

Université de Sherbrooke

**Identification des déterminants moléculaires impliqués dans la formation de la
pochette de liaison du récepteur CXCR4 et des changements conformationnels lors de
son activation**

Par
Philip E. Boulais
Programme de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en Pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Août, 2013

Membres du jury d'évaluation
Pr Richard Leduc, Département de Pharmacologie
Pr Emanuel Escher, Département de Pharmacologie
Pr Jean-Bernard Denault, Département de Pharmacologie
Pr Fernand-Pierre Gendron, Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Pr Stéphane Angers, Leslie Dan Faculty of Pharmacy, Université de Toronto

© Philip E. Boulais, 2013



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-499-00431-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00431-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

À Véro, Patrick et toi qui suivra...

*« Le temps qu'on prend à se remettre en question,
c'est du temps qu'on perd
à ne pas remettre la science en question. »*

Résumé

Identification des déterminants moléculaires impliqués dans la formation de la pochette de liaison du récepteur CXCR4 et des changements conformationnels lors de son activation

Par

Philip E. Boulais

Programme de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) constituent l'une des plus grandes familles de cibles pharmacologiques. Afin de pouvoir extraire tout leur potentiel thérapeutique, il faut d'abord comprendre et caractériser le premier événement dans la cascade pharmacologique, c'est-à-dire la liaison d'un ligand à son récepteur. Nous nous sommes intéressés au récepteur CXCR4, car il fait partie de la famille des récepteurs peptidergiques qui demeure peu comprise au niveau de la structure et de leur mode de liaison. Au niveau physiologique, ce récepteur joue un rôle important pour l'homéostasie du système immunitaire ainsi que dans certaines pathologies comme l'infection au VIH-1 et le cancer.

Nous avons d'abord caractérisé la pochette de liaison du récepteur CXCR4 à l'aide de photoanalogues du T140, un composé peptidomimétique anti-VIH. Nous avons identifié que le domaine transmembranaire 4 (TM4) est impliqué dans la pochette de liaison orthostérique du récepteur CXCR4. Nous avons aussi généré un modèle par homologie de séquence de la liaison du T140 sur CXCR4. Ce modèle nous a permis de constater que le T140 peut lier profondément au niveau de la pochette de liaison du CXCR4 ainsi qu'au niveau des boucles extracellulaires 2 et 3.

À l'aide de la méthode d'accessibilité des résidus cystéines substitués (SCAM), nous avons procédé à la substitution individuelle des résidus du domaine TM4 en cystéine. Nous avons caractérisé ces mutants pour leur affinité et leur expression à l'aide d'études de radioliasion. Nous avons identifié que les résidus Asp171^(4.60) et Pro170^(4.59) se situent face à la pochette de liaison du récepteur à l'état basal. À l'aide du mutant constitutivement actif Asn119^(3.35)Ser, nous avons identifié qu'il y avait un mouvement rotatoire anti-horaire du domaine TM4 permettant au résidu Ile173^(4.62) d'être accessible. Ce mouvement serait couplé à un changement conformationnel de la boucle extracellulaire 2 permettant aux résidus Ser178^(4.67) et Val177^(4.66) d'être accessibles dans un état actif. Ces résultats suggèrent que le domaine TM4 participe à la pochette de liaison du récepteur CXCR4 ainsi qu'aux mouvements conformationnels lors de l'activation.

Mots clés : Récepteurs couplés aux protéines G, Structure moléculaire, CXCR4, pochette de liaison, marquage par photoaffinité, Méthode d'accessibilité des résidus cystéines substitués.

Table des matières

| | |
|--|-------------|
| Résumé | iv |
| Table des matières | v |
| Liste des tableaux | vii |
| Liste des figures | viii |
| Liste des abréviations | x |
| Introduction | 1 |
| 1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) | 2 |
| 1.2 Classification structurale des GPCR | 4 |
| 1.2.1 Les GPCR de classe A..... | 6 |
| 1.2.2 Les GPCR de classe B..... | 8 |
| 1.2.3 Les GPCR de classe C..... | 8 |
| 1.3 L'univers conformationnel des GPCR | 9 |
| 1.3.1 Structure et reconnaissance du ligand..... | 11 |
| 1.3.1.1 La rhodopsine..... | 11 |
| 1.3.1.2 Les récepteurs monoaminergiques | 13 |
| 1.3.1.3 Les récepteurs aux nucléosides..... | 17 |
| 1.3.1.4 Les récepteurs cholinergiques | 18 |
| 1.3.1.5 Les récepteurs lipidiques | 19 |
| 1.3.1.6 Les récepteurs peptidergiques | 20 |
| 1.3.2 Le mécanisme d'activation des GPCR de classe A..... | 21 |
| 1.3.2.1 <i>Rotamer toggle switch</i> et le motif CW _x P ^(6.50) | 25 |
| 1.3.2.2 <i>Ionic lock</i> et le motif (D/E)R ^(3.50) Y..... | 27 |
| 1.3.2.3 <i>Tyrosine toggle switch</i> et le motif NP ^(7.50) xxY..... | 28 |
| 1.3.3 Modulation allostérique des GPCR | 29 |
| 1.3.3.1 Ligand orthostérique versus modulateur allostérique | 31 |
| 1.3.3.2 Oligomérisation et allostérie latérale..... | 32 |
| 1.3.3.3 Sélectivité fonctionnelle et l'allostérie cytosolique..... | 33 |
| 1.4 Le récepteur CXCR4 comme modèle d'étude | 34 |
| 1.4.1 Généralités sur les chimiokines et leur(s) récepteur(s)..... | 34 |
| 1.4.2 Rôles physiologiques et pathologiques de l'axe CXCR4/CXCL12 | 39 |
| 1.4.3 Avenues thérapeutiques ciblant le récepteur CXCR4..... | 42 |
| 1.4.4 Structure-activité du récepteur CXCR4..... | 44 |
| 1.4.5 Signalisation du récepteur CXCR4..... | 47 |

| | |
|--|------------|
| 1.5 Problématique et objectifs de l'étude | 49 |
| 1.5.1 Hypothèse de recherche..... | 50 |
| 1.5.2 Objectif 1 : Identification des domaines de liaison impliqués dans la pochette de liaison du récepteur..... | 50 |
| 1.5.3 Objectif 2 : Déterminer l'accessibilité des résidus constituant la pochette de liaison du récepteur CXCR4 | 50 |
| 1.5.4 Objectif 3 : Déterminer les changements conformationnels des résidus de la pochette de liaison à l'état actif..... | 51 |
| Article 1 | 52 |
| Article 2 | 86 |
| Discussion | 121 |
| 4.1 Identification des domaines de liaison participant à la pochette de liaison du récepteur CXCR4 | 122 |
| 4.1.1 Synthèse et caractérisation des photoanalogues du T140 | 122 |
| 4.1.2 Identification des domaines de liaison du T140 par le photomarquage..... | 124 |
| 4.1.3 Génération d'un modèle par homologie de la liaison T140/CXCR4..... | 125 |
| 4.1.4 Comparaison avec la structure cristallographique du récepteur CXCR4 | 126 |
| 4.2 Caractérisation du rôle du domaine TM4 dans la pochette de liaison du récepteur CXCR4 | 132 |
| 4.2.1 Accessibilité des résidus du domaine TM4 dans un état inactif | 133 |
| 4.2.2 Accessibilité des résidus du domaine TM4 dans un état actif..... | 135 |
| 4.2.3 Comparaison des changements conformationnels du domaine TM4 avec d'autres GPCR de classe A..... | 137 |
| Conclusions et perspectives | 139 |
| Remerciements | 141 |
| Liste des références | 142 |
| Annexes A | 177 |
| A.1 Liste des publications | 177 |
| A.2 Liste des communications..... | 177 |

Liste des tableaux

Introduction

| | |
|--|----|
| Table 1 Composés et applications thérapeutiques pour CXCR4 | 43 |
|--|----|

Article I

| | |
|--|----|
| Table 1 Binding properties of T140 analogs | 69 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Table 2 Inhibition of HIV infection by T140 and its analogs..... | 69 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Table 3 H-bonds and hydrophobic interaction between T140 and CXCR4 | 77 |
|--|----|

Article II

| | |
|---|----|
| Table 1 Binding properties of FC131 to cysteine-substituted CXCR4 TM4 mutant receptors | 99 |
|---|----|

| | |
|--|-----|
| Table 2 Binding properties of FC131 to cysteine-substituted CXCR4 TM4 mutant receptors bearing the N119S ^(3.35) mutation | 103 |
|--|-----|

Liste des figures

Introduction

| | |
|--|----|
| Figure 1 Diversité des ligands et des voies de signalisation des GPCR | 3 |
| Figure 2 Classification structurale des GPCR | 5 |
| Figure 3 Nomenclature Ballesteros-Weinstein pour les récepteurs de classe A..... | 6 |
| Figure 4 Modèles conformationnels de la liaison et de l'activation des GPCR | 10 |
| Figure 5 Structure moléculaire de la rhodopsine | 14 |
| Figure 6 Diversité au niveau des pochettes de liaison des GPCR de classe A | 15 |
| Figure 7 Structure moléculaire du récepteur β 2-adrénergique en conformation active et inactive..... | 22 |
| Figure 8 Comparaison des motifs conservés impliqués dans l'activation des GPCR de classe A..... | 26 |
| Figure 9 Modulation allostérique des GPCR..... | 30 |
| Figure 10 Classification des récepteurs de chimiokines | 36 |
| Figure 11 Représentation tridimensionnelle de la liaison chimiokine/récepteur..... | 38 |
| Figure 12 Fonctions du récepteur CXCR4 au niveau du cancer et la formation de tumeurs | 41 |
| Figure 13 Voies de signalisation intracellulaires classiques du récepteur CXCR4 | 48 |

Article I

| | |
|--|----|
| Figure 1 Amino acid sequence of T140, T140 photoanalogs and CXCR4 | 67 |
| Figure 2 Binding studies on HEK293 cells stably expressing CXCR4..... | 68 |
| Figure 3 Photolabeling specificity of ^{125}I -[Bpa ⁵]T140 or ^{125}I -[Bpa ¹⁰]T140 | 71 |
| Figure 4 Photolabeling of CXCR4 in the presence of T140 | 72 |
| Figure 5 Proteolytic cleavage of ^{125}I -[Bpa ⁵]T140 and ^{125}I -[Bpa ¹⁰]T140 photolabeled CXCR4 with V8 protease | 73 |
| Figure 6 Proteolytic cleavage of ^{125}I -[Bpa ⁵]T140 and ^{125}I -[Bpa ¹⁰]T140 photolabeled fragment Lys ¹⁵⁴ -Glu ¹⁷⁹ of CXCR4 with Endo Asp-N..... | 75 |
| Figure 7 Molecular model of the T140 liganded CXCR4 | 76 |

Article II

| | |
|--|-----|
| Figure 1 Schematic representation of the human CXCR4 receptor | 97 |
| Figure 2 Cell surface expression of CXCR4 mutants..... | 100 |
| Figure 3 Effects of MTSEA on the wild-type receptor and a sensitive reporter cysteine-bearing D171C ^(4.60) mutant | 101 |
| Figure 4 Effects of MTSEA on mutant CXCR4 receptors bearing a reporter cysteine in TM4 | 102 |
| Figure 5 Effects of MTSEA on N119S ^(3.35) mutant receptors bearing a reporter cysteine in TM4 | 105 |
| Figure 6 FC131 protection of MTSEA-sensitive receptor mutants. | 106 |
| Figure 7 Functional properties of the CXCR4 mutant receptors in intact COS-7 cells..... | 109 |
| Figure 8 Molecular model of the CXCR4 receptor with a TM4 pattern of reactivity to MTSEA..... | 113 |

Discussion

| | |
|--|-----|
| Figure 14 Structure cristallographique de la pochette de liaison du récepteur CXCR4 | 128 |
| Figure 15 Comparaison du modèle de liaison du T140 sur CXCR4 par homologie de séquence avec la structure cristallographique..... | 130 |

Liste des abréviations

| | |
|-------------------|--|
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AMPC | Adénosine monophosphate cyclique |
| BIMA | <i>bis(imidazolylmethyl) amine analog</i> |
| Bpa | <i>p</i> -benzoyl-L-phenylalanine |
| BRET | <i>Bioluminescence resonance energy transfer</i> |
| CRTH | <i>Chemoattractant receptor-homologous</i> |
| ECL | <i>Extracellular loop</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FNA | <i>Funaltrexamine</i> |
| ICL | <i>Intracellular loop</i> |
| IP ₃ | Inositol 1,4,5-triphosphate |
| IP ₃ R | Récepteur de l'Inositol 1,4,5-triphosphate |
| GAG | Glycosaminoglycane |
| GABA | acide γ -aminobutyrique |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| GMPc | Guanosine monophosphate cyclique |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| GPCR | <i>G protein-coupled receptor</i> |
| GRK | <i>G protein-coupled receptor kinase</i> |
| CSH | Cellule souche hématopoïétique |
| LPA | <i>acide lysophosphatidique</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MTSEA | 2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide |
| N- α -T | N- α -tosyltryptophan |
| PGD | Prostaglandine |
| QNB | 3-quinuclidinyl-benzilate |
| RAMP | <i>Receptor modifying-activity protein</i> |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| S1P | Sphingosine-1-phosphate |

| | |
|-------|--|
| SCAM | <i>Substituted cysteine accessibility method</i> |
| SDF-1 | <i>Stromal cell-derived factor-1</i> |
| SII | <i>[Sar¹Ile⁴Ile⁸]-angiotensine II</i> |
| TM | <i>Transmembrane</i> |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VIH-1 | <i>Virus d'immunodéficience humaine 1</i> |
| VFT | <i>Venus flytrap domain</i> |
| WHIM | <i>Warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis</i> |

Introduction

L'homme a toujours su se distinguer des autres espèces par sa capacité à préserver une certaine qualité de vie via l'usage de produits à caractères médicaux allant d'extraits de plantes à des composés purement chimiques. Bien avant l'ère moderne, la plupart des remèdes utilisés n'étaient que bien souvent inefficaces ou encore néfastes pour l'Homme. Le besoin de pouvoir mieux isoler et caractériser le mécanisme de ces composés actifs fut à l'origine de la pharmacologie d'aujourd'hui. Vers la fin du 19^e siècle, les études histologiques de Paul Ehrlich sur l'interaction de colorants comme l'éosine ou le vert de malachite lui ont permis d'émettre que certains tissus expriment des « structures biologiques », théorie qu'il transposa à ces études sur la chimiothérapie (Drews, 2004; Ehrlich, 1909). Le physiologiste John Langley fut le premier à émettre l'hypothèse qu'il existait des « substances réceptives » spécifiques à chaque tissu qui permettaient la transmission d'un signal initié par l'administration d'un composé actif (Langley, 1905; Langley, 1907; Langley, 1908a; Langley, 1908b; Langley, 1909). Ces observations constituèrent les fondements de la théorie récepteuriel de l'action des drogues. Elles permirent à des scientifiques comme Alfred Joseph Clark de quantifier la réponse biologique d'une drogue et de proposer un modèle d'activation récepteuriel (Clark, 1933; Maehle et al., 2002). Plusieurs autres scientifiques comme John Gaddum et Heinz Otto Schild ont permis l'élaboration des théories de bases de la pharmacologie pour quantifier l'affinité et l'efficacité d'agonistes et d'antagonistes (Hill, 2006). Ils ont aussi permis d'élucider la compétitivité et la sélectivité de différents ligands. Ces concepts ont forcé les pharmacologues à développer de nouveaux outils moléculaires afin de caractériser l'interaction moléculaire entre un ligand et son récepteur ainsi que par de nouveaux essais fonctionnels quantifiant la production de seconds messagers. La venue de la biologie moléculaire permit le clonage et la purification de différentes classes de récepteurs menant ainsi à l'obtention de la structure de ces entités réceptrices. Parmi celles-ci, nous retrouverons la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).

1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

Les GPCR constituent la plus grande famille de récepteurs avec plus de 865 gènes (Fredriksson and Schiöth, 2005) ce qui représente environ 4 % du génome (Harrow et al., 2012). Ces récepteurs forment des cibles pharmaceutiques de prédilection de l'industrie. En fait, plus de 30 % des médicaments sur le marché ciblent les GPCR (Overington et al., 2006). Environ 478 de ces gènes codent pour des récepteurs olfactifs ou gustatifs (Fredriksson and Schiöth, 2005). Les 375 gènes restants codent pour des GPCR non olfactifs qui ont la capacité de lier une très grande diversité de ligands endogènes et qui participent à l'homéostasie des systèmes du corps humain (Figure 1). De plus, bien que la plupart des GPCR chez l'Homme soient connus, il demeure néanmoins que plus de 140 GPCR non olfactifs ainsi que la plupart des récepteurs olfactifs n'ont pas encore de ligands connus, dits « orphelins » (Tang et al., 2012).

Les GPCR sont composés de 7 domaines transmembranaires (TM) sous forme d'hélices α reliées entre elles par 3 boucles extracellulaires (ECL) et 3 boucles intracellulaires (ICL). Le domaine N-terminal se trouve du côté extracellulaire à l'opposé de la queue C-terminale qui interagit avec plusieurs effecteurs au niveau intracellulaire. Les GPCR peuvent lier une très large diversité de ligands endogènes allant de petites molécules comme les amines biogéniques à des protéines de très grande taille (Figure 1). Lorsqu'un ligand se retrouve lié à son GPCR, ce dernier subit des changements conformationnels spécifiques permettant de les activer. Comme son nom l'indique, les GPCR furent d'abord caractérisés pour leur capacité d'induire une signalisation intracellulaire médiée par les protéines G hétérotrimériques. Celles-ci sont composées d'une sous-unité $G\alpha$ qui à l'état basal est lié au GDP ainsi qu'une sous-unité $G\beta$ et $G\gamma$ qui forme un dimère stable. L'activation d'un GPCR permet certains changements structuraux au niveau de la protéine G ce qui l'amènera à échanger une molécule de GDP pour une molécule de GTP. Il y aura par la suite dissociation entre la sous-unité $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$ ce qui permettra à ces 2 entités d'enclencher différents effecteurs spécifiques (Oldham and Hamm, 2008). Il existe 4 grandes classes de sous-unités α : $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, et $G\alpha_{12/13}$ (Figure 1). L'activation de la

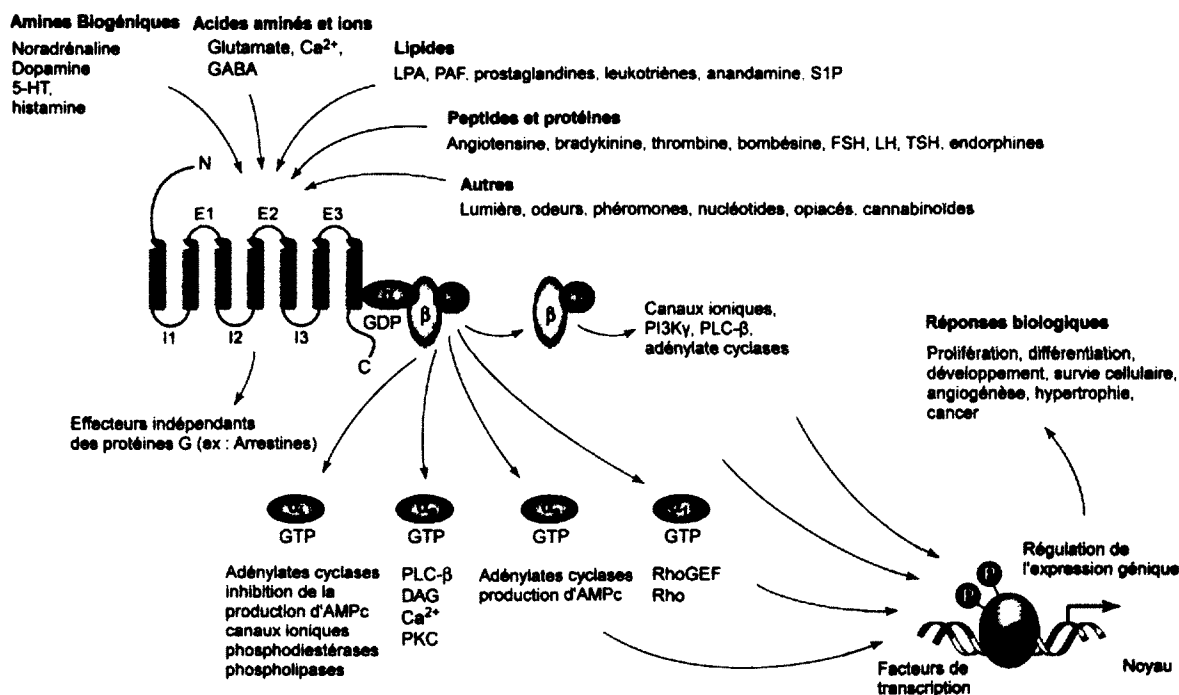


Figure 1. Diversité des ligands et des voies de signalisation des GPCR

Figure modifiée de Marinissen and Gutkind, 2001.

sous-unité $G\alpha_s$ favorise la production d'AMPc par l'adénylate cyclase tandis que la sous-unité $G\alpha_i$ l'inhibera. La sous-unité $G\alpha_q$ est responsable de l'activation de la phospholipase C qui clivera le phosphatidylinosito-1-4,5-biphosphate en diacylglycérol et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). L' IP_3 activera son récepteur, l' IP_3R , pour mobiliser le calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. Le calcium et le diacylglycérol permettra respectivement l'activation de la protéine kinase C et son adressage à la membrane. La sous-unité $G\alpha_{12/13}$ active quant à elle la voie des GTPases Rho qui sont responsables entre autres du remodelage du cytosquelette. Une fois le GPCR activé, sa queue C-terminale sera phosphorylée sur des résidus sérine et/ou thréonine par des protéines kinases spécifiques aux GPCR appelées GRK (Gurevich et al., 2012) ainsi que d'autres protéines kinases comme la PKC (Tobin, 2008). L'arrestine, une protéine d'échafaudage, se liera au GPCR phosphorylé pour ensuite recruter plusieurs effecteurs qui enclencheront diverses voies de signalisation ainsi que l'internalisation du récepteur (Shenoy and Lefkowitz, 2011).

1.2 Classification structurelle des GPCR

Le clonage moléculaire de la rhodopsine bovine par le groupe de Hogness (Nathans and Hogness, 1983) a permis de mettre en lumière sa structure secondaire heptahélicale similaire à la bactériorhodopsine (Steitz et al., 1982). Par la suite, le clonage du récepteur β 2-adrénergique (Dixon et al., 1986) permit de constater qu'il y avait une très forte similarité entre ce récepteur et la rhodopsine au niveau de la structure primaire et secondaire. Le 11-*cis*-rétinal étant capable de lier la rhodopsine en s'intercalant entre les domaines transmembranaires laissait sous-entendre la possibilité que les ligands pour le récepteur β 2-adrénergique pouvaient se lier d'une manière similaire (Thomas and Stryer, 1982). Au niveau de la signalisation intracellulaire, le récepteur β 2-adrénergique et la rhodopsine étaient connus pour activer respectivement la protéine G_s et G_t (aussi connu sous le nom de transducine) laissant présager qu'il existait toute une classe de récepteurs à sept domaines transmembranaires qui agissait via les protéines G hétérotrimériques (Gilman, 1984).

L'identification et la caractérisation de plusieurs autres GPCR ont ensuite mené à leur classification selon diverses nomenclatures. Les GPCR de tous les invertébrés et vertébrés peuvent être regroupés selon un système de classification à 6 classes de A à F (Attwood and Findlay, 1994; Kolakowski, 1994). De manière plus générale, les GPCR chez l'humain peuvent être classés selon 3 grandes classes : la classe A qui regroupe les récepteurs similaires à la rhodopsine, la classe B qui regroupe les récepteurs similaires au récepteur de la sécrétine et la classe C qui regroupe les GPCR apparentés au récepteur du glutamate (Figure 2). De plus, la classe B et la classe C peuvent se subdiviser pour donner respectivement la classe des récepteurs d'adhésions et la classe des récepteurs Frizzled qui permettent de former le système GRAFS de classification des GPCR (Fredriksson et al., 2003; Schioth and Fredriksson, 2005).

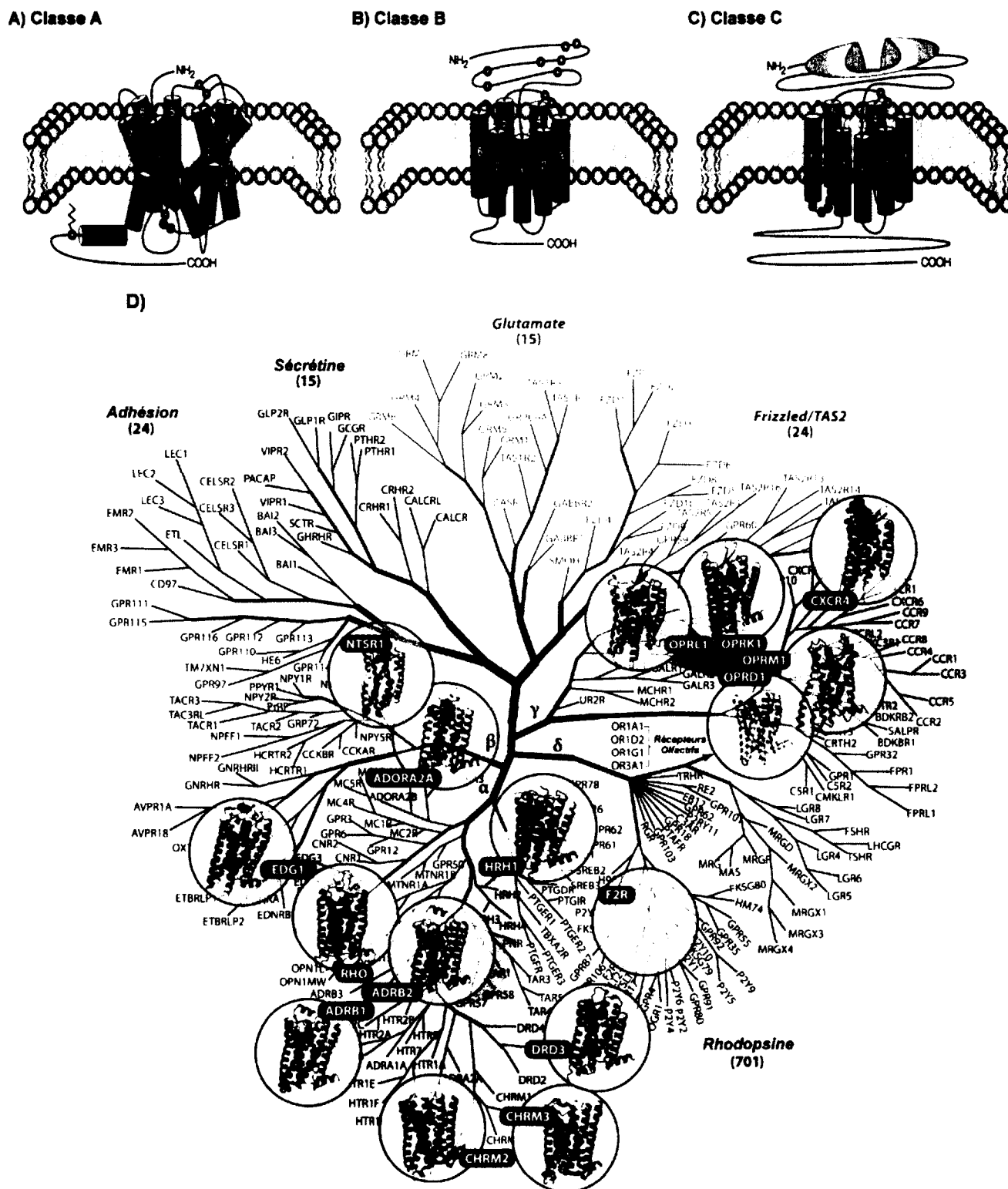


Figure 2. Classification structurale des GPCR

Représentation graphique des différentes classes de GPCR classe A (A) classe B (B) classe C (C) Figure modifiée de George et al., 2002. (D) Dendrogramme sur les différentes familles de GPCR avec les différentes structures cristallographiques connues. Figures modifiée de Katritch et al., 2012.

1.2.1 Les GPCR de classe A

La classe A est la plus étudiée et regroupe les récepteurs olfactifs, aminergiques et peptidergiques incluant les récepteurs aux tachykinines, aux glycoprotéines et aux chimiokines. Le mécanisme de liaison de ces récepteurs impliquent principalement les domaines transmembranaires malgré que certains récepteurs peptidergiques impliquent aussi la portion N-terminale et les boucles extracellulaires. La plupart des GPCR de classe A possèdent un pont disulfure qui relie la première et la deuxième boucle extracellulaire et qui contribue à l'intégrité structurale du récepteur. On retrouve aussi pour certains récepteurs une queue C-terminale encrée à la membrane via un résidu cystéine palmitoylé (Figure 3). Cette modification post-traductionnelle est aussi impliquée dans la stabilisation de l'hélice 8 retrouvée chez certains GPCR comme la rhodopsine (Ovchinnikov et al., 1988).

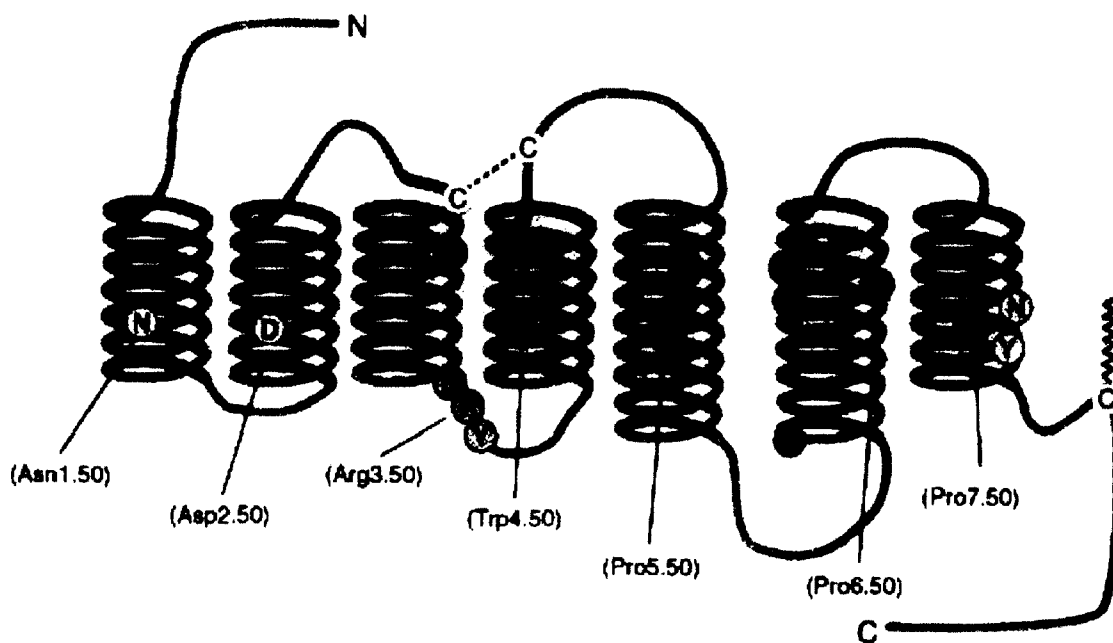


Figure 3. Nomenclature Ballesteros-Weinstein pour les récepteurs de classe A

Chacun des résidus les plus conservés de chaque TM se voit attribuer la valeur 50. Les résidus situés dans les domaines extracellulaires seront indiqués par la mention ECL et les boucles intracellulaires par ICL. Certains résidus conservés sont aussi représentés et discutés dans la section 2.1.1. Figure modifiée de Gether and Kobilka, 1998.

L'identité de séquence entre tous les récepteurs de la classe A se situe environ entre 20% et 25% mais on y retrouve la présence de résidus hautement conservés (Katritch et al., 2013). Afin d'évaluer l'identité de ces résidus spécifiques, quelques nomenclatures ont été proposées dont celle de Ballesteros-Weinstein qui demeure la plus utilisée (Gether and Kobilka, 1998; Ballesteros and Weinstein, 1995). Cette nomenclature attribue la valeur 50 au résidu le plus conservé de chacun des domaines TM et les autres résidus sont numérotés selon leur position relative vis-à-vis ce résidu (Figure 3). Ce système permet aussi de mettre en valeur la présence des motifs spécifiques qui caractérisent les GPCR de classe A.

Au niveau du domaine TM1 on retrouve le résidu Asn^{1.50} qui participe à un réseau intramoléculaire de ponts hydrogène avec les résidus Asp^{2.50}, Trp^{6.48}, Asn^{7.45}, Ser^{7.46}, Asn^{7.49} et Tyr^{7.53} (Ballesteros and Weinstein, 1995). Le motif (D/E)R^(3.50)Y est reconnu pour jouer un rôle important au niveau de l'état conformationnel du récepteur et du couplage avec la protéine G. Certaines études ont caractérisé l'interaction entre les résidus Arg^{3.50}, Asp/Glu^{3.49} et Asp/Glu^{6.30} que l'on appelle communément le *ionic lock* et certaines mutations de ce motif sont connues pour modifier l'activité constitutive ou induite par l'agoniste (Rovati et al., 2007; Trzaskowski et al., 2012). Les résidus proline 5.50, 6.50 et 7.50 sont responsables de l'orientation et de la flexibilité des domaines TM5, TM6, TM7 et participent activement aux multiples conformations induites. Le motif CWxP^(6.50) situé au niveau du domaine TM6 est impliqué au niveau du changement conformationnel appelé *global toggle switch* (Nygaard et al., 2009). Ce mouvement s'explique par un changement conformationnel important lors de l'activation où les résidus Trp^{6.48} et Phe^{6.44} font face au domaine TM7 à l'état inactif et pivotent vers le résidu Pro^{5.50} dans l'état actif. Ce changement d'orientation du domaine TM6 permet aux résidus adjacents de modifier l'angle induit par le résidu Pro^{6.50} du motif CWxP^(6.50). Le motif NP^(7.50)xxY situé au niveau du domaine TM7 qui regroupe le résidu Pro^{7.50} module la transition de l'état inactif vers l'état actif (Govaerts et al., 2001; Trzaskowski et al., 2012). Tous ces résidus conservés jouent des rôles importants au niveau de l'intégrité structurale des GPCR de classe A et leurs implications quant à la liaison du ligand ou à l'activation seront discutées plus en détail dans la section 1.3.2.

1.2.2 Les GPCR de classe B

Cette classe de GPCR regroupe principalement les récepteurs d'hormones peptidergiques comme le peptide vasointestinal actif, le glucagon et la parathormone. Ces récepteurs possèdent un domaine N-terminal très long où l'on retrouve plusieurs résidus cystéine qui forment probablement un réseau de ponts disulfures (Figure 2B). Ce domaine communément appelé *secretin family recognition fold* est grandement impliqué dans la stabilisation d'une structure d'hélice α au niveau du ligand ce qui mène à l'activation du récepteur (Parthier et al., 2009). Comparativement à la classe A, ces récepteurs possèdent une grande divergence au niveau de la position des résidus proline conservés au sein des domaines TM (Fredriksson et al. 2003). Ils n'ont d'ailleurs pas de motif (D/E)R^(3.50)Y et aucun site de palmitoylation au niveau de la queue C-terminale. Les protéines appelées *receptor activity-modifying proteins* (RAMP) sont aussi connues pour s'associer avec les GPCR de classe B pour former une espèce hétérodimérique présentant différentes affinités pour ses ligands selon la protéine RAMP avec laquelle le récepteur s'associe (Hay et al., 2006). Ces protéines modulent non seulement l'affinité, mais aussi le routage intracellulaire des récepteurs de classe B (Hay et al., 2006).

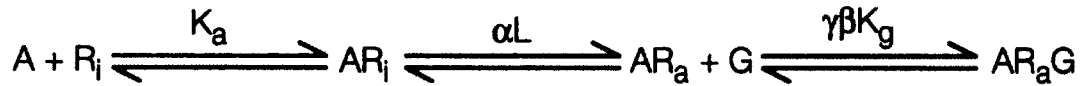
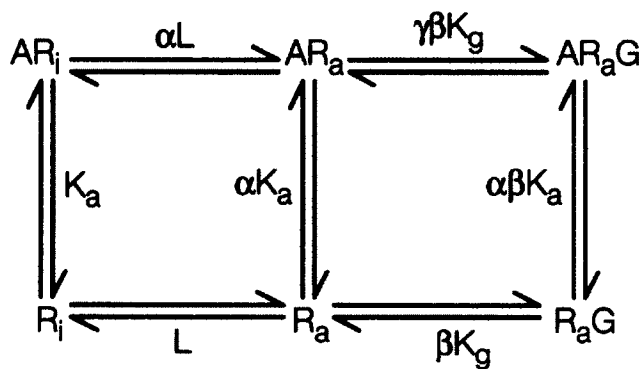
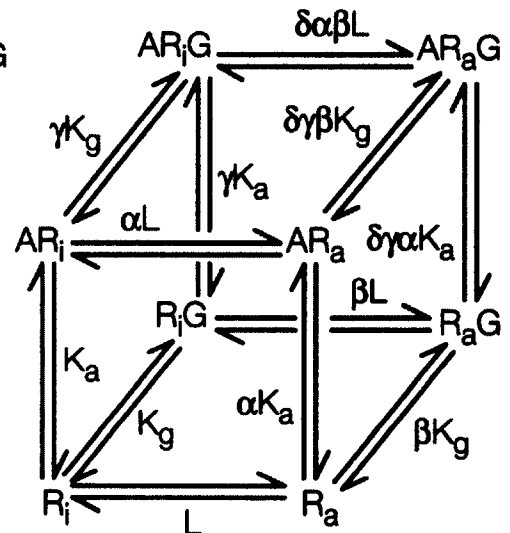
1.2.3 Les GPCR de classe C

Cette classe regroupe les récepteurs métabotropiques du glutamate, de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et du calcium. Ces derniers possèdent un long domaine N-terminal appelé *Venus flytrap domain* (VFT) qui est responsable de la liaison du ligand (Figure 2C). Cette région est connectée au domaine heptahélical, principal responsable de la traduction des changements conformationnels extracellulaires suite à liaison de l'agoniste vers une activation dépendante de la protéine G (Pin et al., 2003). De plus, les GPCR de classe C constituent la première classe pour laquelle la dimérisation et l'oligomérisation furent reconnues pour agir sur leurs fonctions et leur activation (Pin et al., 2004). Les interfaces d'interactions entre dimères sont situées tant au niveau du domaine VFT que du domaine C-terminal de la portion heptahélicale. Les récepteurs métabotropiques du glutamate forment des dimères constitutifs liés entre protomères par l'entremise d'un pont

disulfure (Romano et al., 1996). Il existe aussi des modulateurs allostériques tel que la méthylphényléthynylpyridine pour le récepteur métabotropique du glutamate 5 qui sont capables de lier uniquement le domaine hémataphélicale des récepteurs de classe C (Jensen et al., 2001). Ces modulateurs n'ont aucune activité en soi, mais sont capables d'augmenter l'efficacité de l'agoniste endogène (Pin et al., 2004). Ces composés stabilisent l'état actif du récepteur et démontrent bien la coopération entre le domaine VFT et le domaine heptahélicale des récepteurs de classe C. Le résidu Arg^{3.50} faisant partie du motif (D/E)R^(3.50)Y pour les récepteurs de classe A est présent que chez certains récepteurs de classe C ce qui suggère que d'autres déterminants moléculaires sont impliqués dans l'activation (Pin et al., 2004). Nous retrouvons en C-terminal de la troisième boucle intracellulaire le motif FILN(E/D)xK qui est important dans l'activation dépendante de la protéine G (Chang et al., 2000; Francesconi and Duvoisin, 1998).

