'agoniste partiel AMD3100 ainsi que l'agoniste inverse TC14012, induisent différents changements de conformations mesurables au sein de l'homodimère CXCR4 et que le BRET₅₀ reste invariable en présence de ces ligands (Percherancier et al. 2005). À cet effet, nous avons d'abord évalué l'effet de ces ligands sur le BRET₅₀ des mutants N119S et N119K. Comme pour CXCR4 sauvage, nous montrons que les mutants N119S et N119K ne changent pas la propension (BRET₅₀) des récepteurs à former des dimères. Par la suite, nous avons estimé l'effet des différents ligands sur le BRET maximum des mutants (*Figure 3*) (Berchiche et al. 2007). Ainsi, le traitement avec l'agoniste SDF-1 augmente le signal BRET mesuré pour CXCR4 et les différents mutants. Aussi, la réponse relative des mutants à SDF-1 est différente de celle du récepteur de type sauvage. Toutefois, ces différences ne sont pas statistiquement significatives. En revanche, SDF-1 induit l'augmentation du signal BRET de façon différente et statistiquement significative entre le mutant Y135A et les mutants D133N, R134A, N119K, N119S. L'application de l'agoniste partiel AMD3100 induit un important changement de BRET au sein des dimères mutants, à l'exception de R134A, et cela comparativement à la faible réponse de CXCR4 sauvage. Notamment, le mutant N119K décrit dans la littérature comme étant inactif (Zhang et al. 2002), répond de façon plus importante à l'AMD3100 comparativement aux mutants D133N et N119D. Il est à noter que N119D est décrit avec une activité semblable à CXCR4 (Zhang et al. 2002). Le traitement du mutant N119K avec l'AMD3100 stabilise une conformation du récepteur qui donne lieu à un BRET comparable à celui mesuré pour le récepteur de type sauvage. Cela permet d'envisager qu'en présence d'AMD3100 le mutant N119K adopte la conformation de CXCR4 sauvage à l'état basal. Finalement, la réponse de CXCR4 et des mutants à l'agoniste inverse TC14012 n'atteint pas de différence statistiquement significative sauf pour D133N, qui ne semble pas répondre à ce ligand. Il est possible que TC14012 induise des changements de conformations au sein du dimère D133N, mais que ces derniers ne soient pas mesurables car ils ne modifient pas la distance et/ou l'orientation des fluorophores.

Existe-t-il une corrélation entre les conformations et l'activité G α i mesurée?

Les changements de BRET mesurés en présence des ligands permettent d'acquérir de l'information sur les différences relatives entre les conformations des mutants en présence et en absence de ligand. À titre d'exemple, la faible réponse de CXCR4 sauvage à l'AMD3100 serait causée par le fait que le récepteur ne subit pas de changements conformationnels importants ou que ces changements ne sont pas assez importants et ne se traduisent pas par un changement mesurable de BRET. Par contre, la réponse augmentée de la majorité des mutants à l'AMD3100 suggère que les changements conformationnels au sein des mutants sont différents de ceux du récepteur de type sauvage. Cela résulterait du fait qu'à l'état basal, les mutants et CXCR4 sauvage possèdent des conformations différentes.

Nous avons directement comparé les conformations des différents mutants. À cet effet, les valeurs de BRET maximum des mutants CXCR4 mesurées en présence des différents ligands ont été transformées en pourcentage de la valeur de BRET maximum mesurée pour CXCR4 sauvage à l'état basal (*Figure 3B, Tableau I*) (Berchiche et al. 2007). Cette représentation des résultats met en évidence que nous mesurons différentes conformations pour différents mutants en présence des ligands. Ainsi, en présence de SDF-1, seuls Y135A et N119D possèdent des valeurs de BRET maximum similaires à CXCR4 sauvage. Les conformations des quatre autres mutants en présence de l'agoniste sont différentes de CXCR4 sauvage, même pour D133N et N119S dont la stimulation avec SDF-1 engendre une activité G α i. Nous mesurons aussi des BRET maximums différents pour R134A, N119K et CXCR4 sauvage en présence du TC14012, ce qui suggère l'existence de différentes conformations inactives. Cependant, cette méthode ne semble pas permettre d'apprécier de subtiles distinctions entre les conformations qui pourtant donnent lieu à des effets fonctionnels concrets. De la sorte, nous mesurons des BRET maximums presque identiques en absence et présence des ligands, pour N119K et N119S, malgré les différences détectées dans leurs activités G α i.

Les valeurs de BRET maximum mesurées représentent une moyenne des différentes populations de récepteurs. Ceci n'exclue pas que les BRET maximums

représentent différentes conformations en équilibre entre deux états comme par exemple un état inactif et actif. Toutefois, nous ne rapportons aucun lien linéaire entre les BRET maximums en présence de ligand et l'activation de la protéine G α i. En présence de SDF-1, R134A possède un BRET maximum faible et une activité G α i plus importante que N119K en absence ou en présence de SDF-1. Notamment, des récepteurs actifs et inactifs peuvent avoir des valeurs de BRET maximum similaires (exemple des mutants N119K et N119S en présence de SDF-1). À cet effet, nous concluons que les différents BRET maximums correspondent plutôt à différentes conformations adoptées par les mutants et non à des conformations intermédiaires entre un état inactif et actif du récepteur.

Des mutations ponctuelles introduites dans la séquence de CXCR4 peuvent (1) altérer sa conformation à l'état basal (en absence de ligand) et (2) influencer les réarrangements conformationnels du récepteur en présence de ligand. Or, en présence de l'agoniste, les changements conformationnels au sein d'un mutant (N119K) ne permettent pas de prédire son activité G α i. Toutefois, cela n'exclue pas que ces changements conformationnels ne prédisent pas une activité autre que l'activation de la protéine G α i. Les modèles d'activation probabiliste des récepteurs (Kenakin 1995; Kenakin 2009), suggèrent qu'un récepteur occupe un espace conformationnel dans lequel il peut adopter un nombre infini de conformations. En conséquence, il devient envisageable que le récepteur subit des changements de conformations en présence de ligand qui ne mènent pas à l'activation de la signalisation en général, ou de la voie de signalisation étudiée. En effet, l'agoniste inverse TC14012 induit des changements de conformations qui ne sont pas suivis d'une activité G α i (Tamamura et al. 2001).

Notamment, les différences de conformations mesurées en présence de SDF-1 ne prédisent pas nécessairement l'amplitude (efficacité) de l'activité G α i. À titre d'exemple, CXCR4 sauvage et le mutant N119S possèdent des conformations différentes en présence de SDF-1 mais une activité G α i comparable. Cela n'exclue pas que ce mutant possède des fonctions différentes du récepteur sauvage pour une ou plusieurs autres voies de signalisation. Malgré cela, cette possibilité n'affecte toutefois pas la conclusion selon laquelle différentes conformations de récepteurs

peuvent induire une activité similaire. Nous détectons d'importantes différences tant au niveau fonctionnel que conformationnel des mutants de CXCR4. Or le lien entre la fonction et la conformation reste peu claire et requiert des études supplémentaires.

Enfin, l'analyse des mutants de CXCR4 amène des preuves biophysiques de l'existence d'une diversité des conformations de récepteurs actifs qui n'a pas pu être appréciée auparavant. Ces preuves biophysiques restent consistantes avec le fait que des récepteurs de conformations multiples franchissent les mêmes étapes de changement conformationnels lors de l'activation. Cela est en accord avec des modèles d'activations de récepteurs qui prennent en considération l'hétérogénéité conformationnelle des récepteurs. Au départ, ces modèles ont été utilisés afin de mieux décrire le concept d'allostérisme et supposent qu'une collection de conformations multiples d'un récepteur donne lieu à une sous-population de récepteurs avec une fonction similaire (Onaran and Costa 1997; Kenakin and Onaran 2002; Kenakin 2004). Il est possible d'argumenter que des récepteurs mutants exprimés dans des lignées cellulaires ne reflètent pas le comportement des récepteurs de type sauvage *in vivo*. Malgré cela, ces systèmes artificiels se sont avérés utiles afin d'étudier et de mieux comprendre la signalisation des récepteurs et nous pensons qu'ils peuvent servir à mettre en évidence la plasticité conformationnelle de récepteurs actifs.

Le récepteur de chimiokine CCR2 et ses 7 ligands naturels

Contrairement au travail précédent, dans lequel nous avons étudié le lien entre la conformation et l'activité de mutants de CXCR4, la deuxième partie de ce travail porte sur le récepteur CCR2 de type sauvage qui possède sept différents ligands naturels. Nous avons étudié le lien entre l'activité et la conformation de CCR2 induite par les différents ligands.

CCR2 est un récepteur très étudié à cause de son grand intérêt clinique (Pease and Horuk 2009; Pease and Horuk 2009). Les effets pharmacologiques des différents ligands de CCR2 restent peu caractérisés (Murphy et al. 2000). Malgré que CCR2 possède sept différents ligands naturels, un nombre limité d'études ont investigué le recrutement de la beta-arrestine à CCR2, et ce en utilisant uniquement la chimiokine

CCL2 comme ligand (Aragay et al. 1998; Garcia Lopez et al. 2009). En conséquence, nous avons mesuré l'activité, entre autres le recrutement de la beta-arrestine, et la conformation de CCR2 en réponse aux différents ligands naturels.

Tout d'abord, nous avons établi l'affinité des différents ligands pour CCR2 grâce à un essai de compétition de radioliation en utilisant CCL2¹¹²⁵ comme traceur radioactif (Berchiche et al. 2011). Les affinités ainsi mesurées sont, tel qu'attendu, dans l'ordre du nanomolaire pour la plupart des ligands à l'exception de CCL24 et CCL26 (Berchiche et al. 2011). Les différences d'affinités de CCL24 et CCL26 pourraient être expliquées par le type cellulaire utilisé, dans notre cas des cellules HEK293. L'affinité de ces ligands a été déterminée dans divers types cellulaires tel que rapporté dans la littérature (Ogilvie et al. 2003; Parody and Stone 2004). Il est possible que CCR2 forme des hétérodimères avec les récepteurs endogènes non identifiés de CCL24 ou CCL26, ce qui affecterait leur affinité pour CCR2 (Springael et al. 2006). Notamment, ces deux chimiokines n'ont donné lieu à aucun signal dans nos systèmes expérimentaux. Pour cette raison, nous avons décidé de ne pas les inclure dans la suite de notre travail.

Contrairement au travail rapporté sur les mutants de CXCR4, nous avons non seulement mesuré les activités G α i induites par les différents ligands, mais rapportons pour la première fois les effets de ces différents ligands sur le recrutement de la beta-arrestine au récepteur. Notamment, nous avons mesuré l'effet de la PTX sur le recrutement de la beta-arrestine à CCR2, afin de déterminer si le recrutement de l'arrestine dépend de l'activation des protéines G α i. Enfin, nous avons étudié l'effet des ligands sur l'internalisation du récepteur.

L'interaction CCR2/ beta-arrestine

Grâce au BRET, nous avons mesuré le recrutement de la beta-arrestine à CCR2 suite à la stimulation avec ses cinq différents ligands (*Figures 2A, 2B*) (Berchiche et al. 2011). En absence de ligand, nous ne rapportons aucun signal BRET, ce qui suggère que le récepteur et la beta-arrestine n'interagissent pas de façon constitutive. Nous mesurons différentes réponses significatives pour les

différents ligands, à l'exception de CCL11, qui n'induit aucune réponse fonctionnelle. Les différentes efficacités de BRET pourraient être expliquées par des différences d'affinités du complexe ligand/récepteur pour la beta-arrestine et une plus grande quantité de beta-arrestine recrutée. Par contre, il est aussi possible qu'elles reflètent les différentes conformations des complexes récepteur/beta-arrestine, qui affectent l'efficacité du BRET car elles donnent lieu à différentes distances et/ou orientations des fluorophores. Malgré cela, les différents ligands donnent lieu à différentes réponses. Notamment, les différences d'efficacité de recrutement de la beta-arrestine, permettent de mettre en évidence que les chimiokines CCL7, CCL8 et CCL13 sont des agonistes partiels, du moins pour le recrutement de la beta-arrestine. Ces ligands donnent lieu à des réponses inférieures à la réponse maximale, et cela malgré un taux d'occupation complet du récepteur (*Tableau I*) (Berchiche et al. 2011). Nous montrons ainsi que les effets des différents ligands de CCR2 sur le recrutement de la beta-arrestine sont différents les uns des autres. Aussi, la comparaison du recrutement de la beta-arrestine 1 et 2 montre que les ligands n'induisent pas de recrutement préférentiel significatif au récepteur sauf peut-être à l'exception de CCL13 qui montre une préférence pour la beta-arrestine 2 (*Figures 2A, 2B et Tableau I*) (Berchiche et al. 2011). Toutefois, CCL13 n'induit pas de recrutement important (ni en puissance ni en efficacité) et cela peu importe la beta-arrestine étudiée (*Figures 2A, 2B*) (Berchiche et al. 2011).

Le recrutement de la beta-arrestine à 37°C est très rapide mais à cette température il est difficile d'apprécier sa cinétique. À cet effet, nous avons effectué une série d'expériences de cinétique de recrutement de la beta-arrestine 2 à la température de la pièce. La réponse à CCL2 est rapide, contrairement à la réponse de CCL13 qui est très lente (*Figure 3A*). Nous nous sommes aussi intéressés à la stabilité de l'interaction CCR2/ beta-arrestine 2 en fonction du temps. À cet effet, nous avons stimulé les cellules exprimant les fusions BRET de CCR2 et de la beta-arrestine 2 à la température de la pièce suivie d'une incubation à 37°C pour différentes périodes de temps avant de mesurer le signal BRET (*Figure 3B*). Le faible signal de CCL8 est stable. Le signal BRET suite à la stimulation avec la chimiokine CCL7 est diminué avec le temps de demi-vie le plus court, tandis que la réponse à CCL2 est rapide et de longue durée, tout comme celles générées par CCL8

et CCL13 (*Figures 3A, 3B*). Il est à noter que le signal généré par CCL7 correspond à une courbe de diminution exponentielle monophasique, contrairement à celle de CCL13 qui elle correspond à une courbe biphasique car le signal BRET augmente de façon transitoire durant l'incubation à 37°C suivie d'un signal stable. Nous avons observé des réponses semblables lors des expériences de recrutement de la beta-arrestine 1 (Berchiche et al. 2011).

Les effets des ligands sur le recrutement de la beta-arrestine à CCR2 nous ont amenés à nous questionner quant à leur effet sur l'internalisation du récepteur, car tel que mentionné dans l'introduction de cette thèse, la beta-arrestine joue un rôle important dans l'internalisation des récepteurs de chimiokine (Busillo and Benovic 2007). Les expériences d'internalisation montrent que les différents ligands de CCR2 induisent son internalisation de façon dépendante du ligand. La chimiokine CCL2 étant le ligand qui donne lieu à l'internalisation la plus marquée du récepteur, suivie de CCL7, CCL8 et CCL13 respectivement. La corrélation entre l'efficacité du recrutement de la beta-arrestine avec un taux d'endocytose maximal suggère que l'endocytose de CCR2 serait un processus dépendant de l'arrestine. Aussi, l'efficacité de recrutement de la beta-arrestine est «réelle» et n'est pas uniquement un effet conformationnel.

Les résultats obtenus avec CCL2 corrélaient avec ce qui a été rapporté par la littérature (Aragay et al. 1998; Garcia Lopez et al. 2009). En effet, Garcia Lopez et al. concluent qu'en présence de CCL2, la stabilité du signal place CCR2B dans la classe B, parmi les récepteurs dont le recyclage à la membrane plasmique est lent. Toutefois, nous montrons que les caractéristiques de l'interaction CCR2/arrestine dépendent du ligand utilisé et que différents ligands de CCR2 donnent lieu à différents résultats. Des observations similaires sont rapportées pour les récepteurs CCR7 et CXCR7 (Kohout et al. 2004; Rajagopal et al. 2010). Cela suggère qu'un récepteur de chimiokine n'appartient pas à la classe A ou B, mais que ses caractéristiques dépendent aussi de l'agoniste présent.

L'activité G α i induite par les ligands

Nous avons aussi mesuré l'effet des différents ligands sur l'activation de la protéine G α i, un évènement en amont du recrutement de la beta-arrestine, afin de déterminer s'il existe une corrélation entre ces deux activités. L'activité G α i est mesurée grâce à un système BRET décrit précédemment (Gales et al. 2005; Gales et al. 2006). En bref, le signal BRET est mesuré entre la protéine G α i fusionnée au donneur (RLuc) et l'accepteur (YFP) fusionné à CCR2. La particularité de ce système réside dans le fait que le donneur est fusionné à trois différentes positions de la protéine G α i1, ce qui donne lieu à trois différentes fusions avec la protéine G α i (Galès et al, 2005). Ces outils ont permis de montrer que les 7TMRs peuvent faire partie de complexes préformés incluant le récepteur et les protéines G hétérotrimériques. Notamment, les auteurs rapportent que les changements de BRET, induits par les ligands, dans des complexes 7TRM/G α i, indiquent des changements de conformation dans le complexe préformé qui corrèlent avec l'activation de la protéine G α i (Gales et al. 2005).

Grâce à ce système, nous détectons un signal BRET en absence de ligand entre la protéine G α i1-RLuc et CCR2-YFP, ce qui est accord avec l'existence de complexes préformés et persistants décrit pour plusieurs 7TMRs (Dupre and Hebert 2006). La stimulation avec les différents ligands induit une diminution du signal dans ce système BRET. La réponse du rapporteur G α i1-RLuc122 est la plus importante, suivie d'une plus faible mais similaire réponse de la fusion G α i1-RLuc91, tandis que le signal de la fusion G α i1-RLuc60 est très faible. Le traitement avec les ligands agonistes de CCR2 mène à une diminution de BRET, supérieure à 50%, avec les rapporteurs G α i1-RLuc91 et G α i1-RLuc122. Toutefois, Galès et al. montrent que la stimulation du récepteur α 2A⁻adrénergique induit une augmentation de BRET avec la fusion G α i1-RLuc91 et une diminution avec la protéine G α i1-RLuc122 (Gales et al. 2006). La position de la protéine G α i par rapport à la partie C-terminale des différents récepteurs, pourrait expliquer cette différence. Notons aussi que l'amplitude des changements de BRET mesurés avec les agonistes de CCR2 est supérieure à celle montrée pour le récepteur α 2A-adrénergique (Gales et al. 2006).

La stimulation avec des doses croissantes d'agoniste a permis d'obtenir des courbes de dose/réponse sigmoïdales pour les rapporteurs G α i1-RLuc122 et G α i1-RLuc91 en présence de CCR2-YFP (*Figures 5A et 5B*). Les puissances déduites de ces courbes sont semblables pour les deux rapporteurs. Néanmoins, les différentes efficacités des agonistes tirés à partir des courbes G α i1-RLuc91/CCR2-YFP ne sont pas statistiquement différentes, fort probablement à cause de la faiblesse du signal de ce couple BRET (*Tableau I*). De manière générale, les efficacités et les puissances des agonistes dans ce système BRET G α i1, corrèlent avec celles observées pour le recrutement de la beta-arrestine (*Tableau I*) (Berchiche et al. 2011).

Les travaux de Galès et al. montrent que les efficacités mesurées en BRET corrèlent avec la production d'AMPc (Gales et al. 2005). À cet effet, nous avons mesuré la production d'AMPc par BRET grâce au rapporteur RLucIII-EPAC-GFP10 (Jiang et al. 2007; Leduc et al. 2009). Les courbes dose/réponse tracées suite à la stimulation avec CCL2 et CCL8 montrent qu'elles inhibent la production de l'AMPc, induite par la forskoline, avec différentes efficacités (*Figure 5F*). Cette observation supporte l'idée selon laquelle les différents ligands induisent différents changements dans le complexe récepteur/protéine G qui donnent lieu à différentes efficacités d'activation de la protéine G α i1. Notre conclusion est en accord avec celles tirées à partir des travaux de Galès et al. ainsi que ceux de Nikolaev et al. concernant les bases moléculaires de l'agonisme partiel (Gales et al. 2005; Nikolaev et al. 2006). Les résultats de Nikolaev et al. indiquent que différents agonistes, complets et partiels, du récepteur α 2A-adrénergique induisent des réarrangement de conformations dépendantes des ligands, qui contrôlent l'efficacité de l'activation de la protéine G (Nikolaev et al. 2006).

Le recrutement de la beta-arrestine dépend-t-il de l'activation de G α i ?

L'ordre des efficacités et puissances des différents ligands sont comparables tant pour le recrutement de la beta-arrestine que pour l'activité G α i1. À cet effet, nous avons testé la sensibilité à la PTX dans les deux systèmes expérimentaux, afin de déterminer si le recrutement de la beta-arrestine est la conséquence de l'activation de la protéine G α i1. L'inhibition par les agonistes de la production de l'AMPc,

induite par la forskoline, est complètement abolie en présence de PTX (*Figure 6A*). Cependant, le recrutement de la beta-arrestine 2 à CCR2 induit par CCL2 est résistant à la PTX (*Figure 6B*), ce qui supporte la conclusion que l'internalisation de CCR2 dépend de l'arrestine. Rappelons que l'internalisation de CCR2 induite par CCL2 est rapportée dans la littérature comme étant résistante à la PTX (Garcia Lopez et al. 2009). Notamment, le traitement avec la PTX inhibe de moitié le recrutement de la beta-arrestine 2 à CCR2, induit par CCL7 et CCL13, tandis que le signal induit par CCL8 est trop faible et ne permet pas de tirer des conclusions concernant cette chimiokine. Ainsi, nos expériences montrent que le recrutement de la beta-arrestine induit par la chimiokine CCL2 est PTX résistant, tout comme l'endocytose de CCR2 induite par CCL2 (Garcia Lopez et al. 2009).

Les efficacités de recrutement de la beta-arrestine sont similaires aux efficacités d'activation de la protéine $G\alpha_i$. Malgré cela, la résistance au traitement avec la PTX de la réponse beta-arrestine induite par CCL2, suggère que le recrutement de la β -arrestine n'est pas simplement la conséquence de l'activation de la protéine $G\alpha_i$. Pour CCL2, le recrutement de la beta-arrestine pourrait être complètement indépendant de la protéine G ou bien dépendre de l'activation d'une ou de plusieurs sous-unités $G\alpha$ autres que $G\alpha_i$. En effet, plusieurs travaux montrent que CCR2 peut coupler avec différentes sous-unités $G\alpha$ dont $G\alpha_q$, $G\alpha_{14}$ et $G\alpha_{16}$ qui sont rapportés dans la littérature (Kuang et al. 1996; Tian et al. 2008). Le recrutement de la beta-arrestine 2 possède une sensibilité à la PTX qui varie en fonction du ligand appliqué et supporte l'hypothèse selon laquelle, différents ligands sélectionnent ou montrent une préférence à CCR2 lorsque ce dernier est associé avec une protéine $G\alpha$ différente. Cette hypothèse est aussi supportée par l'observation selon laquelle, la chimiotaxie induite par CCL8 des cellules PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) et des cellules transfectées HEK293-CCR2B est en partie sensible à la cholera toxine (CTX), inhibitrice de l'activation de la protéine $G\alpha_s$, et cela à l'opposé de la chimiotaxie induite par CCL2, CCL7 ou CCL13 (Sozzani et al. 1994; O'Boyle et al. 2007).

Agonistes partiels de CCR2

Nous montrons que les ligands de CCR2, à l'exception de CCL2, sont des agonistes partiels dans les systèmes étudiés. Cela est particulièrement frappant pour CCL8, un ligand puissant mais peu efficace dans nos systèmes. Les implications fonctionnelles de l'agonisme partiel varient en fonction du taux d'expression de CCR2 dans les différents types cellulaires. En effet, elles dépendent de la densité et l'efficacité du couplage du récepteur qui à leur tour dépendent du taux d'expression du récepteur et des molécules de signalisation intracellulaire impliquées. Le récepteur CCR2 possède un taux d'expression relativement bas sur les cellules monocytaires (entre 3000 et 4000 molécules par cellules sont rapportées) (Mine et al. 2006), mais ce nombre peut augmenter de façon drastique sur les cellules NK (Hanna et al. 2005) et les cellules T (Amoura et al. 2003) dans des conditions pathologiques. Nos expériences sont effectuées dans des cellules HEK293 transfectées qui expriment environ 2000 récepteurs à la membrane plasmique par cellule, tel que déterminé grâce à des billes fluorescentes de standardisation. Nous avons mesuré le nombre de récepteurs/cellule afin de montrer que nous ne sur-exprimons pas CCR2 dans nos conditions expérimentales et qu'il est possible de corrélérer le nombre de récepteurs déterminé grâce aux billes fluorescentes avec le nombre de récepteurs présents à la surface des cellules du sang de façon endogène. Cette mesure a été effectuée sur des cellules transfectées avec le récepteur CCR2 sans fusion BRET. Il est envisageable que les agonistes partiels de CCR2 affectent différemment différentes cellules exprimant CCR2 et que ces agonistes partiels se comportent en agonistes complets en présence d'une grande quantité de récepteur de réserve. Un lien entre le taux d'expression du récepteur et la réponse à différentes chimiokines a été montré pour les cellules Th1 et Th2, en réponse aux ligands (CCL17 et CCL22) du récepteur CCR4 (D'Ambrosio et al. 2002).

Également, nous observons différentes conformations de l'homodimère CCR2 stabilisées par différentes chimiokines, grâce au système BRET décrit préalablement (Percherancier et al. 2005). Ces différences en BRET ne sont probablement pas causées par un effet conformationnel de l'interaction récepteur/ligand, mais impliqueraient d'autres composantes du complexe de signalisation de CCR2. En principe, les différences entre l'équilibre entre une

conformation active et une conformation inactive du récepteur pourraient expliquer l'agonisme partiel des ligands de CCR2 grâce aux modèles classiques d'activation des récepteurs. Cependant, la stabilisation intrinsèque de différentes conformations par différents ligands est une autre façon d'expliquer l'agonisme partiel. Cette dernière possibilité est supportée par les résultats obtenus par exemple, pour le récepteur α 2a-adrénérique (Nikolaev et al. 2006). Ce modèle est aussi en accord avec le concept de sélectivité fonctionnelle, selon lequel différentes conformations sont stabilisées par différents ligands et peuvent non seulement mener à des efficacités de réponses différentes, mais aussi à des réponses qualitativement différentes dans différentes voies de signalisations indépendantes (Urban et al. 2007).