1.3 L'univers conformationnel des GPCR

Afin de pouvoir apprécier la diversité structurale des GPCR, il devient non seulement important de les classer, mais aussi d'étudier les différentes possibilités conformationnelles au sein d'un même récepteur. De manière classique, on assume qu'un récepteur peut avoir deux états soit actif et inactif (Figure 4A). Dépendamment de l'affinité de l'agoniste pour son récepteur, il y aura formation d'un complexe entre le récepteur inactif et l'agoniste. Par la suite, dépendamment de l'efficacité de l'agoniste il y aura isomérisation du complexe vers un état actif pour induire une signalisation dépendante de la protéine G. Par contre, ce modèle classique ne tient pas compte de l'affinité de la protéine G pour un récepteur actif. En effet, par des études de radiolisation, on dénote qu'il existe un site de basse affinité ainsi qu'un site de haute affinité responsable de l'activité dépendante de la protéine G (Stadel et al., 1980). Cette observation est à l'origine du modèle du complexe ternaire (Figure 4B) qui tient compte de la différence au niveau de l'affinité entre le complexe ligand-récepteur actif versus inactif (De Lean et al., 1980). La découverte que certains GPCR présentent une activité constitutive, c'est-à-dire, une activité indépendante de la liaison de l'agoniste à son récepteur (Costa and Herz, 1989) a permis de caractériser une nouvelle entité où l'on retrouve un complexe actif récepteur-

a Modèle simple de la liaison et de l'activation**b** Modèle du complexe ternaire simple**c** Modèle du complexe ternaire étendu**d** Modèle du complexe cubique ternaire**Figure 4. Modèles conformationnels de la liaison et de l'activation des GPCR.**

R_i : Récepteur à l'état inactif, R_a : Récepteur à l'état actif, G : Protéine G, K_a : Constante d'association entre l'agoniste et le récepteur, K_g : Constante d'association entre le récepteur et la protéine G, L : constante allostérique représentant le ratio R_i/R_a , α : Facteur différentiel entre l'affinité de l'agoniste pour l'état actif versus l'état inactif, β : Facteur différentiel entre l'affinité de la protéine G pour l'état actif versus l'état inactif, γ : Facteur différentiel pour l'affinité d'un récepteur en conformation lié pour la protéine G, δ : Facteur de la synergie produite par la liaison de l'agoniste sur l'interaction entre la protéine G et le récepteur. Figure modifiée de Kenakin, 2002.

protéine G (Figure 4C). Par le même fait, on peut aussi assumer qu'un récepteur à l'état inactif pourrait avoir une affinité différente du récepteur actif pour la protéine G et former un complexe inactif avec ou sans ligand (Figure 4D).

Au cours des dernières années, plusieurs études ont permis la découverte de concepts très utilisés dans la pharmacologie d'aujourd'hui comme l'allostérie (Section 1.3.3) et la sélectivité fonctionnelle (Section 1.3.3.3). La possibilité qu'un ligand allostérique, c'est-à-dire qu'il peut lier un site autre que le site du ligand endogène (site orthostérique) ouvre la porte à une plus grande diversité conformationnelle au sein d'un même GPCR. Le fait que différents ligands pour un même récepteur peuvent favoriser une voie de signalisation par rapport à une autre nous amène ultimement à la réflexion suivante : « Quels sont les déterminants moléculaires responsables de la liaison de ces composés et quels sont les changements conformationnels nécessaires à l'authenticité de chacune de ces conformations ? » Ces multiples conformations sont aussi influencées par des effecteurs activés par les GPCR qui, au même titre que la protéine G, lieraient le récepteur et stabiliseraient une structure précise qui serait à l'origine de leur action pharmacologique.

1.3.1 Structure et reconnaissance du ligand

Le premier événement dans la cascade d'action pharmacologique est la liaison du ligand à son récepteur. La plupart des composés pharmaceutiques commercialisés ciblent les GPCR de classe A. Ces derniers sont par le même fait les plus étudiés au niveau structural. Cette thèse se consacrera principalement sur la structure des GPCR de classe A. Nous discuterons de quelques familles de récepteurs retrouvés au sein de cette classe ainsi que des différences et des ressemblances au niveau de leur structure générale et des résidus impliqués dans leur pochette de liaison.

1.3.1.1 La rhodopsine

La rhodopsine est un GPCR présent sur les cellules photoréceptrices de la rétine et qui est responsable de convertir et d'amplifier un signal lumineux (Filipek et al., 2003). Le

chromophore 11-*cis*-rétinal est lié de manière covalente avec le récepteur opsine via une base de Schiff protonée pour former la rhodopsine. Le 11-*cis*-rétinal agit comme agoniste inverse du récepteur, c'est-à-dire qu'il stabilise l'état inactif. En présence de lumière, il y aura absorption d'un photon par la rhodopsine qui provoquera une photoisomérisation du 11-*cis*-rétinal en all-*trans*-rétinal pour ensuite induire des changements conformationnels au niveau de l'opsine. Ces mouvements enclencheront une signalisation qui se fera via l'action de sa protéine G, la transducine (G_t), qui activera les phosphodiésterases du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) pour l'hydrolyser et bloquer l'action de canaux cationiques dépendants au GMPc. Cette action permettra l'émission d'une impulsion électrique au niveau du cortex visuel (Palczewski, 2008).

Afin de déterminer les résidus impliqués dans la pochette de liaison de la rhodopsine, plusieurs techniques furent employées dont la mutagenèse dirigée, le marquage par agent de réticulation ou par photoanalogues, le *site-directed spin labeling* et des simulations dynamiques (Hubbell et al., 2003). Les premières structures moléculaires résolues de la rhodopsine proviennent de cristaux bidimensionnels qui permirent de déterminer l'orientation des domaines TM dans la membrane lipidique (Krebs et al., 1998; Unger et al., 1997). Ce récepteur fut ensuite le premier GPCR à voir sa structure tridimensionnelle résolue par des études de cristallisation (Palczewski et al., 2000). La rhodopsine étant très abondante dans les bâtonnets de la membrane externe de la rétine de bovins a facilité la formation de cristaux de la protéine native. De plus, le fait que le 11-*cis*-rétinal est lié de manière covalente au récepteur maintient l'état inactif et favorise une meilleure stabilité et une homogénéité conformationnelle contrairement à d'autres GPCR dont le ligand est diffusible (Kobilka, 2007). C'est entre autres pour ces raisons techniques que la rhodopsine demeura la seule structure moléculaire à haute résolution d'un GPCR pour les quelques années suivantes. Les études de modélisation par homologie de séquence basées sur la structure de la rhodopsine ont grandement contribué à établir des modèles pour d'autres GPCR (Stenkamp et al., 2002).

La rhodopsine est composée de la structure heptahélicale typique des GPCR. Son ligand, le 11-cis-rétinal, est lié profondément dans la pochette de liaison et attaché de manière covalente à la Lys296^(7.32) du domaine TM7 (Palczewski et al., 2000). Les portions extracellulaires de la rhodopsine sont agencées de manière très compacte avec les domaines ECL1 et ECL3 situés en périphérie et le domaine ECL2 au niveau de la pochette de liaison du chromophore (Figure 5A). La région N-terminale et le domaine ECL2 adoptent chacun une conformation composée de deux feuillets β antiparallèles et forme ce qu'on appelle le *retinal plug* obstruant ainsi l'entrée vers la pochette de liaison (Figure 5A). Cette occlusion semble être une caractéristique des GPCR ayant des ligands plutôt hydrophobes, les empêchant ainsi toute interaction avec le milieu extracellulaire aqueux. Certains de ces ligands pourraient même entrer dans la pochette de liaison via la membrane plasmique (Hurst et al., 2010). Un pont disulfure hautement conservé parmi les GPCR de classe A est situé entre le domaine ECL2 et le domaine TM3 ce qui permet de stabiliser le *retinal plug*. Le 11-cis-rétinal forme des interactions avec plusieurs résidus principalement des domaines TM3, TM6, TM7 et ECL2. On y retrouve le résidu Lys296^(7.43) qui constitue la base de Schiff protonée et qui interagit avec le résidu Glu113^(3.28) (Figure 5C) pour stabiliser la rhodopsine à l'état inactif (Kim et al., 2004).

1.3.1.2 Les récepteurs monoaminergiques

Parmi ces récepteurs, nous retrouvons entre autres les récepteurs β -adrénergiques, sérotoninergiques, histaminiques et dopaminergiques. Les monoamines sont en général des neurotransmetteurs dérivés d'acides aminés contenant un groupement éthylamine lié à un noyau aromatique. Le récepteur le mieux étudié de cette classe est sans aucun doute le récepteur β 2-adrénergique qui fut le premier GPCR lié à un ligand diffusible à voir sa structure résolue par des études cristallographiques (Rasmussen et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007). Les résidus impliqués dans la liaison aux composés aminergiques sont situés principalement au niveau des domaines TM3, TM5, TM6 et TM7 (Gether, 2000). Des études de spectroscopie et de mutagenèse (Strader et al., 1989c; Tota and Strader, 1990)

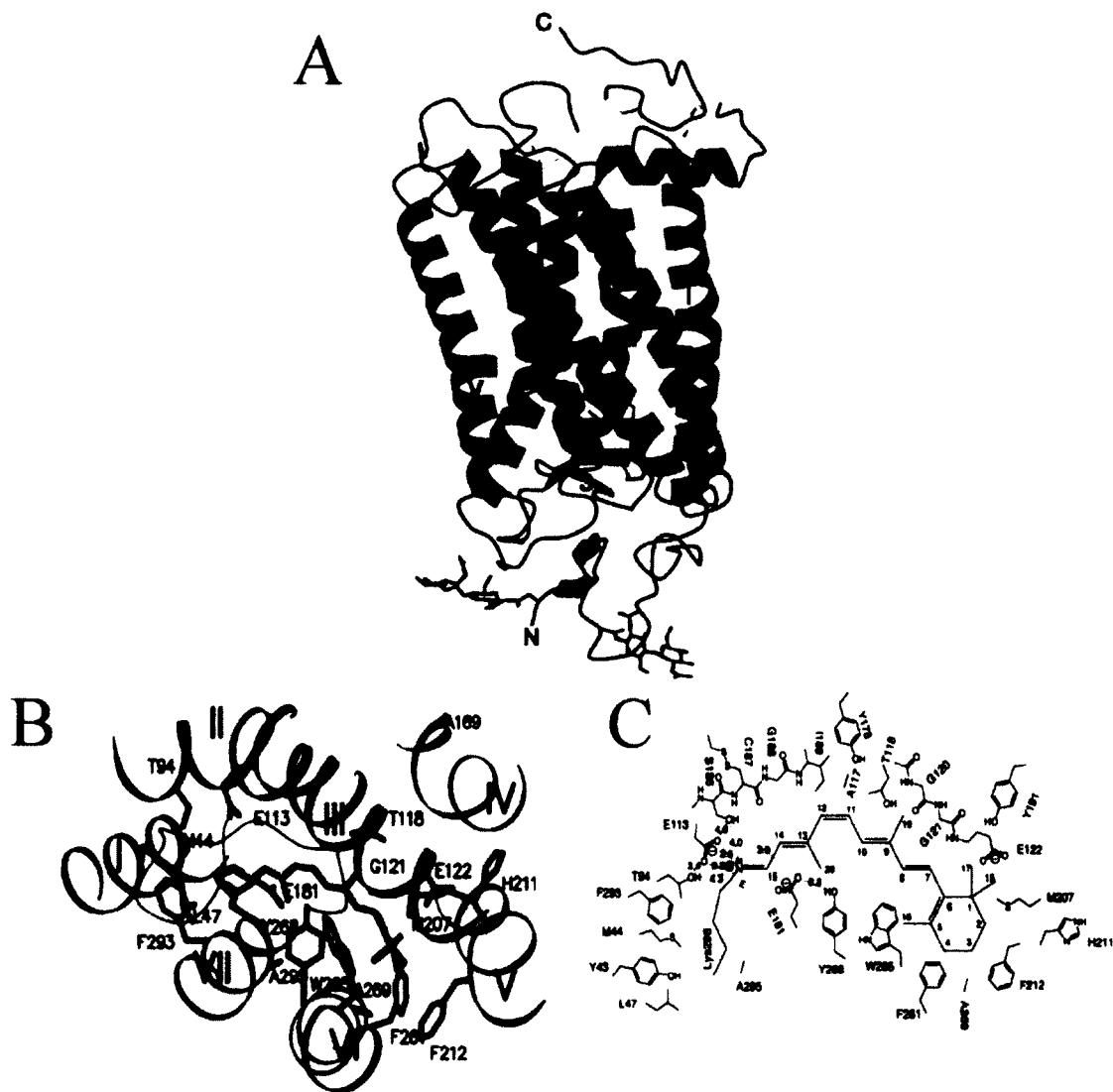


Figure 5. Structure moléculaire de la rhodopsine

(A) Vue parallèle au plan de la membrane plasmique de la rhodopsine. (B) Vue extracellulaire de la pochette de liaison avec les chaînes latérales (bleues) de l'opsine situées à proximité du 11-*cis*-retinal (jaune). (C) Schéma représentant les résidus situés à moins de 4,5 Å du 11-*cis*-retinal. Les domaines TM ainsi que l'hélice 8 sont identifiés par une numérotation en chiffres romains (I à VIII), les feuillets β de la région N-terminale et du domaine ECL2 sont numérotés de 1 à 4, les sites de glycosylation (Asn2^{N-term} et Asn15^{N-term}) du domaine N-terminal sont illustrés par des bâtonnets. Figure adaptée de Palczewski et al., 2000.

ainsi que la cristallisation du récepteur β 2-adrénérique (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007) ont permis de confirmer que les différents ligands de ce récepteur se retrouvaient dans une pochette de liaison située au niveau des segments transmembranaires (Figure 6). Cette pochette de liaison est d'ailleurs conservée parmi les structures moléculaires des récepteurs histaminiques, dopaminergiques et sérotoninergiques (Chien et al., 2010; Shimamura et al., 2011; Wacker et al., 2013; Wang et al., 2013). Le résidu Asp113^(3.32) interagit via un pont salin avec le groupement amine de différents

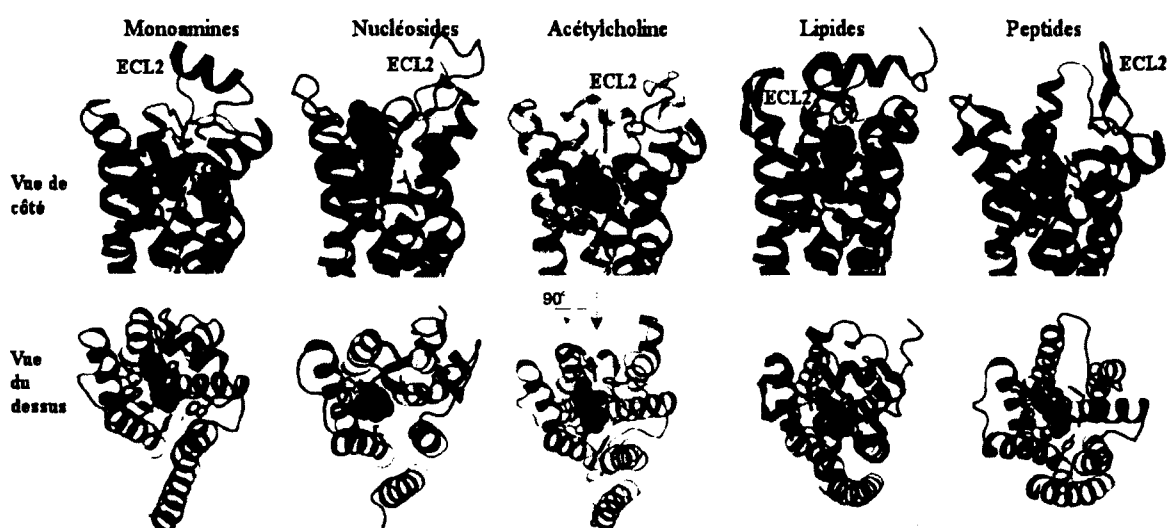


Figure 6. Diversité au niveau des pochettes de liaison des GPCR de classe A

De gauche à droite nous avons respectivement le récepteur β 2-adrénérique lié au carazolol (sphères orange; code Protein Data Bank(PDB) 2RH1), le récepteur adénosine A_{2A} lié au ZM24138 (sphères bleues, code PDB 3EML), le récepteur muscarinique M2 lié au 3-quinuclidinyl-benzilate (QNB) (sphères rouges, code PDB 3UON), le récepteur sphingosine 1-phosphate lié au ML056 (sphères vertes, code PDB 3V2Y) et le récepteur aux opiacés μ (μ) lié au β -FNA (sphères roses, code PDB 4DKL). Les chaînes latérales situées à l'intérieur de 4 Å du ligand sont représentées en mauve. Figure adaptée de Granier and Kobilka, 2012.

agonistes et antagonistes des récepteurs adrénériques (Strader et al., 1989a). Les groupement hydroxyles des ligands monoaminergiques interagissent avec les résidus

Ser203^(5.42), Ser204^(5.43) et Ser207^(5.46) du domaine TM5 (Liapakis et al., 2000; Strader et al., 1989b). Plusieurs résidus du domaine TM6 comme Phe289^(6.51), Phe290^(6.52) et Asn293^(6.55) participent à la formation de la pochette de liaison en interagissant directement avec le ligand (Rosenbaum et al., 2007; Wieland et al., 1996). Au niveau du domaine TM7, nous retrouvons le résidu Phe312^(7.39) qui interagit au moyen de ponts hydrogène et qui serait impliqué dans l'affinité et la sélectivité entre les récepteurs α - et β -adrénergiques (Suryanarayana et al., 1991).

Il existe une certaine similarité entre le récepteur β 2-adrénergique et la rhodopsine, (Huber et al., 2008) mais la différence la plus probante au niveau de la pochette de liaison est certainement la structure secondaire de la région ECL2 (Figure 6). Tel que discuté dans la section 2.2.1.1, la région ECL2 de la rhodopsine se replie en formant deux feuillets β antiparallèles tandis qu'au niveau de la structure du récepteur β 2-adrénergique elle adopte une structure en hélice α . Cette conformation offre beaucoup moins d'encombrement stérique et permet une meilleure accessibilité à la pochette de liaison pour un ligand diffusible. Un pont disulfure entre la région ECL2 et le haut du domaine TM3 ainsi qu'au niveau de l'ECL2 uniquement permettrait de stabiliser cette structure en périphérie du site de liaison (Noda et al., 1994; Rasmussen et al., 2007). Le récepteur β 1-adrénergique qui fut cristallisé par le groupe de Schertler démontra que la région ECL2 adopte une conformation hélicale, ce qui suggère qu'il s'agirait d'une structure conservée au niveau des GPCR de classe A (Warne et al., 2008). Il s'agit aussi de l'une des régions les plus divergentes en acides aminés entre le β 1- et le β 2-adrénergique à l'opposé de leur pochette de liaison qui sont très similaires, ce qui pourrait expliquer la sélectivité entre ces deux récepteurs. Cette région pourrait aussi contribuer à la liaison de composés allostériques au niveau de plusieurs GPCR (Wheatley et al., 2012).

À la liste des structures moléculaires connues de cette classe, nous retrouvons la structure moléculaire du récepteur dopaminergique D3 (Chien et al., 2010). On y observe une structure et une pochette de liaison similaire aux récepteurs adrénérergiques, mais sans la structure hélicale de la région ECL2. Les domaines TM5 et TM6 sont davantage inclinés vers la pochette de liaison ce qui l'obstrue légèrement contrairement à la structure plutôt

ouverte du récepteur β 2-adrénergique. Notons aussi la structure du récepteur histaminique H1 où l'on retrouve une pochette de liaison très similaire aux récepteurs aminergiques composée principalement des domaines TM3, TM5 et TM6. Nous retrouvons les résidus Ile115^(3.40), Phe424^(6.44), Trp428^(6.48) et Phe432^(6.52) qui sont conservés parmi les récepteurs monoaminergiques (Shimamura et al., 2011). Les résidus peu conservés Trp158^(4.56) et Asn198^(5.46) se retrouvent dans la pochette de liaison et pourraient former des interactions hydrophobes avec l'antagoniste doxépin. Autre fait unique à ce récepteur est la présence d'un ion phosphate à l'entrée de la pochette de liaison dans la structure cristallographique qui pourrait agir comme modulateur allostérique positif pour la liaison de certains ligands (Shimamura et al., 2011). Les résidus Lys191^(5.39) et Lys179^(4.77) participeraient à la formation d'une cavité ionique extracellulaire ainsi qu'à la liaison d'antagoniste H1 de deuxième génération.

1.3.1.3 Les récepteurs aux nucléosides

La structure cristallographique du récepteur A_{2A} de l'adénosine fait probablement de ce dernier le récepteur le mieux caractérisé de cette classe (Jaakola et al., 2008). En comparant sa structure par rapport aux récepteurs monoaminergiques, on remarque que l'antagoniste ZM241385 s'installe perpendiculairement par rapport au plan de la membrane et occupe une pochette de liaison qui va du cœur des domaines transmembranaires jusqu'aux boucles extracellulaires (Figure 6). Les principaux déterminants moléculaires se retrouvent au sein des domaines TM3, TM5, TM6 et TM7 et s'étend jusqu'aux régions ECL2 et ECL3 (Fredholm et al., 2011). Les résidus His250^(6.52) et Asn253^(6.55) font d'importants contacts avec le ligand et contribuent aussi à son affinité tel que confirmé par des études de mutagenèse (Jiang et al., 1997; Kim et al., 1995). Les résidus Leu267^(7.32), Met270^(7.35) et Ile274^(7.39) contribuent à la liaison au moyen de contacts hydrophobes (Jaakola et al., 2008). La région ECL2 n'adopte aucune structure secondaire précise, mais possède trois ponts disulfures dont le pont entre l'ECL2 et le domaine TM3 qui est conservé parmi les GPCR de classe A. Les résidus Phe168^(5.29) et Glu169^(5.30) de cette boucle extracellulaire forment des interactions avec l'antagoniste ZM241385 (Figure 6). Lorsque le résidu Glu169^(5.30) est muté en résidu alanine, on observe une diminution de

l'affinité de l'agoniste et de l'antagoniste confirmant son rôle dans la pochette de liaison (Kim et al., 1996).

1.3.1.4 Les récepteurs cholinergiques

Cette famille est composée des récepteurs nicotiniqes qui regroupent en fait des canaux cationiques ainsi que les récepteurs muscariniques qui sont des GPCR de classe A et qui possèdent l'acétylcholine comme ligand. Parmi les cinq sous-types de récepteurs muscariniques, seul les récepteurs M2 et M3 ont vu leurs structures résolues par des études cristallographiques (Haga et al., 2012; Kruse et al., 2012). Les récepteurs M2 et M3 possèdent une pochette extracellulaire similaire au récepteur D3, par contre on y retrouve la région ECL2 en structure hélicale courte telle qu'observée pour le récepteur β 1-adrénergique. Une des particularités des récepteurs muscariniques est que l'on y retrouve un canal hydrophile très étendu qui fait 33 Å de profondeur à partir de la région ECL2. Ce canal est séparé de la surface cytoplasmique par trois résidus hydrophobes conservés à travers les récepteurs muscariniques : Leu65^(2.46), Leu114^(4.43) et Ile392^(6.40). La pochette de liaison se situe profondément au niveau des domaines TM3, TM4, TM5, TM6 et TM7, similaire aux récepteurs monoaminergiques (Figure 6). On y retrouve d'ailleurs l' résidu Asp103^(3.32) qui forme une interaction ionique avec l'agoniste inverse 3-quinuclidinylbenzilate (QNB) tandis que le résidu Asn404^(6.52) forme des ponts hydrogène avec le groupement hydroxyle et le carbonyle du QNB. Ces résidus pourraient potentiellement interagir avec le ligand endogène, l'acétylcholine. Les résidus qui constituent la pochette de liaison du QNB sont identiques parmi les cinq sous-types de récepteurs muscariniques, ce qui est confirmé par des études de mutagenèse dirigée (Heitz et al., 1999; Hulme et al., 2003; Wess, 1993). On retrouve une cage aromatique composée de trois résidus tyrosine (Tyr104^(3.33), Tyr403^(6.51) et Tyr426^(7.39)) qui isole le ligand dans une pochette hydrophobe (Haga et al., 2012; Kruse et al., 2012). Une des particularités du récepteur M3 se situe au niveau de l'orientation de la chaîne latérale du résidu Tyr529^(7.39) qui se situe davantage dans la pochette de liaison que pour le M2. Cette différence est probablement due à une interaction potentielle avec le résidu Phe124^(2.61) contrairement au résidu Tyr80^(2.61) pour le M2. Des études de mutagenèse dirigée ont d'ailleurs confirmé l'importance du résidu 2.61

pour la sélectivité et l'activation du récepteur (Lameh et al., 1992; Lebon et al., 2009; Li et al., 2007). Il existe certaines différences notables au niveau des domaines ECL par exemple le résidu Phe181^(5.33) qui est unique pour le M2 et qui interagit avec l'un des noyaux phényl du QNB (Haga et al., 2012). Ce sont ces résidus qui doivent être ciblés pour augmenter la sélectivité de composés ciblant cette famille de récepteurs.

1.3.1.5 Les récepteurs lipidiques

Plusieurs récepteurs orphelins furent étudiés afin de les caractériser et d'identifier leurs ligands endogènes. C'est pourquoi depuis quelques années seulement, nous commençons à apprécier la diversité de la famille des récepteurs lipidiques qui englobe les récepteurs aux cannabinoïdes, les récepteurs de l'acide lysophosphatidique (LPA) et les récepteurs au sphingosine-1-phosphate (S1P) (Yin et al., 2009). Ce dernier est d'ailleurs le seul récepteur à posséder une structure moléculaire définie et servira de modèle pour le reste de cette famille (Hanson et al., 2012). Les caractéristiques principales de la structure du récepteur S1P se situent d'abord au niveau des domaines extracellulaires. La portion N-terminale du récepteur adopte une conformation d'hélice α qui se replie à proximité des régions ECL1 et ECL2 ce qui permet une occlusion de la pochette de liaison (Figure 6). Cette structure nous rappelle en quelque sorte le *retinal plug* de la rhodopsine (section 2.2.1.1). À cet effet, il est probable que les ligands du récepteur S1P puissent avoir accès à leur pochette de liaison respective via la membrane lipidique similairement à ce qu'il avait été proposé pour la rhodopsine et les récepteurs aux cannabinoïdes (Filipek et al., 2003; Schadel et al., 2003; Hurst et al., 2010). La pochette de liaison amphipatique du récepteur S1P se divise en deux parties pour accommoder autant la nature hydrophobe et zwitterionique du ligand. La première région composée de la portion N-terminale, de la région ECL2, des domaines TM3 et TM7 interagit avec le groupement zwitterionique sphingosine via les résidus conservés Arg120^(3.28) et Glu121^(3.29). La deuxième portion qui se définit par les domaines TM3, TM5, TM6 et TM7 est composée de plusieurs résidus aromatiques formant une pochette hydrophobe pour la chaîne acyle du ligand lipidique. Cette dualité au sein de la pochette de liaison nous rappelle les récepteurs muscariniques et monoaminergiques où le ligand se lie principalement au sein des domaines

transmembranaires malgré la pochette de liaison qui s'étend jusqu'aux boucles extracellulaires (Section 1.3.1.2 et 1.3.1.4). Dans le cas du récepteur S1P, il fut cristallisé en présence d'un antagoniste qui mime la structure du sphingosine-1-phosphate et qui occupe la totalité de la pochette de liaison (Hanson et al., 2012). Par contre, une série de composés capables d'activer ce récepteur ont été démontrés pour ne lier que les domaines transmembranaires sans aucune interaction avec les résidus Arg120^(3.28) et Glu121^(3.29) (Gonzalez-Cabrera et al., 2008).

1.3.1.6 Les récepteurs peptidergiques

Les premiers GPCR à voir leur structure résolue par des études cristallographiques avaient pour ligands soit de petites molécules et/ou des composés synthétiques. Plusieurs groupes se sont alors intéressés sur les récepteurs ayant des ligands peptidiques. Le récepteur CXCR4 lié à l'antagoniste peptidique CVX15 fut le premier GPCR peptidergique à être cristallisé (Wu et al., 2010). Si nous regardons le récepteur CXCR4 vue du dessus (Figure 6), on observe une plus grande accessibilité à la pochette de liaison contrairement aux autres récepteurs. La pochette de liaison est composée principalement des domaines TM3, TM5, TM6 et TM7. Le domaine TM1 est davantage incliné vers le centre du récepteur comparativement au récepteur β 2-adrénergique et au récepteur A_{2A} de l'adénosine (Rasmussen et al., 2007; Jaakola et al., 2008). Les domaines TM2 et TM6 démontrent une inclinaison très prononcée aux résidus Pro92^(2.58) et Pro254^(6.50) ce qui permet à la pochette de liaison du récepteur d'être plus exposée au milieu extracellulaire (Wu et al., 2010). De plus, le domaine TM7 possède deux tours d'hélice α de plus que les autres classes de récepteurs. Au niveau des domaines extracellulaires notons que la région ECL2 adopte une structure formée de deux feuillets β antiparallèles situés en périphérie et qui régulent avec la portion N-terminale l'entrée à la pochette de liaison. Certains résidus transmembranaires comme les résidus Asp97^(2.63), Asp171^(4.60), Asp262^(6.58) et Glu288^(7.39) ainsi que les résidus extracellulaires Asp187^(ECL2) et Arg188^(ECL2) furent identifiés par des études de mutagenèse comme importants pour l'infection au VIH-1 et/ou pour la liaison de SDF-1 α , le ligand endogène de CXCR4 (Brelot et al., 2000; Tian et al., 2005). Il est intéressant de noter que tous ces résidus se retrouvent dans la pochette de liaison et interagissent avec l'analogue

peptidique CVX15 (Asp171^(4.60), Asp187^(ECL2), Arg188^(ECL2), Asp262^(6.58)) et l'antagoniste non-peptidique IT1t (Asp97^(2.63), Asp187^(ECL2) et Glu288^(7.39)) (Wu et al., 2010).

Dans la famille des récepteurs peptidergiques, nous retrouvons aussi la structure cristallographique des récepteurs aux opiacés (κ , δ , μ , nociceptine/orphanine FQ) qui sont responsable de l'activité des endorphines, des enképhalines, des dynorphines ainsi que des dérivés de l'opium comme la morphine et l'héroïne. Ces récepteurs régulent plusieurs processus, principalement la perception de la douleur. Ceux-ci partagent une pochette de liaison très accessible du point de vue extracellulaire (Granier et al., 2012; Manglik et al., 2012; Thompson et al., 2012; Wu et al., 2012) et très similaire à celle de CXCR4 (Figure 6). Les résidus Asp128^(3.32), Tyr129^(3.33), Val281^(6.55), His278^(6.52) et Ile277^(6.51) constituent les déterminants moléculaires conservés parmi tous les récepteurs aux opiacés. De plus, tous ces récepteurs partagent une structure de β -hairpin au niveau de la région ECL2 ce que l'on retrouve chez toutes les structures résolues de cette classe incluant le récepteur PAR1 et CXCR1 (Park et al., 2012; Zhang et al., 2012).

1.3.2 Le mécanisme d'activation des GPCR de classe A

À l'opposé des déterminants moléculaires impliqués au niveau de la pochette de liaison, nous retrouvons plusieurs résidus et motifs conservés au sein de la famille des GPCR de classe A qui favorisent l'équilibre conformationnelle. Beaucoup d'efforts ont été déployés pour mettre en lumière la structure moléculaire de plusieurs GPCR sous forme active alors que ces structures sont en minorité par rapport aux structures inactives (Audet and Bouvier, 2012). Parmi celles-ci, nous retrouvons la structure du récepteur β 2-adrénergique cristallisé en conformation active par le groupe de Kobilka (Rasmussen et al., 2011a; Rasmussen et al., 2011b; Rosenbaum et al., 2011). Ces structures ont permis de constater que la pochette de liaison ne subissait que très peu de changements entre la conformation active et inactive (Figure 7 A, B). Par contre, si l'on regarde à partir de la vue intracellulaire on peut apprécier les changements conformationnels lors de l'activation au niveau des motifs (D/E)R^(3.50)Y et NP^(7.50)xxY ainsi que l'éloignement du domaine TM6 du centre du récepteur (Figure 7C).

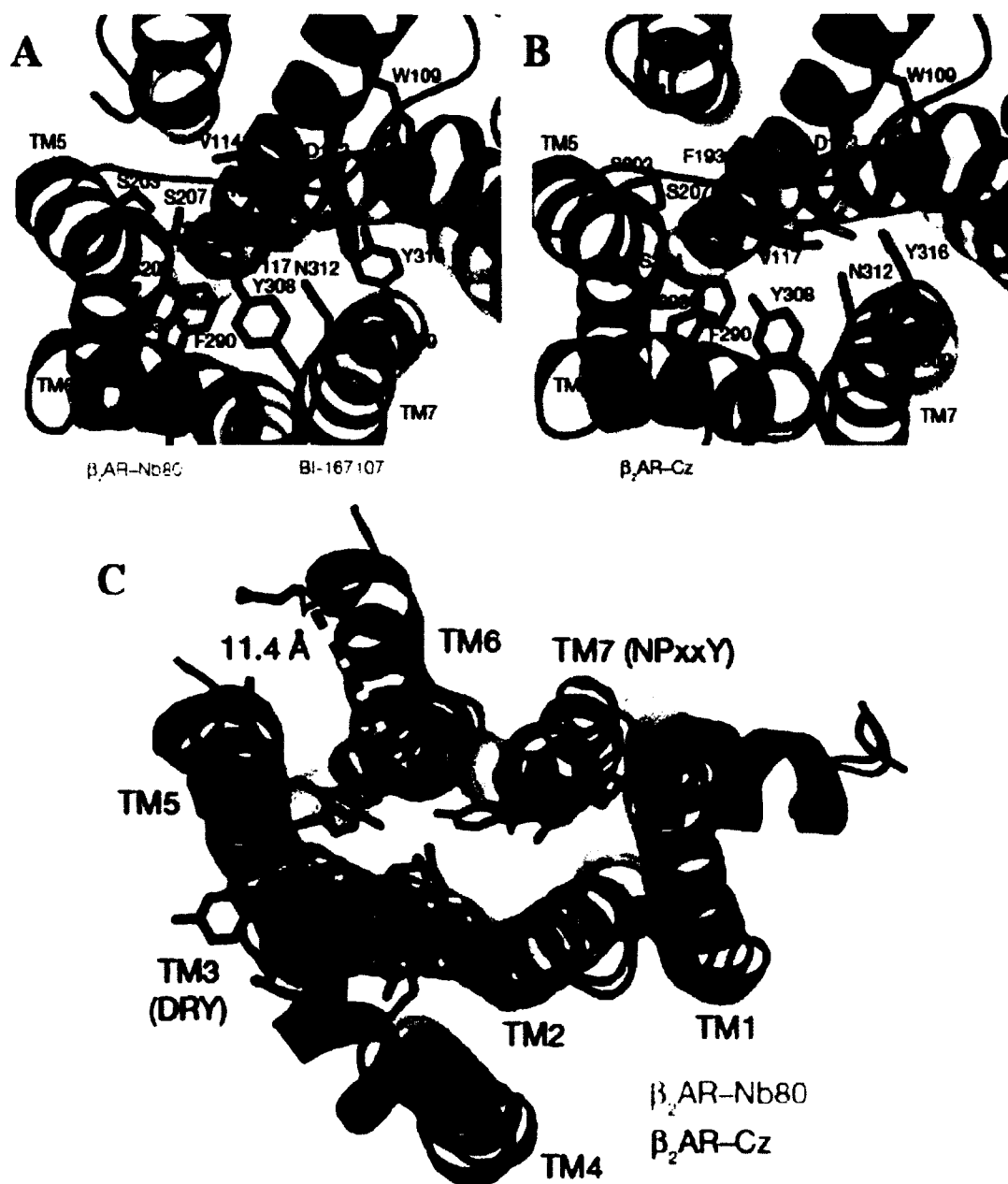


Figure 7. Structure moléculaire du récepteur β_2 -adrénergique en conformation active et inactive

Vue extracellulaire de la pochette de liaison du récepteur β_2 -adrénergique en conformation active lié à l'agoniste BI-167107 et stabilisé par le nanoanticorps Nb80 (A) et en conformation inactive en présence de l'agoniste inverse carazolol (B). Vue intracellulaire liaison du récepteur β_2 -adrénergique en conformation active lié au BI-167107 et stabilisé par le nanoanticorps Nb80 (orange) superposé avec la conformation inactive en présence du carazolol (C). Figure adaptée de Rasmussen et al., 2011a.

Tel que présenté à la section 1.3, les GPCR sont en équilibre constant entre plusieurs conformations, et ce sont ces motifs moléculaires qui permettent d'opérer ces changements au niveau structurel (Nygaard et al., 2009). Malgré le fait que l'utilisation du modèle simple d'activation (Figure 4) permet d'expliquer la grande majorité des phénomènes pharmacologiques entourant l'activité des GPCR, ce modèle est de plus en plus remis en question vu la grande plasticité structurelle de ces récepteurs. Par exemple, nous savons que les GPCR peuvent couplés plusieurs effecteurs différents des protéines G comme les arrestines, des canaux ioniques, des protéines kinases tel que les GRK tout en ajoutant à cette liste la formation d'oligomères qui ont la possibilité de former de nouvelles entités fonctionnelles.

Lorsque l'on regarde le processus d'activation d'un point de vue thermodynamique, on assume que l'état basal représente plusieurs conformations de basse énergie qui fluctuent entre elles selon une barrière d'énergie. Par exemple, certains récepteurs ne présentent que très peu d'activité basale tandis que d'autres sont capables d'activer la protéine G en l'absence de ligand. Ces observations témoignent du fait que chaque récepteur possède son propre éventail de conformations dites basales (Kobilka and Deupi, 2007). Lorsqu'on met un GPCR en présence d'un agoniste, on altère cette barrière d'énergie et/ou l'énergie relative entre l'état actif et inactif. On se retrouve donc avec un ensemble de conformations où il y aura davantage de récepteurs à l'état actif qu'à l'état inactif. On peut assumer que les différents ligands vont modifier l'équilibre conformationnel et l'énergie nécessaire pour transiter d'un état à l'autre (Deupi and Kobilka, 2010). Dans le cas d'un récepteur constitutivement actif, on suppose que l'état inactif est moins stabilisé par des interactions intramoléculaires et risque de basculer plus facilement vers différents états actifs. C'est d'ailleurs le cas pour le récepteur de la ghréline qui démontre environ 50 % d'activité constitutive pour la voie G_q (Holst et al., 2003). Les récepteurs présentant très peu d'activité basale peuvent aussi générer une activité constitutive substantielle suite à l'introduction de certaines mutations. Ces études confirment que des interactions intramoléculaires spécifiques contribuent à la stabilisation d'états conformationnels (Parnot et al., 2002).