Propriétés des ligands de CCR2

Une des caractéristiques de la sélectivité fonctionnelle est l'inversion dans l'ordre d'efficacité ou de puissance de ligands dans un système expérimental. Nous n'observons pas ce type d'inversion dans nos systèmes expérimentaux. Néanmoins, les ordres d'efficacité que nous mesurons corrélerent avec les résultats obtenus en mesurant les flux calciques intracellulaires suite au traitement avec une dose unique de chimiokine rapporté dans la littérature (Combadiere et al. 1995; Martinelli et al. 2001). À partir des ordres d'efficacité et puissances mesurées pour CCR2 il est impossible de conclure qu'il y ait sélectivité fonctionnelle. Toutefois, les différences de sensibilité à la PTX ainsi que les taux de dissociation de la β -arrestine (perte du signal BRET) suggèrent qu'il existe aussi des différences qualitatives dans les réponses de CCR2 aux différentes chimiokines. Cette conclusion est aussi soutenue par la signalisation atypique de CCL11. En effet, CCL11 induit une réponse marginale de la protéine $G\alpha_i$, tel que rapporté dans la littérature (Martinelli et al. 2001; Ogilvie et al. 2001; Ogilvie et al. 2004). Toutefois, CCL11 activerait la cascade Erk1/2 grâce au recrutement de la PI3 kinase p85/p110, contrairement à CCL2 qui active PI3K γ (Ogilvie et al. 2004). Nos résultats suggèrent que ces cascades d'activation induites par CCL11 n'impliquent pas le recrutement de la β -arrestine.

Cela dit, grâce au système de cellules HEK293 reconstitué, nous montrons que les réponses de CCR2 aux différents ligands ne sont pas des réponses redondantes au niveau pharmacologique. Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature, notamment pour le récepteur CCR5 (Oppermann et al. 1999; Leach et al. 2007). À cet effet, l'absence de redondance fonctionnelle parmi les chimiokines liant le même récepteur, ne résulte pas uniquement de mécanismes complexes de régulations *in vivo*, mais fait partie de leurs propriétés pharmacologiques intrinsèques. En conséquence, l'étude d'un seul et unique ligand naturel par défaut comme agoniste prototype est insuffisant. Cela devient particulièrement relevant dans le cas de criblages de drogues qui possèdent comme point référence un seul agoniste. Les petites molécules ciblant les récepteurs de chimiokines sont souvent des ligands allostériques à cause de la taille considérable des ligands naturels. Cela suggère que cibler CCR2 avec de petites molécules peut avoir des effets variés qui dépendent des différents ligands naturels du récepteur. Il est donc possible de se questionner quand aux effets (avantage ou désavantage), par exemple dans un contexte clinique, de ce type de ligand allostérique (Kenakin 2004; Kenakin 2008)

CXCR7, le récepteur alternatif de SDF-1

Dans le dernier travail présenté dans le cadre de cette thèse, nous rapportons que le bicyclam AMD3100, connu comme modulateur négatif de l'interaction CXCR4/SDF-1 est aussi, tout comme SDF-1, un ligand alternatif du récepteur CXCR7. Les ligands allostériques peuvent aussi avoir une activité intrinsèque sur une ou plusieurs voies de signalisation en absence du ligand orthostérique. Dans ce cas, ils sont considérés comme étant des modulateurs allostériques agonistes (Schwartz and Holst 2006).

Nous mesurons la liaison de SDF-1 à CXCR7 dans des essais de radioliation. La liaison de SDF-1 à CXCR7 en présence d'AMD3100 est augmentée, ce qui exclue que les deux ligands interagissent avec CXCR7 au même site, comme le ferait un ligand orthostérique. Cela supporte l'idée qu'AMD3100 lie CXCR7 sur un site allostérique (*Figure 4*) (Kalatskaya et al. 2009). Aussi, grâce au BRET, nous mesurons les changements conformationnels, induit par les ligands, au sein de

l'homodimère CXCR7 constitutif (*Figures 1, 2*). L'effet maximal de SDF-1 sur la conformation de l'homodimère CXCR7 est augmenté de 40% en présence d'AMD3100. Le BRET permet d'apprécier l'augmentation de l'efficacité de SDF-1 en présence d'AMD3100 qui se traduit par une conformation différente de l'homodimère CXCR7 en présence des deux ligands par rapport à celle mesurée en présence de SDF-1 seul (*Figure 3*). Notamment, AMD3100 augmente peu, mais de façon très reproductible la puissance du recrutement de la beta-arrestine 2 à CXCR7 induite par SDF-1. Cette observation met en évidence la nature allostérique de la liaison d'AMD3100 à CXCR7 (*Figure 5C*) (Kalatskaya et al. 2009). Également, ces propriétés d'agoniste d'AMD3100 sont aussi mises à l'avant plan par sa capacité de recruter la beta-arrestine à CXCR7 en absence de SDF-1 (*Figure 5A*) (Kalatskaya et al. 2009). Dans ce contexte, AMD3100 agirait comme un ligand allostérique agoniste sur CXCR7 (Schwartz and Holst 2006).

L'existence d'agonistes allostériques spécifiques aux récepteurs de chimiokine est désormais bien documenté (Allegretti et al. 2008). Les modèles opérationnels dérivés incluent l'effet de doses croissantes d'un modulateur allostérique sur les courbes de dose réponse d'agonistes orthostériques ainsi qu'une série de paramètres indépendants grâce auxquels les ligands allostériques modulent les propriétés des ligands orthostériques (Ehlert 2005; Kenakin 2005; Kenakin et al. 2006). Ces paramètres incluent les effets indépendants du modulateur allostérique sur l'affinité et l'efficacité du ligand orthostérique de façon à ce que chaque paire de modulateur et de ligand étudiés pour une voie de signalisation ait un effet unique en soit. Ainsi, un complexe formé du ligand/modulateur/récepteur stabiliserait une conformation spécifique et l'effet de cette modulation serait unique pour un récepteur et pour la voie de signalisation étudiée. Ce phénomène est nommé sélectivité fonctionnelle (Urban et al. 2007). Le modèle opérationnel illustre que l'effet du ligand allostérique sur la signalisation dépend de la sonde utilisée (Kenakin 2005). À cet effet, Jensen et al. montrent qu'un petit modulateur allostérique agoniste agit en modulateur positif ou négatif sur le récepteur CCR1 et cela en fonction du ligand endogène appliqué (Jensen et al. 2008). Dans le cas d'AMD3100, nous observons que le ligand se comporte différemment sur CXCR4 et CXCR7 en présence de SDF-1.

Malgré que nous montrons qu'AMD3100 se comporte en agoniste allostérique lorsqu'il interagit avec CXCR7, nos résultats ne permettent pas de tirer des conclusions définitives quant à son effet sur CXCR4. Contrairement à nos observations sur CXCR7, nous n'observons aucun effet d'AMD3100 sur la liaison de SDF-1¹¹²⁵ à CXCR4 sauf à des concentrations très élevées de compétiteur froid (*Figure 4A, Tableau III*). Toutefois, à une concentration de 10 μ M l'AMD3100 module la réponse à SDF-1 de l'homodimère CXCR4, tel qu'observé en BRET (*Figure 4A, Tableau II*) (Kalatskaya et al. 2009). Le mécanisme par lequel AMD3100 interfère avec la liaison de SDF-1 à CXCR4 et avec l'activité de CXCR4 reste un sujet de débat à cause de sa complexité. À ce jour, aucune étude utilisant de l'AMD3100 radiomarké dans des expériences de compétition de radioliasion homologue n'est rapporté. Les résultats rapportés des essais de compétition en radioliasion utilisant SDF-1 radiomarké et AMD3100 froid sont souvent divergents. Par exemple, Allegretti et al. se réfèrent à AMD3100 comme étant un inhibiteur allostérique de CXCR4 (Allegretti et al. 2008).

Ainsi, nous montrons pour la première fois que l'AMD3100 est aussi un ligand du récepteur CXCR7, ce qui invite à réexaminer la sélectivité de ce bicyclame. Plusieurs équipes, ont auparavant décrit l'AMD3100 comme étant hautement sélectif pour le récepteur CXCR4 (Labrosse et al. 1998; Hatse et al. 2002). Toutefois, CXCR7 ne faisait pas partie de ces études. La découverte que CXCR7 est aussi un récepteur de SDF-1 implique que les conclusions tirées des effets biologiques attribués à SDF-1 et CXCR4 devraient être revues. Le fait de bloquer CXCR4 ou CXCR7 avec des inhibiteurs sélectifs permettrait de mieux disséquer les effets de SDF-1. L'AMD3100 était un candidat de choix permettant de montrer les rôles de CXCR4 (Cabioglu et al. 2005; Pattarozzi et al. 2008). Nos résultats appellent à la prudence quant à l'utilisation d'AMD3100 pour disséquer les rôles de CXCR4 et CXCR7 comme médiateurs des effets biologiques de SDF-1.

Conclusion

Depuis les 30 dernières années, plusieurs modèles pharmacologiques ont été proposés et modifiés afin d'expliquer l'activation des 7TMRs et d'accommoder les nouvelles observations expérimentales. Dans un premier temps, il y a eu le modèle du complexe ternaire et ses dérivés, puis le modèle de liaison séquentielle ainsi que le modèle probabiliste suggérant qu'il existe un nombre illimité de conformations qu'un récepteur peut adopter. Ce dernier modèle permet d'accommoder le concept de sélectivité fonctionnelle selon lequel différents ligands peuvent induire différentes réponses signalétiques via un même récepteur, et qu'un récepteur peut adopter différentes conformations actives.

Dans le cadre de cette thèse, nous montrons d'abord que des conformations hétérogènes de CXCR4 peuvent donner lieu à des activités $G\alpha_i$ similaires, ce qui suggère une flexibilité des récepteurs actifs qui ne peut être accommodée par le modèle du complexe ternaire et ses dérivés. Une meilleure compréhension de la relation entre la conformation et la fonction de CXCR4 pourrait servir afin de mieux cibler ce récepteur d'un grand intérêt thérapeutique. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs compétitifs de SDF-1 liant CXCR4 mène dans la plupart des cas à des effets secondaires qui rendent impossible leur utilisation comme traitement à long terme, comme par exemple contre l'entrée du VIH-1. Nos résultats suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs allostériques non compétitifs qui modulent la conformation du récepteur et ne bloquent pas complètement ce dernier, permettrait de moduler et maintenir les fonctions vitales de CXCR4 en bloquant ces autres propriétés telles que celle de corécepteur à l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles.

Par ailleurs, l'accumulation de données expérimentales a amené à revoir les définitions pharmacologiques classiques attribuées aux ligands. À l'origine les ligands étaient divisés en agonistes, qui stimulent les récepteurs et en antagonistes, qui inhibent l'activité des récepteurs. L'observation de l'activité constitutive basale des récepteurs a permis de montrer qu'il existe aussi des agonistes inverses. Ensuite, l'activité attribuée à un ligand est montrée comme étant dépendante du contexte cellulaire. En effet, un ligand peut agir comme un agoniste complet dans un modèle expérimental, mais peut aussi agir comme un agoniste partiel dans un autre modèle.

Aussi, l'existence de complexes de signalisation incluant récepteur et protéine G hétérotrimérique est aussi montrée.

Nous montrons pour la première fois l'effet des différents ligands de CCR2 sur le recrutement de la beta-arrestine au récepteur. Nous montrons aussi que ces chimiokines ne sont pas pharmacologiquement redondantes, du moins pour les voies de signalisation étudiées. Ainsi, CCL2 est un agoniste complet tandis que CCL7, CCL8 et CCL13 se comportent comme des agonistes partiels de CCR2. Nos résultats non seulement supportent la notion selon laquelle des ligands naturels, tout comme des ligands synthétiques, peuvent avoir des propriétés de signalisation différentes intrinsèques, mais supportent aussi le concept de sélectivité fonctionnelle en tant que mécanisme d'activité général des 7TMRs.

Enfin, nous montrons pour la première fois que l'AMD3100, un antagoniste de CXCR4, est un modulateur allostérique positif du récepteur CXCR7. Nous montrons également, qu'en réponse à SDF-1 et AMD3100, CXCR7 induit le recrutement de la beta-arrestine 2, montrant qu'il peut induire une signalisation intracellulaire. Le fait qu'AMD3100 est aussi un ligand de CXCR7, appelle à la prudence quant à l'utilisation des molécules ciblant CXCR4 afin de disséquer le rôle de ces deux récepteurs dans la signalisation de SDF-1.

Nos résultats amènent des évidences de l'existence de différentes conformations actives des récepteurs. Une meilleure compréhension de l'implication de ces conformations dans les activités de signalisation permettra de mieux cibler, grâce à des ligands allostériques, les fonctions des récepteurs impliquées dans les pathologies sans toutefois trop affecter leurs fonctions physiologiques.

Perspectives

Plusieurs perspectives découlent des travaux présentés dans cette thèse. Premièrement, mieux caractériser les propriétés de signalisation de CXCR4, autres que l'activité $G\alpha_i$, permettrait de déterminer l'effet des conformations stabilisées par les différentes mutations introduites, sur d'autres voies de signalisation. À cet effet, nous disposons de résultats préliminaires qui montrent que SDF-1 induit un patron de recrutement de la beta-arrestine 2 aux récepteurs mutants différent de l'activation de la protéine $G\alpha_i$. Cela suggère que les différentes conformations de CXCR4 peuvent activer la signalisation de façon distincte en fonction de la voie étudiée et supporterait les modèles d'activation des récepteurs qui prennent en considération leur flexibilité conformationnelle.