De plus en plus d'évidences biochimiques confirment que l'efficacité de signalisation dépend d'un éventail de conformations pouvant être induit par un même ligand (Kobilka and Deupi, 2007). Des études de spectroscopie à fluorescence sur le β 2-adrénergique où des résidus cystéine furent introduits pour incorporer une sonde fluorescente à différents endroits sur le récepteur permet de bien étudier les changements conformationnels induits par ses ligands (Gether et al., 1995; Kobilka et al., 1999). On y observe que les agonistes stabilisent des états bien différents des antagonistes et des agonistes partiels mais qu'il existe des différences notables au sein d'une même classe de ligands. Des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) à partir du récepteur β 2-adrénergique purifié et marqué sur les méthionines par ^1H - ^{13}C permettent de distinguer au moins 2 états inactifs et au moins un état actif (Kofuku et al., 2012; Nygaard et al., 2013) Des expériences de RMN avec le récepteur β 2-adrénergique purifié et marqué au ^{19}F permettent d'observer deux populations en conformation inactive, une population en conformation intermédiaire et trois états conformationnels actifs (Kim et al., 2013). Des études de simulation dynamique moléculaire à partir des structures cristallographiques du récepteur β 2-adrénergique démontrent aussi qu'un ligand peut adopter plusieurs conformations dites intermédiaires entre l'état inactif et l'état actif (Dror et al., 2009; Dror et al., 2011c). La pochette de liaison serait couplée de manière très souple avec le site de liaison de la protéine G via une région désignée comme le connecteur. Cette région permet au récepteur de fluctuer entre plusieurs conformations (Dror et al., 2011a). Les auteurs proposent que le processus d'activation se ferait d'abord au niveau du site de la protéine G. L'agoniste ne permettrait que de stabiliser une conformation active du connecteur afin de maintenir le site de liaison de la protéine G en conformation intermédiaire ou active.

La nécessité d'identifier et de caractériser les conformations qui composent l'équilibre conformationnel d'un même récepteur nous permettra ultimement de concevoir des composés synthétiques plus spécifiques à certains états. Ces composés pourront avoir une activité plus définie, éliminant les voies de signalisation qui mènent à des effets secondaires. Nous discuterons dans la prochaine section des principaux motifs moléculaires impliqués dans l'activation et comment ceux-ci nous permettent de mieux caractériser les états conformationnels des GPCR de classe A.

1.3.2.1 *Rotamer toggle switch* et le motif CWxP^(6.50)

Les comparaisons effectuées entre les structures cristallographiques à l'état actif versus inactif des GPCR ont permis de montrer le rôle important du changement conformationnel du domaine TM6 dans l'activation (Choe et al., 2011; Park et al., 2008a; Rasmussen et al., 2011a; Rasmussen et al., 2011b; Rosenbaum et al., 2011; Scheerer et al., 2008; Xu et al., 2011b). Parmi les résidus conservés du domaine TM6, nous retrouvons la présence du motif CWxP^(6.50) qui régule l'orientation d'une séquence de résidus aromatiques modifiant l'orientation de ce domaine lors de l'activation ce qui constitue le *rotamer toggle switch* (Shi et al., 2002). Par exemple, au niveau des récepteurs monoaminergiques nous retrouvons les résidus Phe^(6.44), Trp^(6.48), Phe^(6.51) et Phe^(6.52) qui sont situés face à la pochette de liaison et qui pourraient potentiellement interagir avec l'agoniste pour promouvoir un réarrangement du domaine TM6 en modifiant l'angle induit par le résidu Pro^(6.50). De plus, lors de l'activation le résidu Cys^(6.47) deviendrait accessible dans la pochette de liaison (Ballesteros et al., 2001; Javitch et al., 1997a; Rasmussen et al., 1999). Il a d'ailleurs été proposé qu'à l'état actif le domaine TM6 s'éloignerait du domaine TM7 pour interagir davantage avec le domaine TM5. Ce mouvement serait caractérisé par un changement conformationnel rotationnel du résidu Trp^(6.48) pour former une interaction avec le résidu Phe^(5.47) (Schwartz et al., 2006).

Si l'on compare plus en détail le motif CWxP^(6.50) au niveau des structures inactives et actives connues, le mouvement de la portion intracellulaire du domaine TM6 semble être critique pour atteindre un état actif (Figure 8A, B, C). Par contre, lorsque l'on regarde plus précisément le résidu Trp^(6.48) au niveau des différentes structures actives de GPCR de classe A, aucune structure cristallographique active ne suggère de mouvement rotamérique de ce résidu malgré un mouvement important du domaine TM6 (Choe et al., 2011; Park et al., 2008a; Rasmussen et al., 2011a; Rasmussen et al., 2011b; Rosenbaum et al., 2011; Scheerer et al., 2008; Xu et al., 2011b). Il est à noter que l'on observe tout de même un mouvement translationnel du Trp^(6.48) en ce qui concerne la structure active du récepteur

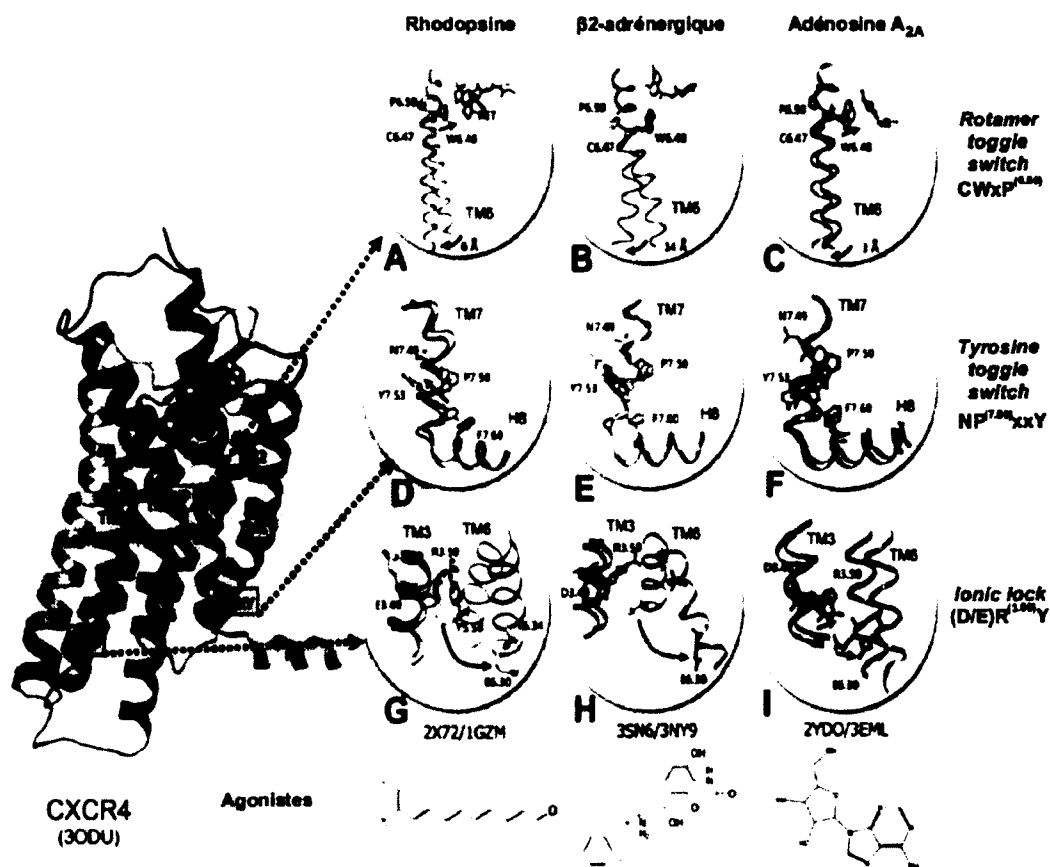


Figure 8. Comparaison des motifs conservés impliqués dans l'activation des GPCR de classe A.

Représentation du *rotamer toggle switch* incluant le motif CWxP (A, B, C), du *tyrosine toggle switch* incluant le motif NP^(7.50)xxY (D, E, F) ainsi que du *ionic lock* (G, H, I) selon les structures cristallographiques de la rhodopsine (A, D, G), du récepteur β2-adrénergique (B, E, H) et du récepteur adénosine A_{2A} (C, F, I). Les structures utilisées pour l'état inactif (gris) ou actif (couleurs) sont identifiées selon leur code du *Protein Data Bank*. Figure adaptée de Trzaskowski et al., 2012.

A_{2A} et de l'opsine (Park et al., 2008b; Scheerer et al., 2008; Xu et al., 2011a). Il est donc fort probable que le motif CWXP^(6.50) contribue au moyen d'interactions intramoléculaires à la stabilité structurelle du récepteur sans nécessairement avoir un rôle prédominant au niveau de l'activation du récepteur.

1.3.2.2 *Ionic lock* et le motif (D/E)R^(3.50)Y

À la jonction du domaine TM3 et de la région ICL2 nous retrouvons le motif (D/E)R^(3.50)Y qui est hautement conservé chez la plupart des GPCR. Certaines de ces études proposent d'ailleurs un réarrangement structurel où le domaine TM3 se situerait à proximité du domaine TM6 (Figure 8 G, H, I). Il fut proposé originellement que le résidu Arg^(3.50) de ce motif pourrait interagir avec le résidu Asp^(2.50) (Scheer et al., 1996) ou le résidu adjacent Asp/Glu^(3.49) ce qui maintiendrait le récepteur dans un état inactif (Ballesteros et al., 1998). Des expériences utilisant des récepteurs purifiés où des résidus cystéine furent introduits par mutagenèse dirigée facilitant l'incorporation de sondes fluorescentes ou radicalaires ont permis d'étudier des changements conformationnels entre le domaine TM3 et le domaine TM6 par des études de spectroscopie à fluorescence ou par résonance paramagnétique électronique (Farrens et al., 1996; Gether et al., 1995; Gether et al., 1997; Jensen et al., 2001). D'autres études ont utilisés des agents alkylants sur des mutants cystéine pour bloquer la liaison du ligand et confirmer l'accessibilité de résidus du domaine TM6 dans la pochette de liaison d'un récepteur actif (Javitch et al., 1997). L'introduction de résidus histidines au sein du domaine TM3 et du domaine TM6 de GPCR ont permis la liaison d'ions de zinc empêchant l'activation dépendante de la protéine G (Sheikh et al., 1996; Sheikh et al., 1999). Des études de mutagenèse ont démontré que l'interaction entre les résidus Glu^(3.49), Arg^(3.50) et Glu^(6.30) du récepteur β2-adrénergique était nécessaire pour promouvoir l'état inactif alors que des mutations abolissant la charge au niveau des résidus Glu^(3.49) ou Glu^(6.30) généreraient une activité constitutive du récepteur (Ballesteros et al., 2001; Rasmussen et al., 1999). L'interaction entre ces résidus des domaines TM3 et TM6 constitue ce qu'on appelle le *ionic lock*.

Lorsque l'on regarde la structure moléculaire de plusieurs récepteurs, on constate que la rhodopsine, le récepteur dopaminergique D3 et le récepteur A_{2A} cristallisés à l'état inactif possèdent tous un *ionic lock* maintenu entre les domaines TM3 et TM6 (J Chien et al., 2010; Dore et al., 2011; Jaakola et al., 2008; Palczewski et al., 2000). Tandis qu'au niveau de la structure de l'opsine cristallisée seule ou avec un fragment C-terminal de la protéine G_t, on dénote que le *ionic lock* est brisé reflétant une conformation active de l'opsine (Park et al., 2008b; Scheerer et al., 2008). En fait, le domaine TM6 s'éloigne du domaine TM3 tout en formant de nouvelles interactions avec le domaine TM5 permettant au résidu Arg^(3.50) d'interagir avec le fragment C-terminal de la protéine G_t, ce qui est aussi observé avec la structure cristallographique de la métarhodopsine II et un mutant constitutivement actif de la rhodopsine, Glu113Gln^(3.28) (Choe et al., 2011; Standfuss et al., 2011). Les récepteurs β-adrénergiques, le récepteur CXCR4 et le récepteur histaminique H1 ne maintiennent pas ce motif intact à l'état inactif dû à une différente orientation ou une absence des résidus participant à ce motif (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007;; Shimamura et al., 2011; Wu et al., 2010). Par contre, on y remarque une forte proximité entre les domaines TM3 et TM6 ce qui favorise d'autres interactions stabilisatrices de l'état inactif et l'éloignement du domaine TM6 par rapport au domaine TM3 est tout de même un important prérequis pour l'activation de ces récepteurs (Figure 8 G,H,I). Des études de simulation dynamique à partir des structures des récepteurs β-adrénergiques ont mené à proposer l'hypothèse qu'il existerait au moins deux conformations inactives de ces récepteurs dont une où le *ionic lock* serait maintenu (Dror et al., 2009; Moukhametzianov et al., 2011). Il est probable que les modifications apportées à ces récepteurs pour augmenter l'homogénéité conformationnelle nécessaire pour faciliter leur cristallisation ont favorisé l'état où le *ionic lock* n'est pas maintenu.

1.3.2.3 Tyrosine toggle switch et le motif NP^(7.50)xxY

Le motif NP^(7.50)xxY se retrouve au cœur d'un réseau de ponts hydrogènes médié par certaines molécules d'eau qui s'y intercalent. Le résidu Asn^(7.49) interagit avec le domaine TM6 (Urizar et al., 2005) alors que le résidu Tyr^(7.53) pourrait interagir avec l'hélice 8 située en C-terminal pour ainsi stabiliser l'état inactif (Fritze et al., 2003).

Lorsque le domaine TM6 se tourne vers le domaine TM5 lors de l'activation, ce réseau de ponts hydrogène est réorganisé de manière à interagir avec le motif (D/E)R^(3.50)Y (Standfuss et al., 2011; Trzaskowski et al., 2012). Au niveau de la rhodopsine (Figure 8 D), on voit clairement l'interaction entre l'hélice 8 et le domaine TM7 et cette interaction est rompue lors de l'activation, ce que l'on appelle le *tyrosine toggle switch*. Pour le récepteur β 2-adrénérique et A_{2A} de l'adénosine (Figure 8 E, F), cette interaction n'est pas présente ce qui soulève une interrogation quant à savoir s'il s'agit d'une interaction conservée ou que ces récepteurs représentent réellement des états inactifs (Trzaskowski et al., 2012). Il demeure néanmoins que lors de l'activation de ces récepteurs, il y a mouvement conformationnel du domaine TM7 qui permet au résidu Tyr^(7.53) de s'orienter davantage vers le cœur du récepteur pour participer à un réseau de ponts hydrogène qui en coopération avec le motif (D/E)R^(3.50)Y favoriserait l'état actif.

1.3.3 Modulation allostérique des GPCR

L'allostérie classique résulte d'un changement de conformation ou d'activité d'une protéine induit par un agent externe (hormones, composés synthétiques, protéines) liant un site autre que le site actif de cette protéine (Figure 9A). Dans le cas des GPCR, le ou les ligands endogènes définissent la pochette de liaison orthostérique. Pour les GPCR de classe A qui possèdent une pochette de liaison majoritairement au cœur des domaines transmembranaires (Figure 6), on pourrait imaginer un modulateur allostérique qui se lierait au niveau des domaines extracellulaires. À l'opposé, pour les GPCR de classe B et C qui possèdent un domaine N-terminal très long liant le ligand endogène, il serait facile de concevoir un modulateur allostérique liant la région des 7 domaines transmembranaires. De plus, les GPCR sont connus pour avoir plusieurs partenaires d'interactions tel que les protéines effectrices (p. ex. : les protéines G, les arrestines, les GRK et certains canaux ioniques). Les GPCR peuvent aussi s'organiser en unité dimérique ou en oligomère. Ces protéines qui interagissent avec les GPCR agissent comme des modulateurs allostériques et permettent la formation de nouveaux complexes de signalisation. Ces protéines peuvent modifier la conformation intrinsèque du GPCR ce qui pourrait ultimement modifier l'affinité du ligand endogène et les voies de signalisation (Figure 9 A).

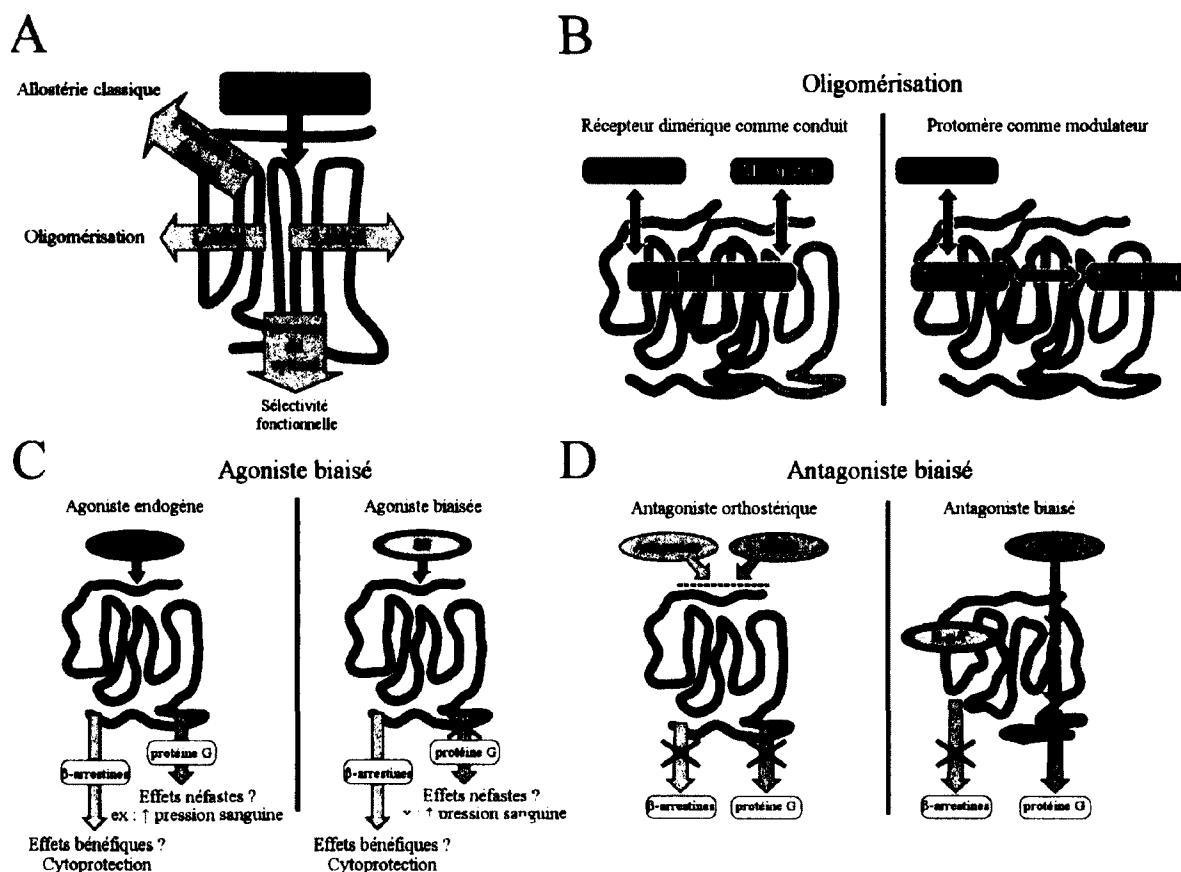


Figure 9. Modulation allostérique des GPCR

(A) Représentation des différents mécanismes allostériques des GPCR. (B) L'oligomérisation de GPCR peut générer une allostérie latérale soit via la liaison d'un modulateur sur un des protomères ou via l'interaction seule entre les protomères. (C) Exemple d'agoniste biaisée sur le récepteur AT₁ de l'angiotensine II où l'activation est sélective pour la voie β-arrestine dans le cas du composé [Sar¹Ile⁴Ile⁸]-angiotensine II (SII) versus l'angiotensine II. (D) N-α-tosyltryptophane (N-α-T), un antagoniste biaisé du récepteur CRTH2, bloque que l'activation dépendante de la protéine G induite par la prostaglandine D₂, alors que celle-ci peut activer la protéine G et recruter la β-arrestine. Figure modifiée de Kenakin and Miller, 2010.

1.3.3.1 Ligand orthostérique versus modulateur allostérique

L'une des propriétés qui caractérisent un modulateur allostérique est le fait que ce dernier ainsi que le ligand endogène peuvent lier simultanément le récepteur. De plus, un modulateur allostérique possède des effets qui sont saturables et module soit l'affinité ou l'activité du ligand endogène (Kenakin and Miller, 2010). Plus important encore, ces modulateurs allostériques modifient l'état conformationnel du récepteur pour en faire une nouvelle entité fonctionnelle. Les modulateurs peuvent donc être très utiles pour cibler une réponse spécifique. Par exemple, plusieurs études se concentrent sur des antagonistes de CCR5 pour bloquer l'interaction avec les glycoprotéines du VIH-1 et inhiber l'infection. Par contre, plusieurs études démontrent que les chimiokines sont nécessaires pour inhiber la progression virale (Garzino-Demo et al., 1999; Heredia et al., 2003a; Heredia et al., 2003b; Shieh et al., 2001; Ullum et al., 1998; Xiang et al., 2004). L'utilisation de composés pouvant bloquer l'interaction entre CCR5 et les glycoprotéines virales sans affecter la liaison de chimiokines pourrait être une stratégie intéressante (Muniz-Medina et al., 2009). Dans cette optique, plusieurs composés allostériques ont été synthétisés pour le récepteur CCR5 dont le maraviroc et qui agissent comme modulateurs allostériques négatifs pour la liaison de chimiokines (Kondru et al., 2008; Maeda et al., 2006). Il existe aussi certains modulateurs allostériques positifs qui favorise soit la liaison du ligand orthostérique ou qui augmente l'activité signalétique comme dans le cas des récepteurs du glutamate où l'on potentie différenciellement la mobilisation calcique au dépend de l'activation de la voie des *mitogen-activated protein kinases* (Zhang et al., 2005). Certains modulateurs allostériques sont classés comme « atypiques » car ils peuvent lier un site allostérique sans toutefois affecter l'affinité ou l'activité induite par le ligand orthostérique (O'Brien et al., 2003).

Le premier GPCR pour lequel une régulation allostérique fut démontrée fut le récepteur M2 et demeure encore à ce jour l'un des récepteurs les plus étudiés pour ce phénomène (Gregory et al., 2007). Sachant que la pochette de liaison est hautement conservée entre les récepteurs muscariniques, il y a beaucoup d'intérêts pour des ligands allostériques se liant au niveau des domaines extracellulaires de ces récepteurs où l'identité

de séquence est plus faible (Haga et al., 2012). Lorsque l'on analyse la structure cristallographique des récepteur M2 et M3, on constate que la pochette de liaison forme ce que les auteurs qualifient de « vestibule » dû au fait qu'elle s'étend des domaines extracellulaires jusqu'à cœur des domaines transmembranaires (Haga et al., 2012; Kruse et al., 2012). Les ligands orthostériques se lient au niveau des domaines transmembranaires, mais des études de simulation démontrent que ces ligands peuvent adopter plusieurs conformations intermédiaires au niveau de sites de liaison allostériques de ces récepteurs (Redka et al., 2008). Certains ligands des récepteurs muscariniques ont la capacité de lier simultanément la pochette de liaison orthostérique et allostérique permettant de modifier leur affinité et leur activité (Lane et al., 2013).

1.3.3.2 Oligomérisation et allostérie latérale

Les GPCR étant de larges protéines à sept domaines transmembranaires ont tendance à former des interactions hydrophobes non spécifiques et de s'agréger. Par contre, il est maintenant accepté que ces récepteurs peuvent former des dimères et même des oligomères de façon spécifique (Angers et al., 2002; Bouvier, 2001; Salahpour et al., 2000). La présence d'oligomères dans des cellules isolées de souris transgéniques (Audet et al., 2010) ainsi que dans des tissus natifs (Albizu et al., 2010) a permis de confirmer que ce phénomène était bien présent au niveau de la régulation de processus physiologiques. L'oligomérisation constituerait un prérequis pour la maturation et le routage intracellulaire des GPCR (Bulenger et al., 2005). Par exemple, le récepteur GABA nécessite un hétérodimère entre GABA_{B1} et GABA_{B2} pour atteindre la surface plasmique (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Il existe aussi quelques modèles qui permettent de décrire l'influence de chacun des protomères à l'intérieur d'une unité fonctionnelle dimérique (Durroux, 2005; Franco et al., 2006). Par exemple, l'hétérodimérisation du récepteur CCR5 avec le récepteur CCR2b impliquent qu'un ligand de CCR2b incapable de lier CCR5 puisse déplacer un radioligand spécifique pour CCR5 lorsque les récepteurs sont co-exprimés dans les mêmes cellules (El-Asmar et al., 2005). Ici l'unité dimérique se comporte comme un récepteur unique où chaque ligand liant spécifiquement l'un des protomères devient un modulateur allostérique pour le deuxième protomère (Figure 9B). Le modulateur

allostérique peut aussi être l'un des protomères de l'unité dimérique (Figure 9B). Par exemple, le récepteur B₂ de la bradykinine peut lier le récepteur AT₁ de l'angiotensine et augmente l'activité de AT₁ en présence de l'angiotensine II (AbdAlla et al., 2000).

1.3.3.3 Sélectivité fonctionnelle et l'allostérie cytosolique

Nous avons discuté dans les sections précédentes d'événements moléculaires qui permettent à un GPCR d'adopter certaines conformations bien spécifiques. Lorsque l'on regarde ces événements d'un point de vue signalétique, on réalise rapidement le potentiel thérapeutique que pourrait avoir un composé qui active spécifiquement une voie de signalisation par rapport aux autres voies possibles. Dans ce cas-ci, nous parlons d'allostérie cytosolique (Kenakin and Miller, 2010). Le terme « sélectivité fonctionnelle » est plus couramment utilisé dans le cadre de ligands « biaisés » pouvant discriminer parmi les différentes voies de signalisation d'un même récepteur. Le cas du récepteur AT₁ illustre bien ce phénomène alors que l'angiotensine II peut activer la voie médiée par la protéine G_q ainsi qu'une activation de la voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) dépendante de l'action de la β -arrestine2 (Hunyady and Catt, 2006). Pour sa part, le composé [Sar¹Ile⁴Ile⁸]-angiotensine II (SII) n'active que la voie des MAPK dépendante de l'action de la β -arrestine2 (Holloway et al., 2002; Wei et al., 2003). Il a été démontré que cet agoniste biaisé permet d'améliorer les fonctions cardiaques ainsi que la survie des cardiomyocytes (Rajagopal et al., 2006). Il a été démontré que la stimulation chronique de la voie G_q pourrait résulter à long terme en une dysfonction cardiaque (D'Angelo et al., 1997) contrairement à l'activation de voies β -arrestines dépendantes qui démontreraient des effets cytoprotecteurs (DeFea et al., 2000; Povsic et al., 2003; Revankar et al., 2004). Il existe aussi des composés allostériques qui sont classifiés comme des antagonistes biaisés, c'est-à-dire qu'ils peuvent inhiber sélectivement certaines voies enclenchées par un agoniste. Le N- α -tosyltryptophan (N- α -T) est un modulateur allostérique des récepteurs CRTH2 et peut donc se lier simultanément avec la PGD₂ au récepteur (Mathiesen et al., 2005). Alors que la PGD₂ enclenche une signalisation via les protéines G_i et les β -arrestines, la présence de N- α -T bloque l'activation des voies dépendantes des β -arrestines par la PGD₂ (Figure 9D).

Ces exemples démontrent le besoin de connaître les signatures conformationnelles des GPCR dans le but de cibler une réponse précise dans un système cellulaire précis (Wacker et al., 2013). Si chaque GPCR possède un éventail de conformations et de voies de signalisation précises, il est de mise que le type cellulaire visé par une thérapie possèdera lui aussi sa propre signature au niveau de la stochiométrie des différents partenaires d'interaction et effecteurs d'un GPCR donné.

1.4 Le récepteur CXCR4 comme modèle d'étude

Au cours des dernières années, plusieurs études ont grandement contribué à la compréhension de la structure et de la fonction des GPCR dans divers systèmes biologiques. La majorité des efforts déployés ont mis l'emphase sur les récepteurs « classiques » comme la rhodopsine et les β -adrénergiques qui ne lient que de très petites molécules. Les récepteurs peptidergiques ont pour leur part des ligands qui possèdent une masse moléculaire plus élevée ce qui augmente les interactions potentielles de ces ligands avec leur(s) récepteur(s). La stabilisation du complexe entre le ligand et le récepteur est un processus plus complexe ce qui peut expliquer que très peu de GPCR peptidergiques ont été cristallisés en présence de leur(s) ligand(s) endogène(s). De plus, le rôle de ces récepteurs dans des systèmes biologiques précis demeure très complexe, car chaque système pourrait aussi favoriser des conformations et des activités différentes. Il est important de transposer les études ayant des approches réductionnistes dans des modèles plus complexes, mais qui reflètent davantage la réalité. Les récepteurs de chimiokines illustrent très bien cette problématique et nous discuterons plus en détail du récepteur CXCR4 pour ces implications tant au niveau physiologique que pathologique.

1.4.1 Généralités sur les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines doivent leur nom à leur propriété chimiotactique qui permet aux leucocytes d'être recrutés et activés pour répondre soit à la présence d'un antigène, d'un tissu endommagé ou à un stimulus physiologique (Allen et al., 2007). Cette migration

dirigée par l'action des chimiokines est responsable de plusieurs processus importants tels que le développement des lymphocytes (Loetscher et al., 2000), du système nerveux central (Adler et al., 2006), de la cardiogénèse et de l'angiogénèse (Le et al., 2004) ainsi que du développement et du trafic de cellules souches hématopoïétiques (Magnon and Frenette, 2008). Les chimiokines sont caractérisées pour leur propriété à interagir avec leurs récepteurs qui sont des GPCR de classe A. Ces derniers initieront la chimiotaxi et permettront la répartition du gradient et la rétention de chimiokines au même titre que les glycosaminoglycanes (GAGs) (Butcher and Picker, 1996; Weber, 2003).

Jusqu'à présent, il n'existe pas moins de cinquante chimiokines chez l'homme ainsi qu'une vingtaine de récepteurs (Figure 10). Les chimiokines sont regroupées en 4 grandes classes selon le patron des deux premiers résidus cystéine (CXC, CC, C, CX₃C) et présentent une masse moléculaire allant de 8 à 12 kilodaltons (Allen et al., 2007). Leur structure est stabilisée par la présence de 1 à 3 ponts disulfures et malgré une identité de séquence variable entre les chimiokines, celles-ci retiennent une structure tertiaire très similaire. Les études cristallographiques et de RMN démontrent que les chimiokines sont composées d'un domaine N-terminal flexible de 6 à 10 acides aminés suivit d'une boucle appelée *N-loop* où l'on remarque la présence d'une hélice 3₁₀ (Figure 11A). On retrouve aussi 3 feuillets β et un domaine C-terminal désordonné (Blaszczyk et al., 2000; Clore et al., 1990; Crump et al., 1998; Handel and Domaille, 1996; Liwang et al., 1999; Lodi et al., 1994; Mizoue et al., 1999; Skelton et al., 1995; Swaminathan et al., 2003). La portion N-terminale est d'ailleurs critique pour l'activation des récepteurs tandis que le cœur et la portion C-terminale des chimiokines contribuent davantage à l'affinité et à la sélectivité des chimiokines (Gong and Clark-Lewis, 1995; Hemmerich et al., 1999; Heveker et al., 1998; Jarnagin et al., 1999; Ott et al., 2004). Plusieurs protéases ont d'ailleurs la capacité de changer l'affinité et la sélectivité des chimiokines via le clivage de la portion N-terminale (McQuibban et al., 2000; McQuibban et al., 2001; McQuibban et al., 2002; Zhang et al., 2003). Certaines études reportent aussi la capacité des chimiokines de former des homo- et hétérodimères ainsi que des oligomères d'ordre supérieur (Czaplewski et al., 1999; Lubkowski et al., 1997; Swaminathan et al., 2003; Zhang et al., 1994) malgré le fait que

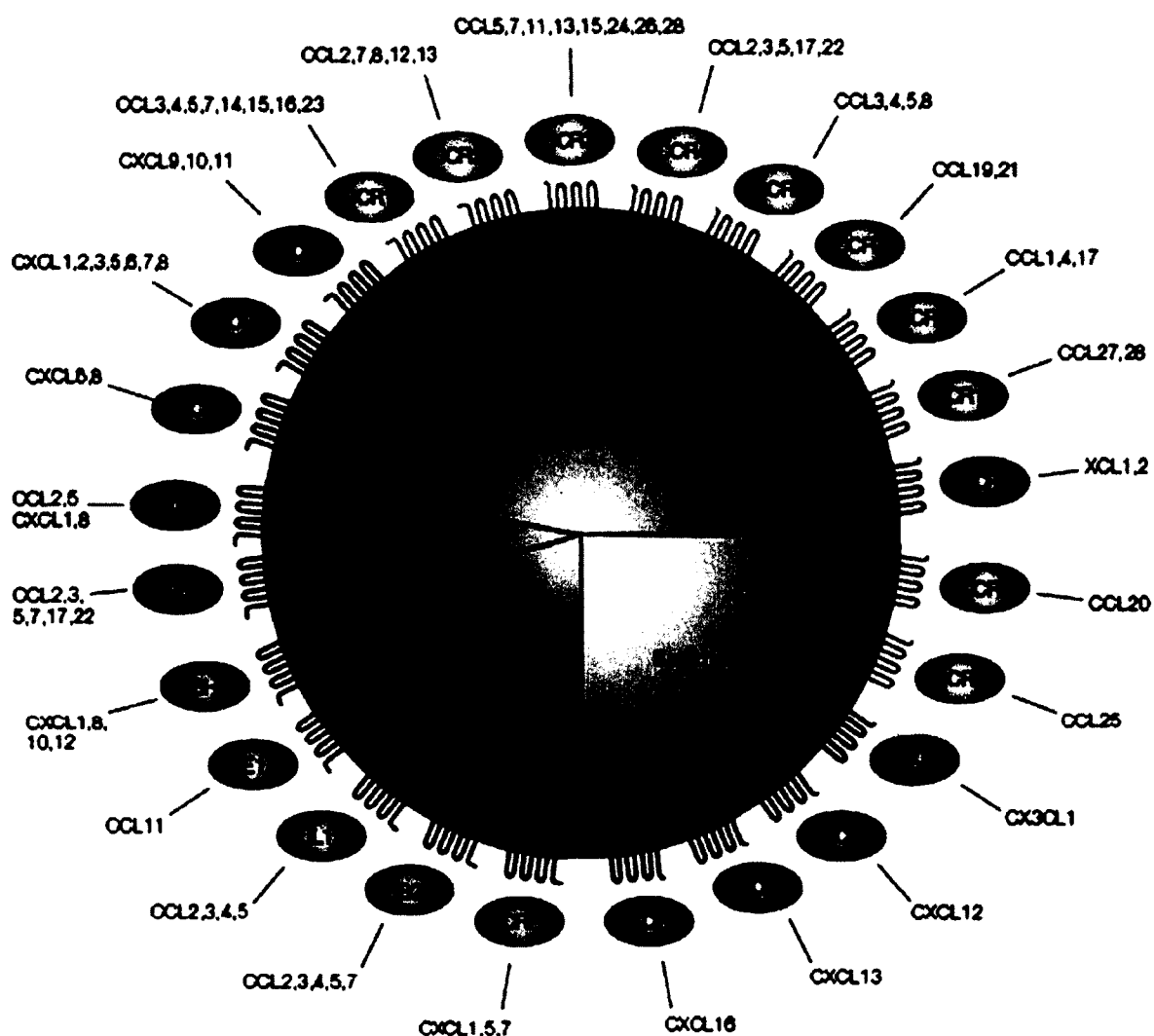


Figure 10. Classification des récepteurs de chimiokines

Représentation graphique des récepteurs de chimiokines classés selon leurs ligands. Les récepteurs communs ont la capacité de lier plusieurs chimiokines contrairement aux récepteurs spécifiques qui ne lient qu'une seule chimiokine. Les récepteurs viraux contribuent à l'infection virale tandis que les récepteurs atypiques ne présentent aucune signalisation dépendante de la protéine G. Figure adapté de Balkwill, 2004a.

l'entité monomérique est suffisante pour enclencher une voie de signalisation (Laurence et al., 2000; Paavola et al., 1998; Rajarathnam et al., 1994).

Les récepteurs de chimiokines peuvent eux aussi se regrouper selon quatre classes distinctes (Figure 10). Les récepteurs « communs » peuvent lier plusieurs chimiokines et ces dernières peuvent aussi lier plusieurs récepteurs. À l'opposé, on retrouve les récepteurs « spécifiques » c'est-à-dire qu'ils ne lient qu'une seule chimiokine connue. Il existe aussi les récepteurs viraux qui auraient évolué à partir de leurs homologues humains et favoriseraient l'infection et la réplication virale (Montaner et al., 2013). Finalement, on y retrouve la classe de récepteur qualifiée comme étant « atypiques ». Ces derniers peuvent lier plusieurs chimiokines permettant principalement de les retirer du milieu extracellulaire pour promouvoir un gradient précis et diriger la migration (Boldajipour et al., 2008; Bonecchi et al., 2010; Graham, 2009). Ces récepteurs étaient qualifiés au départ de silencieux, car ils n'élicitent aucune activation dépendante des protéines G mais quelques études démontrent que ces récepteurs peuvent moduler différentes voies signalétiques via les β -arrestines (Bamberg et al., 2010; Rajagopal et al., 2006).

Ces récepteurs possèdent la topologie classique des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Figure 11 B) comme le montre la structure cristallographique du récepteur CXCR4 (Wu et al., 2010). Les études de structure-activité ont permis d'établir que le mode de liaison des chimiokines suivrait un modèle à deux sites (Crump et al., 1997; Kofuku et al., 2009; Siciliano et al., 1994). La portion N-terminale du récepteur (site I) interagit d'abord avec la *N-loop* de la chimiokine permettant ainsi à la portion N-terminale de la chimiokine d'entrer en contact avec les domaines transmembranaires (site II). Cette dernière interaction permet l'activation du récepteur (Figure 11C). Des études de RMN sur la portion N-terminale de CXCR4 a permis de mieux comprendre comment le SDF-1 peut interagir avec certains résidus plus précisément au niveau de résidus tyrosine sulfatés (Veldkamp et al., 2008a). La plupart des antagonistes connus pour les récepteurs de chimiokines sont caractérisés pour ne lier que le site II afin d'empêcher l'activation réceptorielle (Choi et al., 2012; Gerlach et al., 2001; Rosenkilde et al., 2007; Wong et al., 2008).

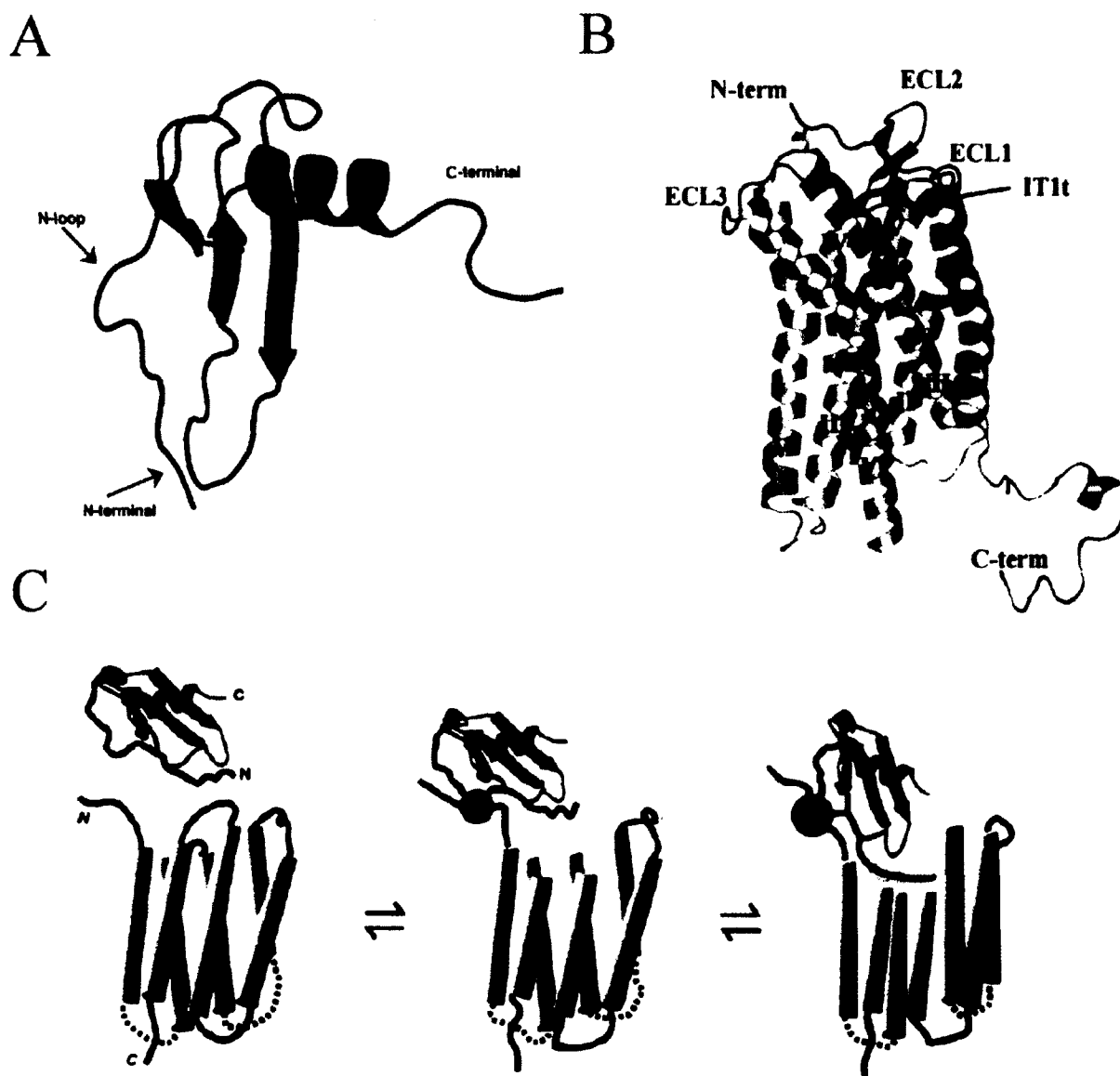


Figure 11. Représentation tridimensionnelle de la liaison chimiokine/récepteur

(A) Représentation de la structure typique des chimiokines. (B) Structure cristallographique du récepteur CXCR4 en complexe avec la molécule IT1t. Les ponts disulfures sont indiqués en jaune et les molécules d'eau conservées ont été identifiées en rouge. (C) Schéma décrivant le mode de liaison à deux sites pour caractériser l'interaction entre une chimiokine et son récepteur. Figure adaptée de Crump et al., 1997; Rajagopalan and Rajarathnam, 2006; Wu et al., 2010.

1.4.2 Rôles physiologiques et pathologiques de l'axe CXCR4/SDF-1

L'axe CXCR4/SDF-1 constitue l'un des piliers du système immunitaire et de l'organisme en général. Ses principaux acteurs sont exprimés de manière ubiquitaire, mais c'est surtout au niveau du système immunitaire que l'on y attribue la majeure partie de ces effets (Murphy et al., 2000). Le récepteur CXCR4 fut cloné par plusieurs groupes (Federspiel et al., 1993; Herzog et al., 1993; Jazin et al., 1993; Loetscher et al., 1994; Nomura et al., 1993) avant d'être identifié comme co-récepteur du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) (Feng et al., 1996). Le SDF-1 (CXCL12) fut ensuite identifié comme le ligand du CXCR4 (Bleul et al., 1996a; Oberlin et al., 1996). Le récepteur CXCR4 possède 2 isoformes qui diffèrent au niveau des neuf acides aminés de la portion N-terminale mais ces isoformes ont une affinité et activité similaire (Gupta and Pillarisetti, 1999). Le SDF-1 possède 6 isoformes (α , β , γ , δ , ϵ , ϕ) capables d'activer CXCR4, mais qui diffèrent par la taille de leur exon 4 ce qui résulte en une portion C-terminale altérée au niveau protéique (Yu et al., 2006). Il est aussi à noter que le SDF-1 et CXCR4 sont conservés à plus de 98 % et 94 % respectivement entre l'homme et la souris malgré le fait que les chimiokines font partie des protéines les moins conservées au niveau de l'évolution (Murphy, 1993). Les embryons de souris transgéniques où l'expression du gène de CXCR4 ou SDF-1 a été inhibée sont non viables et présentent des phénotypes similaires, c'est-à-dire des défauts au niveau développemental (Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998). Au niveau physiologique, l'axe CXCR4/SDF-1 fut d'abord caractérisé pour médier le recrutement de leucocytes à différents sites immunologiques ou à un site d'inflammation (Baggiolini, 1998; Bleul et al., 1996a; Bleul et al., 1996b). Il permet aussi de réguler l'hématopoïèse en dirigeant le trafic de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui permet de générer l'ensemble des cellules sanguines (Aiuti et al., 1997; Nagasawa et al., 1996; Zou et al., 1998).

D'un point de vue physiopathologique, le rôle du récepteur CXCR4 comme co-récepteur du VIH-1 a permis de propulser à l'avant-plan ce récepteur comme une cible thérapeutique potentielle. Le VIH-1 nécessite la présence du récepteur CD4 ainsi que d'un co-récepteur tel que CCR5 ou CXCR4 pour permettre la fusion membranaire et l'infection

virale (Berger et al., 1998; Deng et al., 1996; Doms, 2001). Au cours de l'infection, 50 % des souches virales spécifiques pour CCR5 changent leur spécificité pour le CXCR4 et cette évolution est associée à un déclin accéléré des cellules CD4⁺ et une progression vers le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Koot et al., 1993).

Le récepteur CXCR4 joue également un rôle clé dans le cancer. En fait, la grande majorité des cellules cancéreuses présentes une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 (Balkwill, 2004b; Zlotnik, 2008). La présence accrue de CXCR4 permet à ces cellules de proliférer et de migrer suite à des gradients de SDF-1 produit par les cellules environnantes (Figure 12A; Orimo et al., 2005). La migration de cellules cancéreuses est aussi à l'origine de la formation de métastases et plusieurs antagonistes de CXCR4 sont en phase clinique pour bloquer ce phénomène (Domanska et al., 2013).

L'implication de l'axe CXCR4/SDF-1 dans le trafic de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a permis de développer le composé AMD3100 (plerixafor) comme agent mobilisateur de ces cellules dans le sang (De Clercq, 2010; Motabi and DiPersio, 2012). Ce traitement facilite la transplantation autologue des CSH dans les cas de patients atteints de la leucémie, de lymphomes ou de myélomes multiples qui nécessitent une reconstitution du système hématopoïétique après des traitements de chimiothérapie (Kessans et al., 2010; Steinberg and Silva, 2010). De plus, l'inhibition de l'axe CXCR4/SDF-1 permet de mobiliser dans le sang des cellules cancéreuses qui survivent en se logeant au niveau de la moelle osseuse et de les sensibiliser à la chimiothérapie (Figure 12B; Uy et al., 2012a).

Lors de la progression tumorale, les cellules cancéreuses se retrouvent rapidement en conditions hypoxiques. Elles produisent alors du SDF-1 pour ainsi recruter des cellules stromales progénitrices monocytaires (Figure 12C). Le logement de ces cellules monocytaires provoque la sécrétion de facteurs angiogéniques dont le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) qui favorise la formation d'un réseau vasculaire qui alimente les tissus cancéreux (Du et al., 2008; Jin et al., 2006).

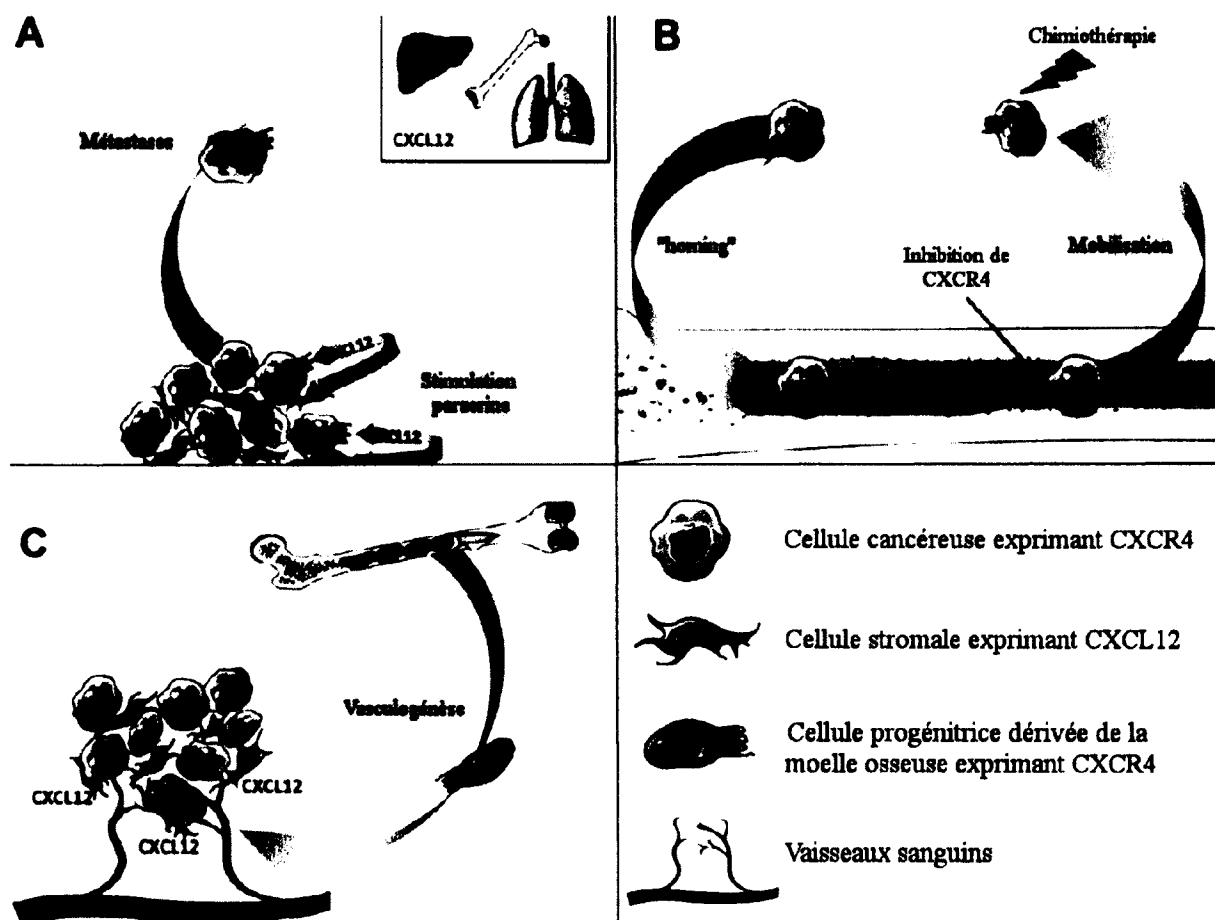


Figure 12. Fonctions du récepteur CXCR4 au niveau du cancer et la formation de tumeur

(A) Les cellules stromales présentes au niveau de la tumeur sécrètent du CXCL12 (SDF-1) qui favorise la survie et la croissance de cellules cancéreuses exprimant CXCR4. Les cellules tumorales peuvent aussi migrer selon le gradient de CXCL12 pour former des métastases au niveau d'organes éloignés. (B) Les cellules tumorales utilisent aussi le récepteur CXCR4 pour aller se loger au niveau de la moelle osseuse (*homing*) ce qui favorise leur survie et leur croissance. L'inhibition de l'interaction entre CXCR4 et CXCL12 pourrait prévenir ce phénomène et permettre aux cellules cancéreuses logées dans la moelle osseuse de se mobiliser dans le sang où elles deviendraient plus sensibles à des traitements comme la chimiothérapie. (C) La sécrétion de CXCL12 par les cellules cancéreuses et stromales entourant la tumeur permet le recrutement de cellules progénitrices exprimant CXCR4 ce qui favorise le développement de la vasculature et la sécrétion de facteurs angiogéniques. Figure adaptée de Domanska et al., 2013.

1.4.3 Avenues thérapeutiques ciblant le récepteur CXCR4

Le rôle prédominant du récepteur CXCR4 dans plusieurs pathologies ont forcé l'apparition de plusieurs études cliniques. Les premières études regardaient d'abord le potentiel de certains composés à inhiber l'infection par le VIH-1. Ces composés étaient classés selon 4 classes distinctes : les peptidomimétiques (BKT140, POL6326 et FC131), les petites molécules (AMD3100, AMD070, MSX-122, GSK812397, KRH-3955), les anticorps (MDX-1338/BMX 93956, ALX-0651) et les peptides modifiés tels que CTCE-9908 (Table 1).

Le composé AMD3100 fut d'abord étudié pour son potentiel à inhiber l'infection par le VIH-1 en agissant comme antagoniste du récepteur CXCR4 bloquant ainsi la liaison de la glycoprotéine virale gp120 au récepteur (Donzella et al., 1998b; Schols et al., 1997a; Schols et al., 1997b). La faible biodisponibilité de ce composé suite à une administration orale (Hendrix et al., 2000) poussa les chercheurs à développer de nouveaux composés tel que l'AMD070 (Stone et al., 2007), le GSK812397 (Jenkinson et al., 2010) et le KRH-3955 (Murakami et al., 2009). Néanmoins, lors des essais cliniques précédents, les auteurs ont notés que l'AMD3100 avait pour effet secondaires d'augmenter le nombre de leucocytes dans le sang (Hendrix et al., 2000; Lack et al., 2005), plus spécifiquement des cellules souches hématopoïétiques CD34+ (Liles et al., 2003). Plusieurs études cliniques ont démontrés que l'utilisation de l'AMD3100 couplé avec le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), un agent mobilisateur connu, augmente le taux de mobilisation de cellules souches hématopoïétique de manière synergique contrairement au G-CSF seul (Flomenberg et al., 2005). L'AMD3100 est le seul composé ayant eu l'approbation de l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques dans des cas de myélomes multiples ou de lymphomes non-hodgkinien qui représentent des cas où la mobilisation se fait plus difficilement (Calandra et al., 2008; DiPersio et al., 2009; Micallef et al., 2009). La capacité de recruter dans le sang des cellules cancéreuses chez les patients atteints de leucémie par l'AMD3100 sensibilisent ces cellules à des traitements de chimiothérapie

Table 1 : Composés et applications thérapeutiques pour CXCR4

| Produit | Compagnie | Structure | Affinité (IC ₅₀) | Administration | Indication | Phase |
|-----------------------|--|-----------------------------|------------------------------|----------------|--|--|
| AMD3100 | Genzyme | Petite molécule | 651 nM | s.c., i.v. | Mobilisation de cellules souches, myélome multiple, lymphomes, VIH | Approuvé par la FDA mobilisation de cellules souches, lymphomes non-hodgkinien, myélome multiple |
| AMD070 | Genzyme | Petite molécule | N/D | Oral | VIH | Phase I/II |
| GSK812397 | GlaxoSmithKline | Petite molécule | N/D | Oral | VIH | Préclinique |
| KRH-3955 | AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo | Petite molécule | 1 nM | Oral | HIV | Préclinique |
| MSX-122 | Metastatic, Inc | Petite molécule | N/D | Oral | Tumeurs solides | Phase I |
| ALX-40-C | Allelix | Peptidomimétique | 717 nM | s.c. | VIH | Phase I |
| BKT140 | Biokine Therapeutics | Peptidomimétique | 1 nM | s.c. | Myélome multiple | Phase I/II |
| FC131 | Université de Kyoto | Peptidomimétique | 68 nM | N/D | HIV | Préclinique |
| POL6326 | Polyphor | Peptidomimétique | N/D | s.c./i.v. | Mobilisation de cellules souches | Phase I |
| TG-0054 | TaiGen Biotechnology Co | N/A | N/D | N/A | Mobilisation de cellules souches | Phase I/II |
| CTCE-9908 | Chemokine Therapeutics Corp | Peptide | N/D | s.c./i.v. | Tumeurs solides | Phase I/II |
| ALX-0651 | Ablynx | nano-anticorps de lama | N/D | i.v. | Mobilisation de cellules souches | Phase I |
| MDX-1338 BMS 93656 | Bristol-Myers Squibb | Anticorps humain monoclonal | N/D | s.c./i.v. | Myélome multiple, leucémie myéloïde aiguë | Phase I/II |

s.c. : sous-cutanée, i.v. : intraveineux FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

Table adaptée de Peled et al., 2012

(Nervi et al., 2009; Uy et al., 2012a; Uy et al., 2012b). La molécule MSX-122 est aussi sous étude pour sa capacité à inhiber la formation de métastases sans induire la migration de cellules souches hématopoïétiques ou de cellules cancéreuses dans le sang (Liang et al., 2012).

Dans la catégories des peptidomimétiques, nous retrouvons le composé ALX-40-C composé de 9 résidus arginine qui fut le premier antagoniste CXCR4 à être utilisé en essai clinique contre l'infection au VIH-1 (Doranz et al., 1997; Doranz et al., 2001). Par contre, son manque de biodisponibilité orale et sa faible efficacité ont forcé l'arrêt des études en phase I. Le BKT140 et le FC131 sont des agonistes inverses (Evans et al., 2009; Zhang et al., 2002) dérivés de peptides anti-microbiens appelées polyphémusines capable d'inhiber l'infection par le VIH-1 via CXCR4 (Fujii et al., 2003; Tamamura et al., 1998; Tamamura et al., 2003). Le BKT140 est davantage étudié en clinique pour induire l'apoptose des cellules issues de myélomes multiples ou de lymphomes ainsi que la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques au même titre que le POL6326 (Beider et al., 2011; Nagler et al., 2010; Schmitt et al., 2010).

On retrouve certains composés dérivés de la séquence du SDF-1 tel que le CTCE-9908 capable d'éliminer la prolifération de cellules cancéreuses et la formation de métastases (Huang et al., 2009; Kwong et al., 2009; Richert et al., 2009). Finalement certains anticorps dirigés contre CXCR4 sont évalués au même titre que les antagonistes classiques, c'est-à-dire pour leur capacité à induire la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques ou de cellules cancéreuses pour les sensibiliser à des traitements chimiothérapeutiques (Table 1).

1.4.4 Structure-activité du récepteur CXCR4

Le potentiel thérapeutique que représente le récepteur CXCR4 comme cible est reconnu depuis plusieurs années et justifie pourquoi plusieurs groupes recherchent à comprendre l'organisation structurale de ce récepteur. La découverte que les glycoprotéines de surface du VIH-1 pouvaient interagir avec CXCR4 ou CCR5 suscita

beaucoup d'intérêts concernant les domaines d'interaction du récepteur avec le virus (Lapham et al., 1996; Trkola et al., 1996; Wu et al., 1996). Des chimères du récepteur CXCR4 ont permis de déterminer que le domaine N-terminal ainsi que la région ECL2 participent au processus d'infection de certaines souches du VIH-1 (Brelot et al., 1997). Lorsque le CXCR4 fut identifié comme récepteur pour le composé anti-VIH AMD3100 (Donzella et al., 1998a), plusieurs mutants du récepteur CXCR4 furent générés pour confirmer l'implication des domaines TM4 et ECL2 comme sites d'interactions (Labrosse et al., 1998). Certains résidus chargés positivement comme Asp171^(4.60), Asp262^(6.58) et Glu288^(7.39) lorsque mutés diminuent l'efficacité de l'AMD3100 permettant de conclure qu'ils s'agiraient de déterminants importants impliqués dans la liaison de ce composé (Gerlach et al., 2001; Gerlach et al., 2003; Hatse et al., 2001; Labrosse et al., 1998; Rosenkilde et al., 2004). Le résidu Asp262^(6.58) est aussi impliqué dans la liaison du VIH-1 alors que certaines souches résistantes à l'AMD3100 ne dépendent plus de ce résidu pour l'infection suggérant un mode de liaison alternatif (Hatse et al., 2003). Des études de simulation dynamique moléculaire ainsi que de radioliation en utilisant le T140, un dérivé de peptides antimicrobiens de la limule appelées « polyphémusines », ont permis de générer un modèle de liaison qui impliquait des interactions avec des résidus des domaines TM4 (Asp171^(4.60)), ECL2 (Arg188^(ECL2), Tyr190^(ECL2), G207^(ECL2)) et TM6 (Asp262^(6.58)) (Trent et al., 2003).

Selon le modèle de liaison à deux sites des chimiokines, des études de mutagenèse ont permis d'identifier aussi que des résidus situés en N-terminal (Tyr7^(N-term) et Tyr12^(N-term)) du récepteur CXCR4 constitueraient le site I de liaison du SDF-1 tandis que le site II serait situé au niveau des domaines TM2 (Asp97^(2.63)), ECL2 (Asp187^(ECL2)) et TM7 (Glu288^(7.39)) (Brelot et al., 2000). Fait intéressant, il semblerait que malgré l'implication de ces résidus pour la liaison du SDF-1, ils ne seraient pas nécessairement impliqués dans la liaison de la glycoprotéine virale gp120 permettant d'évoquer l'hypothèse qu'ils auraient des sites distincts sur CXCR4 (Doranz et al., 1999; Tian et al., 2005). Les résidus Tyr7^(N-term), Tyr12^(N-term) et Tyr21^(N-term) qui composent le site I du récepteur CXCR4 sont sulfatés et stabilisent la liaison avec la forme dimérique de SDF-1 modifiant son activité (Veldkamp et al., 2006; Veldkamp et al., 2008b). On y retrouve aussi un des deux sites consensus de

glycosylation potentiel (Asn-X-Ser/Thr) du CXCR4 soit le résidu Asn11^(N-term). Ce site de glycosylation jouerait un rôle sur la spécificité de reconnaissance des souches du VIH-1 ainsi que dans la liaison au SDF-1 (Wang et al., 2004b; Zhou and Tai, 1999). Le résidu Asn176^(4.65) constituerait le deuxième site potentiel malgré qu'il n'y aurait glycosylation qu'au niveau du résidu Asn11^(N-term) (Chabot et al., 2000).

La liaison du SDF-1 au niveau du site II induirait un changement conformationnel au niveau du domaine TM6 responsable de l'activation du récepteur (Huang et al., 2003). En ce qui concerne les domaines intracellulaires du CXCR4, la région ICL1 serait importante pour le repliement et l'expression à la surface tandis que les régions ICL2, ICL3 et la portion C-terminale sont nécessaires pour induire la chimiotaxie. Seulement la région ICL3 est nécessaire pour la mobilisation calcique et l'activation de la voie des MAPK et la portion C-terminale est indispensable pour l'internalisation du récepteur via la phosphorylation de ses résidus sérine ou thréonine (Roland et al., 2003). Notons aussi que la mutation du résidu Asn119^(3.35) en alanine ou sérine permet de générer un mutant constitutivement actif du récepteur CXCR4 (Zhang et al., 2002). Cette mutation en position 3.35 est aussi retrouvée chez plusieurs autres GPCR de classe A (Ishii et al., 1997; Marie et al., 1999; Perez et al., 1996; Robinson et al., 1992; Zuscik et al., 1998) laissant supposer que ce résidu fait partie d'un réseau d'interactions conservées maintenant le récepteur à l'état inactif (Karnik et al., 2003). Ces études ont permis de classer les antagonistes T140 et AMD3100 en agoniste inverse et en agoniste partiel respectivement (Zhang et al., 2002).

Il est important de considérer que le SDF-1 constitue le seul ligand endogène de CXCR4, mais qu'il est aussi un ligand pour le récepteur CXCR7 (RDC1). CXCR7 fut d'abord identifié comme récepteur orphelin par son identité de séquence avec les GPCR (Libert et al., 1989; Libert et al., 1990). Il fallut ensuite une quinzaine d'années pour identifier qu'il s'agit d'un récepteur pour le SDF-1 et I-TAC (CXCL11) (Balabanian et al., 2005a; Burns et al., 2006). Le récepteur CXCR7 était à la base classifié comme un récepteur dit « silencieux », car il n'enclenchait aucune réponse dépendante des protéines G (Naumann et al., 2010; Thelen and Thelen, 2008). Des études démontrent que le récepteur CXCR7 peut recruter la β -arrestine ce qui initierait l'activation de la voie des MAPK et

participerait au phénomène de migration (Rajagopal et al., 2010). Ce récepteur est d'ailleurs capable d'hétérodimériser avec CXCR4 altérant sa réponse dépendante de la protéine G (Levoye et al., 2009). Il peut aussi lier l'AMD3100 au même titre que CXCR4 malgré que ce composé agirait comme un agoniste allostérique pour la liaison du SDF-1 sur CXCR7 (Kalatskaya et al., 2009). Le récepteur CXCR7 peut aussi lier le composé TC14012, un analogue du T140, ce qui permet un recrutement de la β -arrestine et une activation de la voie des MAPK ce qui n'est pas retrouvé chez CXCR4 (Gravel et al., 2010). Cet exemple illustre la complexité du système des chimiokines où les fonctions d'une même chimiokine peuvent être modulées par différents récepteurs qui ont eux-mêmes ont la capacité d'adapter leurs réponses par la formation d'une unité dimérique ou par une activation croisée (*crossstalk*) au niveau fonctionnel.

1.4.5 Signalisation du récepteur CXCR4

Comme la plupart des récepteurs de chimiokines, la signalisation du récepteur CXCR4 est connue pour se faire principalement via la protéine G_i (Figure 13). Lorsqu'activée, la protéine G_i subit plusieurs changements conformationnels permettant l'échange d'une molécule de GDP pour du GTP et la dissociation entre la sous-unité $G\alpha_i$ et le dimère stable $G\beta\gamma$. La sous-unité $G\alpha_i$ inhibe la production d'AMPc par l'adénylate cyclase et permet aussi d'activer la voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) qui favorise la réponse chimiotactique ainsi que la transcription génique (Figure 13). L'activation de la voie des MAPK pourrait se produire via l'activation de la protéine tyrosine kinase c-Src par une interaction directe avec $G\alpha_i$ (Ma et al., 2000) ce qui entrainerait la phosphorylation de Src homology 2 domain containing transforming protein 1 (SHc) ou par la transactivation de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Gao et al., 2001). Le traitement à la toxine *pertussis* qui ADP-ribosyle la sous-unité $G\alpha_i$ permet de bloquer son activation et confirme que le ligand endogène SDF-1 autant que les glycoprotéines du VIH-1 se lient à CXCR4 et signalent via cette protéine G (Davis et al., 1997). Les sous-unités $G\beta\gamma$ activent la phospholipase C ce qui permettra d'enclencher la mobilisation calcique via la génération d'inositol phosphate ainsi que l'activation de la

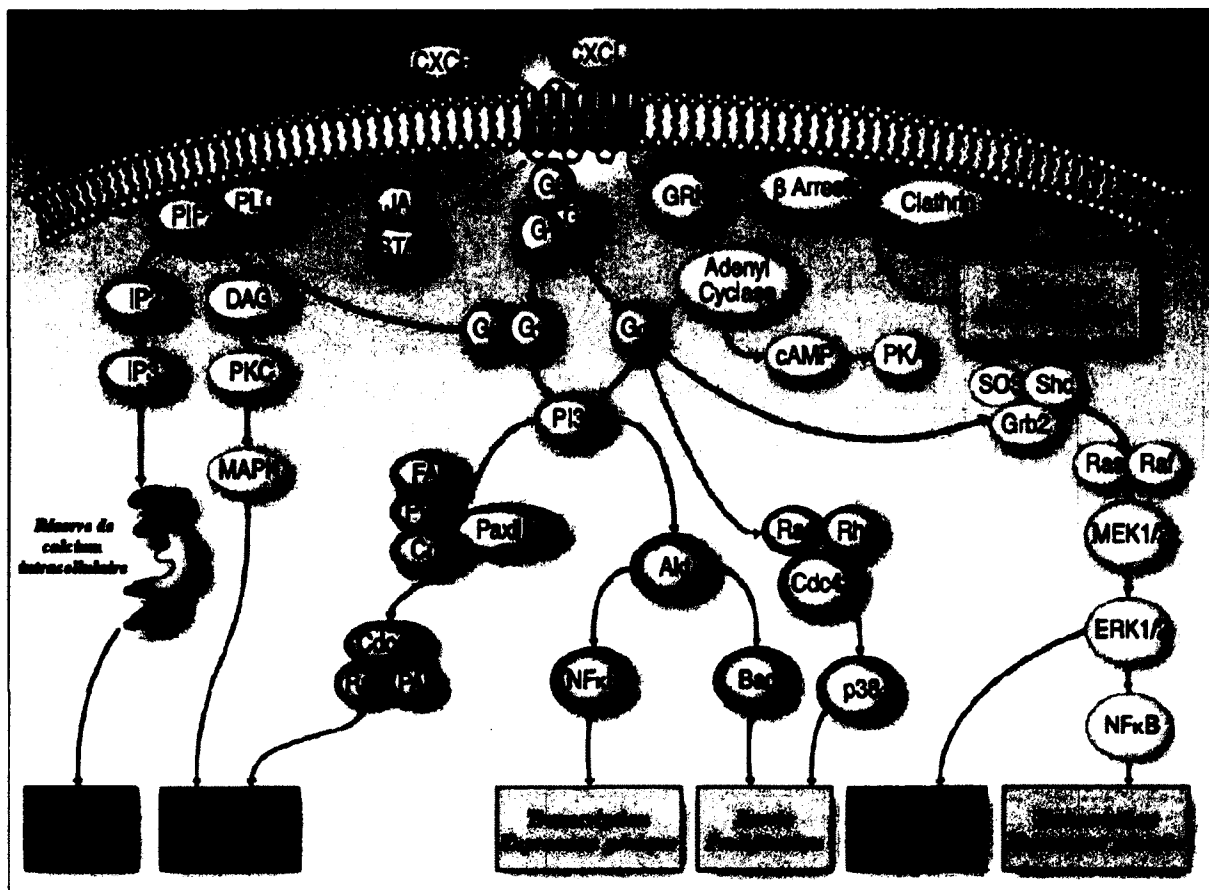


Figure 13. Voies de signalisation intracellulaires classiques du récepteur CXCR4

Le récepteur CXCR4 est classiquement reconnu pour signaler via les protéines $G_{\alpha i}$ qui inhibe la production d'AMPc par l'adénylate cyclase. On retrouve une signalisation dépendante des sous-unités $G_{\beta\gamma}$ ainsi que via les β -arrestines qui activent la voie des MAPK. Figure adaptée de Teicher and Fricker, 2010

protéine kinase C (PKC) et de la voie des MAPK (Luttrell et al., 1996). La protéine G_i est aussi responsable de l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui joue un rôle prédominant dans la chimiotaxie via l'activation de petite protéine G, comme Rac et CDC42, et dans la prolifération/transcription/survie par l'activation d'AKT (Sotsios et al., 1999; Tilton et al., 2000). Certains groupes suggèrent aussi que l'activation de CXCR4 induirait sa dimérisation et activerait la voie des JAK/STATs (Vila-Coro et al., 1999) mais cette activation demeure discutable (Moriguchi et al., 2005). CXCR4 peut aussi se coupler

à la protéine $G\alpha_{13}$ permettant l'activation de la GTPase Rho impliquée dans le remodelage du cytosquelette ce qui contribue à la migration induite par SDF-1 (Tan et al., 2006). Suite à son activation, le récepteur CXCR4 sera phosphorylé par les kinases spécifiques de GPCR (GRK) pour ensuite permettre le recrutement des β -arrestines qui recruteront à leur tour la machinerie nécessaire menant à l'internalisation du récepteur et à sa désensibilisation (Orsini et al., 1999). De plus, il est reconnu que les β -arrestines agissent comme des protéines d'échafaudage pouvant réguler plusieurs voies de signalisation (Shukla et al., 2011). La β -arrestine2 participe activement à la chimiotaxie induite par l'activation de CXCR4 ainsi qu'à l'activation de MAPK (Cheng et al., 2000; Fong et al., 2002; Luttrell et al., 1999; Sun et al., 2002).

Ces voies de signalisation jouent un rôle prédominant dans la propagation du VIH-1 où elles seraient essentielles à la réplication virale (Chackerian et al., 1997; Yoder et al., 2008). À l'opposé, le processus d'infection et de fusion membranaire se produit même dans le cas d'un récepteur déficient en signalisation (Amara et al., 1997; Cocchi et al., 1996). La signalisation dépendante de CXCR4 nous permet de mieux apprécier l'importance de son expression au sein de plusieurs cancers facilitant leur prolifération, leur survie ainsi que leur capacité à former des métastases (Teicher and Fricker, 2010; Vlahakis et al., 2002; Yagi et al., 2011). Le syndrome de WHIM (*Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, and Myelokathexis*) où une délétion ou une mutation de la queue C-terminale de CXCR4 résulte en un récepteur qui n'est plus désensibilisé ou internalisé, provoque une augmentation de la réponse chimiotactique induite par SDF-1 (Balabanian et al., 2005b; Gulino et al., 2004; Hernandez et al., 2003; Liu et al., 2012).

1.5 Problématique et objectifs de l'étude

Le récepteur CXCR4 représente une cible thérapeutique très importante pour ses multiples fonctions tant au niveau physiologique que pathologique. Au début de mes travaux de thèse, il n'y avait aucune structure moléculaire connue de CXCR4. Plusieurs études utilisaient des techniques de mutagenèse ou de simulation dynamique pour comprendre l'interaction entre le récepteur et son ligand endogène SDF-1 ainsi que certains

composés comme l'AMD3100 et le T140 (Huang et al., 2003; Trent et al., 2003). Il n'y avait que très peu de preuves directes entre l'interaction de ces différents ligands avec CXCR4 ainsi que sur l'organisation structurale de la pochette de liaison. Il y avait donc un besoin d'information en ce qui concernait le mode de liaison des ligands sur CXCR4 ainsi que le mécanisme d'activation de ce récepteur.

1.5.1 Hypothèse de recherche

Les déterminants moléculaires qui constituent la pochette de liaison du récepteur CXCR4 sont peu caractérisés. Notre hypothèse stipule que les ligands du récepteur CXCR4 interagissent avec des domaines précis de ce récepteur et que ces interactions sont à l'origine de leurs effets.

1.5.2 Objectif 1 : Identification des domaines impliqués dans la pochette de liaison du récepteur CXCR4

Nous caractériserons d'abord les domaines de la pochette de liaison du récepteur CXCR4 par la méthode de marquage par photoaffinité. Nous synthétiserons des photoanalogues à partir du T140, un ligand peptidomimétique capable de lier CXCR4, pour ainsi photomarquer le récepteur. Nous délimiterons les domaines importants du récepteur participant à la pochette de liaison à l'aide de digestions enzymatiques du complexe entre le CXCR4 et les photoanalogues. Nous proposerons par la suite un modèle de liaison entre le T140 et le CXCR4 basé sur ces résultats et la littérature. (Boulais et al., 2009)

1.5.3 Objectif 2 : Déterminer l'accessibilité des résidus constituant la pochette de liaison du récepteur CXCR4

Nous identifierons les déterminants moléculaires impliqués directement dans la pochette de liaison à l'aide de la méthode de SCAM (*Substituted cysteine accessibility method*). Nous effectuerons la substitution individuelle en résidu cystéine de chaque acide aminé compris dans les régions d'interactions identifiées dans l'objectif 1 pour mesurer si

l'alkylation de ces résidus cystéine obstrue la liaison du ligand. Ceci nous permettra de déterminer le patron des acides aminés de ces régions qui sont directement orientés vers la pochette de liaison.

1.5.4 Objectif 3 : Déterminer les changements conformationnels des résidus de la pochette de liaison à l'état actif

Nous transposerons les mutants cystéine générés à l'objectif 2 au niveau du mutant Asn119^(3.35)Ser du CXCR4 pour déterminer l'accessibilité de ces résidus dans un état actif et de les comparer à un état inactif. Nous proposerons par la suite un modèle nous permettant d'identifier les changements conformationnels dus à l'activation du récepteur CXCR4 et nous le comparerons avec le mécanisme d'activation des autres GPCR de la classe A.

Article 1

Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site.

Auteurs de l'article: Philip E. Boulais, Dominic Dulude, Jérôme Cabana, Nikolaus Heveker, Emanuel Escher, Pierre Lavigne and Richard Leduc

Statut de l'article: (2009) Biochem. Pharmacol. 78, 1382-1390

Avant-propos: J'ai contribué à cet article en effectuant toutes les manipulations expérimentales à l'exception des essais d'infection au VIH-1. J'ai contribué à l'élaboration du modèle par homologie, à la conception du projet et à l'écriture du manuscrit.

Résumé :

Le récepteur CXCR4 fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G et possède comme seul ligand endogène la chimiokine SDF-1 α . Ce récepteur est impliqué dans plusieurs processus comme le transport et la maturation des lymphocytes, l'angiogenèse ainsi qu'au niveau de l'infection du VIH-1 et du cancer. Utilisant des photoanalogues du peptidomimétique T140, nous avons démontré qu'il était possible de photomarquer spécifiquement le récepteur CXCR4. Nous avons synthétisé deux photoanalogues en substituant la position 5 et 10 du T140 par des résidus *p*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) pour donner le [Bpa⁵]T140 et le [Bpa¹⁰]T140 respectivement. Ces photoanalogues conservent une affinité identique au T140 natif pour la liaison à la pochette de liaison orthostérique du CXCR4. Ces photoanalogues retiennent aussi leur potentiel d'inhiber l'infection au VIH-1, confirmant que ces modifications n'altèrent ni leur affinité et leur activité sur le récepteur CXCR4. Nous avons soumis le complexe entre CXCR4 et ces photoanalogues à la protéase V8 identifiant la région Glu179^(4.68)-Lys154^(4.43) correspondant au domaine TM4 comme participant à la pochette de liaison du CXCR4 pour le T140. Nous avons confirmé ces résultats à l'aide d'une digestion enzymatique du fragment Glu179^(4.68)-Lys154^(4.43) par l'endoprotéinase Asp-N. Nos résultats démontrent l'implication du domaine TM4 dans la pochette de liaison du CXCR4 nous permettant d'établir un modèle du complexe T140/CXCR4.

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : _____
 Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Philip Boulais

inscrit(e) au programme de Pharmacologie

de la Faculté de Médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature _____ Date : 18-04-2013

Nom Richard Leduc

Coordonnées 3001, 12e Avenue Nord
Sherbrooke, Qc, Ca
J1H 5N4

Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Signature _____ Date : 18-04-2013

Nom Emanuel Escher

Coordonnées 3001, 12e Avenue Nord
Sherbrooke, Qc, Ca
J1H 5N4

Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : _____
Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse
de l'étudiant(e) (nom) : Philip boulais

inscrit(e) au programme de Pharmacologie

de la Faculté de Médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature [Signature] Date : 16 Sept 2009

Nom Dominic Dulude

Coordonnées Centre de Recherche, #6737 ; Hôpital Sainte-Justine
3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine
Montréal (Qc) H3T 1C5

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : _____
 Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Philip boulais

inscrit(e) au programme de Pharmacologie

de la Faculté de Médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature [Signature] Date : 1/11/2009
 Nom Nikolaus Heveker
 Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____
 Nom _____
 Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____
 Nom _____
 Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____
 Nom _____
 Coordonnées _____

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussigné(e)s, soussigné(s), co-auteur(e)s, co-auteur(s) de l'article intitulé :

Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Philip boulais

inscrit(e) au programme de Pharmacologie

de la Faculté de Médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature

Date :

Nom

Coordonnées

Signature

Date :

Nom

Coordonnées

Signature

Date :

Nom

Coordonnées

Signature

Date :

Nom

Coordonnées

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site.

Philip E. Boulais¹, Dominic Dulude^{2,3}, Jérôme Cabana¹, Nikolaus Heveker^{2,3}, Emanuel Escher¹, Pierre Lavigne¹ and Richard Leduc^{1#}

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H5N4, ²Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T1J4, ³Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada, H3T1C5.