Ensuite, la caractérisation des effets des différents ligands sur CCR2 est nécessaire afin de mieux comprendre leurs caractéristiques intrinsèques, ce qui permettra éventuellement de mieux cibler CCR2 dans un contexte thérapeutique. En conséquence, l'une des questions à poser devient : Est-ce que les réponses induites par les différents ligands dépendent de l'assemblage de CCR2 dans différents complexes de signalisation incluant différentes protéines $G\alpha$? Et si tel est le cas : Est-ce que les ligands ont différentes affinités pour différents complexes comprenant CCR2 et une protéine $G\alpha$? Nous essayons d'abord d'apporter des réponses à la deuxième question. À cet effet, nous avons fusionné le récepteur CCR2 aux différentes protéines $G\alpha$ et nous mesurons les affinités des ligands aux différentes fusions grâce à des expériences de radiolisation. Ces affinités permettront de sélectionner les protéines $G\alpha$ qui modulent l'affinité des ligands et d'étudier l'effet des ligands de CCR2 sur la signalisation activée par ces protéines $G\alpha$. Ceci permettra d'identifier et caractériser des complexes signalétiques « préférés » par les différents ligands de CCR2 et permettra éventuellement dans un contexte thérapeutique de cibler CCR2 dans des complexes signalétiques spécifiques.

Finalement, mieux caractériser la spécificité des autres ligands de CXCR4 pour CXCR7 est importante afin de trouver des outils permettant d'étudier le rôle de ces deux récepteurs dans les fonctions de SDF-1. Les résultats obtenus au laboratoire

montrent que, tout comme l'AMD3100, TC14012 est aussi un ligand de CXCR7 qui induit non seulement le recrutement de la beta-arrestine au récepteur mais aussi la phosphorylation des ERK1/2. Les observations que des ligands ciblant à l'origine CXCR4 sont aussi des ligands de CXCR7 incite à identifier les déterminants moléculaires spécifiques responsables des différents effets de l'AMD3100 et de TC14012 sur les récepteurs de SDF-1.

Références

Acharya, S. and S. S. Karnik (1996). "Modulation of GDP release from transducin by the conserved Glu134-Arg135 sequence in rhodopsin." J Biol Chem **271**(41): 25406-11.

Ahuja, S. K., J. C. Lee and P. M. Murphy (1996). "CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct." J Biol Chem **271**(1): 225-32.

Ai, L. S. and F. Liao (2002). "Mutating the four extracellular cysteines in the chemokine receptor CCR6 reveals their differing roles in receptor trafficking, ligand binding, and signaling." Biochemistry **41**(26): 8332-41.

Aiuti, A., M. Taviani, A. Cipponi, F. Ficara, E. Zappone, J. Hoxie, B. Peault and C. Bordignon (1999). "Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors." Eur J Immunol **29**(6): 1823-31.

Alewijnse, A. E., H. Timmerman, E. H. Jacobs, M. J. Smit, E. Roovers, S. Cotecchia and R. Leurs (2000). "The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H(2) receptor." Mol Pharmacol **57**(5): 890-8.

Allegretti, M., R. Bertini, C. Bizzarri, A. Beccari, A. Mantovani and M. Locati (2008). "Allosteric inhibitors of chemoattractant receptors: opportunities and pitfalls." Trends Pharmacol Sci **29**(6): 280-6.

Allen, S. J., S. E. Crown and T. M. Handel (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." Annu Rev Immunol **25**: 787-820.

Aman, A. and T. Piotrowski (2008). "Wnt/beta-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression." Dev Cell **15**(5): 749-61.

Amoura, Z., C. Combadiere, S. Faure, C. Parizot, M. Miyara, D. Raphael, P. Ghillani, P. Debre, J. C. Piette and G. Gorochoff (2003). "Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares." Arthritis Rheum **48**(12): 3487-96.

Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairret, D. Chelsky, M. Dennis and M. Bouvier (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3684-9.

Aragay, A. M., M. Mellado, J. M. Frade, A. M. Martin, M. C. Jimenez-Sainz, A. C. Martinez and F. Mayor, Jr. (1998). "Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2985-90.

Auger-Messier, M., M. Clement, P. M. Lanctot, P. C. Leclerc, R. Leduc, E. Escher and G. Guillemette (2003). "The constitutively active N111G-AT1 receptor for angiotensin II maintains a high affinity conformation despite being uncoupled from its cognate G protein Gq/11alpha." Endocrinology **144**(12): 5277-84.

Ayoub, M. A., C. Couturier, E. Lucas-Meunier, S. Angers, P. Fossier, M. Bouvier and R. Jockers (2002). "Monitoring of Ligand-independent Dimerization and Ligand-induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer." J. Biol. Chem. **277**(24): 21522-21528.

Ayoub, M. A., A. Levoye, P. Delagrangue and R. Jockers (2004). "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared to MT2 homodimers." Mol Pharmacol.

Babcock, G. J., M. Farzan and J. Sodroski (2003). "Ligand-independent Dimerization of CXCR4, a Principal HIV-1 Coreceptor." J. Biol. Chem. **278**(5): 3378-3385.

Bachelder, R. E., M. A. Wendt and A. M. Mercurio (2002). "Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4." Cancer Res **62**(24): 7203-6.

Balabanian, K., B. Lagane, S. Infantino, K. Y. Chow, J. Harriague, B. Moepps, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen and F. Bachelierie (2005). "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." J Biol Chem **280**(42): 35760-6.

Ballesteros, J. and H. Weinstein (1995). "Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relations in G-Protein-Coupled Receptors. ." Methods in Neuroscience **25**: 366-428.

Ballesteros, J. and H. Weinstein (1995). "Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relationships in G-protein-coupled receptors." Methods Neurosci **25**: 366-428.

Baribaud, F., T. G. Edwards, M. Sharron, A. BreLOT, N. Heveker, K. Price, F. Mortari, M. Alizon, M. Tsang and R. W. Doms (2001). "Antigenically distinct conformations of CXCR4." J Virol **75**(19): 8957-67.

Bartolome, R. A., B. G. Galvez, N. Longo, F. Baleux, G. N. Van Muijen, P. Sanchez-Mateos, A. G. Arroyo and J. Teixido (2004). "Stromal cell-derived factor-1 α promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities." Cancer Res **64**(7): 2534-43.

Beaulieu, J. M., S. Marion, R. M. Rodriguiz, I. O. Medvedev, T. D. Sotnikova, V. Ghisi, W. C. Wetsel, R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2008). "A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior." Cell **132**(1): 125-36.

Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, S. Marion, R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2005). "An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior." Cell **122**(2): 261-73.

Benkirane, M., D. Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup and K. T. Jeang (1997). "Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32." J Biol Chem **272**(49): 30603-6.

Berchiche, Y. A., K. Y. Chow, B. Lagane, M. Leduc, Y. Percherancier, N. Fujii, H. Tamamura, F. Bachelierie and N. Heveker (2007). "Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(α)_i activation." J Biol Chem **282**(8): 5111-5.

Berchiche, Y. A., S. Gravel, M. E. Pelletier, G. St-Onge and N. Heveker (2011). "Different effects of the different natural CC-chemokine receptor 2B (CCR2B) ligands on β -arrestin recruitment, G α _i signalling, and receptor internalization." Mol Pharmacol **79**(3):488-98

Berger, E. A., P. M. Murphy and J. M. Farber (1999). "Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease." Annu Rev Immunol **17**: 657-700.

Berkhout, T. A., H. M. Sarau, K. Moores, J. R. White, N. Elshourbagy, E. Appelbaum, R. J. Reape, M. Brawner, J. Makwana, J. J. Foley, D. B. Schmidt, C. Imburgia, D. McNulty, J. Matthews, K. O'Donnell, D. O'Shannessy, M. Scott, P. H. Groot and C. Macphee (1997). "Cloning, in vitro expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of the monocyte chemotactic protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B." J Biol Chem **272**(26): 16404-13.

Bermejo, M., J. Martin-Serrano, E. Oberlin, M. A. Pedraza, A. Serrano, B. Santiago, A. Caruz, P. Loetscher, M. Baggiolini, F. Arenzana-Seisdedos and J. Alcamí (1998). "Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains." Eur J Immunol **28**(10): 3192-204.

Berthouze, M., M. Ayoub, O. Russo, L. Rivail, S. Sicsic, R. Fischmeister, I. Berque-Bestel, R. Jockers and F. Lezoualc'h (2005). "Constitutive dimerization of human serotonin 5-HT₄ receptors in living cells." FEBS Lett **579**(14): 2973-80.

Bhandari, D., S. L. Robia and A. Marchese (2009). "The E3 ubiquitin ligase atrophin interacting protein 4 binds directly to the chemokine receptor CXCR4 via a novel WW domain-mediated interaction." Mol Biol Cell **20**(5): 1324-39.

Blanpain, C., B. J. Doranz, A. Bondue, C. Govaerts, A. De Leener, G. Vassart, R. W. Doms, A. Proudfoot and M. Parmentier (2003). "The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle." J Biol Chem **278**(7): 5179-87.

Blanpain, C., B. Lee, J. Vakili, B. J. Doranz, C. Govaerts, I. Migeotte, M. Sharron, V. Dupriez, G. Vassart, R. W. Doms and M. Parmentier (1999). "Extracellular cysteines of CCR5 are required for chemokine binding, but dispensable for HIV-1 coreceptor activity." J Biol Chem **274**(27): 18902-8.

Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1925-30.

Boldajipour, B., H. Mahabaleswar, E. Kardash, M. Reichman-Fried, H. Blaser, S. Minina, D. Wilson, Q. Xu and E. Raz (2008). "Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration." Cell **132**(3): 463-473.

Borroni, E. M., R. Bonecchi, C. Buracchi, B. Savino, A. Mantovani and M. Locati (2008). "Chemokine decoy receptors: new players in reproductive immunology." Immunol Invest **37**(5): 483-97.

Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-301.

Bouvier, M., N. Heveker, R. Jockers, S. Marullo and G. Milligan (2007). "BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better." Nat Methods **4**(1): 3-4; author reply 4.

Bradstock, K. F., V. Makrynika, A. Bianchi, W. Shen, J. Hewson and D. J. Gottlieb (2000). "Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers." Leukemia **14**(5): 882-8.

Bridger, G. J., R. T. Skerlj, S. Padmanabhan, S. A. Martellucci, G. W. Henson, S. Struyf, M. Witvrouw, D. Schols and E. De Clercq (1999). "Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-azamacrocycles that inhibit HIV-1 and HIV-2 replication by antagonism of the chemokine receptor CXCR4." J Med Chem **42**(19): 3971-81.

Burger, M., A. Glodek, T. Hartmann, A. Schmitt-Graff, L. E. Silberstein, N. Fujii, T. J. Kipps and J. A. Burger (2003). "Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells." Oncogene **22**(50): 8093-101.

Burns, J. M., B. C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M. E. Penfold, M. J. Sunshine, D. R. Littman, C. J. Kuo, K. Wei, B. E. McMaster, K. Wright, M. C. Howard and T. J. Schall (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." J Exp Med **203**(9): 2201-13.

Busillo, J. M. and J. L. Benovic (2007). "Regulation of CXCR4 signaling." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 952-63.

Byers, M. A., P. A. Calloway, L. Shannon, H. D. Cunningham, S. Smith, F. Li, B. C. Fassold and C. M. Vines (2008). "Arrestin 3 mediates endocytosis of CCR7 following ligation of CCL19 but not CCL21." J Immunol **181**(7): 4723-32.

Cabioglu, N., J. Summy, C. Miller, N. U. Parikh, A. A. Sahin, S. Tuzlali, K. Pumiglia, G. E. Gallick and J. E. Price (2005). "CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation." Cancer Res **65**(15): 6493-7.

Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, O. M. Tepper, N. Bastidas, M. E. Kleinman, J. M. Capla, R. D. Galiano, J. P. Levine and G. C. Gurtner (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." Nat Med **10**(8): 858-64.

Chandrasekar, B., S. Bysani and S. Mummidi (2004). "CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation." J Biol Chem **279**(5): 3188-96.

Charo, I. F., S. J. Myers, A. Herman, C. Franci, A. J. Connolly and S. R. Coughlin (1994). "Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2752-6.

Chen, Z., D. J. Dupre, C. Le Gouill, M. Rola-Pleszczynski and J. Stankova (2002). "Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. Role of the C terminus and the (D/N)PXXY motif." J Biol Chem **277**(9): 7356-62.

Cheng, Z. J., J. Zhao, Y. Sun, W. Hu, Y. L. Wu, B. Cen, G. X. Wu and G. Pei (2000). "beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4." J Biol Chem **275**(4): 2479-85.

Chensue, S. W., K. S. Warmington, N. W. Lukacs, P. M. Lincoln, M. D. Burdick, R. M. Strieter and S. L. Kunkel (1995). "Monocyte chemotactic protein expression during schistosome egg granuloma formation. Sequence of production, localization, contribution, and regulation." Am J Pathol **146**(1): 130-8.

Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka and R. C. Stevens (2007). "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor." Science **318**(5854): 1258-65.

Cheung, R., M. Malik, V. Ravyn, B. Tomkowicz, A. Ptasznik and R. G. Collman (2009). "An arrestin-dependent multi-kinase signaling complex mediates MIP-1beta/CCL4 signaling and chemotaxis of primary human macrophages." J Leukoc Biol **86**(4): 833-45.

Chute, J. P. (2006). "Stem cell homing." Curr Opin Hematol **13**(6): 399-406.

Cohen, G. B., T. Yang, P. R. Robinson and D. D. Oprian (1993). "Constitutive activation of opsin: influence of charge at position 134 and size at position 296." Biochemistry **32**(23): 6111-5.

Colobran, R., R. Pujol-Borrell, M. P. Armengol and M. Juan (2007). "The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity." Clin Exp Immunol **148**(2): 208-17.

Colobran, R., R. Pujol-Borrell, M. P. Armengol and M. Juan (2007). "The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility." Clin Exp Immunol **150**(1): 1-12.

Combadiere, C., S. K. Ahuja, J. Van Damme, H. L. Tiffany, J. L. Gao and P. M. Murphy (1995). "Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B." J Biol Chem **270**(50): 29671-5.