Running title: Mapping T140's binding site on CXCR4

#Corresponding author:

Richard Leduc, Ph.D.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Quebec

Canada, J1H 5N4

Tel.: (819) 564-5413;

Fax: (819) 564-5400;

E-mail: Richard.Leduc@USherbrooke.ca

ABSTRACT

CXCR4, a G protein-coupled receptor, which binds the chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF-1 α , CXCL12), is one of two co-receptors most frequently used by HIV-1 to infect CD4+ lymphocytes. The SDF-1 α /CXCR4 axis is also involved in angiogenesis, in stem cell homing to bone marrow, in rheumatoid arthritis and in cancer. Here, we directly determined the binding site of the inverse agonist T140 on CXCR4 using photoaffinity labeling. Two T140 photoanalogs were synthesized containing the photoreactive amino acid *p*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) in positions 5 or 10, yielding [Bpa⁵]T140 and [Bpa¹⁰]T140. Binding experiments on HEK293 cells stably expressing the wild-type CXCR4 receptor using ¹²⁵I-SDF-1 α demonstrated that T140 and both photoanalogs had affinities in the nanomolar range, similar to SDF-1 α . Photolabeling led to the formation of specific, covalent 42 kDa T140-CXCR4 complexes. V8 protease digestion of both CXCR4/¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 and CXCR4/¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 adducts generated a fragment of 6 kDa suggesting that the T140 photoanalogs labeled a fragment corresponding to Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ of the receptor's 4th transmembrane domain. Further digestion of this 6 kDa fragment with endo Asp-N led to the generation of a shorter fragment validating the photolabeled region. Our results demonstrate that T140 interacts with residues of the fourth transmembrane domain of the CXCR4 receptor and provide new structural constraints enabling us to model the complex between T140 and CXCR4.

Keywords: CXCR4, T140, GPCR, photoaffinity labeling, molecular modeling, ligand-binding pocket.

1. INTRODUCTION

Chemokines are small proteins that act as chemoattractants for various leukocyte subpopulations [1] as well as non-hematopoietic cells [2]. The chemokine superfamily is divided into four groups (CXC, CX₃C, CC and C) according to the position of the first two cysteines [3]. The CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha (SDF-1 α , also known as CXCL12) triggers many cellular processes such as leukocyte maturation and trafficking [1], stem cell homing to bone marrow [4, 5] and angiogenesis [6]. SDF-1 α is also involved in rheumatoid arthritis [7] and cancer [8]. The actions of SDF-1 α are mediated by CXCR4 [9], a 'class A' G protein-coupled receptor, but also through CXCR7 [10], a newly reported SDF-1 α receptor. CXCR4 is present in many types of leukocytes such as T and B lymphocytes, monocytes, neutrophils [11] and its expression is upregulated in different cancers including breast cancer [12]. The receptor is involved in promoting tumor metastasis [13] and acts as a co-receptor for HIV-1 infection of CD4⁺ T lymphocytes [14]. The interaction of glycoprotein gp120 of HIV-1 with the CD4 receptor and co-receptor CXCR4 (or CCR5) is a critical step in the infection process [15].

The identification of CXCR4 as a major player in HIV-1 infection made it a promising target for the development of new antiretroviral drugs such as the bicyclam AMD3100 [16] and the peptidomimetic T140 [17]. T140 is a 14-residue (Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Arg-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg) synthetic peptide based on the primary structure of a polyphemusin peptide isolated from horseshoe crab developed through structure-activity studies by the group of Fujii [18]. T140 and analogs have inhibitory properties towards HIV-1 infection [19], rheumatoid arthritis [20] and the progression of metastasis in breast cancer [21]. T140 was originally described as a CXCR4 antagonist by virtue of its capacity to block SDF-1 α binding to CXCR4. Subsequently, T140 has been found to be a CXCR4 inverse agonist by reducing basal [³⁵S]GTP γ S binding to constitutively active CXCR4 receptor mutants [22].

A better understanding of the molecular basis by which T140 interacts with CXCR4 would provide new insights in the structure-activity relationship of CXCR4 and could ultimately contribute to the design of novel and/or improved antiretroviral or anti-

cancer compounds. Structure-function studies based on alanine scanning of the T140 primary sequence have shown that Arg², Nal³, Tyr⁵ and Arg¹⁴ are essential for anti-HIV activity [23]. Conversely, substitution mutagenesis studies on the CXCR4 receptor have revealed the importance of specific residues involved in binding SDF-1 α [24, 25] or the HIV envelope protein gp120 [26]. Similarly, reduced binding of [¹²⁵I]-T140 on CXCR4 receptors mutated at selected residues suggested that Asp¹⁷¹, Arg¹⁸⁸, Tyr¹⁹⁰, Gly²⁰⁷ and Asp²⁶² may act as key residues for the interaction of CXCR4 with T140 and were compatible with computer simulations of the receptor-ligand complex [27].

Here we use photoaffinity labeling to directly probe wild-type CXCR4 in order to identify residues that interact with T140 analogs containing the photoreactive amino acid *p*-benzoyl-*L*-phenylalanine (Bpa). Photoaffinity labeling using Bpa [28] has been successful for the identification of binding sites within the angiotensin II type-1 receptor [29, 30], the urotensin II receptor [31], the motilin receptor [32] as well as many others. This approach allows us to identify specific residues or regions of a receptor interacting directly with Bpa thereby enabling direct mapping within a given binding pocket. Here we probed the specific interaction of ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 and ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 with CXCR4.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Acrylamide, bovine serum albumin (BSA), deoxycholic acid, polyethylenimine and puromycin were from Sigma (Oakville, ON, Canada). Ammonium bicarbonate was from Fischer Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Complete protease cocktail inhibitor, endo AspN (endoproteinase Asp-N; EC 3.4.24.33), glycine, Nonidet P40, Staphylococcal V8 protease (Endo Glu-C; EC 3.4.21.19) were from Roche (Indianapolis, IN, USA). X-Omat® Blue (XB) films (Kodak), ^{125}I -SDF-1 α (2200 Ci/mmol) were from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Woodbridge, ON, Canada). DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS (foetal bovine serum) and penicillin/streptomycin were obtained from Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). Sodium dodecyl sulphate (SDS) and sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4) were from Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). HEK293 stably expressing N-terminally HA-tagged CXCR4 was kindly provided by Dr. Michel Bouvier (Department of Biochemistry, University of Montreal, QC, Canada). Human SDF-1 α was from PeproTech (Rocky Hills, NJ, USA).

2.2 Peptide synthesis and radioiodination.

T140 and Bpa-containing T140 analogs were synthesized in our laboratories on an automatic peptide synthesis instrument (Pioneer), using the N α -Fmoc protection strategy and TBTU (o-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate) as coupling agent, starting for each peptide with 0.3 g Fmoc Arg(Pbf)-PEG-PS resin from Novabiochem (0.22 meq/g; Gibbstown, NJ, USA). Side-chain functional groups of Cysteine residues were protected by trityl groups, Arginine by Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl), Tyrosine by t-Butyl and Lysines by Boc which were all simultaneously removed during solid support cleavage by 92.5% aqueous trifluoroacetic acid (TFA) containing 2.5% of ethanedithiol and 2.5% triisopropylsilane. Disulfide bond formation was achieved by oxidation with DMSO. The synthetic peptides were purified to homogeneity (at least 95%) on a C18 reverse-phase column. Each peptide was characterised by analytical HPLC and mass spectrometry. ^{125}I -[Bpa⁵]T140 and ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 were prepared with Iodo-Gen® (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycouril) from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA) as described [33]. Briefly, 10 μl of a 1mM

peptide solution was incubated with 5 μg of Iodo-Gen®, 80 μl of 100 mM borate buffer, pH 8.5, and 1 mCi of Na^{125}I for 30 min at room temperature (25°C) before being purified by HPLC on a C_{18} column.

2.3 Cell culture

HEK293 cells were grown in DMEM containing 10 % (v/v) FBS, 100 IU/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin at 37 °C. HEK293 stably expressing CXCR4 were grown using puromycin (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as a selection agent. Confluent cells (95%) in 100-mm-diameter Petri dishes were used for photoaffinity labeling and binding assays.

2.4 Binding experiments

HEK293 cells were washed once with PBS and subjected to one freeze–thaw cycle. Broken cells were then gently scraped in binding buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 1 mM CaCl_2 and 5 mM MgCl_2), centrifuged at 3500 g for 15 min at 4°C and resuspended in binding buffer containing 0.1 % BSA. For competition binding assays, broken cells (1-10 μg of protein) were incubated for 1 h at room temperature in binding buffer with ^{125}I -SDF-1 α (0.4 nM) as a tracer and increasing concentrations of T140 peptide analogs or SDF-1 α in a final volume of 0.5 ml. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration through GF/C filters pre-soaked for 2 h in polyethylenimine 0.2% at 4°C and washed with ice-cold washing buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 500 mM NaCl). Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ -radiation counting. Specific binding was defined as the difference of binding in the absence and presence of 1 μM of the corresponding unlabeled ligand. Radioligand binding assays were collected in triplicate and are presented as means \pm S.E.M. Binding curves were fitted using a binding model for two sites ($R^2 = 0.9866$) and K_i values were determined using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) using non-linear regression.

Dissociation kinetic assays were performed using ^{125}I -SDF-1 α (0.4 nM) in binding buffer in a final volume of 500 μL . We used the isotopic dilution method [34] to measure the dissociation rate constant for ^{125}I -SDF-1 α . 1 μg of broken cells stably expressing CXCR4 were pre-incubated with ^{125}I -SDF-1 α for 1 h at room temperature. Dissociation

was then initiated by the addition of unlabeled SDF-1 α (1 μ M) in presence or absence of different concentration of T140. Dissociation times from 2 to 120 min at room temperature were used. To determine non-specific binding, dissociation experiments on broken cells by pre-incubating with 125 I-SDF-1 α and with 1 μ M SDF-1 α . Bound radioactivity was then separated from free ligand by filtration through GF/C filters pre-soaked for 2 h in polyethylenimine 0.2% at 4°C and washed with ice-cold washing buffer. Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ -radiation counting.

2.5 HIV infection

Inhibition of HIV infection by T140 and Bpa-derivatives was measured using the reporter cell line U373-X4.15 [35], and the dualtropic HIV strain HIV-1_{89.6} [36]. Infectious virus was produced from HEK293 cells transfected with HIV-1_{89.6} proviral DNA (obtained from the NIH AIDS Research & Reference Reagent Program) and infection assays performed as described [24, 25]. Briefly, cells were seeded in microtiter plates and cultured overnight before incubating them with various concentrations of compounds and HIV-1_{89.6} for 24h. Cells were then lysed and beta-galactosidase content measured using the colorimetric substrate CPRG (chlorophenolred- β -D-galactopyranoside).

2.6 Photoaffinity labeling

Photoaffinity labeling was performed essentially as described previously [31]. HEK293 cells stably expressing CXCR4 were incubated for 1 h at room temperature in 0.5 ml of binding buffer containing the photoreactive radioligand (50 nM), in the presence (10 μ M) or absence of either T140 or Bpa-containing T140 analogs. Cells were then washed, irradiated for 1 h at 4°C under filtered UV light in washing buffer and centrifuged at 3500 g for 15 min at 4°C. The pellet was solubilized on ice for 30 min in modified radioimmunoprecipitation buffer [m-RIPA; 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 5 mM sodium azide, 1 % (v/v) nonidet P40, 0.25 % (v/v) deoxycholic acid and 0.1 % (w/v) SDS] containing Complete protease inhibitor cocktail. After centrifugation at 15 000 g for 30 min at 4°C, the supernatants were kept at -80°C until further analysis.

2.7 Partial purification of the labeled complex

Photolabeled receptors were separated by SDS/PAGE using 10% (w/v) acrylamide/Tris/glycine gels followed by autoradiography using X-Omat® Blue (XB) films (Kodak). Bands corresponding to receptor-ligand complexes were excised from the gels and submitted to electroelution. Eluted proteins were then concentrated and kept at -80°C .

2.8 Endoglycosidase and Proteolytic digestions of the radiophotolabeled complex

For endoglycosidase digestions, partially purified photolabeled receptors (3500 cpm), were resuspended in 50 μL of digestion buffer (200 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 50 mM EDTA, 0.5% Nonidet P40) and samples were incubated with 5 units of PNGase F for 16 h at room temperature. For V8 protease digestions, partially purified photolabeled receptors (3500 cpm) were resuspended in 50 μL of digestion buffer (100 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0) and incubated with 5 μg of V8 protease at room temperature for 16 h. Under these conditions, V8 protease cleaves at the C-terminal side of glutamate residues. For endo Asp-N digestion, partially purified photolabeled receptors (5000 c.p.m.) were resuspended in 50 μL of digestion buffer (50 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 0.01% SDS), and samples were incubated with endo Asp-N (0.5 μg) for 16 h at room temperature. Under these conditions, endo Asp-N cleaves at the N-terminal side of aspartate residues. When subsequent digestions were needed, products of the first digestion were run on a 16.5% (w/v) acrylamide/Tris/Tricine gel, and the corresponding band was electroeluted. Eluted proteins were concentrated and submitted to subsequent digestion. The products of proteolysis were analysed by SDS/PAGE using 16.5% (w/v) acrylamide/Tris/Tricine gels, followed by autoradiography on X-ray films (BioMax® MS) with intensifying screens. ^{14}C -labeled low-molecular-mass protein standards (Amersham Biosciences) were used to determine apparent molecular masses.

2.9 Molecular modeling

All calculations were performed on a Silicon Graphics Octane2 workstation (Silicon Graphics Inc. Mountain View, CA, U.S.A.). Molecular modeling of the CXCR4 receptor and T140-CXCR4 receptor complex was done with the INSIGHTII suite of

programs (Homology, Discover and Biopolymer; Accelrys, San Diego, CA). The molecular model of human CXCR4 (GenBank™ accession no. **P61073**) was based on the crystal structure of opsin (pdb accession number 3dqb) [37]. The sequence alignment between the CXCR4 receptor and the opsin sequence was used to identify and assign the structurally conserved regions (SCRs). All the strictly conserved residues of family A members were aligned. There were no gaps in any of the TMDs. The coordinates of the assigned SCRs were then transferred to the sequence of CXCR4, followed by the generation of the intra and extracellular loops with the database found in Homology. The potential energy of the model was minimized using Discover with a consistent valence force field (31); first by fixing all heavy atoms, then by fixing only the backbone and, finally, by fixing the backbone of the TMD. The disulphide bonds (between ECL1 and ECL2 and between N-terminal and ECL3) were then added to CXCR4 and the potential energy was minimized again by fixing all heavy atoms besides the concerned loops and the N-terminus, which were left unrestrained.

2.10 Generation of liganded receptor structures by molecular modeling

The T140 ligand was constructed with INSIGHTII BUILDER based on the reported NMR solution structure of T140 [38] and the molecule was placed in CXCR4's binding pocket with Tyr⁵ and Tyr¹⁰ facing toward TM4, as suggested by the photolabeling results. For the minimization process, CXCR4's TMD were fixed and the T140 ligand was left completely unrestrained. The complex was minimized until the maximum derivative was less than 0.1 kcal/mol⁻¹.

3. RESULTS

3.1 Binding specificity of the photoreactive analogs

Figure 1 shows the primary structure of T140 and the photoreactive analogs used in the present study (Fig. 1A) as well as the CXCR4 receptor (Fig. 1B). Tyr⁵ and Tyr¹⁰ were respectively replaced by Bpa to give [Bpa⁵]T140 and [Bpa¹⁰]T140. We validated our HEK293 cells stably expressing CXCR4 by competition binding assays. Figure 2A shows that we found a 2.5-fold increase in total specific ¹²⁵I-SDF-1 α binding on HEK293 stably expressing CXCR4 as compared to untransfected HEK293 cells. Binding of SDF-1 α to untransfected HEK293 cells is due to the presence of trace endogenous CXCR4 receptors as previously reported [39]. Displacement binding of ¹²⁵I-SDF-1 α with unlabeled SDF-1 α showed a dose dependant fit for a two site model ($R^2 = 0.9866$) as previously observed in transfected HEK293T cells [40] and in Jurkat cells endogenously expressing CXCR4 [41]. The SDF-1 α high affinity site for CXCR4 has a K_i value of 0.4 ± 0.4 nM, while the low affinity site has a K_i of 31 ± 12 nM (Fig. 2A, Table 1). In competitive binding assays, the photoanalogs [Bpa⁵]T140 and [Bpa¹⁰]T140 (Fig 2B) exhibited K_i values of 2.8 ± 0.9 nM and 1.1 ± 0.8 nM respectively for the high affinity site of ¹²⁵I-SDF-1 α on CXCR4 compared to 2.6 ± 2.5 nM for T140. For the low affinity site, [Bpa⁵]T140 and [Bpa¹⁰]T140 showed K_i values of 40 ± 20 nM and 63 ± 8.8 nM respectively compared to 84 ± 36 nM for T140. Similar K_i values between T140 and the photoanalogs confirmed that substitution of Tyr⁵ and Tyr¹⁰ with Bpa did not alter their affinity for CXCR4.

To assess whether T140 bound CXCR4's orthosteric site, we performed dissociation kinetics experiments using ¹²⁵I-SDF-1 α in absence or presence of 1 μ M or 10 μ M of T140 (Fig. 2C). Dissociation kinetic measurements are used to detect conformational change induced by an allosteric compound that usually slows the dissociation of the orthosteric ligand [34]. The dissociation curves revealed no significant changes in the dissociation rate whether T140 was absent ($K = 0.029 \pm 0.0043$ min⁻¹) or present at either 1 μ M ($K = 0.034 \pm 0.0063$ min⁻¹) or 10 μ M ($K = 0.033 \pm 0.011$ min⁻¹). This suggests that T140 binds within CXCR4's orthosteric binding pocket.

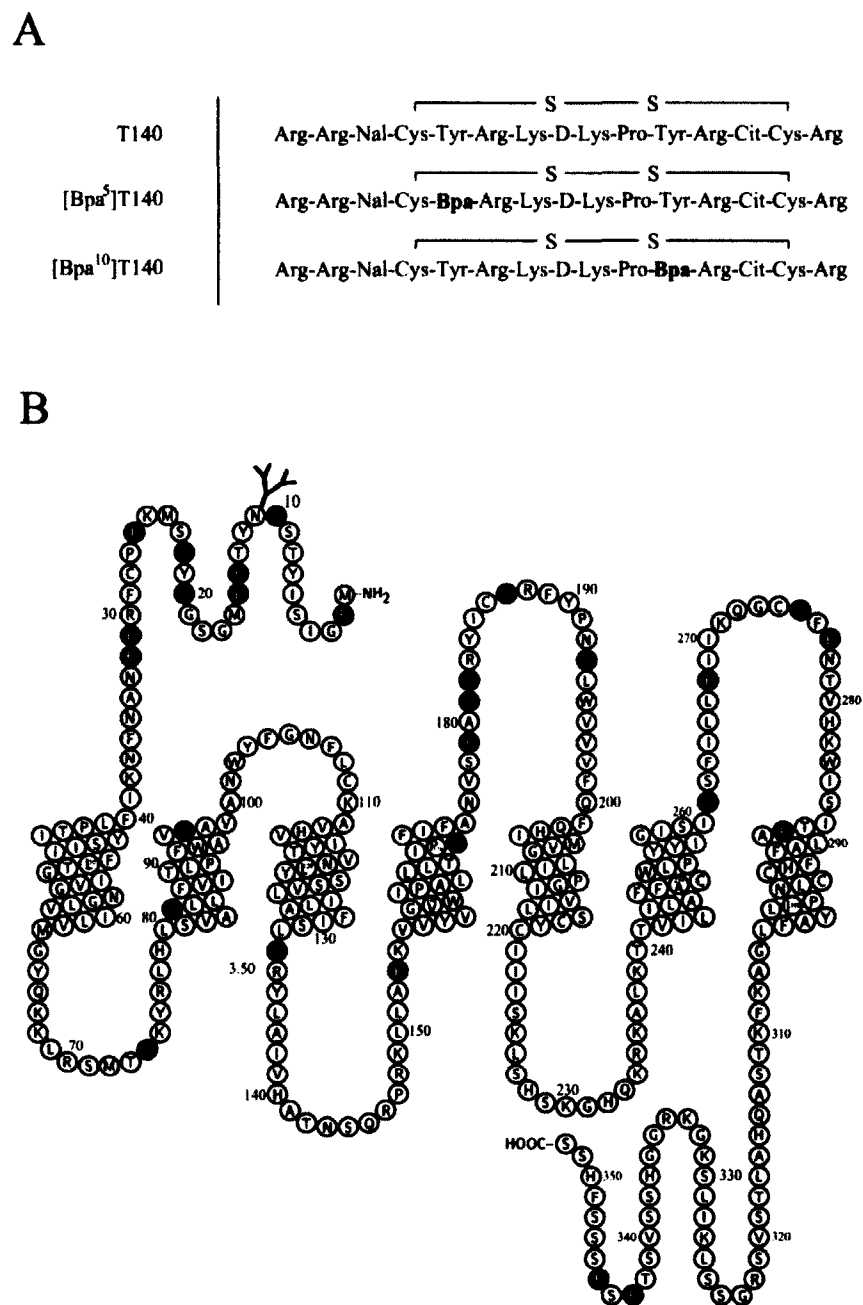


Fig. 1. (A) Amino acid sequence of T140 and T140 photoreactive analogs. Bpa residues are represented in bold. (B) Two-dimensional representation of the primary structure of human CXCR4 receptor. Black closed circles indicate cleavage sites for V8 protease. Gray closed circles indicate cleavage sites for Endo Asp-N protease.

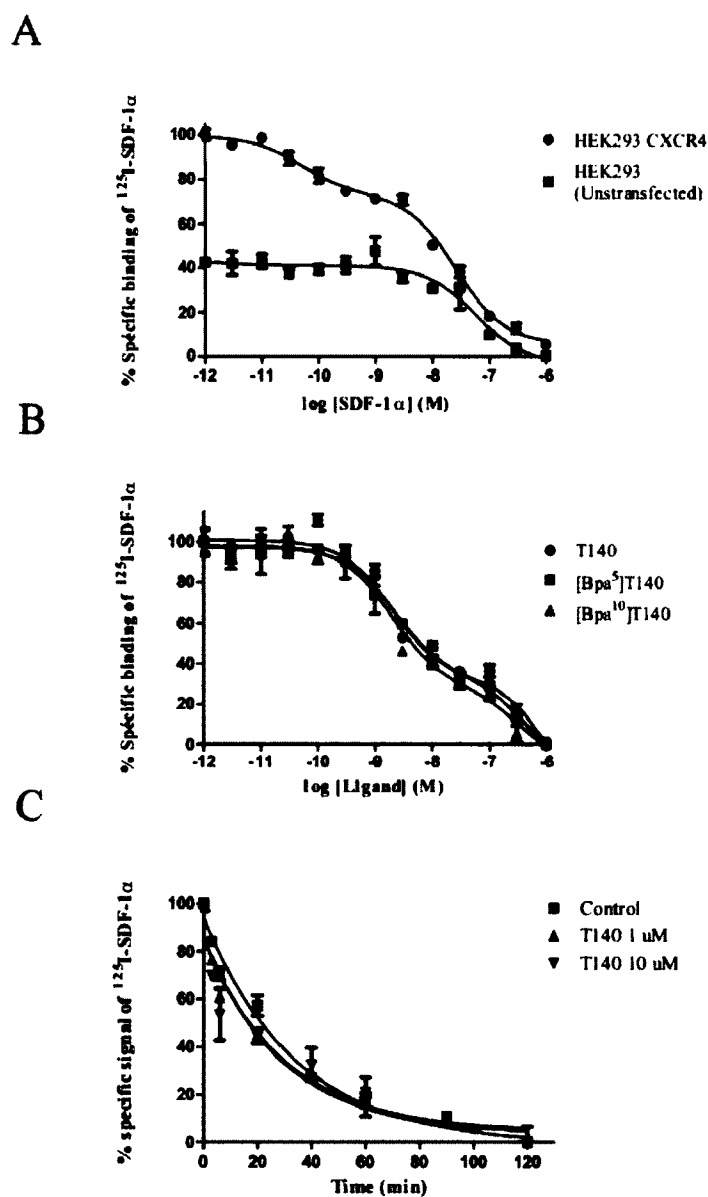


Fig. 2. Binding studies on HEK293 cells stably expressing CXCR4. (A) Competition binding using ^{125}I -SDF-1 α on HEK293 stably expressing CXCR4 versus untransfected HEK293 cells. (B) Competition binding of ^{125}I -SDF-1 α using T140 and the photoanalogs on HEK293 stably expressing CXCR4. These results (A, B) are representative of at least 3 separate experiments. (C) Dissociation kinetics using ^{125}I -SDF-1 α on HEK293 cells stably expressing CXCR4. These results (C) are representative of 2 separate experiments. Competition studies with broken cells expressing CXCR4 were carried out as described under Materials and Methods. K_i values were determined using GraphPad Prism version 5.00 for Windows.

Table 1 Binding properties of T140 analogs

| Ligand | K_i Site 1 (nM) | K_i Site 2 (nM) |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| SDF-1α | 0.4 \pm 0.4 | 31 \pm 12 |
| T140 | 2.6 \pm 2.5 | 84 \pm 36 |
| [Bpa⁵]T140 | 2.8 \pm 0.9 | 40 \pm 20 |
| [Bpa¹⁰]T140 | 1.1 \pm 0.8 | 63 \pm 8.8 |

HEK293 stably expressing CXCR4 were assayed as described in Experimental Procedures. Binding affinities (K_i) are expressed as the means \pm S.E.M. These results were obtained in 3 independent experiments performed in triplicate.

3.2 HIV infection blockade by T140 photoanalogs

To further assess the functionality of the T140 photoanalogs, we determined their potency at inhibiting HIV infection (Table 2). While the observed IC₅₀ of T140 in our conditions was 54 nM, it was similar to previously reported values (26 nM in [19], 90 nM in [42]), both photoanalogs had reduced IC₅₀s of 261 nM and 107 nM for [Bpa⁵]T140 and [Bpa¹⁰]T140 respectively, maintaining their capacity at blocking HIV infection albeit at lower potencies.

Table 2 Inhibition of HIV infection by T140 and its analogs

| Ligand | IC₅₀ (nM) | pIC₅₀\pmSEM |
|-------------------------------|-----------------------------|--|
| T140 | 54 | -7.27 \pm 0.08 |
| [Bpa⁵]T140 | 261 | -6.58 \pm 0.02 |
| [Bpa¹⁰]T140 | 107 | -6.97 \pm 0.01 |

U373-X4.15 reporter cell lines were infected with HIV-1_{89.6} in the presence of the different compounds. Data are means \pm SEM of two independent experiments performed in triplicate.

3.3 Photolabeling of human CXCR4 receptor

Since good affinities toward CXCR4 had been observed for both photoanalogs, ^{125}I -[Bpa⁵]T140 and ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 were subsequently used in photolabeling experiments. When incubated with membranes of HEK293 cells stably expressing CXCR4, both photoanalogs covalently labeled a protein migrating at 42 kDa on SDS-PAGE. However a significantly reduced labeling yield was observed for ^{125}I -[Bpa⁵]T140 compared to ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 (Fig. 3). This 42 kDa band was not observed in untransfected HEK293 confirming the identity of the labeled protein as CXCR4. Although we did find CXCR4-dependent SDF-1 α binding in untransfected cells, it is possible that photolabeling conditions are not as sensitive as γ -radiation counting and do not permit detection of trace endogenous CXCR4. The labeling of CXCR4 by ^{125}I -[Bpa⁵]T140 and ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 was abolished in presence of [Bpa⁵]T140 (10 μM) and [Bpa¹⁰]T140 (10 μM) respectively, thereby confirming the specificity of the labeling (Fig. 4). Photolabeling of CXCR4 with both photoanalogs was also abolished in presence of native T140 (10 μM) in agreement with the fact that the photoanalogs interact within the same confines of T140's binding pocket.

3.4 V8 protease digestion of ^{125}I -[Bpa⁵]T140/CXCR4 and ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140/CXCR4 complexes

To map the ligand-receptor contact site(s), the 42 kDa photoligand-receptor complex was partially purified and submitted to V8 protease digestion which cleaves on the C-terminal side of glutamate residues. This digestion produced a band migrating at 6.5 kDa for both ^{125}I -[Bpa⁵]T140/CXCR4 and ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140/CXCR4 complexes. The partially purified complex was also submitted to PNGase F and further treatment with V8 protease also generated a 6.5 kDa band (Fig. 5) suggesting the absence of N-glycosylation on this fragment. The only fragment corresponding to this molecular weight was one encompassing Lys¹⁵⁴ – Glu¹⁷⁹ of the receptor's fourth transmembrane domain with a calculated mass of 3.0 kDa in addition to the mass of the photoligand (3.5 kDa) as observed on SDS-PAGE gel (Fig. 5).

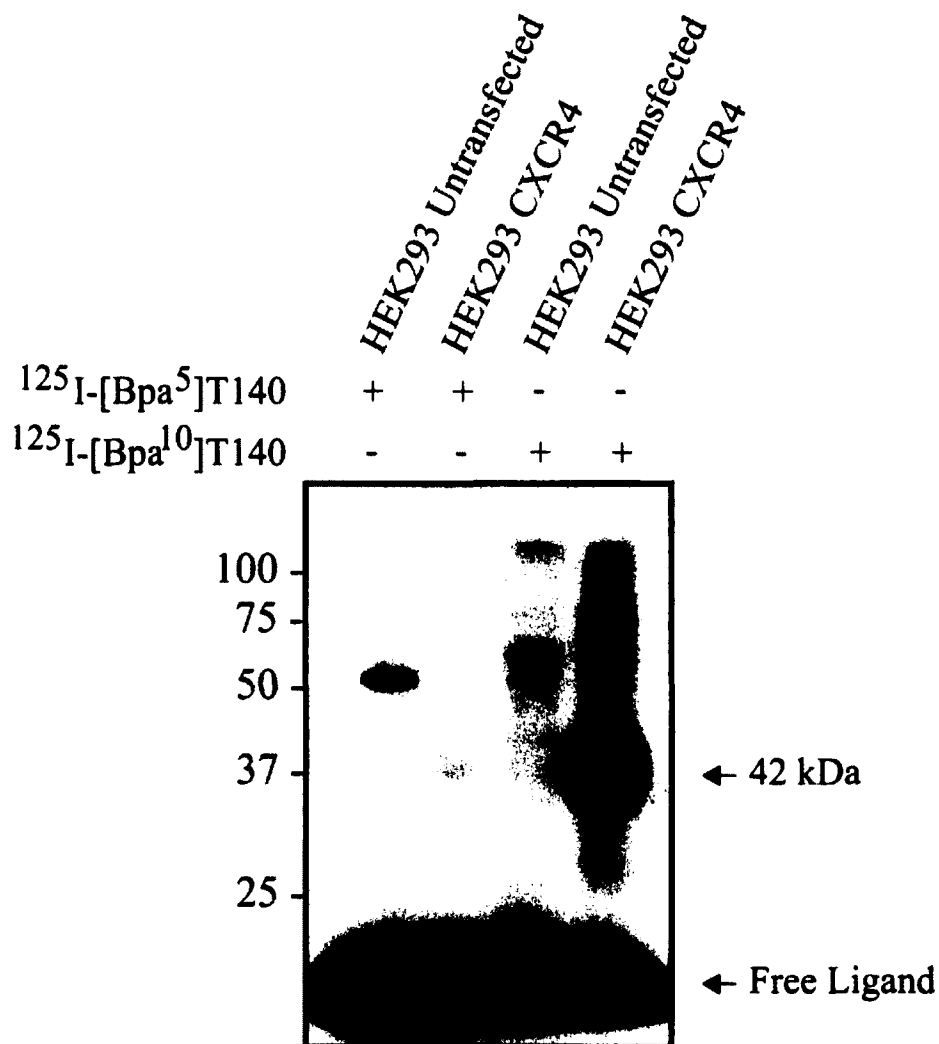


Fig. 3. Photolabeling specificity of ^{125}I -[Bpa⁵]T140 or ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140. Untransfected HEK293 cells (Lane 1,3) and HEK293 cells stably expressing CXCR4 (Lane 2,4) were photolabeled using ^{125}I -[Bpa⁵]T140 (Lane 1,2) or ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 (Lane 3,4). Following photolabeling, proteins were solubilized, denatured and submitted to SDS-PAGE on 10% acrylamide gel followed by autoradiography. Protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of at least 3 separate experiments.

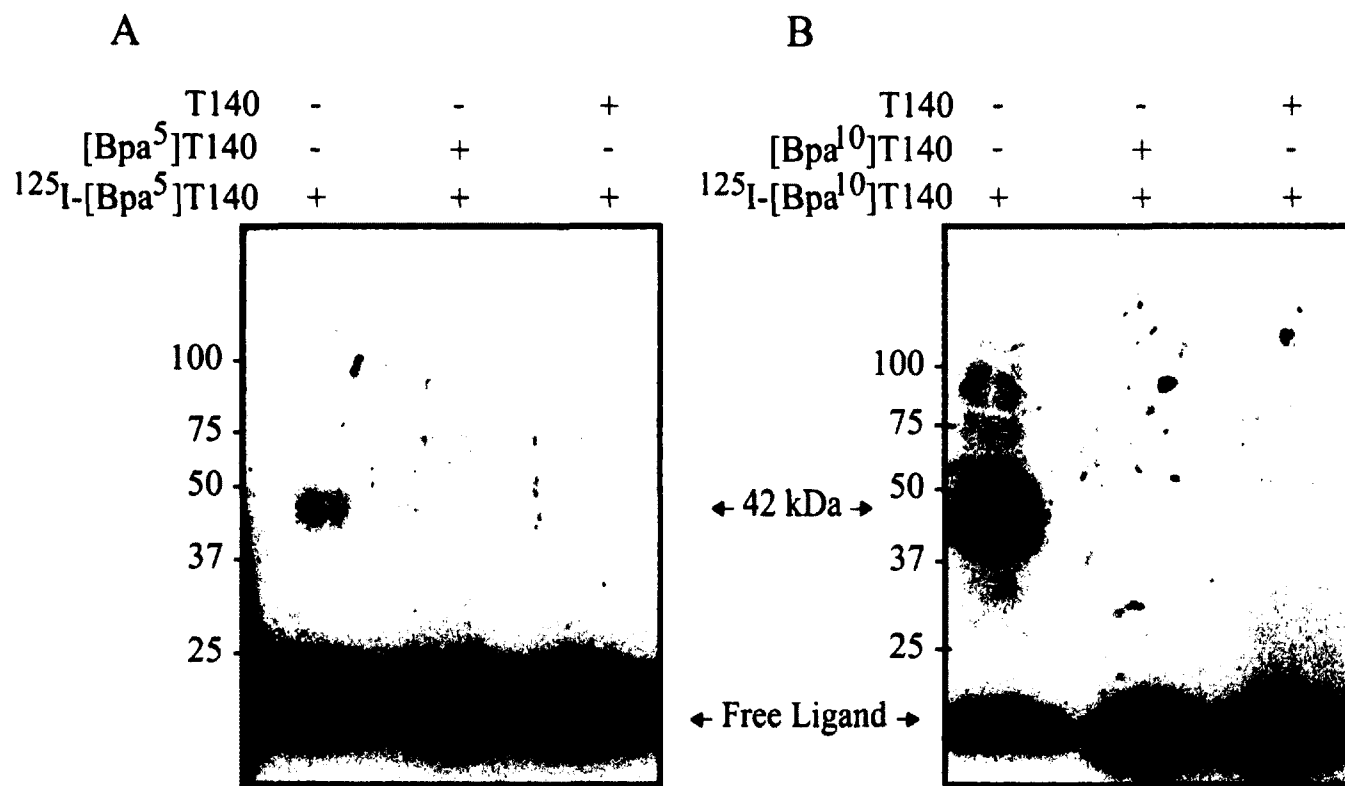


Fig. 4. Photolabeling of CXCR4 in the presence of T140. HEK293 stably expressing CXCR4 were photolabeled using ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 (A). Total labeling (Lane 1), labeling in the presence of 10 μM [Bpa⁵]T140 (Lane 2) and labeling in the presence of 10 μM T140 (Lane 3). HEK293 stably expressing CXCR4 were photolabeled using ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 (B). Total labeling (Lane 1), labeling in the presence of 10 μM [Bpa⁵]T140 (Lane 2) and labeling in the presence of 10 μM T140 (Lane 3). After photolabeling, cellular proteins were solubilized, denatured and submitted to SDS-PAGE on 10% acrylamide gel followed by autoradiography. Protein standards of the indicated molecular masses (kDa) are run in parallel. These results are representative of at least 3 separate experiments.

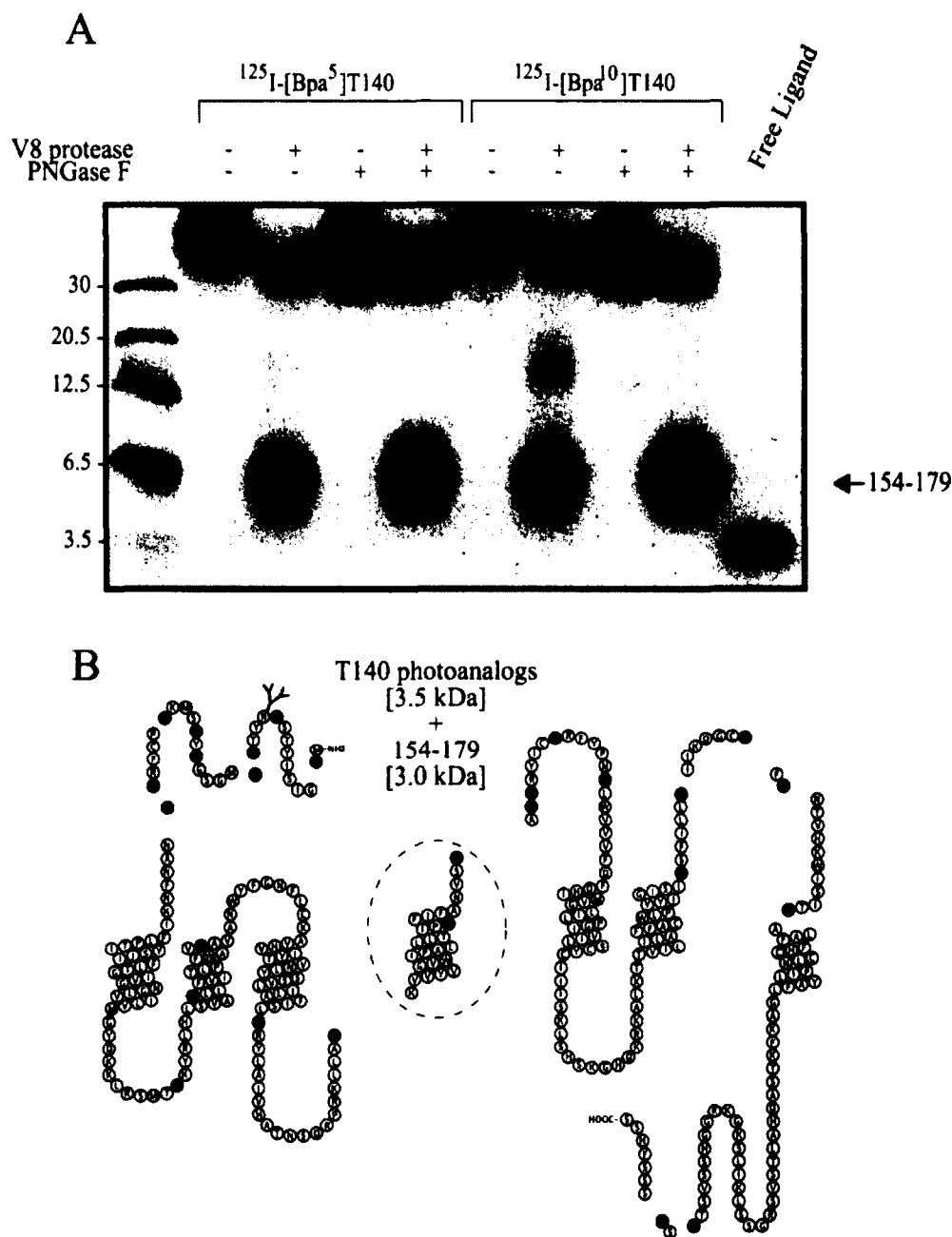


Figure 5 Proteolytic cleavage of ^{125}I -[Bpa⁵]T140 and ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 photolabeled CXCR4 with V8 protease. (A) Partially purified photolabeled CXCR4 (3500 cpm) was incubated in absence (lanes 1, 3, 5, 7) or in presence of V8 protease (lanes 2, 4, 6, 8) (5 μg); lanes 1, 2, 5, 6 show glycosylated photolabeled CXCR4; lanes 3, 4, 7, 8 show PNGase treated (deglycosylated) photolabeled CXCR4. Lanes 1-4: ^{125}I -[Bpa⁵]T140 photolabeled CXCR4. Lanes 5-8: ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 photolabeled CXCR4. Samples were run on a 16.5% Tris/Tricine acrylamide gel followed by autoradiography. ^{14}C -labeled protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments. (B) Two-dimensional representation of the primary structure of human CXCR4 receptor cleaved by V8 protease.

3.5 Endo AspN protease digestion of fragment Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹

To further refine the binding site(s) of the photoanalogs, we partially purified the Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ fragment obtained previously by V8 protease digestion of the native complex and digested it with endo AspN protease, which cleaves on the N-terminal side of aspartate residues. The Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ fragment has a single Asp residue in its sequence (Asp¹⁷¹), resulting in two possible fragments: Lys¹⁵⁴-Pro¹⁷⁰ (1.9 kDa) and Asp¹⁷¹-Glu¹⁷⁹ (1.0 kDa). Endo AspN digestion led to the cleavage of the Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ fragment validating that photolabeling site(s) of both photoanalogs occurred in this region of the receptor (Fig. 6). However, the limited resolution of the SDS-PAGE conditions under which we separate the photolabeled fragments did not enable us to delineate whether labeling occurred in a fragment corresponding to residues Lys¹⁵⁴-Pro¹⁷⁰ or Asp¹⁷¹-Glu¹⁷⁹ for both photoanalogs.

3.6 Molecular modeling of the CXCR4-T140 complex

To extend the analysis of the T140 binding site on CXCR4, we performed molecular modeling using the reported NMR solution structure of T140 [38]. This structure consists of a β -hairpin with a type II' β -turn with residues Tyr⁵ and Tyr¹⁰ on the same side of the T140 β -hairpin (see figure 7A). Since both photoanalogs labeled the same region of CXCR4 (i.e. the Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ fragment within TM4), it is reasonable to assume that this side of T140 lies in close proximity to the Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ region of the receptor. Whereas our results indicate that both Tyr⁵ and Tyr¹⁰ can contact residues from Leu¹⁵⁴ to Glu¹⁷⁹, it does not allow us to determine the exact orientation of T140 in the complex. However, considering that T140 is positively charged both above and below the disulfide bond, we hypothesized that the N- and C-terminal ends of T140 will be oriented towards the extracellular domains of CXCR4 with the type II' β -turn buried deep into the binding pocket. Thus, T140 would insert itself in the CXCR4 orthosteric binding pocket as a U-shaped ligand with residues 5 and 10 interacting with TM4.

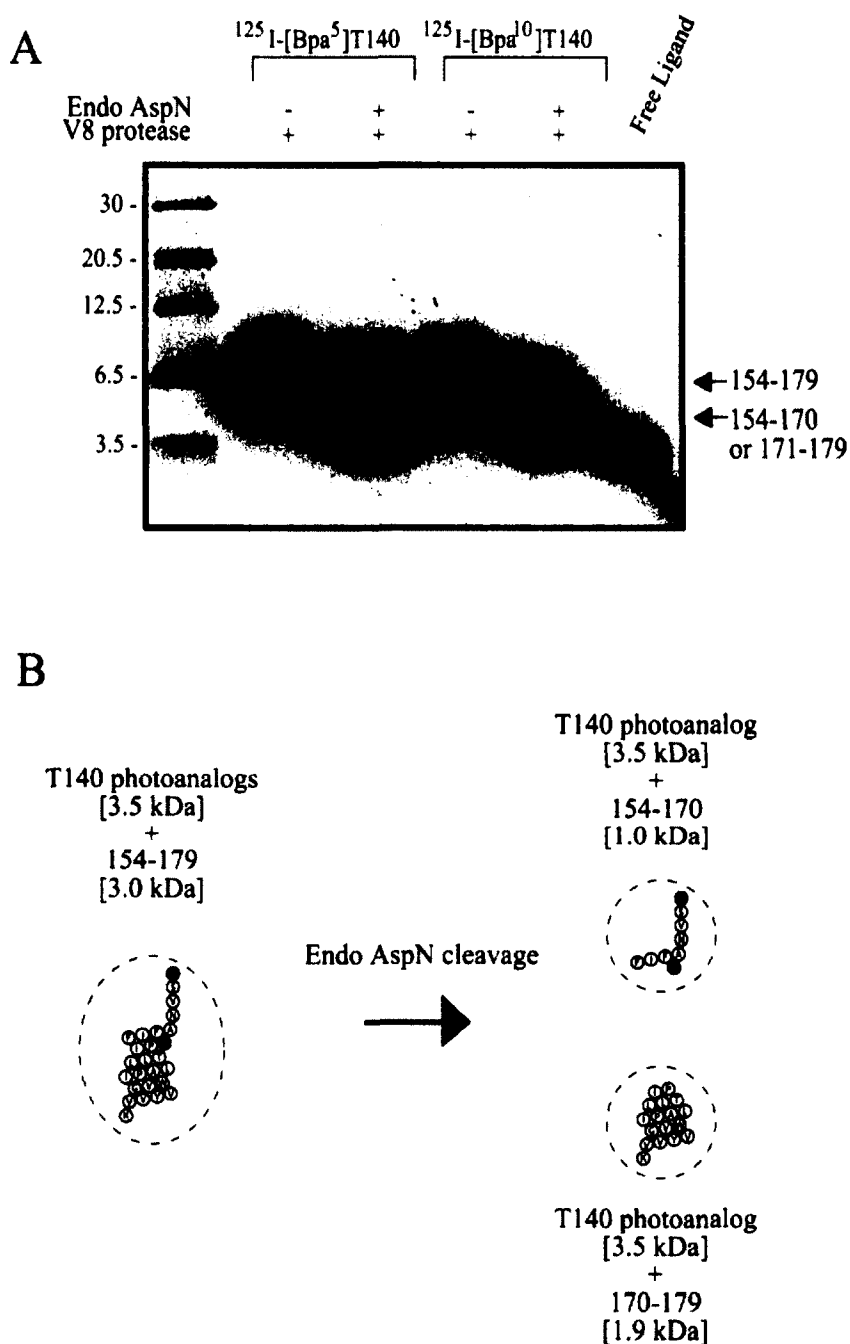


Figure 6 Proteolytic cleavage of ^{125}I -[Bpa⁵]T140 and ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 photolabeled fragment Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ of CXCR4 with Endo Asp-N. (A) Partially purified photolabeled fragment Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ of CXCR4 (3500 cpm) was incubated in absence (Lanes 1, 3) or in the presence of Endo Asp-N (Lanes 2, 4) (5 μg). Lanes 1-2: ^{125}I -[Bpa⁵]T140 photolabeled Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ fragment. Lanes 3-4: ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 photolabeled fragment Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹. Samples were run on a 16.5% Tris/Tricine acrylamide gel followed by autoradiography. ^{14}C -labeled protein standards of the indicated molecular masses (kDa) were run in parallel. These results are representative of at least three separate experiments (B) two-dimensional representation of the Lys¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ fragment of CXCR4 cleaved by Endo Asp-N.

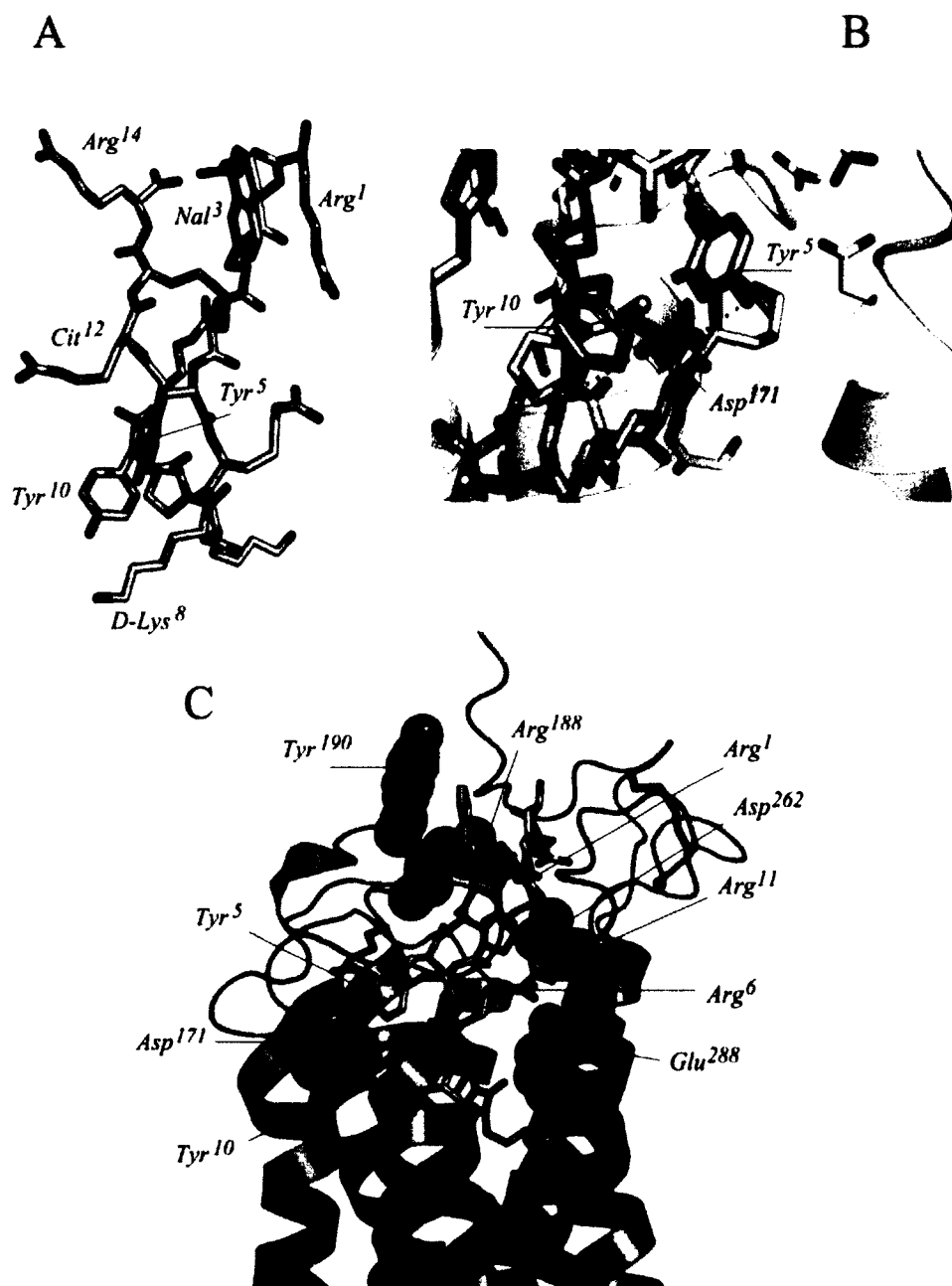


Figure 7 Molecular model of the T140 liganded CXCR4. (A) NMR structure of T140 [38]. Note that Tyr⁵ and Tyr¹⁰ are on the same face of the disulfide-linked β -hairpin. (B) Tyr⁵ and Tyr¹⁰ (yellow) of T140 are positioned to form specific H-bonds with Asp¹⁷¹ (green) of CXCR4. (C) Global view of the model of the complex between T140 and CXCR4 (green) with an emphasis on key interactions of T140 (indicated in black) with key residues (indicated in blue) on CXCR4. See text for further details.

Table 3 H-bonds and hydrophobic interaction between T140 and CXCR4

| T140 residues | | CXCR4 residues |
|---|--------|--|
| L-Arginine 1 | N-term | Asp 22 (C=O) |
| | sc | Asp 262 (sc) Gln 272 (sc) |
| | C=O | Met 24 (NH) |
| L-Arginine 2 | sc | Glu 26 (sc, NH), T140 C-terminal |
| | C=O | Gln 272 (sc) |
| L-3-(2-naphthyl)alanine 3 | sc | Hydrophobic pocket formed by the methylene, methyl groups and aromatic ring of: Asp 22 (sc), Ser23 (sc), Phe 189 (sc), Thr 190 (sc), Arg 188 |
| | NH | Arg 188 (sc) |
| L-Tyrosine 5 | sc | Asp 171 (sc), Asn 176 (sc) |
| | C=O | Tyr 255 (sc) |
| L-Arginine 6 | sc | Asp 262 (sc), Thr 255 (sc), Gly 258 (C=O) |
| | C=O | His 203 (sc) |
| L-Lysine 7 | sc | Thr 117 (sc), Thr 168 (sc), His 203 (sc), Tyr 121 (sc) |
| D-Lysine 8 | sc | Thr 287 (sc, C=O), Cys 251 (C=O), Tyr 255 (NH) |
| L-Tyrosine 10 | sc | Asp 171 (sc), Thr 117 (sc), Thr 168 (C=O) |
| | C=O | Tyr 116 (sc) |
| L-Arginine 11 | sc | Arg 183 (C=O), Tyr 184 (sc), His 281 (C=O), Ser 285 (sc), Glu 288 (sc) |
| | C=O | Ile 185 (NH) |
| L-Citrulline 12 | sc | His 113(sc), Asn 176 (sc), Val 177 (C=O), Cys 186 (NH), |
| L-Arginine 14 | sc | Glu 179 (sc, C=O), Ala 180 (C=O), Asp 181 (C=O) |
| | NH | Arg 188 (sc) |
| | C-term | Arg 183 (sc), Arg 188 (sc), T140 Arg 2 (sc) |
| Legend : "sc" = Side chain, "C=O" = backbone carbonyl group, "NH" = backbone amino group, bold : T140 intramolecular interactions In bold : T140 intramolecular interactions | | |

4. DISCUSSION

The identification of residues involved in formation of a receptor's binding pocket is an important step in understanding the bimolecular recognition between a ligand and its receptor. In this study, we used photoaffinity labeling as a strategy to identify CXCR4 residues found in close proximity to the inverse agonist T140. This approach depends on the spatial proximity between the photoligand and the receptor's residues that are oriented towards the binding pocket in order to form a covalent conjugate that can be further analyzed biochemically for the identification of interaction sites.

Previous reports on the structure-activity of T140 had shown that replacing either Arg², Nal³, Tyr⁵ and Arg¹⁴ with alanine caused a significant decrease in the anti-HIV activity of T140 [23]. However, the overall binding properties of these analogs on CXCR4 had not been assessed. To facilitate production of photoanalogs incorporating a radioactive, iodinated Tyr residue, we substituted either Tyr at position 5 or position 10 of the original T140 sequence with the photoreactive Bpa amino acid. The resulting T140 photoligands as well as T140 and SDF-1 α presented high affinities (Table 1) for the orthosteric pocket of the CXCR4 receptor as defined by binding and dissociation kinetic experiments. T140 and the photoanalogs also exhibited antiviral activity in HIV-1 infection assays. These results suggest that the Bpa substitutions of Tyr⁵ and Tyr¹⁰ did not alter the properties of native T140, making them functional candidates for the identification of the T140 binding pocket on CXCR4.

We further characterized these peptides for their ability to recognize and to label the CXCR4 receptor. ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 and ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 both labeled CXCR4 and the resulting complex migrates at 42 kDa. ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 showed reduced labeling of CXCR4 compared to ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 although both analogs exhibited similar affinities. The reduced CXCR4 labeling by ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 compared to ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 is due to the photolabeling reaction that is itself highly dependent on the proximity of residues surrounding Bpa which may influence the photolabeling yield. Residues influencing the photolabeling yield of a receptor without affecting the affinity of the photoanalog have been demonstrated for other receptors [43].

Labeling of CXCR4 by ^{125}I -[Bpa⁵]T140 and ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140 was completely abolished by the presence of unlabeled photoanalogs and with native T140 suggesting that the photoanalogs are specific for the T140 binding site. Using PNGase F and V8 protease digestions, a 6.5 kDa fragment corresponding to Asn¹⁵⁴-Glu¹⁷⁹ was labeled with either ^{125}I -[Bpa⁵]T140 or ^{125}I -[Bpa¹⁰]T140. Further digestion of this fragment with endo Asp-N, cleaved at Asp¹⁷¹ thereby confirming that both T140 photoanalogs were labeling this region. This suggests that specific TM4 residues of CXCR4 are in close proximity to residues 5 and 10 of T140.

Using site-directed mutagenesis, the potential involvement of CXCR4's TM4 in T140 binding and in mediating human immunodeficiency virus entry have been reported [27]. Substituting Asp¹⁷¹ of TM4 as well as Arg¹⁸⁸ and Tyr¹⁹⁰ of ECL2 for alanine led to a loss of sensitivity to T140 inhibition of Env-mediated fusion. Binding experiments confirmed that these residues were critical for T140 binding to CXCR4. Using these results to perform molecular modeling it was suggested that the N-terminus of T140 interacted with ECL2 of CXCR4 while the C-terminus was interacting with TM4, ECL2 and ECL3. The authors proposed that Arg¹⁴ of T140 forms a hydrogen bond with Asp¹⁷¹ of CXCR4, while Phe¹⁷⁴, Arg¹⁸⁸, Tyr¹⁹⁰ and Phe²⁰¹ of CXCR4 are involved in a hydrophobic network with Nal³ and Tyr⁵ of T140. This led to a model in which the two beta strands of T140 positioned perpendicular to the TM, with the N-terminal strand lying on top of the C-terminal strand and with the type II' β -turn extending away from the binding pocket.

In our model, we find that restraining the position of Tyr⁵ and Tyr¹⁰ of T140 close to residues Leu¹⁵⁴ to Glu¹⁷⁹ of CXCR4 during the potential energy minimization leads to the formation of H-bonds (internal solvation) between the two side-chain ³OH and the carboxylate of Asp¹⁷¹ (Figure 7B). This locks the two beta strands of T140 parallel to the TM. In addition, we find that Arg¹, Arg⁶ and Arg¹¹ of T140 forms an extensive number of favorable electrostatic interactions and H-bonds with two other conserved negatively charged side-chains, Asp²⁶² and Glu²⁸⁸ (Figure 7C and Table S1 in supplementary material). This is in agreement with a thermodynamically stable configuration of this complex. Moreover, Asp¹⁷¹, Asp²⁶² and Glu²⁸⁸ have been identified as key residues in

CXCR4 co-receptor function in HIV-1 entry [24]. Hence, these results support the notion that these interactions are critical for the formation of a stable complex between CXCR4 and T140. Similarly to the model proposed by Trent et al. [27], contact sites between T140 and CXCR4 that we experimentally determined lead to a model where Tyr¹⁹⁰ is involved in a hydrophobic network with Nal³. Note that Arg¹⁸⁸ is also part of this hydrophobic network through its methylenes and forms a salt-bridge with the terminal carboxylate of T140. We also observe the existence of a network of additional solvent exposed salt bridges between negatively charged side-chains of acidic residues found in ECL2 and Arg¹ and Arg¹⁴ of T140 (see Figure 7C and Table S1 in supplementary material). In summary, we find that the complex between T140 and CXCR4 depicts an optimized array of electrostatic interactions and H-Bonds. Such an array of interactions is the hallmark of molecular recognition. Finally, it is noteworthy that the residues on CXCR4 found to be critical for T140 inhibition of Env-mediated fusion are involved in an array of specific interactions in our model. Knowingly, it can be argued that this functional analysis of the T140-CXCR4 interactions adequately supports our model based on direct contacts obtained by photolabeling.

In conclusion, our results offer a novel view and interpretation of the T140 binding site and its interactions with CXCR4. Indeed, using photoaffinity labeling, we demonstrate interaction of Tyr⁵ and Tyr¹⁰ of T140 with a precise domain in TM4 of CXCR4. Our overall view of this interaction takes the form of a U-shaped T140 ligand inserting itself deeper in CXCR4's binding pocket than previous models depicted, suggesting a new interpretation of the key residues involved in the binding of anti-HIV compounds like T140.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Michel Bouvier (Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) for the HEK293-CXCR4 stable cell line and Marie-Reine Lefebvre (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada) for the synthesis of T140 and T140 photoanalogs. We also thank Brian J. Holleran for critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research Team in GPCR Allosteric Regulation (CTiGAR) and is part of the Ph.D. thesis of P.E.B. E.E. is the recipient of the J.C. Edwards Chair in cardiovascular research. R.L. is a Chercheur National of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). P.L. and N.H. are senior scholars of the FRSQ.

REFERENCES

- [1] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-8.
- [2] Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185:111-20.
- [3] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:145-76.
- [4] Broxmeyer HE. Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008;15:49-58.
- [5] Chute JP. Stem cell homing. *Curr Opin Hematol* 2006;13:399-406.
- [6] Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* 2003;10:359-70.
- [7] Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J* 2008;275:4448-55.
- [8] Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 2008;267:226-44.
- [9] Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833-5.
- [10] Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 2005;280:35760-6.
- [11] Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* 2004;104:565-71.
- [12] Benovic JL, Marchese A. A new key in breast cancer metastasis. *Cancer Cell* 2004;6:429-30.
- [13] Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 2007;256:137-65.
- [14] Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-7.

- [15] Lusso P. HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* 2006;25:447-56.
- [16] Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, et al. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 1998;4:72-7.
- [17] Tamamura H, Xu Y, Hattori T, Zhang X, Arakaki R, Kanbara K, et al. A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:877-82.
- [18] Fujii N, Tamamura H. Peptide-lead CXCR4 antagonists with high anti-HIV activity. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2:1198-202.
- [19] Tamamura H, Tsutsumi H, Masuno H, Mizokami S, Hiramatsu K, Wang Z, et al. Development of a linear type of low molecular weight CXCR4 antagonists based on T140 analogs. *Org Biomol Chem* 2006;4:2354-7.
- [20] Tamamura H, Fujisawa M, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, et al. Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett* 2004;569:99-104.
- [21] Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, et al. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett* 2003;550:79-83.
- [22] Zhang WB, Navenot JM, Haribabu B, Tamamura H, Hiramatsu K, Omagari A, et al. 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* 2002;277:24515-21.
- [23] Tamamura H, Omagari A, Oishi S, Kanamoto T, Yamamoto N, Peiper SC, et al. Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorg Med Chem Lett* 2000;10:2633-7.
- [24] BreLOT A, Heveker N, Montes M, Alizon M. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem* 2000;275:23736-44.
- [25] Zhou N, Luo Z, Luo J, Liu D, Hall JW, Pomerantz RJ, et al. Structural and functional characterization of human CXCR4 as a chemokine receptor and HIV-1 co-receptor by mutagenesis and molecular modeling studies. *J Biol Chem* 2001;276:42826-33.
- [26] Basmaciogullari S, Babcock GJ, Van Ryk D, Wojtowicz W, Sodroski J. Identification of conserved and variable structures in the human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein of importance for CXCR4 binding. *J Virol* 2002;76:10791-800.

- [27] Trent JO, Wang ZX, Murray JL, Shao W, Tamamura H, Fujii N, et al. Lipid bilayer simulations of CXCR4 with inverse agonists and weak partial agonists. *J Biol Chem* 2003;278:47136-44.
- [28] Dorman G, Prestwich GD. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* 1994;33:5661-73.
- [29] Boucard AA, Wilkes BC, Laporte SA, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Photolabeling identifies position 172 of the human AT(1) receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure. *Biochemistry* 2000;39:9662-70.
- [30] Laporte SA, Boucard AA, Servant G, Guillemette G, Leduc R, Escher E. Determination of peptide contact points in the human angiotensin II type I receptor (AT1) with photosensitive analogs of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 1999;13:578-86.
- [31] Holleran BJ, Beaulieu ME, Proulx CD, Lavigne P, Escher E, Leduc R. Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem J* 2007;402:51-61.
- [32] Coulie B, Matsuura B, Dong M, Hadac EM, Pinon DI, Feighner SD, et al. Identification of peptide ligand-binding domains within the human motilin receptor using photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 2001;276:35518-22.
- [33] Fraker PJ, Speck JC, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849-57.
- [34] Price MR, Baillie GL, Thomas A, Stevenson LA, Easson M, Goodwin R, et al. Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor. *Mol Pharmacol* 2005;68:1484-95.
- [35] Munch J, Standker L, Pohlmann S, Baribaud F, Papkalla A, Rosorius O, et al. Hemofiltrate CC chemokine 1[9-74] causes effective internalization of CCR5 and is a potent inhibitor of R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains in primary T cells and macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:982-90.
- [36] Collman R, Balliet JW, Gregory SA, Friedman H, Kolson DL, Nathanson N, et al. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1992;66:7517-21.
- [37] Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, et al. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 2008;455:497-502.
- [38] Tamamura H, Sugioka M, Odagaki Y, Omagari A, Kan Y, Oishi S, et al. 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* 2001;11:359-62.

- [39] Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14759-64.
- [40] Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol* 2009;75:1240-7.
- [41] Gupta SK, Pillarisetti K, Thomas RA, Aiyar N. Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1alpha: implications for development of selective CXCR4 antagonists. *Immunol Lett* 2001;78:29-34.
- [42] Lin G, Bertolotti-Ciarlet A, Haggarty B, Romano J, Nolan KM, Leslie GJ, et al. Replication-competent variants of human immunodeficiency virus type 2 lacking the V3 loop exhibit resistance to chemokine receptor antagonists. *J Virol* 2007;81:9956-66.
- [43] Fillion D, Deraet M, Holleran BJ, Escher E. Stereospecific synthesis of a carbene-generating angiotensin II analogue for comparative photoaffinity labeling: improved incorporation and absence of methionine selectivity. *J Med Chem* 2006;49:2200-9.

Article 2

Analysis by substituted cysteine scanning mutagenesis of the fourth transmembrane domain of the CXCR4 receptor in its inactive and active state.

Auteurs de l'article: Philip E. Boulais, Emanuel Escher and Richard Leduc

Statut de l'article: (2013). *Biochem. Pharmacol.* 85, 541-550

Avant-propos: J'ai performé toutes les expériences de cette publication en plus de la conception du projet et de l'écriture du manuscrit.

Résumé :

La chimiokine SDF-1 est le seul ligand connu du récepteur CXCR4. Par la méthode d'accessibilité des résidus cystéine substitués (SCAM), nous avons identifiés les résidus spécifiques du domaine TM4 du CXCR4 participant à la pochette de liaison. Nous avons substitué individuellement chaque résidu de la région Glu179^(4.68)-Lys154^(4.43) par des résidus cystéine et exprimés ces mutants dans les cellules COS-7. Nous avons ensuite soumis ces mutants à un traitement alkylant par le méthaneéthiosulfonate-éthylammonium (MTSEA) et suite à ce traitement nous avons mesuré par radioligand l'inhibition de la liaison du FC131, un composé anti-VIH. Le SCAM sur le récepteur de type sauvage nous a permis d'identifier les mutants Asp171^(4.60)Cys et Pro170^(4.59)Cys comme étant sensibles au traitement MTSEA confirmant leur implication dans la pochette de liaison. En transposant les mutants cystéine dans un récepteur constitutivement actif (Asn119^(3.35)Ser), les mutants Ser178^(4.67)Cys, Val177^(4.66)Cys et Ile173^(4.62)Cys ont démontré une sensibilité au MTSEA. Ces résultats proposent que les domaines TM4 et ECL2 subissent des changements conformationnels lors de l'activation du récepteur CXCR4.

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : _____
 Analysis by substituted cysteine scanning mutagenesis of the fourth transmembrane domain of the CXCR4 receptor in
 its inactive and active state

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Phillip Boulais

inscrit(e) au programme de Pharmacologie

de la Faculté de Médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature  Date : 18-04-2013

Nom Richard Leduc

Coordonnées 3001, 12e Avenue Nord
Sherbrooke, Qc, Ca
J1H 5N4

Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Signature  Date : 18-04-2013

Nom Emanuel Escher

Coordonnées 3001, 12^e Avenue Nord
Sherbrooke, Qc, Ca
J1H 5N4

Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

Analysis by substituted cysteine scanning mutagenesis of the fourth transmembrane domain of the CXCR4 receptor in its inactive and active state.

Philip E. Boulais, Emanuel Escher and Richard Leduc[#]

Department of Pharmacology, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H5N4

Running title: CXCR4 activation modulates TM4 accessibility.

[#]Corresponding author:

Richard Leduc, Ph.D.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Quebec

Canada, J1H 5N4

Tel.: (819) 564-5413;

Fax: (819) 564-5400;

E-mail: Richard.Leduc@USherbrooke.ca

ABSTRACT

The chemokine SDF-1 (CXCL12) selectively binds to CXCR4, a member of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. In this study, we used the substituted-cysteine accessibility method (SCAM) to identify specific residues of the fourth transmembrane domain (TM4) that contribute to the formation of the binding pocket of CXCR4 in its inactive and active state. We successively substituted each residue from E179^(4.68) to K154^(4.43) with cysteine and expressed the mutants in COS-7 cells. Mutant receptors were then alkylated with methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA), and binding inhibition was monitored using the CXCR4 antagonist FC131 [*cyclo*(-D-Tyr¹-Arg²-Arg³-Nal⁴-Gly⁵-)], which displays anti-HIV activity. MTSEA treatment resulted in a significant reduction of FC131 binding to D171C^(4.60) and P170C^(4.59). To assess TM4 accessibility in an active state of CXCR4, TM4 cysteine mutants were transposed within the constitutively active mutant N119S^(3.35). MTSEA treatment of TM4 mutants N119S-S178C^(4.67), N119S-V177C^(4.66) and N119S-I173C^(4.62) resulted in a significant reduction in FC131 binding. Protection assays using FC131 prior to MTSEA treatment significantly reduced the alkylation of all MTSEA-sensitive mutants. The accessibility of the D171C^(4.60) and P170C^(4.59) residues suggests that they are oriented towards a water-accessible area of the binding pocket of CXCR4. S178C^(4.67), V177C^(4.66) and I173C^(4.62) showed binding inhibition only in an N119S^(3.35) background. Taken together our results suggest that TM4 and ECL2 undergo conformational changes during CXCR4 activation and also demonstrate how TM4 is an important feature for the binding of anti-HIV compounds.

Keywords: CXCR4, G Protein-coupled receptor, Substituted-cysteine accessibility method, binding pocket, receptor activation.

1. INTRODUCTION

The CXCR4 receptor is a class A G protein-coupled receptor that binds the chemokine SDF-1, also known as CXCL12. The activation of this receptor triggers $G\alpha_i$ -mediated cAMP inhibition, calcium flux and beta-arrestin recruitment that mainly promotes chemotaxis and cell adhesion [1]. These signaling pathways lead to many physiological processes, such as stem cell mobilization [2] as well as leucocyte maturation and trafficking [3]. The expression of the CXCR4 receptor is broad compared with that of most chemokine receptors [4] and disruption of either the CXCR4 or SDF-1 gene leads to embryonic lethality [5-7]. CXCR4 also mediates HIV-1 infection [8] and is overexpressed in cancer cells, highlighting the importance of the SDF-1/CXCR4 axis in tumor progression and metastasis [9-11]. Autosomal dominant mutations of the CXCR4 gene that produces a truncated or mutated C-tail results in increased signaling, defective desensitization and down-regulation, which causes warts, hypogammaglobulinemia, infections and myelokathexis (WHIM) syndrome [12,13].

As with other GPCR, understanding the molecular mechanism underlying CXCR4 activation is of major importance in regard to drug development. It is known that following agonist binding, GPCR activation triggers conformational changes in the transmembrane region (TM), mostly within TM3, TM5 and TM6 [14]. These conformational changes would sustain GDP/GTP exchange within specific guanine nucleotide-binding proteins (G proteins), leading to the activation of intracellular signaling cascades. Until recently, our understanding of GPCR structure was based mostly on the first high-resolution X-ray crystal structure of bovine rhodopsin [15]. Recent breakthroughs have enabled the crystallization of many GPCR, including the CXCR4 receptor [16].

Our group has shown that TM4 of CXCR4 is part of the binding pocket of the anti-HIV compound T140 [17]. T140 analogs such as FC131 and AMD3100 are also known to interact with TM4 residues [18-20] and mutations of TM4 residues have been associated with reduced HIV-1 infection [21-23]. TM4 also participates in the formation of dimer interfaces in many GPCR, including the dopamine D2 receptor [24-26], 5-HT_{2C} receptor

[27], delta opioid receptor [28] and rhodopsin [29]. A peptide corresponding to TM4 was also shown to inhibit SDF-1 α activation of CXCR4, as well as the conformational changes in the CXCR4 homodimer following either SDF-1 α or T140 treatment [30]. This same TM4 peptide has also been shown to reduce migration of cancer cells [31].

The substituted cysteine accessibility method (SCAM) [32-34] has proven to be useful in the identification of residues that contribute to the binding pocket of a GPCR. Consecutive residues in a specific region are individually mutated to cysteine, and the mutant receptors are expressed in heterologous cells. Treatment of cysteine mutants with positively charged methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA), which reacts more rapidly with a sulfhydryl in a hydrophilic environment, would result in the alkylation of cysteines oriented towards the receptor's binding pocket rather than cysteines facing the interior of the protein or the lipid bilayer. Inhibition of ligand binding would confirm whether the cysteine is positioned in the binding pocket. To probe the accessibility of TM4 residues in an activated receptor, we used the N119S^(3.35) mutant of the CXCR4 receptor as a model of an activated state. N119^(3.35) is involved in a network of interactions locking the receptor into an inactive conformation, and mutating this residue to alanine or serine results in constitutive activity of CXCR4 [35]. In this study, we report the identification of residues within TM4 that form the binding pocket for FC131 in the wild-type and the constitutively active CXCR4 receptor.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Bovine serum albumin (BSA), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), polyethylenimine (PEI) solution 50% (v/w) in water, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and Forskolin were from Sigma (Oakville, ON, Canada). The sulfhydryl-specific alkylating reagents MTSEA ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) was from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). Transfection reagent PEI MW-25000 was from Polysciences (Warrington, PA, USA). Oligonucleotide primers were from IDT (Coralville, IA, USA). FC131 was synthesized in our laboratory on an automatic peptide synthesis instrument (Pioneer), using the $\text{N}\alpha$ -Fmoc protection strategy. ^{125}I -FC131 (specific activity 600 Ci/mmol) was prepared using IODO-GEN[®] (1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenyl-glycoluril; Pierce Chemical Co.) as described [36]. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 319-005-CL), foetal bovine serum (FBS), Hanks balanced salt solution (HBSS 311-516-CL) and penicillin/streptomycin were obtained from Wisent Bioproducts (St-Bruno, Quebec, Canada). Human SDF-1 α was from PeproTech (Rocky Hills, NJ, USA). Coelenterazine 400a was from Biosynth (Itasca, IL, USA). The BRET²-cAMP biosensor, GFP10-EPAC-Rluc2 [37] and $\text{G}\alpha_{11-91}$ -Rluc2 [38,39], $\text{G}\beta_2$, GFP¹⁰- $\text{G}\gamma_1$ were kindly provided by Dr. Michel Bouvier (Department of Biochemistry, University of Montreal, QC, Canada).

2.2 Numbering of Residues in TM4

Residues in TM4 of the human CXCR4 receptor were given two numbering schemes. First, residues were numbered according to their positions in the human CXCR4 receptor sequence. Second, residues were also indexed according to their position relative to the most conserved residue in each TM in which it is located [40]. By definition, the most conserved residue was assigned the position index "50" e.g. in TM4, Trp-161 is the most conserved residue and was designated W161^(4.50), whereas the upstream residue was designated V160^(4.49) and the downstream residue, I162^(4.51).

2.3 PCR mutagenesis

The cDNA clone of the human HA-tagged CXCR4 receptor was kindly provided by Dr. Michel Bouvier (Department of Biochemistry, University of Montreal, QC, Canada). CXCR4 mutants were generated using the QuikChange II XL mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) as recommended by the manufacturer.

2.4 Cell Culture

COS-7 cells were grown in DMEM containing 10 % (v/v) FBS, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C. Semi-confluent cells (70%) in 100-mm-diameter Petri dishes were transfected using 20 µL of PEI (1µg/mL) with 5 µg of DNA and used 24h post-transfection for binding and 48h post-transfection for SCAM assays.

2.5 Binding Experiments

HEK293 cells were washed once with PBS and subjected to one freeze–thaw cycle. Broken cells were then gently scraped in resuspension buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM CaCl₂ and 5 mM MgCl₂), centrifuged at 3500 g for 15 min at 4°C and resuspended in binding buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 0,5% BSA). Saturation binding experiments were performed by incubating broken cells (15 µg of protein) for 1 h at room temperature in binding buffer with increasing concentration of ¹²⁵I-FC131 in a final volume of 200 µL. Non-specific binding was determined in the presence of 1 µM of unlabeled FC131. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration through glass fiber filter plates (Millipore, Billerica, MA) pre-soaked for 1 h in PEI 0.2% at 4°C and washed 3 times with 200 µL of ice-cold washing buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 500 mM NaCl). Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ-radiation counting. Results are presented as means ± SD. Binding data (B_{max} and K_d) were analyzed with GraphPad Prism version 5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using a one-site binding hyperbola nonlinear regression analysis.

2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

COS-7 cells were seeded in 24-well plates precoated with 0.1 mg/mL poly-L-Lysine (sigma) at 30 000 cells/well. 48h post-transfection, cells were fixed in 3.7% (v/v) formaldehyde/Tris-buffered saline (TBS) (20mM Tris-HCl pH 7.5 and 150mM NaCl) for 5 minutes at room temperature. Cells were then washed twice with TBS and incubated 30 min with TBS containing 1% BSA at room temperature to block non-specific binding. A monoclonal anti-HA-peroxidase antibody (clone 3F10, Roche Applied Sciences) was then added at a dilution of 1:1000 in TBS-BSA 1% for 60 min. Following the incubation with the primary antibody, cells were washed twice with TBS and 250 μ L of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (T0440, Sigma-Aldrich) was added. The plates were incubated at room temperature and the reaction was stopped using 250 μ L of HCL 2N. 200 μ L of the colorimetric reaction was transferred to a 96-well plate and the absorbance was measured at 450 nm. Cells transfected with empty vector (pIRES-puro3) were used to determine background.

2.7 Treatment with MTSEA reagent

MTSEA treatment was performed according to the procedure of Javitch et al. [21], with minor modifications. Two days after transfection, cells, which were grown in 12-well plates, were washed with PBS and incubated for 3 min at room temperature with freshly prepared MTSEA at the desired concentrations (typically 0.5 mM to 4.0 mM) in a final volume of 200 μ L. The reaction was stopped by washing the cells with ice-cold PBS. Intact cells were then incubated in binding medium (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.5% BSA) containing 0.1 nM 125 I-FC131 for 90 min at room temperature. Non-specific binding was determined in the presence of 1 μ M of unlabeled FC131 on mock transfected cells. After washing with ice-cold PBS, cells were lysed with 0.1 N NaOH and the radioactivity was evaluated by γ -radiation counting. The percentage of fractional binding inhibition was calculated as $[1 - (\text{specific binding after MTSEA treatment} / \text{specific binding without treatment})] \times 100$.