Comerford, I. and R. J. Nibbs (2005). "Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors?" Immunol Lett **96**(2): 163-74.

Conn, P. J., A. Christopoulos and C. W. Lindsley (2009). "Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders." Nat Rev Drug Discov **8**(1): 41-54.

Cotecchia, S., F. Fanelli and T. Costa (2003). "Constitutively active G protein-coupled receptor mutants: implications on receptor function and drug action." Assay Drug Dev Technol **1**(2): 311-6.

Crump, M. P., J. H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier, M. Baggiolini, B. D. Sykes and I. Clark-Lewis (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." Embo J **16**(23): 6996-7007.

Cushing, S. D., J. A. Berliner, A. J. Valente, M. C. Territo, M. Navab, F. Parhami, R. Gerrity, C. J. Schwartz and A. M. Fogelman (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 5134-8.

D'Ambrosio, D., C. Albanesi, R. Lang, G. Girolomoni, F. Sinigaglia and C. Laudanna (2002). "Quantitative differences in chemokine receptor engagement generate diversity in integrin-dependent lymphocyte adhesion." J Immunol **169**(5): 2303-12.

Dar, A., O. Kollet and T. Lapidot (2006). "Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice." Exp Hematol **34**(8): 967-75.

Darash-Yahana, M., E. Pikarsky, R. Abramovitch, E. Zeira, B. Pal, R. Karplus, K. Beider, S. Avniel, S. Kasem, E. Galun and A. Peled (2004). "Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis." Faseb J **18**(11): 1240-2.

Datema, R., L. Rabin, M. Hincenbergs, M. B. Moreno, S. Warren, V. Linnquist, B. Rosenwirth, J. Seifert and J. M. McCune (1996). "Antiviral efficacy in vivo of the anti-human immunodeficiency virus bicyclam SDZ SID 791 (JM 3100), an inhibitor of infectious cell entry." Antimicrob Agents Chemother **40**(3): 750-4.

De Clercq, E. (2003). "The bicyclam AMD3100 story." Nat Rev Drug Discov **2**(7): 581-7.

De Clercq, E. (2005). "Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100." Mini Rev Med Chem **5**(9): 805-24.

De Clercq, E. (2010). "Highlights in the discovery of antiviral drugs: a personal retrospective." J Med Chem **53**(4): 1438-50.

De Lean, A., J. M. Stadel and R. J. Lefkowitz (1980). "A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor." J Biol Chem **255**(15): 7108-17.

Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini and B. E. Sawaya (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-26.

DeWire, S. M., S. Ahn, R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy (2007). "Beta-arrestins and cell signaling." Annu Rev Physiol **69**: 483-510.

Di Salvo, J., G. E. Koch, K. E. Johnson, A. D. Blake, B. L. Daugherty, J. A. DeMartino, A. Sirotna-Meisher, Y. Liu, M. S. Springer, M. A. Cascieri and K. A. Sullivan (2000). "The CXCR4 agonist ligand stromal derived factor-1 maintains high affinity for receptors in both Galpha(i)-coupled and uncoupled states." Eur J Pharmacol **409**(2): 143-54.

Donzella, G. A., D. Schols, S. W. Lin, J. A. Este, K. A. Nagashima, P. J. Maddon, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, G. Henson, E. De Clercq and J. P. Moore (1998). "AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor." Nat Med **4**(1): 72-7.

Duarte, R. F., B. E. Shaw, P. Marin, P. Kottaridis, M. Ortiz, C. Morante, J. Delgado, J. Gayoso, R. Goterriz, C. Martinez-Chamorro, J. J. Mateos-Mazon, C. Ramirez, J. de la Rubia, H. Achtereekte, P. J. Gandhi, K. W. Douglas and N. H. Russell (2010). "Plerixafor plus granulocyte CSF can mobilize hematopoietic stem cells from multiple myeloma and lymphoma patients failing previous mobilization attempts: EU compassionate use data." Bone Marrow Transplant.

Dulkys, Y., G. Schramm, D. Kimmig, S. Knoss, A. Weyergraf, A. Kapp and J. Elsner (2001). "Detection of mRNA for eotaxin-2 and eotaxin-3 in human dermal fibroblasts and their distinct activation profile on human eosinophils." J Invest Dermatol **116**(4): 498-505.

Dupre, D. J. and T. E. Hebert (2006). "Biosynthesis and trafficking of seven transmembrane receptor signalling complexes." Cell Signal **18**(10): 1549-59.

Dupre, D. J., M. Robitaille, N. Ethier, L. R. Villeneuve, A. M. Mamarbachi and T. E. Hebert (2006). "Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking." J Biol Chem **281**(45): 34561-73.

Ehlert, F. J. (2005). "Analysis of allosterism in functional assays." J Pharmacol Exp Ther **315**(2): 740-54.

Ehlert, F. J. (2008). "On the analysis of ligand-directed signaling at G protein-coupled receptors." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **377**(4-6): 549-77.

El-Asmar, L., J. Y. Springael, S. Ballet, E. U. Andrieu, G. Vassart and M. Parmentier (2005). "Evidence for Negative Binding Cooperativity within CCR5-CCR2b Heterodimers." Mol Pharmacol **67**(2): 460-9.

Endres, M. J., P. R. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J. D. Turner, A. McKnight, J. F. Thomas, B. Stoebenau-Haggarty, S. Choe, P. J. Vance, T. N. Wells, C. A. Power, S. S. Sutterwala, R. W. Doms, N. R. Landau and J. A. Hoxie (1996). "CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4." Cell **87**(4): 745-56.

Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.

Feng, Y. H., S. Miura, A. Husain and S. S. Karnik (1998). "Mechanism of constitutive activation of the AT1 receptor: influence of the size of the agonist switch binding residue Asn(111)." Biochemistry **37**(45): 15791-8.

Fischer, A. M., J. C. Mercer, A. Iyer, M. J. Ragin and A. August (2004). "Regulation of CXC chemokine receptor 4-mediated migration by the Tec family tyrosine kinase ITK." J Biol Chem **279**(28): 29816-20.

Flower, D. R. (1999). "Modelling G-protein-coupled receptors for drug design." Biochim Biophys Acta **1422**(3): 207-34.

Foord, S. M. (2002). "Receptor classification: post genome." Curr Opin Pharmacol **2**(5): 561-6.

Frade, J. M., M. Mellado, G. del Real, J. C. Gutierrez-Ramos, P. Lind and A. C. Martinez (1997). "Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells." J Immunol **159**(11): 5576-84.

Franitza, S., O. Kollet, A. Brill, G. G. Vaday, I. Petit, T. Lapidot, R. Alon and O. Lider (2002). "TGF-beta1 enhances SDF-1alpha-induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules." Eur J Immunol **32**(1): 193-202.

Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-72.

Fricker, S. P., V. Anastassov, J. Cox, M. C. Darkes, O. Grujic, S. R. Idzan, J. Labrecque, G. Lau, R. M. Mosi, K. L. Nelson, L. Qin, Z. Santucci and R. S. Wong (2006). "Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4." Biochem Pharmacol **72**(5): 588-96.

Fujino, H. and J. W. Regan (2006). "EP(4) prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein." Mol Pharmacol **69**(1): 5-10.

Galandrin, S., G. Oligny-Longpre and M. Bouvier (2007). "The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 423-30.

Gales, C., R. V. Rebois, M. Hogue, P. Trieu, A. Breit, T. E. Hebert and M. Bouvier (2005). "Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells." Nat Methods **2**(3): 177-84.

Gales, C., J. J. Van Durm, S. Schaak, S. Pontier, Y. Percherancier, M. Audet, H. Paris and M. Bouvier (2006). "Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 778-86.

Galvez, T., B. Duthey, J. Kniazeff, J. Blahos, G. Rovelli, B. Bettler, L. Prezeau and J. P. Pin (2001). "Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function." EMBO J **20**(9): 2152-9.

Ganju, R. K., S. A. Brubaker, J. Meyer, P. Dutt, Y. Yang, S. Qin, W. Newman and J. E. Groopman (1998). "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways." J Biol Chem **273**(36): 23169-75.

Garcia-Zepeda, E. A., C. Combadiere, M. E. Rothenberg, M. N. Sarafi, F. Lavigne, Q. Hamid, P. M. Murphy and A. D. Luster (1996). "Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3." J Immunol **157**(12): 5613-26.

Garcia Lopez, M. A., A. Aguado Martinez, C. Lamaze, A. C. Martinez and T. Fischer (2009). "Inhibition of dynamin prevents CCL2-mediated endocytosis of CCR2 and activation of ERK1/2." Cell Signal **21**(12): 1748-57.

Gay, E. A., J. D. Urban, D. E. Nichols, G. S. Oxford and R. B. Mailman (2004). "Functional selectivity of D2 receptor ligands in a Chinese hamster ovary hD2L cell line: evidence for induction of ligand-specific receptor states." Mol Pharmacol **66**(1): 97-105.

Gelmini, S., M. Mangoni, F. Castiglione, C. Beltrami, A. Pieralli, K. L. Andersson, M. Fambrini, G. L. Taddei, M. Serio and C. Orlando (2009). "The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer." Clin Exp Metastasis **26**(3): 261-8.

Gerlach, L. O., J. S. Jakobsen, K. P. Jensen, M. R. Rosenkilde, R. T. Skerlj, U. Ryde, G. J. Bridger and T. W. Schwartz (2003). "Metal ion enhanced binding of AMD3100 to Asp262 in the CXCR4 receptor." Biochemistry **42**(3): 710-7.

Gerlach, L. O., R. T. Skerlj, G. J. Bridger and T. W. Schwartz (2001). "Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor." J Biol Chem **276**(17): 14153-60.

Gerrits, H., D. S. van Ingen Schenau, N. E. Bakker, A. J. van Disseldorp, A. Strik, L. S. Hermens, T. B. Koenen, M. A. Krajnc-Franken and J. A. Gossen (2008). "Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice." Genesis **46**(5): 235-45.

Gerszten, R. E., E. A. Garcia-Zepeda, Y. C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. A. Gimbrone, Jr., A. D. Luster, F. W. Luscinskas and A. Rosenzweig (1999). "MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions." Nature **398**(6729): 718-23.

Gesty-Palmer, D., P. Flannery, L. Yuan, L. Corsino, R. Spurney, R. J. Lefkowitz and L. M. Luttrell (2009). "A beta-arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation." Sci Transl Med **1**(1): 1ra1.

Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.

Gether, U., J. A. Ballesteros, R. Seifert, E. Sanders-Bush, H. Weinstein and B. K. Kobilka (1997). "Structural instability of a constitutively active G protein-coupled

receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility." J Biol Chem **272**(5): 2587-90.

Gether, U., S. Lin, P. Ghanouni, J. A. Ballesteros, H. Weinstein and B. K. Kobilka (1997). "Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor." EMBO J **16**(22): 6737-47.

Ghanouni, P., Z. Gryczynski, J. J. Steenhuis, T. W. Lee, D. L. Farrens, J. R. Lakowicz and B. K. Kobilka (2001). "Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor." J Biol Chem **276**(27): 24433-6.

Ghanouni, P., J. J. Steenhuis, D. L. Farrens and B. K. Kobilka (2001). "Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 5997-6002.

Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, V. L. Schweickart, H. L. Trong and P. W. Gray (1997). "Monocyte chemotactic protein-4: tissue-specific expression and signaling through CC chemokine receptor-2." J Leukoc Biol **61**(3): 353-60.

Gong, X., W. Gong, D. B. Kuhns, A. Ben-Baruch, O. M. Howard and J. M. Wang (1997). "Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 and CCR2B as its functional receptors." J Biol Chem **272**(18): 11682-5.

Gonzalo, J. A., C. M. Lloyd, D. Wen, J. P. Albar, T. N. Wells, A. Proudfoot, A. C. Martinez, M. Dorf, T. Bjerke, A. J. Coyle and J. C. Gutierrez-Ramos (1998). "The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness." J Exp Med **188**(1): 157-67.

Gravel, S., C. Malouf, P. E. Boulais, Berchiche Y. A., S. Oishi, N. Fujii, R. Leduc, D. Sinnett and N. Heveker (2010). "The Peptidomimetic CXCR4 Antagonist TC14012 Recruits β -Arrestin to CXCR7: ROLES OF RECEPTOR DOMAINS." J Biol Chem **285**(49): 37939-43.

Graves, D. T., Y. L. Jiang, M. J. Williamson and A. J. Valente (1989). "Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells." Science **245**(4925): 1490-3.

Grymula, K., M. Tarnowski, M. Wysoczynski, J. Drukala, F. G. Barr, J. Ratajczak, M. Kucia and M. Z. Ratajczak (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.

Guan, X. M., T. S. Kobilka and B. K. Kobilka (1992). "Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide." J Biol Chem **267**(31): 21995-8.

Gupta, S. K., K. Pillarisetti and P. G. Lysko (1999). "Modulation of CXCR4 expression and SDF-1alpha functional activity during differentiation of human monocytes and macrophages." J Leukoc Biol **66**(1): 135-43.

Gupta, S. K., K. Pillarisetti, R. A. Thomas and N. Aiyar (2001). "Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1alpha: implications for development of selective CXCR4 antagonists." Immunol Lett **78**(1): 29-34.

Hamdan, F. F., M. Audet, P. Garneau, J. Pelletier and M. Bouvier (2005). "High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay." J Biomol Screen **10**(5): 463-75.

Handel, T. M. and P. J. Domaille (1996). "Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer." Biochemistry **35**(21): 6569-84.

Hanna, J., H. Mussaffi, G. Steuer, S. Hanna, M. Deeb, H. Blau, T. I. Arnon, N. Weizman and O. Mandelboim (2005). "Functional aberrant expression of CCR2 receptor on chronically activated NK cells in patients with TAP-2 deficiency." Blood **106**(10): 3465-73.

Haraldsen, G. and A. Rot (2006). "Coy decoy with a new ploy: interceptor controls the levels of homeostatic chemokines." Eur J Immunol **36**(7): 1659-61.

Harikumar, K. G. and L. J. Miller (2005). "Fluorescence resonance energy transfer analysis of the antagonist- and partial agonist-occupied states of the cholecystinin receptor." J Biol Chem **280**(19): 18631-5.

Hartmann, T. N., V. Grabovsky, R. Pasvolsky, Z. Shulman, E. C. Buss, A. Spiegel, A. Nagler, T. Lapidot, M. Thelen and R. Alon (2008). "A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin

activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells." J Leukoc Biol **84**(4): 1130-40.

Hassan, S., C. Ferrario, U. Saragovi, L. Quenneville, L. Gaboury, A. Baccarelli, O. Salvucci and M. Basik (2009). "The influence of tumor-host interactions in the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 ligand/receptor axis in determining metastatic risk in breast cancer." Am J Pathol **175**(1): 66-73.

Hatse, S., K. Princen, G. Bridger, E. De Clercq and D. Schols (2002). "Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4." FEBS Lett **527**(1-3): 255-62.

He, J., Y. Chen, M. Farzan, H. Choe, A. Ohagen, S. Gartner, J. Busciglio, X. Yang, W. Hofmann, W. Newman, C. R. Mackay, J. Sodroski and D. Gabuzda (1997). "CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia." Nature **385**(6617): 645-9.

Hebert, T. E., T. P. Loisel, L. Adam, N. Ethier, S. S. Onge and M. Bouvier (1998). "Functional rescue of a constitutively desensitized beta2AR through receptor dimerization." Biochem J **330** (Pt 1): 287-93.

Helbig, G., K. W. Christopherson, 2nd, P. Bhat-Nakshatri, S. Kumar, H. Kishimoto, K. D. Miller, H. E. Broxmeyer and H. Nakshatri (2003). "NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4." J Biol Chem **278**(24): 21631-8.

Hendrix, C. W., A. C. Collier, M. M. Lederman, D. Schols, R. B. Pollard, S. Brown, J. B. Jackson, R. W. Coombs, M. J. Glesby, C. W. Flexner, G. J. Bridger, K. Badel, R. T. MacFarland, G. W. Henson and G. Calandra (2004). "Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection." J Acquir Immune Defic Syndr **37**(2): 1253-62.

Hermans, E. (2003). "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors." Pharmacol Ther **99**(1): 25-44.

Hernanz-Falcon, P., J. M. Rodriguez-Frade, A. Serrano, D. Juan, A. del Sol, S. F. Soriano, F. Roncal, L. Gomez, A. Valencia, A. C. Martinez and M. Mellado (2004). "Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization." Nat Immunol **5**(2): 216-23.

Heveker, N., M. Montes, L. Germeroth, A. Amara, A. Trautmann, M. Alizon and J. Schneider-Mergener (1998). "Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides." Curr Biol **8**(7): 369-76.

Hulme, E. C., Z. L. Lu, S. D. Ward, K. Allman and C. A. Curtis (1999). "The conformational switch in 7-transmembrane receptors: the muscarinic receptor paradigm." Eur J Pharmacol **375**(1-3): 247-60.

Hunyady, L., G. Vauquelin and P. Vanderheyden (2003). "Agonist induction and conformational selection during activation of a G-protein-coupled receptor." Trends Pharmacol Sci **24**(2): 81-6.

Infantino, S., B. Moepps and M. Thelen (2006). "Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells." J Immunol **176**(4): 2197-207.

Issafras, H., S. Angers, S. Bulenger, C. Blanpain, M. Parmentier, C. Labbe-Jullie, M. Bouvier and S. Marullo (2002). "Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors." J Biol Chem.

Jaakola, V. P., M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman and R. C. Stevens (2008). "The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist." Science **322**(5905): 1211-7.

Jensen, P. C., S. Thiele, T. Ulven, T. W. Schwartz and M. M. Rosenkilde (2008). "Positive versus negative modulation of different endogenous chemokines for CC-chemokine receptor 1 by small molecule agonists through allosteric versus orthosteric binding." J Biol Chem **283**(34): 23121-8.

Jiang, L. I., J. Collins, R. Davis, K. M. Lin, D. DeCamp, T. Roach, R. Hsueh, R. A. Rebres, E. M. Ross, R. Taussig, I. Fraser and P. C. Sternweis (2007). "Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway." J Biol Chem **282**(14): 10576-84.

Jin, Z., D. Nagakubo, A. K. Shirakawa, T. Nakayama, A. Shigeta, K. Hieshima, Y. Yamada and O. Yoshie (2009). "CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells." Int J Cancer **125**(9): 2229-35.

Jordan, B. A. and L. A. Devi (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." Nature **399**(6737): 697-700.

Kalatskaya, I., Y. A. Berchiche, S. Gravel, B. J. Limberg, J. S. Rosenbaum and N. Heveker (2009). "AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties." Mol Pharmacol **75**(5): 1240-7.

Kato, M., J. Kitayama, S. Kazama and H. Nagawa (2003). "Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma." Breast Cancer Res **5**(5): R144-50.

Kenakin, T. (1995). "Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals." Trends Pharmacol Sci **16**(7): 232-8.

Kenakin, T. (1996). "The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems." Pharmacol Rev **48**(3): 413-63.

Kenakin, T. (2002). "Efficacy at G-protein-coupled receptors." Nat Rev Drug Discov **1**(2): 103-10.

Kenakin, T. (2004). "G-protein coupled receptors as allosteric machines." Receptors Channels **10**(2): 51-60.

Kenakin, T. (2004). "Principles: receptor theory in pharmacology." Trends Pharmacol Sci **25**(4): 186-92.

Kenakin, T. (2005). "New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism." Nat Rev Drug Discov **4**(11): 919-27.

Kenakin, T. (2007). "Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 407-15.

Kenakin, T. (2008). "Functional assays as prismatic views of drug activity: relevance to new drug discovery." J Recept Signal Transduct Res **28**(1-2): 109-25.

Kenakin, T. (2010). "Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling." J Pharmacol Exp Ther.

Kenakin, T., S. Jenkinson and C. Watson (2006). "Determining the potency and molecular mechanism of action of insurmountable antagonists." J Pharmacol Exp Ther **319**(2): 710-23.

Kenakin, T. and O. Onaran (2002). "The ligand paradox between affinity and efficacy: can you be there and not make a difference?" Trends Pharmacol Sci **23**(6): 275-80.

Kenakin, T. P. (2009). A Pharmacology Primer. Theory, Applications and Methods. London, Elsevier Academic Press.

Kendall, R. T. and L. M. Luttrell (2009). "Diversity in arrestin function." Cell Mol Life Sci **66**(18): 2953-73.

Kim, J., Ahn, S., Ren, X. R., Whalen, E. J., Reiter, E., Wei, H., Lefkowitz, R. J. (2005). "Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling". Proc Natl Acad Sci U S A **102** (5):1442-7.

Kjelsberg, M. A., S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992). "Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation." J Biol Chem **267**(3): 1430-3.

Kobilka, B. K. (1990). "The role of cytosolic and membrane factors in processing of the human beta-2 adrenergic receptor following translocation and glycosylation in a cell-free system." J Biol Chem **265**(13): 7610-8.

Kobilka, B. K. and X. Deupi (2007). "Conformational complexity of G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 397-406.

Kohout, T. A., S. L. Nicholas, S. J. Perry, G. Reinhart, S. Junger and R. S. Struthers (2004). "Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7." J Biol Chem **279**(22): 23214-22.

Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J (2003). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization". Mol Pharmacol **63**(1): 9-18

Kovacs, K., K. Hanto, Z. Bogнар, A. Tapodi, E. Bogнар, G. N. Kiss, A. Szabo, G. Rappai, T. Kiss, B. Sumegi and F. Gallyas, Jr. (2009). "Prevalent role of Akt and ERK activation in cardioprotective effect of Ca(2+) channel- and beta-adrenergic receptor blockers." Mol Cell Biochem **321**(1-2): 155-64.

Kuang, Y., Y. Wu, H. Jiang and D. Wu (1996). "Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors." J Biol Chem **271**(8): 3975-8.

Kuszak, A. J., S. Pitchiaya, J. P. Anand, H. I. Mosberg, N. G. Walter and R. K. Sunahara (2009). "Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2." J Biol Chem **284**(39): 26732-41.

Labrosse, B., A. BreLOT, N. Heveker, N. Sol, D. Schols, E. De Clercq and M. Alizon (1998). "Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100." J Virol **72**(8): 6381-8.

Lagane, B., S. Ballet, T. Planchenault, K. Balabanian, E. Le Poul, C. Blanpain, Y. Percherancier, I. Staropoli, G. Vassart, M. Oppermann, M. Parmentier and F. Bachelier (2005). "Mutation of the DRY motif reveals different structural requirements for the CC chemokine receptor 5-mediated signaling and receptor endocytosis." Mol Pharmacol **67**(6): 1966-76.

Lambright, D. G., J. Sondek, A. Bohm, N. P. Skiba, H. E. Hamm and P. B. Sigler (1996). "The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein." Nature **379**(6563): 311-9.

Langmead, C. J. and A. Christopoulos (2006). "Allosteric agonists of 7TM receptors: expanding the pharmacological toolbox." Trends Pharmacol Sci **27**(9): 475-81.

Lapidot, T. (2001). "Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions." Ann N Y Acad Sci **938**: 83-95.

Lapidot, T., A. Dar and O. Kollet (2005). "How do stem cells find their way home?" Blood **106**(6): 1901-10.

LaRosa, G. J., K. M. Thomas, M. E. Kaufmann, R. Mark, M. White, L. Taylor, G. Gray, D. Witt and J. Navarro (1992). "Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity." J Biol Chem **267**(35): 25402-6.

Larsen, C. G., C. O. Zachariae, J. J. Oppenheim and K. Matsushima (1989). "Production of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by human dermal fibroblasts in response to interleukin 1 or tumor necrosis factor." Biochem Biophys Res Commun **160**(3): 1403-8.

Le, M. T., P. M. Vanderheyden, M. Szaszak, L. Hunyady, V. Kersemans and G. Vauquelin (2003). "Peptide and nonpeptide antagonist interaction with constitutively active human AT1 receptors." Biochem Pharmacol **65**(8): 1329-38.

Le, M. T., P. M. Vanderheyden, M. Szaszak, L. Hunyady and G. Vauquelin (2002). "Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation." J Biol Chem **277**(26): 23107-10.

Leach, K., S. J. Charlton and P. G. Strange (2007). "Analysis of second messenger pathways stimulated by different chemokines acting at the chemokine receptor CCR5." Biochem Pharmacol **74**(6): 881-90.

Leduc, M., B. Breton, C. Gales, C. Le Gouill, M. Bouvier, S. Chemtob and N. Heveker (2009). "Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands." J Pharmacol Exp Ther **331**(1): 297-307.

Levoe, A., K. Balabanian, F. Baleux, F. Bachelier and B. Lagane (2009). "CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling." Blood **113**(24): 6085-93.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-89.

Li, Y. M., Y. Pan, Y. Wei, X. Cheng, B. P. Zhou, M. Tan, X. Zhou, W. Xia, G. N. Hortobagyi, D. Yu and M. C. Hung (2004). "Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis." Cancer Cell **6**(5): 459-69.

Lin, S. H. and O. Civelli (2004). "Orphan G protein-coupled receptors: targets for new therapeutic interventions." Ann Med **36**(3): 204-14.

Locati, M., Y. M. Torre, E. Galliera, R. Bonecchi, H. Bodduluri, G. Vago, A. Vecchi and A. Mantovani (2005). "Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 679-86.

Loetscher, P., J. H. Gong, B. Dewald, M. Baggiolini and I. Clark-Lewis (1998). "N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities." J Biol Chem **273**(35): 22279-83.

Lohse, M. J., S. Andexinger, J. Pitcher, S. Trukawinski, J. Codina, J. P. Faure, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992). "Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems." J Biol Chem **267**(12): 8558-64.

Lu, X. and Y. Kang (2009). "Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone." J Biol Chem **284**(42): 29087-96.

Lu, Z. L., C. A. Curtis, P. G. Jones, J. Pavia and E. C. Hulme (1997). "The role of the aspartate-arginine-tyrosine triad in the m1 muscarinic receptor: mutations of aspartate 122 and tyrosine 124 decrease receptor expression but do not abolish signaling." Mol Pharmacol **51**(2): 234-41.

Luker, K. E., M. Gupta, J. M. Steele, B. R. Foerster and G. D. Luker (2009). "Imaging ligand-dependent activation of CXCR7." Neoplasia **11**(10): 1022-35.

Luker, K. E. and G. D. Luker (2006). "Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer." Cancer Lett **238**(1): 30-41.

Luker, K. E., J. M. Steele, L. A. Mihalko, P. Ray and G. D. Luker (2010). "Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands." Oncogene **29**(32): 4599-610.

Lymperi, S., F. Ferraro and D. T. Scadden (2010). "The HSC niche concept has turned 31. Has our knowledge matured?" Ann N Y Acad Sci **1192**(1): 12-8.

Ma, Q., D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson and T. A. Springer (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9448-53.

Maksym, R. B., M. Tarnowski, K. Grymula, J. Tarnowska, M. Wysoczynski, R. Liu, B. Czerny, J. Ratajczak, M. Kucia and M. Z. Ratajczak (2009). "The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer." Eur J Pharmacol **625**(1-3): 31-40.