2.8 Protection against MTSEA reagent

Transfected cells grown in 12-well plates were washed once with PBS and incubated in the presence or absence of 1 μ M of FC131 for 1 h at 16°C. Cells were washed to remove excess ligand and were treated with MTSEA. Cells were washed three times with ice-cold PBS and once with an acidic buffer (150 mM NaCl, 50 mM acetic acid, pH 3.0) to dissociate bound ligand. They were then incubated for 3 h at 4°C in binding medium (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.5% BSA) containing 0.1 nM 125 I-FC131. The percentage of protection was calculated as [(inhibition in the absence of FC131) – (inhibition in the presence of FC131)]/(inhibition in the absence of FC131) \times 100.

2.9 BRET² assays

To monitor cAMP level following G α_i activation, the BRET² – cAMP biosensor GFP10-EPAC-Rluc2 was used [37]. Semi-confluent cells (70%) in 100-mm-diameter Petri dishes were transfected using 20 μ L of PEI (1 μ g/mL) with 3 μ g of plasmid encoding CXCR4 and 150 ng of plasmid encoding EPAC biosensor. Total amount of DNA transfected was completed to 5 μ g with salmon sperm DNA. The following day, transfected cells were then seeded in a white 96-well plate at a density of 50 000 cells per well. The cells were then washed with PBS and kept in PBS with 0.1% (w/v) glucose and 500 μ M IBMX. Coelenterazine 400a was then added to a final concentration of 5 μ M. BRET² was measured after the addition CXCR4 ligands SDF-1 α (1 μ M) or FC131 (1 μ M) followed by the addition of 1 μ M forskolin to stimulate cAMP production and cells were incubated for 20 minutes at 37°C. BRET ratio measurements were then collected using a TECAN M1000 microplate reader. BRET² readings between Rluc2 and GFP10 were collected in the 400 to 450 nm window (Rluc2) and 500 to 550 nm window (GFP10). The BRET² signal was calculated as the ratio of light emitted by the acceptor GFP10 over the light emitted by the donor Rluc2. To determine basal BRET² ratio in both wild-type and constitutively active background, inverse agonist FC131 was used to reduce constitutive activity to none. Percent basal inhibition of BRET² signal was calculated as (BRET² ratio in the presence of 1 μ M forskolin – BRET² ratio in the presence of 1 μ M FC131 and 1 μ M forskolin) / (BRET²

ratio in the presence of control buffer – BRET² ratio in the presence of 1 μM FC131 and 1 μM forskolin). SDF-1α induced inhibition of cAMP production was calculated as (BRET² ratio in the presence of 1 μM forskolin and 1 μM SDF-1α – BRET² ratio in the presence of 1 μM FC131 and 1 μM forskolin) / (BRET² ratio in the presence of control buffer – BRET² ratio in the presence of 1 μM FC131 and 1 μM forskolin).

To monitor direct Gα_i activation, we used the biosensor Gα_{i1}-91-Rluc2, Gβ₂, GFP10-Gγ₁ [38,39]. COS-7 cells were seeded at 500 000 cells per well in 6-well plates in the transfection mix that contained 20 μL of PEI (1 μg/mL) with 500 ng of plasmid encoding CXCR4 and 100 ng of Gα_{i1}-91-Rluc2, 100 ng Gβ₂, 50 ng GFP10-Gγ₁. Total amount of DNA transfected was completed to 1.5 μg with salmon sperm DNA. The following day, transfected cells were seeded in a white 96-well plate at a density of 50 000 cells per well. The cells were then washed with HBSS and kept in HBSS. Coelenterazine 400a was then added to a final concentration of 5 μM. BRET² was measured after the addition CXCR4 ligands SDF-1α (1 μM) or FC131 (1 μM) or T140 (1 μM).

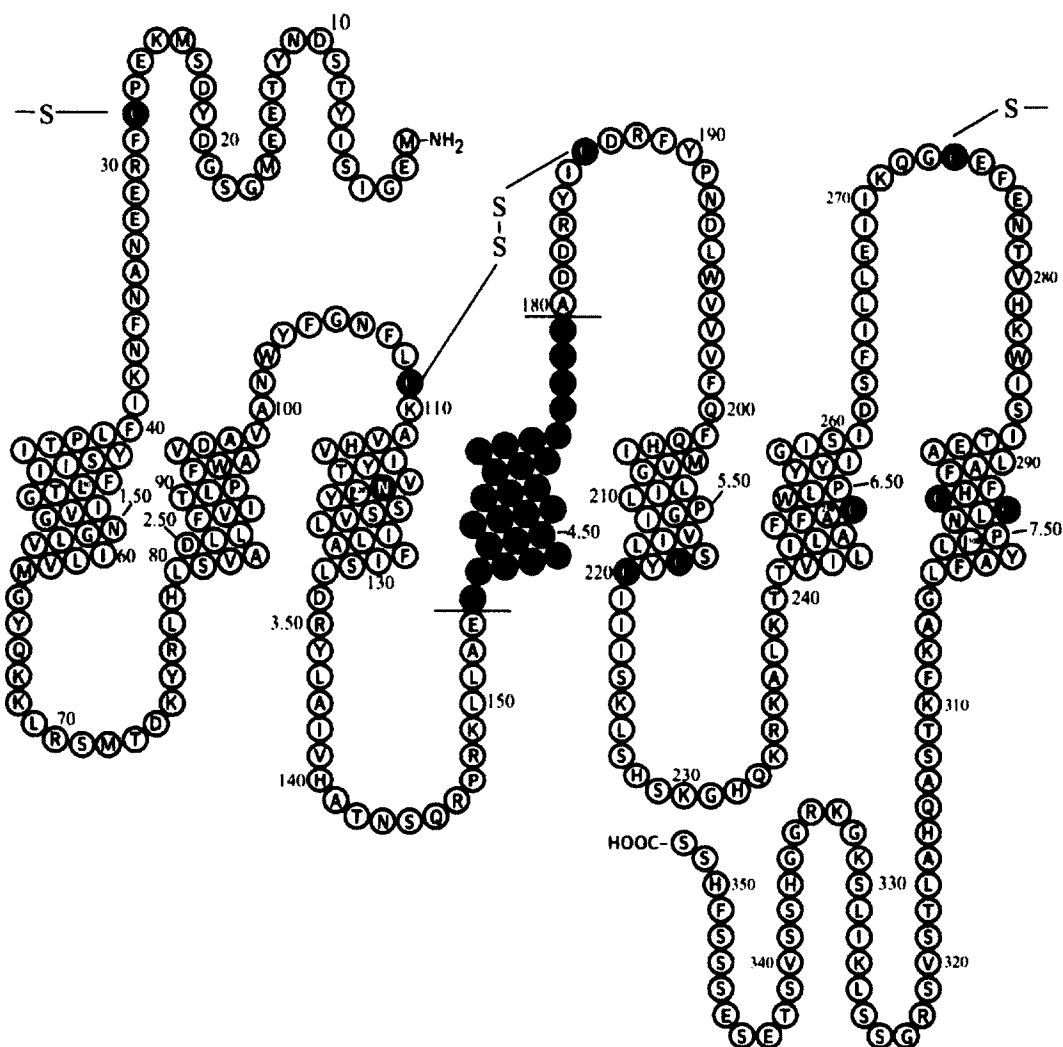


Fig. 1. Schematic representation of the human CXCR4 receptor. The black closed circles represent endogenous cysteines, and the grey closed circles represent mutated TM4 residues located between E179^(4.68) and K154^(4.43), inclusively. The N119^(3.35) residue is shown in light grey. Residues were numbered as described in Materials and Methods.

3. RESULTS

3.1 Binding properties of CXCR4 mutant receptors with cysteines in TM4 in a wild-type background

To evaluate the accessibility of CXCR4 TM4 residues in the binding pocket, we individually substituted each residue from E179^(4.68) to K154^(4.43) with a cysteine (Fig. 1) [17]. Each mutant was transiently transfected into COS-7 cells. To assess the conservation of the overall conformation of the mutants, we performed saturation binding assays using an increasing concentration of ¹²⁵I-FC131 and determined the pharmacological parameters (K_d and B_{max}) for each mutant. Most mutant receptors exhibited high affinity for ¹²⁵I-FC131, similar to that of the wild-type receptor (WT) (Table 1). No detectable binding was observed for the mutants N176C^(4.65) and A175C^(4.64); therefore, these mutants were not used for SCAM analysis. ELISA confirmed that N176C^(4.65) showed reduced cell surface expression in contrast to A175C^(4.64) (Fig. 2).

3.2 Effect of MTSEA treatment on the binding properties of CXCR4 TM4 cysteine mutants

To determine if TM4 residues are oriented towards the binding pocket, all of the mutants that bound ¹²⁵I-FC131 were exposed to MTSEA at different concentrations for 3 min. The WT receptor, which contains 9 endogenous cysteines (Fig. 1), was treated with 0.5 mM to 4.0 mM MTSEA. The WT receptor presented no significant reduction in binding following MTSEA treatment suggesting that endogenous cysteines do not contribute to the formation of the CXCR4 binding pocket (Fig. 3). We used the mutant receptor D171C^(4.60) as a positive control that showed a significant loss of binding following MTSEA treatment from 0.5 mM to 4.0 mM. Treatment of all TM4 cysteine mutants (Fig. 4A) with 0.5 mM MTSEA showed that mutants D171C^(4.60) and P170C^(4.59) exhibited full inhibition of ¹²⁵I-FC131 binding (102% and 91%, respectively). Treatment at 2.0 mM MTSEA did not increase the binding inhibition of any TM4 mutants, including D171C^(4.60) and P170C^(4.59) (Fig. 4B).

Table 1**Binding properties of FC131 to cysteine-substituted CXCR4 TM4 mutant receptors**

| Mutants | K_d (nM) | | | B_{max} (pmole/mg) | | | N |
|-------------------------------|---------------------------|---|------|-----------------------------------|---|-----|----------|
| WT | 17.0 | ± | 9.9 | 12.1 | ± | 6.5 | 7 |
| E179C^(4.68) | 19.6 | ± | 3.7 | 5.5 | ± | 3.3 | 3 |
| S178C^(4.67) | 21.1 | ± | 12.9 | 6.7 | ± | 2.1 | 3 |
| V177C^(4.66) | 19.6 | ± | 4.4 | 6.6 | ± | 1.0 | 3 |
| N176C^(4.65) | NDB | | | NDB | | | 3 |
| A175C^(4.64) | NDB | | | NDB | | | 3 |
| F174C^(4.63) | 8.6 | ± | 5.4 | 2.8 | ± | 1.3 | 3 |
| I173C^(4.62) | 23.7 | ± | 10.9 | 7.9 | ± | 2.6 | 3 |
| F172C^(4.61) | 22.1 | ± | 11.8 | 11.3 | ± | 4.5 | 3 |
| D171C^(4.60) | 39.6 | ± | 14.4 | 2.7 | ± | 1.9 | 3 |
| P170C^(4.59) | 23.6 | ± | 3.2 | 3.0 | ± | 1.2 | 3 |
| I169C^(4.58) | 8.7 | ± | 6.4 | 3.1 | ± | 1.0 | 3 |
| T168C^(4.57) | 11.2 | ± | 2.1 | 11.4 | ± | 4.6 | 3 |
| L167C^(4.56) | 15.7 | ± | 8.7 | 3.3 | ± | 1.8 | 3 |
| L166C^(4.55) | 21.7 | ± | 12.1 | 7.5 | ± | 2.7 | 3 |
| L165C^(4.54) | 29.7 | ± | 4.1 | 9.8 | ± | 4.7 | 3 |
| A164C^(4.53) | 31.8 | ± | 16.3 | 9.7 | ± | 5.5 | 3 |
| P163C^(4.52) | 45.1 | ± | 12.2 | 6.7 | ± | 3.5 | 3 |
| I162C^(4.51) | 13.6 | ± | 9.7 | 7.2 | ± | 4.0 | 3 |
| W161C^(4.50) | 13.2 | ± | 7.8 | 1.4 | ± | 0.3 | 3 |
| V160C^(4.49) | 35.5 | ± | 17.2 | 11.3 | ± | 1.2 | 3 |
| G159C^(4.48) | 19.5 | ± | 7.8 | 9.2 | ± | 5.6 | 3 |
| V158C^(4.47) | 14.0 | ± | 5.5 | 8.3 | ± | 6.3 | 3 |
| Y157C^(4.46) | 43.0 | ± | 15.4 | 11.7 | ± | 6.2 | 3 |
| V156C^(4.45) | 21.2 | ± | 8.3 | 6.2 | ± | 2.6 | 3 |
| V155C^(4.44) | 13.8 | ± | 6.9 | 9.3 | ± | 3.8 | 3 |
| K154C^(4.43) | 38.2 | ± | 22.4 | 11.4 | ± | 2.0 | 3 |

Cells transfected with the appropriate receptor were assayed as described in the Experimental Procedure. Binding affinities (K_d) and maximal binding capacities (B_{max}) are expressed as the means \pm SD of values obtained in n independent experiments performed in duplicate. Mutants N176C^(4.65) and A175C^(4.64) did not exhibit any detectable binding (NDB; no detectable binding).

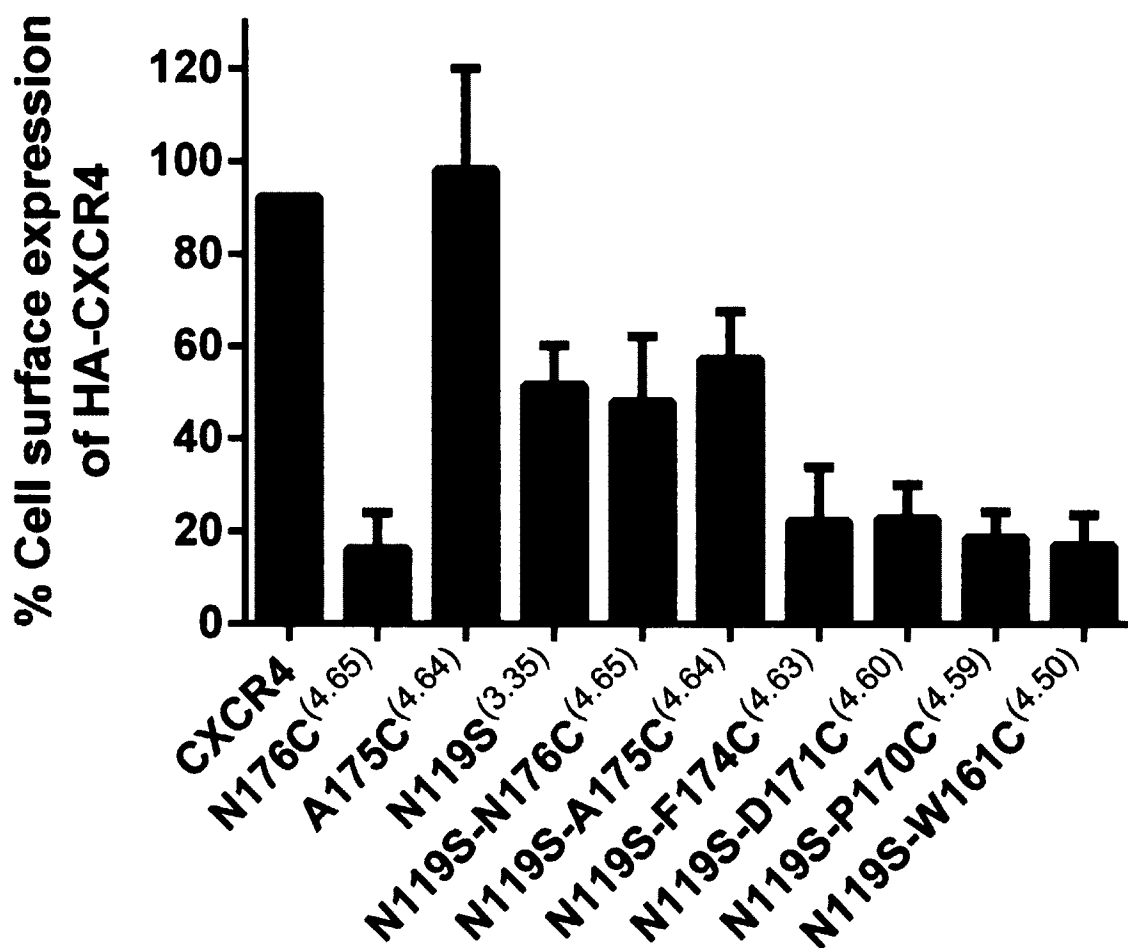


Fig. 2. Cell surface expression of CXCR4 mutants

Cell surface expression was measured by ELISA (as described under materials and methods) in COS-7 cells transiently expressing HA-CXCR4 mutants that were not detected in binding experiments. The results are shown as the percentage of cell surface receptor expression of the HA-CXCR4 (100%). Data represent the mean \pm SD of three independent experiments (N = 3).

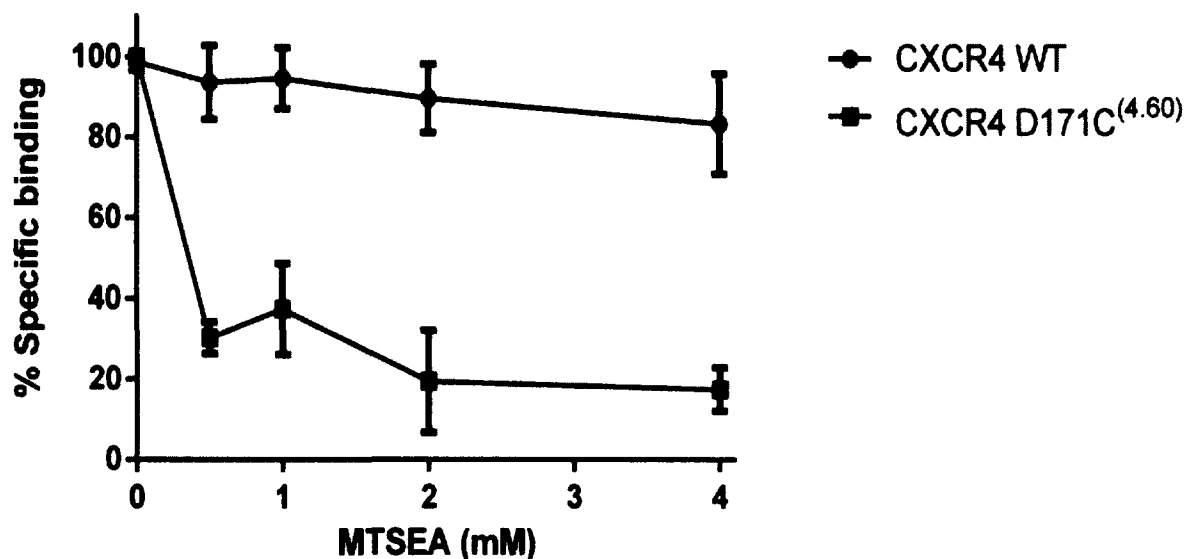
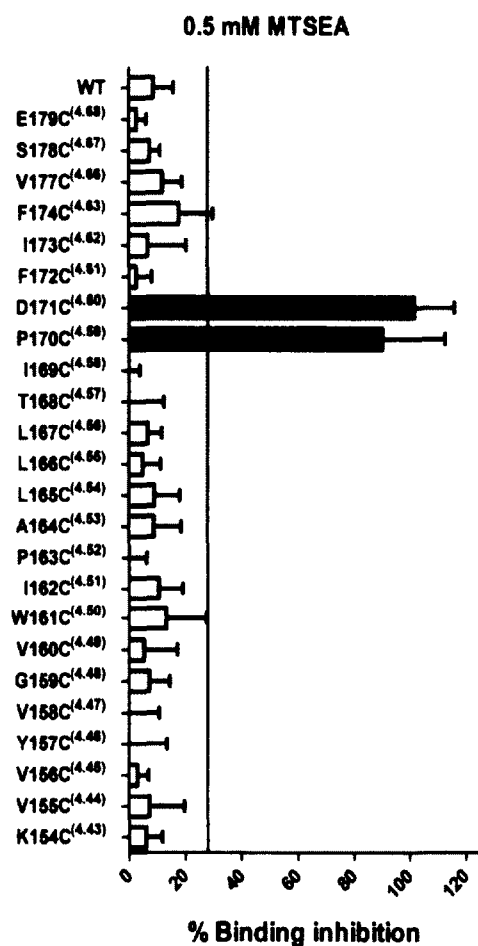


Fig. 3. Effects of MTSEA on the wild-type receptor and a sensitive reporter cysteine-bearing D171C^(4.60) mutant. Intact COS-7 cells transiently expressing the CXCR4 receptor and the D171C^(4.60) mutant receptor were incubated with MTSEA in a final volume of 0.2 ml at room temperature for 3 min. The reaction was stopped by dilution in ice-cold PBS. Intact cells were then incubated with 0.1 nM ¹²⁵I-FC131 for 90 min at room temperature. Bars represent the means \pm SD of the results from three independent experiments (N = 3).

3.3 Binding properties of CXCR4 mutant receptors with cysteines in TM4 in a N119S^(3.35) constitutively active background

To determine if the activation process of the CXCR4 receptor resulted in a change of TM4 accessibility, we used the constitutively active mutant (CAM) N119S^(3.35) as a template for reporter cysteines in TM4. Within the N119S^(3.35) background, most mutants retained a high affinity for ¹²⁵I-FC131, although mutants N176C^(4.65), A175C^(4.64), F174C^(4.63), D171C^(4.60), P170C^(4.59) and W161C^(4.50) (Table 2) did not show any detectable binding, and mutant I169C^(4.58) showed a reduction in binding affinity ($K_D > 6$ fold). Mutants that possessed no detectable binding were not used for SCAM analysis. ELISA confirmed that N119S-F174C^(4.63), N119S-D171C^(4.60), N119S-P170C^(4.59) and N119S-W161C^(4.50) showed impaired cell surface expression (Fig 2). N119S-N176C^(4.65) and N119S-A175C^(4.64) showed similar cell surface expression compared to the N119S^(3.35) mutant (Fig 2).

A



B

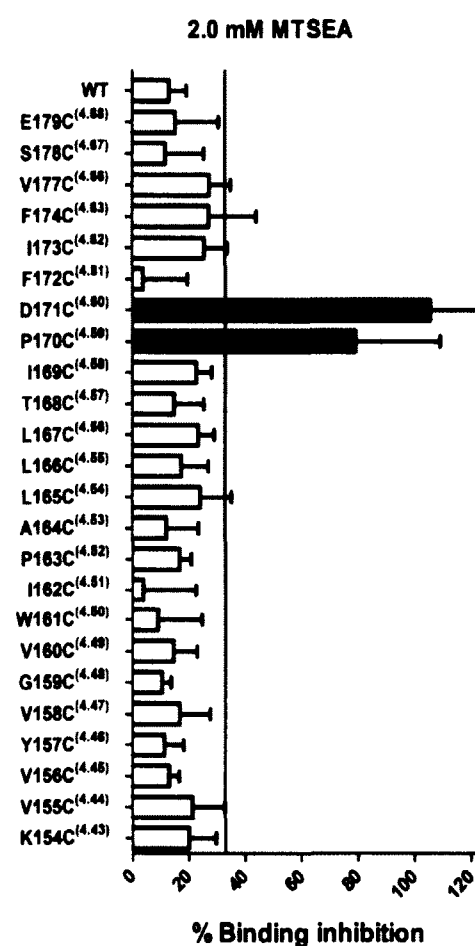


Fig. 4. Effects of MTSEA on mutant CXCR4 receptors bearing a reporter cysteine in TM4. Intact COS-7 cells transiently expressing wild-type or TM4 mutant CXCR4 receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 90 min at room temperature with 0.1 nM 125 I-FC131. The percentage of binding inhibition was calculated as indicated in Materials and Methods. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants and was set at a value corresponding to a binding inhibition 20% greater than that of the wild-type CXCR4 receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to the wild-type receptor after MTSEA treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. Each curve represents the mean \pm SD of data obtained from three independent experiments ($N = 3$).

Table 2

Binding properties of FC131 to cysteine-substituted CXCR4 TM4 mutant receptors bearing the N119S^(3.35) mutation

| Mutants | K_d (nM) | | | B_{max} (pmole/mg) | | | N |
|-------------------------------|---------------------------|---|------|-----------------------------------|---|-----|----------|
| N119S | 15.8 | ± | 8.2 | 2.7 | ± | 1.4 | 5 |
| E179C^(4.68) | 29.7 | ± | 4.3 | 5.0 | ± | 0.9 | 3 |
| S178C^(4.67) | 39.3 | ± | 12.1 | 7.1 | ± | 0.8 | 3 |
| V177C^(4.66) | 36.2 | ± | 18.6 | 2.4 | ± | 1.1 | 3 |
| N176C^(4.65) | NDB | | | NDB | | | 3 |
| A175C^(4.64) | NDB | | | NDB | | | 3 |
| F174C^(4.63) | NDB | | | NDB | | | 3 |
| I173C^(4.62) | 21.9 | ± | 7.7 | 2.7 | ± | 0.7 | 3 |
| F172C^(4.61) | 39.1 | ± | 9.6 | 3.4 | ± | 0.9 | 3 |
| D171C^(4.60) | NDB | | | NDB | | | 3 |
| P170C^(4.59) | NDB | | | NDB | | | 3 |
| I169C^(4.58) | 101.4 | ± | 18.0 | 3.2 | ± | 1.1 | 3 |
| T168C^(4.57) | 12.8 | ± | 7.0 | 3.0 | ± | 1.4 | 3 |
| L167C^(4.56) | 43.2 | ± | 28.1 | 3.2 | ± | 2.2 | 3 |
| L166C^(4.55) | 23.5 | ± | 14.3 | 2.7 | ± | 1.0 | 3 |
| L165C^(4.54) | 13.7 | ± | 8.2 | 4.3 | ± | 2.4 | 3 |
| A164C^(4.53) | 32.1 | ± | 17.7 | 2.5 | ± | 0.4 | 3 |
| P163C^(4.52) | 36.5 | ± | 21.9 | 7.9 | ± | 4.1 | 3 |
| I162C^(4.51) | 14.4 | ± | 2.2 | 4.6 | ± | 2.4 | 3 |
| W161C^(4.50) | NDB | | | NDB | | | 3 |
| V160C^(4.49) | 44.1 | ± | 15.8 | 3.9 | ± | 2.1 | 3 |
| G159C^(4.48) | 14.6 | ± | 6.2 | 6.2 | ± | 2.0 | 3 |
| V158C^(4.47) | 64.1 | ± | 21.8 | 5.3 | ± | 1.4 | 3 |
| Y157C^(4.46) | 5.6 | ± | 3.3 | 0.8 | ± | 0.6 | 3 |
| V156C^(4.45) | 27.5 | ± | 10.2 | 5.4 | ± | 1.8 | 3 |
| V155C^(4.44) | 30.3 | ± | 13.7 | 2.2 | ± | 0.3 | 3 |
| K154C^(4.43) | 47.3 | ± | 15.3 | 1.8 | ± | 0.1 | 3 |

Cells transfected with the appropriate receptor were assayed as described in the Experimental Procedure. Binding affinities (K_d) and maximal binding capacities (B_{max}) are expressed as the means \pm SD of values obtained in n independent experiments performed in duplicate. Mutants N176C^(4.65), A175C^(4.64), F174C^(4.63), D171C^(4.60), P170C^(4.59) and W161C^(4.50) did not exhibit any detectable binding (NDB ; no detectable binding).

3.4 Effect of MTSEA treatment on the binding properties of CXCR4 TM4 cysteine mutants bearing the N119S^(3,35) mutation

MTSEA treatment of the CAM receptor at either 0.5 mM or 2.0 mM MTSEA did not show any significant reduction in binding compared to the wild type receptor (Fig. 5), which indicates that this activated state of the receptor does not undergo any change in the binding pocket that would expose endogenous cysteines. Treatment of the TM4 cysteine mutants within the CAM template using 0.5 mM MTSEA showed no significant inhibition of ¹²⁵I-FC131 (Fig. 5A). Treatment with 2 mM MTSEA revealed that mutants N119S-S178C^(4.67), N119S-V177C^(4.66) and N119S-I173C^(4.62) showed binding inhibitions of 48%, 52% and 53%, respectively (Fig. 5B). Notably, in the wild-type template, S178C^(4.67), V177C^(4.66), I173C^(4.62) did not show any significant reduction of binding, even at 2.0 mM MTSEA (Fig. 4). Mutants D171C^(4.60) and P170C^(4.59), which were sensitive to MTSEA in the WT template, could not be assessed in the N119S^(3,35) background because no binding was observed.

3.5 Protection against MTSEA by pretreating with FC131

To confirm that reporter cysteines sensitive to MTSEA were located in the binding pocket of the CXCR4 receptor, mutants were incubated with 1 μM of unlabeled FC131 prior to MTSEA treatment. The cells were then washed with an acid buffer to dissociate the bound ligand, and the receptors were assayed for binding with the radiolabeled competitive ligand. To assess the protection of cysteine mutants in the WT background, 0.5 mM MTSEA was used because mutants D171C^(4.60) and P170C^(4.59) presented high binding inhibition at this concentration. Pre-incubation with FC131 protected mutant receptors D171C^(4.60) and P170C^(4.59) from the effect of MTSEA by 75% and 62%, respectively (Fig. 6A). To assess the protection of cysteine mutants in the CAM background, 2.0 mM MTSEA was used because mutants N119S-S178C^(4.67), N119S-V177C^(4.66) and N119S-I173C^(4.62) only displayed sensitivity at this concentration. FC131 protected mutants N119S-S178C^(4.67), N119S-V177C^(4.66) and N119S-I173C^(4.62) from MTSEA by 62%, 97% and 48% respectively (Fig. 6B).

A

B

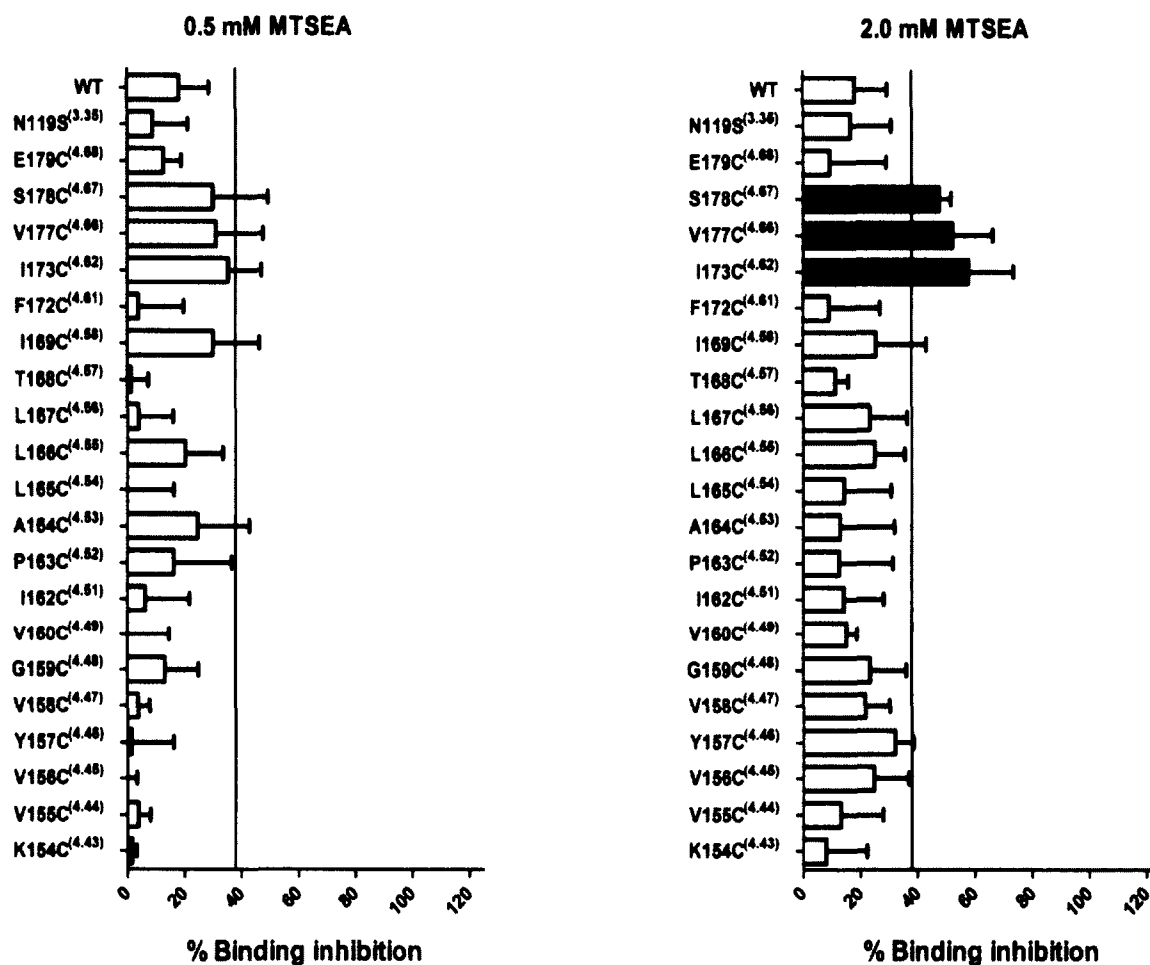


Fig. 5. Effects of MTSEA on N119S^(3,35) mutant receptors bearing a reporter cysteine in TM4. Intact COS-7 cells transiently expressing wild-type or TM4 mutant CXCR4 receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 90 min at room temperature with 0.1 nM ¹²⁵I-FC131. The percentage of binding inhibition was calculated as indicated in Materials and Methods. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants and was set at a value corresponding to a binding inhibition 20% greater than that of the wild-type CXCR4 receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to the wild-type receptor after MTSEA treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. Each curve represents the mean \pm SD of data obtained from three independent experiments (N = 3).

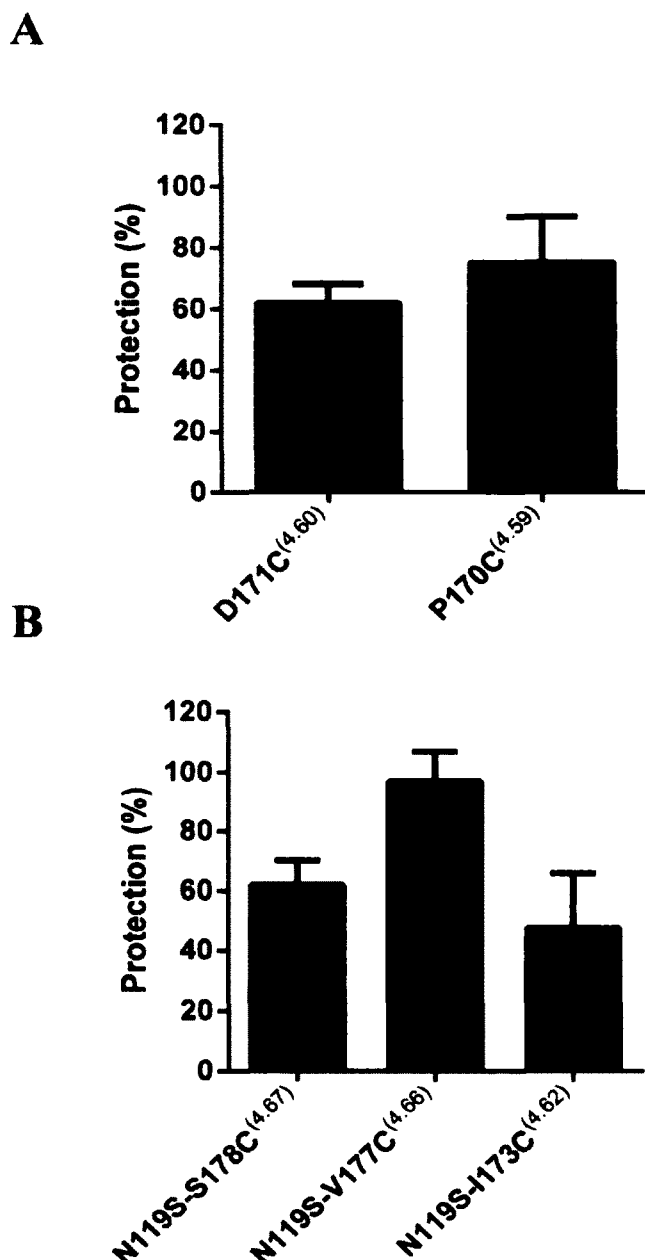


Fig. 6. FC131 protection of MTSEA-sensitive receptor mutants. Intact COS-7 cells transiently expressing the indicated MTSEA-sensitive mutant CXCR4 receptors in the wild-type background (A) and in the N119S^(3.35) background (B) were pre-incubated for 1 h at 16°C in the absence or presence of 1 μ M FC131. The cells were then washed with PBS to remove excess ligand and treated with the appropriate MTSEA concentration that was sufficient to achieve maximal inhibition of binding to each receptor. The concentrations of MTSEA were as follows: 0.5 mM for D171C^(4.60) and P170C^(4.59), and 2.0 mM for N119S-S178C^(4.67), N119S-V177C^(4.66) and N119S-I173C^(4.62). The cells were then washed with ice-cold PBS and incubated for 3 h at 4°C with 0.1 nM ¹²⁵I-FC131. The degree of protection was calculated as described in Materials and Methods. Bars represent the means \pm SD of results from three independent experiments (N = 3).

3.6 Functional properties of WT and CAM MTSEA-sensitive mutant receptors

To evaluate the signaling properties of WT and constitutively active cysteine mutant receptors, we used the EPAC BRET² biosensor to monitor cAMP level. Binding of cAMP to the EPAC biosensor induces a conformational change that results in a decrease of BRET² signal [37]. Forskolin (1 μ M) induced a decrease in the BRET² signal of EPAC (Fig. 7A,B,C). Using forskolin with either 1 μ M of SDF-1 α , FC131 or T140 did not alter the BRET² signal on mock-transfected cells (Fig. 7A). On CXCR4 transfected cells, 1 μ M SDF-1 α followed by forskolin elevated the BRET² signal (diminished cAMP levels) when compared to forskolin alone while FC131 and T140 had no effect on forskolin-induced cAMP monitored by EPAC (Fig. 7B). This confirms that SDF-1 α induces CXCR4 activation that promotes inhibition of forskolin-induced cAMP and that CXCR4 presents no basal activity since CXCR4 inverse agonist FC131 and T140 have no effect on forskolin-induced cAMP. Using N119S^(3.35) transfected cells, both FC131 and T140 treatment followed by forskolin resulted in a lower BRET² signal compared to forskolin alone while SDF-1 α treatment increased the BRET² signal (Fig. 7C). This confirms that FC131 and T140 reduced the constitutive activity of the N119S^(3.35) mutant supporting that these compounds are both inverse agonist as described in previous studies [41,42]. To support that FC131 and T140 are specific inverse agonist at G α_i -mediated inhibition of cAMP production, we used the G α_i biosensor that monitors the BRET² signal generated by the proximity of G α_{i1} -91-Rluc2 and GFP10-G γ_1 [38,39]. Mock transfected cells presented a basal BRET² signal that was not altered by the addition of 1 μ M of either SDF-1 α , FC131 or T140 (Fig. 7D). On CXCR4 transfected cells, basal BRET² signal was similar to mock transfected cells but the addition of SDF-1 α decreased the BRET² signal (Fig. 7E). This confirms that activation of CXCR4 results in a conformational change between the G α_{i1} et G γ_1 subunit. Using N119S^(3.35) transfected cells, we noticed a significant decrease in the basal BRET² signal in contrast to either mock or WT transfected cells as a result of constitutive activity (Fig. 7F). Addition of SDF-1 α decreased the BRET² signal while FC131 and T140 showed an increase that supports that they are both specific CXCR4 inverse agonists for the G α_i pathway.