Marchese, A. (2009). "Ubiquitination of chemokine receptors." Methods Enzymol **460**: 413-22.

Marchese, A., M. M. Paing, B. R. Temple and J. Trejo (2008). "G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 601-29.

Martinelli, R., I. Sabroe, G. LaRosa, T. J. Williams and J. E. Pease (2001). "The CC chemokine eotaxin (CCL11) is a partial agonist of CC chemokine receptor 2b." J Biol Chem **276**(46): 42957-64.

May, L. T., K. Leach, P. M. Sexton and A. Christopoulos (2007). "Allosteric modulation of G protein-coupled receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 1-51.

McIntire, W. E. (2009). "Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers." Neurosignals **17**(1): 82-99.

McKnight, A., D. Wilkinson, G. Simmons, S. Talbot, L. Picard, M. Ahuja, M. Marsh, J. A. Hoxie and P. R. Clapham (1997). "Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent." J Virol **71**(2): 1692-6.

McVey, M., D. Ramsay, E. Kellett, S. Rees, S. Wilson, A. J. Pope and G. Milligan (2001). "Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy." J Biol Chem **276**(17): 14092-9.

Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. Aragay, G. del Real, A. M. Martin, A. J. Vila-Coro, A. Serrano, F. Mayor, Jr. and A. C. Martinez (1998). "The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor." J Immunol **161**(2): 805-13.

Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, S. Manes and A. C. Martinez (2001). "Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation." Annu Rev Immunol **19**: 397-421.

Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, S. Fernandez, A. Martin de Ana, D. R. Jones, J. L. Toran and A. C. Martinez (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." EMBO J **20**(10): 2497-507.

Mercier, J. F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit and M. Bouvier (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and

heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **277**(47): 44925-31.

Miao, Z., K. E. Luker, B. C. Summers, R. Berahovich, M. S. Bhojani, A. Rehemtulla, C. G. Kleer, J. J. Essner, A. Nasevicius, G. D. Luker, M. C. Howard and T. J. Schall (2007). "CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15735-40.

Miller, R. J., G. Banisadr and B. J. Bhattacharyya (2008). "CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development." J Neuroimmunol **198**(1-2): 31-8.

Milligan, G. and E. Kostenis (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S46-55.

Mine, S., Y. Okada, T. Tanikawa, C. Kawahara, T. Tabata and Y. Tanaka (2006). "Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus." Biochem Biophys Res Commun **344**(3): 780-5.

Minty, A., P. Chalon, J. C. Guillemot, M. Kaghad, P. Liauzun, M. Magazin, B. Miloux, C. Minty, P. Ramond, N. Vita and et al. (1993). "Molecular cloning of the MCP-3 chemokine gene and regulation of its expression." Eur Cytokine Netw **4**(2): 99-110.

Montecclaro, F. S. and I. F. Charo (1996). "The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation." J Biol Chem **271**(32): 19084-92.

Mori, T., R. Doi, M. Koizumi, E. Toyoda, D. Ito, K. Kami, T. Masui, K. Fujimoto, H. Tamamura, K. Hiramatsu, N. Fujii and M. Imamura (2004). "CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer." Mol Cancer Ther **3**(1): 29-37.

Morin, D., N. Cotte, M. N. Balestre, B. Mouillac, M. Manning, C. Breton and C. Barberis (1998). "The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities." FEBS Lett **441**(3): 470-5.

Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-6.

Muller, G. (2000). "Towards 3D structures of G protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach." Curr Med Chem **7**(9): 861-88.

Murdoch, C. (2000). "CXCR4: chemokine receptor extraordinaire." Immunol Rev **177**: 175-84.

Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-76.

Myers, S. J., L. M. Wong and I. F. Charo (1995). "Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells." J Biol Chem **270**(11): 5786-92.

Naumann, U., E. Cameroni, M. Pruenster, H. Mahabaleswar, E. Raz, H. G. Zerwes, A. Rot and M. Thelen (2010). "CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11." PLoS One **5**(2): e9175.

Neubig, R. R., M. Spedding, T. Kenakin and A. Christopoulos (2003). "International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology." Pharmacol Rev **55**(4): 597-606.

Nikolaev, V. O., C. Hoffmann, M. Bunemann, M. J. Lohse and J. P. Vilaradaga (2006). "Molecular basis of partial agonism at the neurotransmitter alpha2A-adrenergic receptor and Gi-protein heterotrimer." J Biol Chem **281**(34): 24506-11.

Nishita, M., H. Aizawa and K. Mizuno (2002). "Stromal Cell-Derived Factor 1alpha Activates LIM Kinase 1 and Induces Cofilin Phosphorylation for T-Cell Chemotaxis." Mol Cell Biol **22**(3): 774-83.

Nobles, M., A. Benians and A. Tinker (2005). "Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18706-11.

O'Boyle, G., J. G. Brain, J. A. Kirby and S. Ali (2007). "Chemokine-mediated inflammation: Identification of a possible regulatory role for CCR2." Mol Immunol **44**(8): 1944-53.

Odemis, V., K. Boosmann, A. Heinen, P. Kury and J. Engele (2010). "CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells." J Cell Sci **123**(Pt 7): 1081-8.

Ogilvie, P., G. Bardi, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and M. Uguccioni (2001). "Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5." Blood **97**(7): 1920-4.

Ogilvie, P., S. Paoletti, I. Clark-Lewis and M. Uguccioni (2003). "Eotaxin-3 is a natural antagonist for CCR2 and exerts a repulsive effect on human monocytes." Blood **102**(3): 789-94.

Ogilvie, P., S. Thelen, B. Moepps, P. Gierschik, A. C. da Silva Campos, M. Baggiolini and M. Thelen (2004). "Unusual chemokine receptor antagonism involving a mitogen-activated protein kinase pathway." J Immunol **172**(11): 6715-22.

Oldham, W. M. (2006). "Structural basis of function in heterotrimeric G proteins." Quarterly Reviews of Biophysics **39**.

Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 60-71.

Onaran, H. O. and T. Costa (1997). "Agonist efficacy and allosteric models of receptor action." Ann N Y Acad Sci **812**: 98-115.

Oppermann, M., M. Mack, A. E. Proudfoot and H. Olbrich (1999). "Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus." J Biol Chem **274**(13): 8875-85.

Orsini, M. J., J. L. Parent, S. J. Mundell, A. Marchese and J. L. Benovic (2000). "Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4: role of arrestins and identification of residues in the C-terminal tail that mediate receptor internalization." J Biol Chem **275**(33): 25876.

Ottoson, N. C., J. T. Pribila, A. S. Chan and Y. Shimizu (2001). "Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase." J Immunol **167**(4): 1857-61.

Overington, J. P., B. Al-Lazikani and A. L. Hopkins (2006). "How many drug targets are there?" Nat Rev Drug Discov **5**(12): 993-6.

Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.

Parnot, C., S. Bardin, S. Miserey-Lenkei, D. Guedin, P. Corvol and E. Clauser (2000). "Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II type 1A receptor by screening a randomly mutated cDNA library with an original pharmacological bioassay." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7615-20.

Parody, T. R. and M. J. Stone (2004). "High level expression, activation, and antagonism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR3 in Chinese hamster ovary cells." Cytokine **27**(1): 38-46.

Pattarozzi, A., M. Gatti, F. Barbieri, R. Wurth, C. Porcile, G. Lunardi, A. Ratto, R. Favoni, A. Bajetto, A. Ferrari and T. Florio (2008). "17beta-estradiol promotes breast cancer cell proliferation-inducing stromal cell-derived factor-1-mediated epidermal growth factor receptor transactivation: reversal by gefitinib pretreatment." Mol Pharmacol **73**(1): 191-202.

Pease, J. E. and R. Horuk (2009). "Chemokine receptor antagonists: Part 1." Expert Opin Ther Pat **19**(1): 39-58.

Pease, J. E. and R. Horuk (2009). "Chemokine receptor antagonists: part 2." Expert Opin Ther Pat **19**(2): 199-221.

Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, I. Slight, R. Volkmer-Engert, H. Tamamura, N. Fujii, M. Bouvier and N. Heveker (2005). "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers." J Biol Chem **280**(11): 9895-903.

Perez, D. M., J. Hwa, R. Gaivin, M. Mathur, F. Brown and R. M. Graham (1996). "Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor." Mol Pharmacol **49**(1): 112-22.

Perez, D. M. and S. S. Karnik (2005). "Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors." Pharmacol Rev **57**(2): 147-61.

Ponath, P. D., S. Qin, T. W. Post, J. Wang, L. Wu, N. P. Gerard, W. Newman, C. Gerard and C. R. Mackay (1996). "Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils." J Exp Med **183**(6): 2437-48.

Proost, P., A. Mortier, T. Loos, J. Vandercappellen, M. Gouwy, I. Ronsse, E. Schutyser, W. Put, M. Parmentier, S. Struyf and J. Van Damme (2007). "Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration." Blood **110**(1): 37-44.

Proudfoot, A. E., C. A. Power and M. K. Schwarz (2010). "Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future?" Expert Opin Investig Drugs **19**(3): 345-55.

Quirk, K., D. J. Roberts and P. G. Strange (2007). "Mechanisms of G protein activation via the D2 dopamine receptor: evidence for persistent receptor/G protein interaction after agonist stimulation." Br J Pharmacol **151**(1): 144-52.

Rabin, R. L., M. K. Park, F. Liao, R. Swofford, D. Stephany and J. M. Farber (1999). "Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling." J Immunol **162**(7): 3840-50.

Rajagopal, K., R. J. Lefkowitz and H. A. Rockman (2005). "When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors." J Clin Invest **115**(11): 2971-4.

Rajagopal, S., J. Kim, S. Ahn, S. Craig, C. M. Lam, N. P. Gerard, C. Gerard and R. J. Lefkowitz (2010). "Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(2): 628-32.

Rajagopalan, L. and K. Rajarathnam (2006). "Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity." Biosci Rep **26**(5): 325-39.

Ramsay, D., E. Kellett, M. McVey, S. Rees and G. Milligan (2002). "Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences." Biochem J **365**(Pt 2): 429-40.

Rasmussen, S. G., H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis and B. K. Kobilka (2007). "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor." Nature **450**(7168): 383-7.

Rasmussen, S. G., A. D. Jensen, G. Liapakis, P. Ghanouni, J. A. Javitch and U. Gether (1999). "Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6." Mol Pharmacol **56**(1): 175-84.

Ratajczak, M. Z., E. Zuba-Surma, M. Kucia, R. Reza, W. Wojakowski and J. Ratajczak (2006). "The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis." Leukemia **20**(11): 1915-24.

Ritter, S. L. and R. A. Hall (2009). "Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(12): 819-30.

Rochdi, M. D. and J. L. Parent (2003). "Galphaq-coupled receptor internalization specifically induced by Galphaq signaling. Regulation by EBP50." J Biol Chem **278**(20): 17827-37.

Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana, J. P. Albar, A. C. Martinez and M. Mellado (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-33.

Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen and B. K. Kobilka (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." Nature **459**(7245): 356-63.

Rothenberg, M. E. (1999). "Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues." Am J Respir Cell Mol Biol **21**(3): 291-5.

Rovati, G. E., V. Capra and R. R. Neubig (2007). "The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state." Mol Pharmacol **71**(4): 959-64.

Salcedo, R. and J. J. Oppenheim (2003). "Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses." Microcirculation **10**(3-4): 359-70.

Samama, P., S. Cotecchia, T. Costa and R. J. Lefkowitz (1993). "A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model." J Biol Chem **268**(7): 4625-36.

Scheer, A., F. Fanelli, T. Costa, P. G. De Benedetti and S. Cotecchia (1996). "Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation." EMBO J **15**(14): 3566-78.

Scheer, A., F. Fanelli, T. Costa, P. G. De Benedetti and S. Cotecchia (1997). "The activation process of the alpha1B-adrenergic receptor: potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(3): 808-13.

Schioth, H. B. and R. Fredriksson (2005). "The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective." Gen Comp Endocrinol **142**(1-2): 94-101.

Schmouder, R. L., R. M. Strieter and S. L. Kunkel (1993). "Interferon-gamma regulation of human renal cortical epithelial cell-derived monocyte chemotactic peptide-1." Kidney Int **44**(1): 43-9.

Schols, D., S. Struyf, J. Van Damme, J. A. Este, G. Henson and E. De Clercq (1997). "Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4." J Exp Med **186**(8): 1383-8.

Schwartz, T. W. and B. Holst (2006). "Allosteric modulation and other types of allostery in dimeric 7TM receptors." J Recept Signal Transduct Res **26**(1-2): 107-28.

Shen, W., L. J. Bendall, D. J. Gottlieb and K. F. Bradstock (2001). "The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow." Exp Hematol **29**(12): 1439-47.

Shenoy, S. K., L. S. Barak, K. Xiao, S. Ahn, M. Berthouze, A. K. Shukla, L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (2007). "Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation." J Biol Chem **282**(40): 29549-62.

Shenoy, S. K., M. T. Drake, C. D. Nelson, D. A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R. T. Premont, O. Lichtarge and R. J. Lefkowitz (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." J Biol Chem **281**(2): 1261-73.

Sierro, F., C. Biben, L. Martinez-Munoz, M. Mellado, R. M. Ransohoff, M. Li, B. Woehl, H. Leung, J. Groom, M. Batten, R. P. Harvey, A. C. Martinez, C. R. Mackay and F. Mackay (2007). "Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14759-64.

Signoret, N., L. Hewlett, S. Wavre, A. Pelchen-Matthews, M. Oppermann and M. Marsh (2005). "Agonist-induced endocytosis of CC chemokine receptor 5 is clathrin dependent." Mol Biol Cell **16**(2): 902-17.

Sodhi, A., S. Montaner and J. S. Gutkind (2004). "Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(12): 998-1012.

Sozzani, S., D. Zhou, M. Locati, M. Rieppi, P. Proost, M. Magazin, N. Vita, J. van Damme and A. Mantovani (1994). "Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1." J Immunol **152**(7): 3615-22.

Spano, J. P., F. Andre, L. Morat, L. Sabatier, B. Besse, C. Combadiere, P. Deterre, A. Martin, J. Azorin, D. Valeyre, D. Khayat, T. Le Chevalier and J. C. Soria (2004). "Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome." Ann Oncol **15**(4): 613-7.

Spengler, D., C. Waeber, C. Pantaloni, F. Holsboer, J. Bockaert, P. H. Seeburg and L. Journot (1993). "Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor." Nature **365**(6442): 170-5.

Springael, J. Y., P. N. Le Minh, E. Urizar, S. Costagliola, G. Vassart and M. Parmentier (2006). "Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers." Mol Pharmacol **69**(5): 1652-61.

Springael, J. Y., E. Urizar and M. Parmentier (2005). "Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 611-23.

Standiford, T. J., S. L. Kunkel, S. H. Phan, B. J. Rollins and R. M. Strieter (1991). "Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells." J Biol Chem **266**(15): 9912-8.

Stanfield, P. (2006). "Voltage sparks a GPCR." Nat Cell Biol **8**(12): 1323-5.

Steinberg, M. and M. Silva (2010). "Plerixafor: A chemokine receptor-4 antagonist for mobilization of hematopoietic stem cells for transplantation after high-dose chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma." Clin Ther **32**(5): 821-43.

Stubbs, V. E., C. Power and K. D. Patel (2010). "Regulation of eotaxin-3/CCL26 expression in human monocytic cells." Immunology **130**(1): 74-82.

Sun, Y., Z. Cheng, L. Ma and G. Pei (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**(51): 49212-9.

Swaminath, G., Y. Xiang, T. W. Lee, J. Steenhuis, C. Parnot and B. K. Kobilka (2004). "Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states." J Biol Chem **279**(1): 686-91.

Szabo, I., X. H. Chen, L. Xin, M. W. Adler, O. M. Howard, J. J. Oppenheim and T. J. Rogers (2002). "Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10276-81.

Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto and T. Nagasawa (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature **393**(6685): 591-4.

Takeya, M., T. Yoshimura, E. J. Leonard, T. Kato, H. Okabe and K. Takahashi (1991). "Production of monocyte chemoattractant protein-1 by malignant fibrous histiocytoma: relation to the origin of histiocyte-like cells." Exp Mol Pathol **54**(1): 61-71.

Tamamura, H. and N. Fujii (2005). "The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis." Expert Opin Ther Targets **9**(6): 1267-82.

Tamamura, H., M. Fujisawa, K. Hiramatsu, M. Mizumoto, H. Nakashima, N. Yamamoto, A. Otaka and N. Fujii (2004). "Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent." FEBS Lett **569**(1-3): 99-104.

Tamamura, H., A. Hori, N. Kanzaki, K. Hiramatsu, M. Mizumoto, H. Nakashima, N. Yamamoto, A. Otaka and N. Fujii (2003). "T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer." FEBS Lett **550**(1-3): 79-83.

Tamamura, H., A. Omagari, K. Hiramatsu, K. Gotoh, T. Kanamoto, Y. Xu, E. Kodama, M. Matsuoka, T. Hattori, N. Yamamoto, H. Nakashima, A. Otaka and N. Fujii (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**(14): 1897-902.

Tamamura, H., M. Sugioka, Y. Odagaki, A. Omagari, Y. Kan, S. Oishi, H. Nakashima, N. Yamamoto, S. C. Peiper, N. Hamanaka, A. Otaka and N. Fujii (2001). "Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity." Bioorg Med Chem Lett **11**(3): 359-62.

Tamamura, H., M. Waki, M. Imai, A. Otaka, T. Ibuka, K. Waki, K. Miyamoto, A. Matsumoto, T. Murakami, H. Nakashima, N. Yamamoto and N. Fujii (1998). "Downsizing of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II), with the maintenance of anti-HIV activity and solution structure." Bioorg Med Chem **6**(4): 473-9.

Tateyama, M., H. Abe, H. Nakata, O. Saito and Y. Kubo (2004). "Ligand-induced rearrangement of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1alpha." Nat Struct Mol Biol **11**(7): 637-42.

Terrillon, S., C. Barberis and M. Bouvier (2004). "Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1548-53.

Terrillon, S. and M. Bouvier (2004). "Roles of G-protein-coupled receptor dimerization." EMBO Rep **5**(1): 30-4.

Thelen, M. and S. Thelen (2008). "CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio?" J Neuroimmunol **198**(1-2): 9-13.

Tian, Y., M. M. Lee, L. Y. Yung, R. A. Allen, P. M. Slocombe, B. M. Twomey and Y. H. Wong (2008). "Differential involvement of Galpha16 in CC chemokine-induced stimulation of phospholipase Cbeta, ERK, and chemotaxis." Cell Signal **20**(6): 1179-89.

Tournamille, C., C. Le Van Kim, P. Gane, D. Blanchard, A. E. Proudfoot, J. P. Cartron and Y. Colin (1997). "Close association of the first and fourth extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding." J Biol Chem **272**(26): 16274-80.

Tsutsumi, H., T. Tanaka, N. Ohashi, H. Masuno, H. Tamamura, K. Hiramatsu, T. Araki, S. Ueda, S. Oishi and N. Fujii (2007). "Therapeutic potential of the chemokine receptor CXCR4 antagonists as multifunctional agents." Biopolymers **88**(2): 279-89.

Uchida, D., T. Onoue, N. M. Begum, N. Kuribayashi, Y. Tomizuka, T. Tamatani, H. Nagai and Y. Miyamoto (2009). "Vesnarinone downregulates CXCR4 expression via upregulation of Kruppel-like factor 2 in oral cancer cells." Mol Cancer **8**: 62.

Urban, J. D., W. P. Clarke, M. von Zastrow, D. E. Nichols, B. Kobilka, H. Weinstein, J. A. Javitch, B. L. Roth, A. Christopoulos, P. M. Sexton, K. J. Miller, M. Spedding and R. B. Mailman (2007). "Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology." J Pharmacol Exp Ther **320**(1): 1-13.

Urban, J. D., W. P. Clarke, M. von Zastrow, D. E. Nichols, B. K. Kobilka, H. Weinstein, J. A. Javitch, B. L. Roth, A. Christopoulos, P. Sexton, K. Miller, M. Spedding and R. B. Mailman (2006). "Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology." J Pharmacol Exp Ther.

Vaidehi, N. and T. Kenakin (2010). "The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity." Curr Opin Pharmacol **10**(6): 775-81.

Van Coillie, E., J. Van Damme and G. Opdenakker (1999). "The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines." Cytokine Growth Factor Rev **10**(1): 61-86.

Van Damme, J., P. Proost, J. P. Lenaerts and G. Opdenakker (1992). "Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family." J Exp Med **176**(1): 59-65.

Van Damme, J., P. Proost, W. Put, S. Arens, J. P. Lenaerts, R. Conings, G. Opendakker, H. Heremans and A. Billiau (1994). "Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers. Chemical synthesis of MCP-2 and development of a specific RIA." J Immunol **152**(11): 5495-502.

van Koppen, C. J. and K. H. Jakobs (2004). "Arrestin-independent internalization of G protein-coupled receptors." Mol Pharmacol **66**(3): 365-7.

Vauquelin, G. and I. Van Liefde (2005). "G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations." Fundam Clin Pharmacol **19**(1): 45-56.

Vicente-Manzanares, M., J. R. Cabrero, M. Rey, M. Perez-Martinez, A. Ursa, K. Itoh and F. Sanchez-Madrid (2002). "A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis." J Immunol **168**(1): 400-10.

Vihinen, M., F. X. Arredondo-Vega, J. L. Casanova, A. Etzioni, S. Giliani, L. Hammarstrom, M. S. Hershfield, P. G. Heyworth, A. P. Hsu, A. Lahdesmaki, I. Lappalainen, L. D. Notarangelo, J. M. Puck, W. Reith, D. Roos, R. F. Schumacher, K. Schwarz, P. Vezzoni, A. Villa, J. Valiaho and C. I. Smith (2001). "Primary immunodeficiency mutation databases." Adv Genet **43**: 103-88.

Vila-Coro, A. J., M. Mellado, A. Martin de Ana, P. Lucas, G. del Real, A. C. Martinez and J. M. Rodriguez-Frade (2000). "HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3388-93.

Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, A. Martin De Ana, M. C. Moreno-Ortiz, A. C. Martinez and M. Mellado (1999). "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." Faseb J **13**(13): 1699-710.

Vilardaga, J. P., R. Steinmeyer, G. S. Harms and M. J. Lohse (2005). "Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor." Nat Chem Biol **1**(1): 25-8.

Volin, M. V., L. Joseph, M. S. Shockley and P. F. Davies (1998). "Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium." Biochem Biophys Res Commun **242**(1): 46-53.

Wang, J., Y. Shiozawa, J. Wang, Y. Wang, Y. Jung, K. J. Pienta, R. Mehra, R. Loberg and R. S. Taichman (2008). "The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer." J Biol Chem **283**(7): 4283-94.

Wang, J., Y. Shiozawa, Y. Wang, Y. Jung, K. J. Pienta, R. Mehra, R. Loberg and R. S. Taichman (2008). "The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer." J Biol Chem **283**(7): 4283-94.

Warne, T., M. J. Serrano-Vega, J. G. Baker, R. Moukhametzianov, P. C. Edwards, R. Henderson, A. G. Leslie, C. G. Tate and G. F. Schertler (2008). "Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor." Nature **454**(7203): 486-91.

Weber, K. S., P. J. Nelson, H. J. Grone and C. Weber (1999). "Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(9): 2085-93.

Wei, H., S. Ahn, S. K. Shenoy, S. S. Karnik, L. Hunyady, L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (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**(19): 10782-7.

Weiss, J. M., P. H. Morgan, M. W. Lutz and T. P. Kenakin (1996). "The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy." J Theor Biol **181**(4): 381-97.

Wess, J. (1998). "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity." Pharmacol Ther **80**(3): 231-64.

Whorton, M. R., M. P. Bokoch, S. G. Rasmussen, B. Huang, R. N. Zare, B. Kobilka and R. K. Sunahara (2007). "A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7682-7.

Whorton, M. R., B. Jastrzebska, P. S. Park, D. Fotiadis, A. Engel, K. Palczewski and R. K. Sunahara (2008). "Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer." J Biol Chem **283**(7): 4387-94.

Wilbanks, A. M., S. A. Laporte, L. M. Bohn, L. S. Barak and M. G. Caron (2002). "Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors." Biochemistry **41**(40): 11981-9.

Wu, B., E. Y. T. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn, T. M. Handel, V. Cherezov and R. C. Stevens (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. Science Express in press, DOI: 10.1126/science.1194396

Xia, M. and Z. Sui (2009). "Recent developments in CCR2 antagonists." Expert Opin Ther Pat **19**(3): 295-303.

Yao, X., C. Parnot, X. Deupi, V. R. Ratnala, G. Swaminath, D. Farrens and B. Kobilka (2006). "Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta(2)-adrenoceptor." Nat Chem Biol **2**(8): 417-22.

Yoshida, T., T. Imai, M. Kakizaki, M. Nishimura, S. Takagi and O. Yoshie (1998). "Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1." J Biol Chem **273**(26): 16551-4.

Yoshimura, T., N. Yuhki, S. K. Moore, E. Appella, M. I. Lerman and E. J. Leonard (1989). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE." FEBS Lett **244**(2): 487-93.

Zabel, B. A., Y. Wang, S. Lewen, R. D. Berahovich, M. E. Penfold, P. Zhang, J. Powers, B. C. Summers, Z. Miao, B. Zhao, A. Jalili, A. Janowska-Wieczorek, J. C. Jaen and T. J. Schall (2009). "Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands." J Immunol **183**(5): 3204-11.

Zaitseva, M., A. Blauvelt, S. Lee, C. K. Lapham, V. Klaus-Kovtun, H. Mostowski, J. Manischewitz and H. Golding (1997). "Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection." Nat Med **3**(12): 1369-75.

Zaitseva, M. B., S. Lee, R. L. Rabin, H. L. Tiffany, J. M. Farber, K. W. Peden, P. M. Murphy and H. Golding (1998). "CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection." J Immunol **161**(6): 3103-13.

Zeyda, M., K. Gollinger, E. Kriehuber, F. W. Kiefer, A. Neuhofer and T. M. Stulnig (2010). "Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression." Int J Obes (Lond)

Zhang, J., X. Q. Shi, S. Echeverry, J. S. Mogil, Y. De Koninck and S. Rivest (2007). "Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain." J Neurosci **27**(45): 12396-406.

Zhang, W. B., J. M. Navenot, B. Haribabu, H. Tamamura, K. Hiramatu, A. Omagari, G. Pei, J. P. Manfredi, N. Fujii, J. R. Broach and S. C. Peiper (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**(27): 24515-21.

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** (24):9649-54.

Zlotnik, A. (2004). "Chemokines in neoplastic progression." Semin Cancer Biol **14**(3): 181-5.

Zlotnik, A. (2006). "Chemokines and cancer." Int J Cancer **119**(9): 2026-9.

Zlotnik, A. (2006). "Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis." Contrib Microbiol **13**: 191-9.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi and D. R. Littman (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-9.