To assess the signaling capacities of the MTSEA-sensitive mutants, cells were co-transfected with the corresponding mutant and the EPAC biosensor. We added 1 μM of SDF-1 α to evaluate $\text{G}\alpha_i$ activation or 1 μM of the inverse agonist FC131 to assess the basal activity of the mutant receptors followed by forskolin (1 μM)-induced cAMP production. Cells expressing the cysteine mutant receptors in the wild-type background showed no constitutive activity and displayed activity levels that were similar to that of the wild-type receptor (Fig. 7G). Mutant receptors in the N119S^(3.35) background showed constitutive activity (between 26% and 32% of BRET² signal inhibition) similar to that of the N119S^(3.35) receptor (37 % of BRET² signal inhibition), confirming that the cysteine mutations did not affect the constitutive activity of the receptor. SDF-1 α induced activation of the mutant receptors in both the wild-type and N119S^(3.35) background, with activity being between 37% and 62% of BRET² signal inhibition (Fig 7H). These results show that introducing cysteine residues into either the wild-type or the N119S^(3.35) background did not compromise the $\text{G}\alpha_i$ -dependent activity of the receptor.

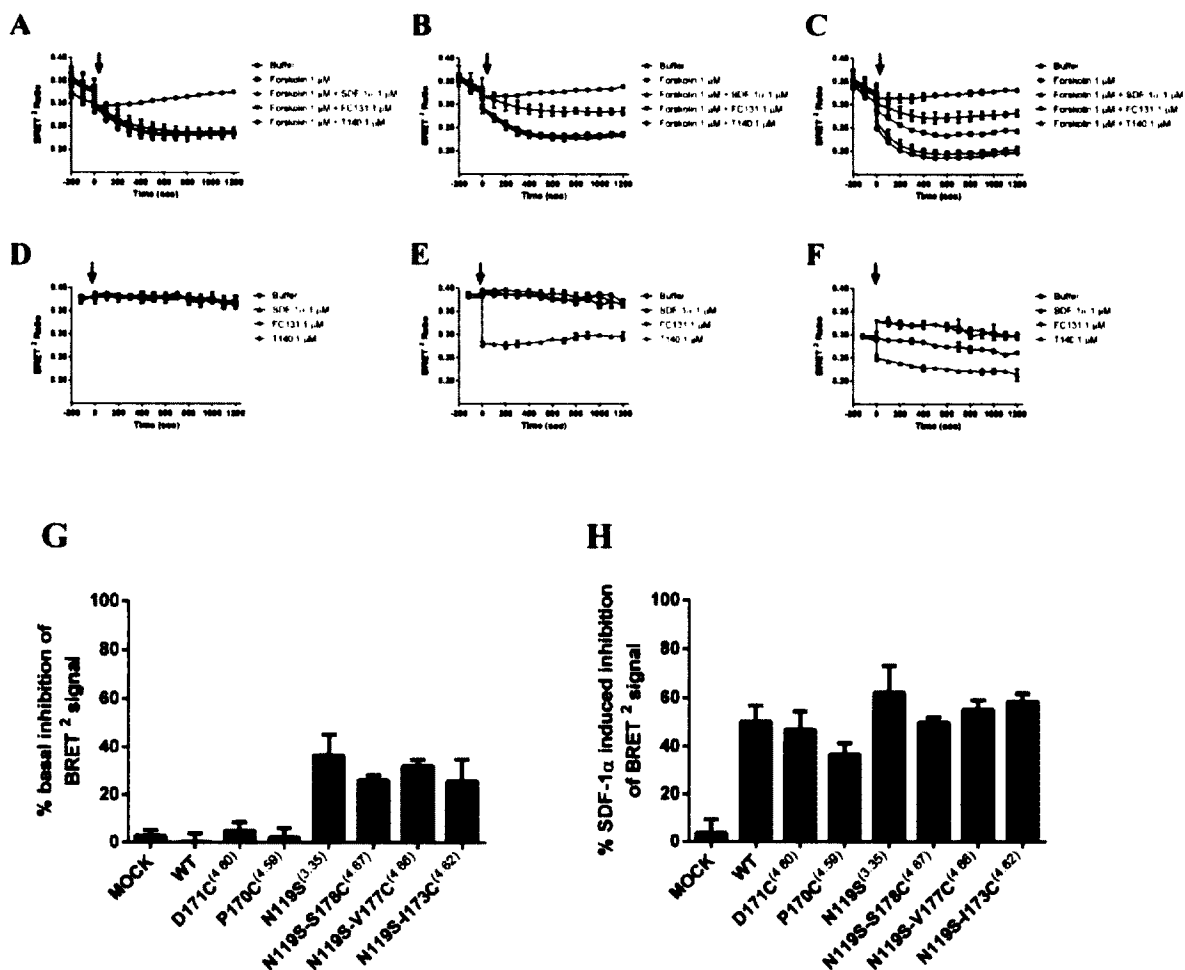


Fig. 7. Functional properties of the CXCR4 mutant receptors in intact COS-7 cells.

Cells expressing MTSEA-sensitive CXCR4 mutants were stimulated and their activity were assessed using either the EPAC biosensor (A,B,C,G,H) or the G_{α_i} biosensor (D,E,F). Realtime BRET² measurements of mock (A,D), WT CXCR4 (B,E) and N119S^(3,35) (C,F) transfected cells in the presence or absence of compounds as indicated. The black arrow indicates time where the compounds were added. Time-point BRET² of the MTSEA-sensitive CXCR4 mutants were measured using EPAC (G,H). The percentage of basal inhibition of BRET² signal was assessed as specified in Materials and Methods (G). cAMP was measured by BRET² variation in the presence of 1 μM SDF-1α and 1 μM forskolin for 10 minutes at 37°C (H). The data represent the means ± SD of results from three independent experiments (N = 3).

4. DISCUSSION

GPCR are major targets for drug discovery [43], and recent crystal structures have given us a wealth of information on ligand-receptor interactions in different conformational states [44]. Crystal structures are also useful in mutagenesis studies, some of which being designed to better understand the role of ligand-binding residues in receptors. The SCAM method is based on the reactivity of an engineered cysteine with MTSEA, a reagent that reacts 10^9 times faster with an ionized thiol compared to an un-ionized thiol [34] and covalently alkylates any cysteine located in a hydrophilic environment (i.e., a receptor's binding pocket). Close inspection of the crystal structure of the CXCR4 receptor reveals that TM4 may be considered not to be directly involved in ligand binding but that it may be part of the homodimer interface with TM5 and TM6 [16]. However, the TM4-ECL2 region has been well studied for its interaction with HIV-1 glycoproteins, including its role in promoting HIV-1 infection [21-23,45-48], as well as its role in binding anti-HIV compounds [17,41]. In a previous study, we labeled the TM4 region (E179^(4.68) to K154^(4.43)) with photoactive analogs of T140, thereby confirming the role of TM4 in the formation of the binding pocket of CXCR4 for this particular ligand [17]. To probe the role of each residue in this region of the receptor, we individually substituted each residue with a cysteine. We were then able to perform SCAM studies to determine the accessibility of these residues in the binding pocket. The constitutively active mutant N119S^(3.35) background was also used to assess the relative accessibility of TM4 residues in an activated receptor.

We initially determined the binding properties of each TM4 cysteine mutant in a wild-type background. Most mutants exhibited affinity comparable to that of the wild-type receptor, with the exceptions of N176C^(4.65) and A175C^(4.64). Residue N176^(4.65) is part of a consensus motif for N-glycosylation (N-X-S/T), although studies have demonstrated that only N11 is glycosylated in CXCR4 [49,50]. Mutations at position 176 are also known to alter binding of SDF-1 α but not alter CXCR4 expression [51,52]; however, mutant N176C^(4.65) clearly showed reduced cell surface expression (Fig. 2). Mutant A175C^(4.64) showed similar surface expression compared to the WT receptor, suggesting that replacing

an alanine with a cysteine would alter the binding of FC131 (Fig. 2). In the N119S^(3.35) background, N176C^(4.65), A175C^(4.64), F174C^(4.63), D171C^(4.60), P170C^(4.59) and W161C^(4.50) did not exhibit detectable binding. Indeed, most of these mutants showed reduced cell surface expression that was most likely due to improper receptor maturation and/or folding. Only N119S-N176C^(4.66) and N119S-A175C^(4.64) demonstrated similar surface expression levels compared to the N119S^(3.35) receptor (Fig. 2). Cell surface expression of the N119S-N176C^(4.65) mutant is rescued by the N119S^(3.35) mutation when compared to N176C^(4.66).

The CXCR4 receptor presents nine endogenous cysteines with four of them involved in disulfide bond formation (C109-C186 and C28-C274). To evaluate whether the remaining five cysteines are involved in the formation of the receptor's binding pocket, we treated the wild-type CXCR4 with MTSEA. No significant reduction of binding was observed following MTSEA treatment. An active conformation induced by the N119S^(3.35) mutation and the potential alkylation of endogenous cysteines also did not affect binding of ¹²⁵I-FC131. This finding suggests that these residues are not in the CXCR4 binding pocket or are not accessible for MTSEA alkylation in either the active or inactive state. For the TM4 cysteine mutants in the wild-type background, SCAM identified two MTSEA-sensitive mutants: D171C^(4.60) and P170C^(4.59). This result suggests that these residues are part of the CXCR4 binding pocket and alkylation of these residues blocks the binding of ¹²⁵I-FC131. Protection of these residues with FC131 potentially prevented them from alkylation by MTSEA, confirming their role as a part of the binding pocket in the inactive conformation of CXCR4. D171^(4.60) has already been involved 1) in binding HIV-1 glycoproteins that mediate infection and 2) in binding anti-HIV agents [23,48,53,54]. When looking at the crystal structure of the liganded CXCR4 with CVX15 [16] (a CXCR4 ligand that, like FC131 and T140, is derived from the horseshoe crab polyphemusin peptide), both residues are located at the top of TM4 and are pointing towards the binding pocket. Indeed, Arg² of CVX15 interacts with D171^(4.60), R187^(4.77), T117^(3.33) and possibly H113^(3.29) in the crystal structure. Molecular modeling also suggests that D171^(4.60) interacts with FC131 and derivatives [55,56].

MTSEA treatment of the TM4 cysteine mutants in the N119S^(3.35) background revealed that N119S-S178C^(4.67), N119S-V177C^(4.66) and N119S-I173C^(4.62) lost their ability to bind ¹²⁵I-FC131. Cysteine residues of mutants N119S-S178C^(4.67) and N119S-V177C^(4.66) are both located in extracellular loop 2 (ECL2) and are exposed to a favorable hydrophilic environment for MTSEA alkylation. Extracellular residues are found in a more flexible region compared to transmembrane residues. Therefore, we cannot exclude the possibility that MTSEA alkylation may alter the conformational state of ECL2, which is where binding inhibition would occur. The cysteine of N119S-I173C^(4.62) is located at the top of TM4 and does not appear to be oriented towards the binding pocket in the CXCR4 crystal structure (Fig. 8). This result suggests that the top of TM4 in the constitutively active receptor would undergo a counter-clockwise rotation from its inactive state, which would expose this residue to the binding pocket. Although further changes in the accessibility of nearby residues could have been observed, the resulting cysteine-replacement mutants did not show any detectable binding (Table 2) or displayed significantly reduced cell surface expression (Fig. 2). Still, it is interesting to note that all of the MTSEA-sensitive mutants in the constitutively active background were protected using FC131. This observation means either that these residues participate in the formation of the binding pocket or that FC131 binding to N119S^(3.35) receptor was able to stabilize a conformation in which extracellular residues N119S-S178C^(4.67) and N119S-V177C^(4.66) were no longer accessible for alkylation. This result is not surprising because FC131 acts as a CXCR4 inverse agonist and will stabilize the N119S^(3.35) receptor in the inactive state, in which the cysteines of S178C^(4.67), V177C^(4.66) and I173C^(4.62) would not be accessible (Fig. 4).

Recent crystal structures of GPCR in the active state did not reveal significant movement of TM4 in comparison to the inactive state. However, it is noteworthy that the active structure of the β 1-adrenergic receptor did show a loss of van der Waals interaction between S215^{5.56} and V172^{4.56}, resulting in a minimal interface between TM5 and TM4 [57]. The authors concluded that this loss of interaction might contribute to the activation process. Because TM4 does not seem to undergo a significant conformational movement as other TM, stabilization of TM5 by TM4, or vice-versa, might represent an important feature in

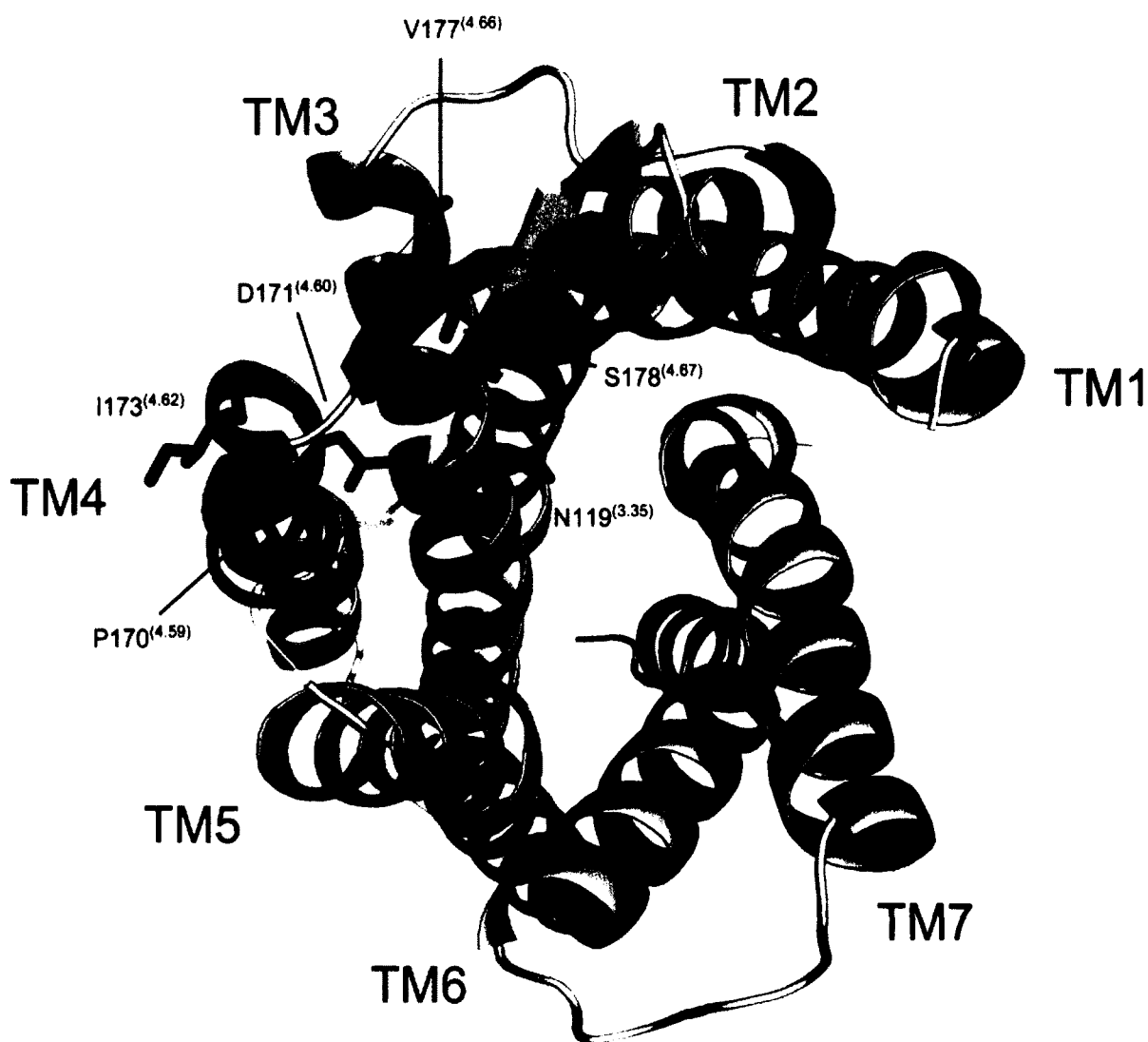


Fig. 8. Molecular model of the CXCR4 receptor with a TM4 pattern of reactivity to MTSEA. The positions in TM4 of alkylated cysteine residues affecting ligand binding in the ground state of CXCR4 are shown in red. The positions in TM4 of alkylated cysteine residues affecting ligand binding in the CAM are shown in blue. Residue N119^(3.35), which has been mutated to serine to create a constitutively active mutant, is represented in orange. The ECL2 region, from I185^(4.74) to N192^(4.81), is shaded for clarity. This model is based on the crystal structure of CXCR4 bound with the CVX15 peptide (PDB: 3OE0) [16].

maintaining the receptor in an inactive state. Activation would then release TM4 from a conformational constraint imposed by TM5, thereby enabling significant transmembrane movement upon activation. Moreover, it was also demonstrated that a peptide corresponding to TM4 inhibited the activation of the CXCR4 receptor [58], which again demonstrates that TM4 might be involved in a network of interactions stabilizing the receptor in the inactive state. With regards to ECL2, it has been shown that conformational changes in the transmembrane regions could be coupled to ECL2 movement in rhodopsin activation [59], and has also been demonstrated in the crystal structure of constitutively active metarhodopsin-II coupled to C-terminal fragment of $G\alpha_i$ [60].

In conclusion, we have assessed the accessibility of TM4 residues in the CXCR4 binding pocket. Comparing the inactive ground state with a constitutively active mutant of CXCR4 revealed differences in the accessibility of TM4 residues suggesting that those residues located at the top of the transmembrane, as well as in ECL2, would become more sensitive to MTSEA alkylation. Conformational changes of TM4 may represent a key feature in the activation process of the CXCR4 receptor as well as other GPCR.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Michel Bouvier (Department of Biochemistry, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) for the HA-CXCR4 plasmid, the EPAC and $G\alpha_i$ biosensor. Marie-Reine Lefebvre (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada) for the synthesis of FC131. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and is part of the Ph.D. thesis of P.E.B. P.E.B. holds a CIHR fellowship.

REFERENCES

- [1] Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim.Biophys.Acta* 2007;1768:952-63.
- [2] Schroeder MA, DiPersio JF. Mobilization of hematopoietic stem and leukemia cells. *J.Leukoc.Biol.* 2012;91:47-57.
- [3] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-8.
- [4] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol.Rev.* 2000;52:145-76.
- [5] Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998;393:595-9.
- [6] Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591-4.
- [7] Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635-8.
- [8] Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-7.
- [9] Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-6.
- [10] Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat.Rev.Immunol.* 2011;11:597-606.
- [11] Zlotnik A. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J.Pathol.* 2008;215:211-3.
- [12] Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat.Genet.* 2003;34:70-4.
- [13] Liu Q, Chen H, Ojode T, Gao X, Anaya-O'Brien S, Turner NA, et al. WHIM syndrome caused by a single amino acid substitution in the carboxy-tail of chemokine receptor CXCR4. *Blood* 2012.

- [14] Deupi X, Standfuss J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 2011;21:541-51.
- [15] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000;289:739-45.
- [16] Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 2010;330:1066-71.
- [17] Boulais PE, Dulude D, Cabana J, Heveker N, Escher E, Lavigne P, et al. Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site. *Biochem.Pharmacol.* 2009;78:1382-90.
- [18] Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J.Biol.Chem.* 2001;276:14153-60.
- [19] Rosenkilde MM, Gerlach LO, Jakobsen JS, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J.Biol.Chem.* 2004;279:3033-41.
- [20] Gerlach LO, Jakobsen JS, Jensen KP, Rosenkilde MR, Skerlj RT, Ryde U, et al. Metal ion enhanced binding of AMD3100 to Asp262 in the CXCR4 receptor. *Biochemistry* 2003;42:710-7.
- [21] Reeves JD, Heveker N, BreLOT A, Alizon M, Clapham PR, Picard L. The second extracellular loop of CXCR4 is involved in CD4-independent entry of human immunodeficiency virus type 2. *J.Gen.Virol.* 1998;79 (Pt 7):1793-9.
- [22] BreLOT A, Heveker N, Adema K, Hosie MJ, Willett B, Alizon M. Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses. *J.Virol.* 1999;73:2576-86.
- [23] Labrosse B, BreLOT A, Heveker N, Sol N, Schols D, De Clercq E, et al. Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J.Virol.* 1998;72:6381-8.
- [24] Guo W, Shi L, Javitch JA. The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *J.Biol.Chem.* 2003;278:4385-8.
- [25] Guo W, Shi L, Filizola M, Weinstein H, Javitch JA. Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2005;102:17495-500.

- [26] Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, Filizola M, et al. Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* 2008;27:2293-304.
- [27] Mancia F, Assur Z, Herman AG, Siegel R, Hendrickson WA. Ligand sensitivity in dimeric associations of the serotonin 5HT_{2c} receptor. *EMBO Rep.* 2008;9:363-9.
- [28] Johnston JM, Aburi M, Provasi D, Bortolato A, Urizar E, Lambert NA, et al. Making structural sense of dimerization interfaces of delta opioid receptor homodimers. *Biochemistry* 2011;50:1682-90.
- [29] Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett.* 2004;564:281-8.
- [30] Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, et al. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J.Biol.Chem.* 2005;280:9895-903.
- [31] Wang J, He L, Combs CA, Roderiquez G, Norcross MA. Dimerization of CXCR4 in living malignant cells: control of cell migration by a synthetic peptide that reduces homologous CXCR4 interactions. *Mol.Cancer.Ther.* 2006;5:2474-83.
- [32] Akabas MH, Stauffer DA, Xu M, Karlin A. Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 1992;258:307-10.
- [33] Javitch JA, Fu D, Chen J, Karlin A. Mapping the binding-site crevice of the dopamine D2 receptor by the substituted-cysteine accessibility method. *Neuron* 1995;14:825-31.
- [34] Javitch JA, Shi L, Liapakis G. Use of the substituted cysteine accessibility method to study the structure and function of G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol.* 2002;343:137-56.
- [35] Zhang WB, Navenot JM, Haribabu B, Tamamura H, Hiramatu K, Omagari A, et al. 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.* 2002;277:24515-21.
- [36] Fraker PJ, Speck JC, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1978;80:849-57.
- [37] Leduc M, Breton B, Gales C, Le Gouill C, Bouvier M, Chemtob S, et al. Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2009;331:297-307.

- [38] Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE, et al. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat.Methods* 2005;2:177-84.
- [39] Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2006;13:778-86.
- [40] Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure–function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci* 1995;25:366-428.
- [41] Trent JO, Wang ZX, Murray JL, Shao W, Tamamura H, Fujii N, et al. Lipid bilayer simulations of CXCR4 with inverse agonists and weak partial agonists. *J.Biol.Chem.* 2003;278:47136-44.
- [42] Evans BJ, Wang Z, Broach JR, Oishi S, Fujii N, Peiper SC. Expression of CXCR4, a G-protein-coupled receptor for CXCL12 in yeast identification of new-generation inverse agonists. *Methods Enzymol.* 2009;460:399-412.
- [43] Ma P, Zimmel R. Value of novelty? *Nat.Rev.Drug Discov.* 2002;1:571-2.
- [44] Salon JA, Lodowski DT, Palczewski K. The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. *Pharmacol.Rev.* 2011;63:901-37.
- [45] Lu Z, Berson JF, Chen Y, Turner JD, Zhang T, Sharron M, et al. Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:6426-31.
- [46] Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, et al. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J.Virol.* 1999;73:2752-61.
- [47] Chabot DJ, Zhang PF, Quinnan GV, Broder CC. Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates. *J.Virol.* 1999;73:6598-609.
- [48] BreLOT A, Heveker N, Montes M, Alizon M. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J.Biol.Chem.* 2000;275:23736-44.
- [49] Chabot DJ, Chen H, Dimitrov DS, Broder CC. N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J.Virol.* 2000;74:4404-13.

- [50] Wang J, Babcock GJ, Choe H, Farzan M, Sodroski J, Gabuzda D. N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology* 2004;324:140-50.
- [51] Zhou H, Tai HH. Characterization of recombinant human CXCR4 in insect cells: role of extracellular domains and N-glycosylation in ligand binding. *Arch.Biochem.Biophys.* 1999;369:267-76.
- [52] Thordesen I, Polzer S, Schreiber M. Infection of cells expressing CXCR4 mutants lacking N-glycosylation at the N-terminal extracellular domain is enhanced for R5X4-dualtropic human immunodeficiency virus type-1. *BMC Infect.Dis.* 2002;2:31.
- [53] Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J.Biol.Chem.* 2001;276:14153-60.
- [54] Hatse S, Princen K, Gerlach LO, Bridger G, Henson G, De Clercq E, et al. Mutation of Asp(171) and Asp(262) of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. *Mol.Pharmacol.* 2001;60:164-73.
- [55] Yoshikawa Y, Kobayashi K, Oishi S, Fujii N, Furuya T. Molecular modeling study of cyclic pentapeptide CXCR4 antagonists: new insight into CXCR4-FC131 interactions. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 2012;22:2146-50.
- [56] Kobayashi K, Oishi S, Hayashi R, Tomita K, Kubo T, Tanahara N, et al. Structure-activity relationship study of a CXC chemokine receptor type 4 antagonist, FC131, using a series of alkene dipeptide isosteres. *J.Med.Chem.* 2012;55:2746-57.
- [57] Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehme R, Edwards PC, Leslie AG, et al. The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature* 2011;469:241-4.
- [58] Tarasova NI, Rice WG, Michejda CJ. Inhibition of G-protein-coupled receptor function by disruption of transmembrane domain interactions. *J.Biol.Chem.* 1999;274:34911-5.
- [59] Ahuja S, Hornak V, Yan EC, Syrett N, Goncalves JA, Hirshfeld A, et al. Helix movement is coupled to displacement of the second extracellular loop in rhodopsin activation. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2009;16:168-75.
- [60] Deupi X, Edwards P, Singhal A, Nickle B, Oprian D, Schertler G, et al. Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2012;109:119-24.

DISCUSSION

Le récepteur CXCR4 constitue un joueur important dans plusieurs processus physiologiques comme le développement et le maintien du système immunitaire et en fait une cible de choix dans plusieurs pathologies comme le cancer et le VIH-1. Afin de le cibler spécifiquement, il faut d'abord élucider le ou les mode(s) de liaison des ligands du récepteur CXCR4 en identifiant les déterminants moléculaires constituant la poche de liaison. Comme il le fut décrit à la section 1.3, un GPCR peut adopter un énorme éventail de conformations différentes. Les conformations les plus couramment étudiées sont celles qui représentent l'état inactif et l'état actif bien qu'il existe probablement plusieurs conformations pour chacun de ces états. Ces conformations nous permettent néanmoins de comprendre les mécanismes structuraux qui maintiennent ces différents états ou qui permettent la transition d'un état à l'autre.

Au début de mes travaux de thèse, la structure moléculaire du récepteur CXCR4 obtenue par des études cristallographiques n'existait pas. Le seul GPCR ayant sa structure moléculaire résolue était la rhodopsine, un GPCR de classe A dont le ligand était lié de manière covalente avec son récepteur (Palczewski et al., 2000). Il y avait alors beaucoup d'interrogations par rapport aux modes de liaison de GPCR ayant des ligands diffusibles, puisque ces derniers constituent plus de 30% des cibles thérapeutiques ciblées par l'industrie (Overington et al., 2006). Les récepteurs monoaminergiques comme le β 2-adrénergique constituent probablement les récepteurs les plus étudiés après la rhodopsine, mais beaucoup de questions demeurent quant aux récepteurs peptidergiques et leurs modes de liaison. De plus, il est important de noter que la rhodopsine cristallisée avec son agoniste inverse, le 11-*cis*-rétinal, ne représentait que l'état inactif de ce récepteur. La capacité de caractériser les changements conformationnels suite à l'activation nous permettrait d'élargir nos connaissances sur ces différents états et de comprendre les processus fondamentaux qui régulent l'activité des GPCR.

4.1 Identification des domaines participants à la formation de la pochette de liaison du récepteur CXCR4

Afin de permettre de mieux cibler le récepteur CXCR4 par la synthèse de composés spécifiques, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation de la pochette de liaison orthostérique du récepteur CXCR4. Plusieurs études de mutagenèse ont d'abord permis d'identifier plusieurs résidus importants pour la liaison et l'activité tel que les résidus Asp97^(2.63), Asp171^(4.60), Asp262^(6.58) et Glu288^(7.39) ainsi que les résidus extracellulaires Asp187^(ECL2) et Arg188^(ECL2) (Brelot et al., 1999; Brelot et al., 2000; Gerlach et al., 2001; Hatse et al., 2001; Hatse et al., 2003; Labrosse et al., 1998; Rosenkilde et al., 2004; Trent et al., 2003). Ces résultats ont permis de générer quelques modèles moléculaires du récepteur CXCR4 mais aucun de ces modèles ne s'appuie sur des preuves expérimentales directes entre le ligand et le récepteur (Gerlach et al., 2001; Rosenkilde et al., 2004; Trent et al., 2003). L'utilisation de mutations pourrait potentiellement altérer la structure du récepteur et empêcher le ligand de lier sans toutefois muter des résidus qui interagissent directement avec ce dernier. Pour remédier à ces possibles biais, nous avons procédé à des études de marquage par photoaffinité qui permettent de créer un complexe covalent entre un ligand peptidique et le récepteur de type sauvage afin de cartographier la pochette de liaison (Boucard et al., 2000; Boucard et al., 2003; Fillion et al., 2006; Holleran et al., 2007; Laporte et al., 1999).

4.1.1 Synthèse et caractérisation des photoanalogues du T140

Afin de procéder à des études de marquage par photoaffinité nous avons choisi le T140 comme ligand peptidique pour CXCR4 afin de synthétiser des photoanalogues qui contiendront un groupement photoactivable. Des études de structure-activité avaient permis de démontrer que les résidus Arg², Nal³, Tyr⁵ et Arg¹⁴ lorsque mutés en résidu alanine causaient une diminution significative de la capacité du T140 à inhiber l'infection au VIH-1 (Tamamura et al., 2000). Comme la séquence de 14 acides aminés du T140 contient deux résidus tyrosine, nous avons substitué individuellement chacun de ces résidus par un acide aminé artificiel le *p*-benzoyl-*L*-phenylalanine (Bpa) pour générer les photoanalogues

[Bpa⁵]T140 et [Bpa¹⁰]T140 (Figure 1A, article 1). Nous pourrions ainsi radiomarquer les photoanalogues à l'iode 125 sur le résidu tyrosine restant. Le Bpa est très stable chimiquement et peut être photoactivé à une longueur d'onde non dommageable pour les protéines soit à 350 nm (Dorman and Prestwich, 1994; Kauer et al., 1986).

Les photoanalogues furent alors caractérisés pour leur affinité pour le récepteur CXCR4 par des études de radioliation employant le ¹²⁵I-SDF-1α comme traceur (Figure 2A, table 1, article 1). Lorsque l'on analyse le déplacement du traceur ¹²⁵I-SDF-1α par le SDF-1α sur des cellules HEK293 transfectées de manière stable avec le récepteur CXCR4, nous observons une courbe avec deux points d'inflexion telle que décrit dans la littérature (Gupta et al., 2001). On remarque aussi la présence d'un site de basse affinité autant chez les cellules transfectées de manière stable que les cellules non transfectées. Ce site pourrait être dû au fait que le SDF-1α est reconnu pour lier plusieurs glycosaminoglycans comme l'héparine sulfatée (Amara et al., 1999) ou à une présence endogène du récepteur CXCR4 (Sierro et al., 2007). L'affinité du [Bpa⁵]T140 et [Bpa¹⁰]T140 est comparable à celui du T140 pour le site du ¹²⁵I-SDF-1α (Figure 2B, table 1, article 1). La substitution de Tyr⁵ ou de Tyr¹⁰ par un Bpa n'affecte donc aucunement l'affinité de ces ligands. Afin de déterminer si l'utilisation de ces photoanalogues nous permettrait de cartographier la pochette de liaison orthostérique soit celle occupée par le ligand endogène SDF-1α, nous avons procédé à des études de dissociation du ¹²⁵I-SDF-1α en présence ou non du T140. Lorsqu'un ligand se lie dans la pochette orthostérique, nous assumons qu'il se lie dans une région similaire au ligand endogène. Par le même fait, nous pouvons assumer que la présence de ce ligand n'affectera pas la vitesse de dissociation du ligand endogène qui compétitionnerait pour le même site contrairement à un ligand allostérique qui stabiliserait une conformation intermédiaire capable d'altérer la dissociation du ligand endogène (Christopoulos and Kenakin, 2002). La présence du T140 n'influe en rien la vitesse de dissociation du radiotraceur induit par SDF-1α. Ce résultat suggère donc que les deux ligands stabilisent le récepteur CXCR4 dans une conformation similaire qui n'affecte pas la vitesse de dissociation (Figure 2C, table 1, article 1). Ces expériences nous ont permis de conclure que le T140 lie de manière orthostérique le récepteur CXCR4 et que les résidus environnants seraient probablement impliqués aussi dans la pochette de liaison du SDF-1α.

Le T140 est reconnu comme un composé présentant l'une des plus fortes inhibitions de l'infection au VIH-1 (Tamamura et al., 1998). Nous avons donc utilisé cette caractéristique pour vérifier l'activité biologique des photoanalogues. Alors que le T140 présente une inhibition de 50% de l'infection virale à 54 nM telle que décrit dans la littérature (Lin et al., 2007; Tamamura et al., 2006) les photoanalogues démontrent des IC_{50} de 261 nM et 107 nM pour le [Bpa⁵]T140 et [Bpa¹⁰]T140 respectivement (Table 2, article 1). Malgré une baisse de leur potentiel anti-VIH, ces photoanalogues présentent tout de même des inhibitions significatives de l'infection au VIH-1 ce qui nous permet de conclure que les photoanalogues possèdent une activité similaire au T140.

4.1.2 Identification des domaines de liaison du T140 par le photomarquage

En utilisant les photoanalogues radiomarqués à l'iode 125, nous avons démontré qu'il était possible de photomarquer spécifiquement le récepteur CXCR4 en comparant des cellules HEK293 exprimant de manière stable le récepteur CXCR4 avec des cellules HEK293 non transfectées (Figure 3, article 1). Nous avons constaté que le ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 présente une efficacité de photomarquage réduite par rapport au ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 alors que ces deux photoanalogues présentaient des affinités identiques. L'environnement dans lequel se trouve le résidu Bpa est connu pour jouer un grand rôle dans sa capacité à photomarquer le récepteur (Dorman and Prestwich, 1994). Le Bpa possède d'ailleurs une préférence pour le marquage de résidus méthionine (Fillion et al., 2006; Rihakova et al., 2002). Pour confirmer la spécificité de ces photoanalogues pour CXCR4, nous avons procédé à des expériences de photomarquage en présence d'un excès de photoanalogue non radiomarqué ou de T140. Dans les deux cas, nous avons observé une abolition complète du marquage autant pour ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 que pour ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 nous permettant de confirmer que ces photoanalogues photomarquent le récepteur CXCR4 (Figure 4, article 1).

Afin de délimiter les domaines de liaison de la poche de liaison, nous avons soumis les complexes entre le récepteur CXCR4 et ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 ou ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140 à des digestions enzymatiques. La protéase V8 qui clive suivant les résidus glutamate nous a

permis de générer un fragment correspondant à la séquence Glu179^(4.68)-Lys154^(4.43) du domaine TM4 pour ces deux complexes. Ces résultats nous indiquent que le résidu Bpa serait orienté vers la même région du récepteur CXCR4 pour les deux photoanalogues (Figure 5, article 1). Nous avons aussi couplé la digestion par la protéase V8 avec la PNGase F qui clive toute glycosylation présente sur les résidus asparagine. Alors que le complexe récepteur/photoanalogue est sensible à la PNGase F, nous avons constaté que le fragment généré par la protéase V8 n'est pas influencé par l'ajout de PNGase F, suggérant que ce fragment n'est pas glycosylé (Figure 5, article 1). Malgré le fait qu'un site potentiel de glycosylation (N-X-S/T) se retrouve au niveau du fragment identifié par photomarquage, nos données vont de pair avec d'autres études qui démontrent que ce site n'est pas glycosylé dans des cellules de mammifères (Chabot et al., 2000)(Chabot and Broder, 2000) Chabot and Broder, 2000). Le clivage par l'endoprotéinase Asp-N du fragment généré par la protéase V8 nous permet de confirmer que le domaine TM4 représente la région photomarkuée vu la présence d'un résidu aspartate au sein de ce fragment (Figure 6, article 1). Malheureusement, nous ne pouvons discriminer à partir de cette digestion si le photomarquage se fait au niveau du haut ou du bas du domaine TM4 dû à une faible résolution de notre gel SDS-PAGE pour un fragment de moins de 1 kDa. Nous pouvons tout de même confirmer que le domaine TM4 du récepteur CXCR4 est photomarkuée par les photoanalogues ¹²⁵I-[Bpa⁵]T140 et ¹²⁵I-[Bpa¹⁰]T140.

4.1.3 Génération d'un modèle par homologie de la liaison T140/CXCR4

La structure du T140 ayant été résolue par des études de RMN (Tamamura et al., 2001) nous permet de constater que ce dernier adopte une conformation en *β-hairpin* où les résidus Tyr⁵ et Tyr¹⁰ sont situés du même côté (Figure 7A, article 1). Il n'est donc pas étonnant de constater que la substitution de ces résidus pour un Bpa nous permet de photomarkuer une région similaire du récepteur. La portion N-terminale et C-terminale du T140 sont très riches en acides aminés chargés négativement ce qui est compatible avec leurs interactions avec les domaines extracellulaires du CXCR4 (Trent et al., 2003). Basés sur ces données, nous avons réalisé un modèle par homologie de séquence nous permettant de placé le T140 avec les extrémités N- et C-terminales vers les domaines extracellulaires

et l'extrémité du β -hairpin vers le cœur du récepteur. Les résidus Tyr⁵ et Tyr¹⁰ sont orientés vers le domaine TM4 tel que définis par le photomarquage. Le modèle généré démontre que le T140 se place de manière parallèle aux domaines transmembranaires avec les résidus Arg¹ et Arg¹⁴ du T140 qui interagissent avec la portion N-terminale et la région ECL2 respectivement (Figure 7C, Table 3, article 1). Cette orientation du T140 est stabilisée par les groupements hydroxyle des résidus Tyr⁵ et Tyr¹⁰ qui forment des ponts hydrogène avec le résidu Asp171^(4.60) (Figure 2.7B). On remarque aussi un réseau important d'interactions électrostatiques et de ponts hydrogène (Figure 7C, table 3, article 1) impliquant entre autres les résidus Arg¹, Arg⁶ et Arg¹¹ du T140 avec les résidus Asp262^(6.58) et Glu288^(7.39) du récepteur CXCR4. Il est à souligner que ces résidus acides du récepteur CXCR4 ont tous été préalablement identifiés comme importants pour sa fonction de co-récepteur du VIH-1 (Brelot et al., 2000; Gerlach et al., 2001; Hatse et al., 2001). Nous retrouvons un réseau d'interactions hydrophobes impliquant les résidus Arg188^(ECL2) et Tyr190^(ECL2) avec le résidu Nal³ du T140, similaire à ce qui fut observé par le groupe de Peiper (Trent et al., 2003). Par contre, ces auteurs ont démontré que le T140 adopterait une orientation parallèle à la membrane plasmique avec un réseau d'interactions principalement au niveau des domaines extracellulaires. Les auteurs suggèrent que le résidu Arg¹⁴ du T140 forme un pont hydrogène avec le résidu Asp171^(4.60) alors les résidus Nal³ et Tyr⁵ du T140 interagissent avec les résidus Phe174^(4.63), Arg188^(ECL2), Tyr189^(ECL2) et Phe201^(5.40) du récepteur CXCR4. L'importance de résidus chargés pour la liaison du T140 situés principalement dans les domaines extracellulaires du récepteur CXCR4, explique probablement pourquoi les expériences de simulation dynamique du groupe de Peiper positionnent le T140 au niveau de cette région. Notre modèle basé sur les résultats de photomarquage suggère que le T140 avec sa conformation de β -hairpin peut s'insérer profondément entre les transmembranes permettant son interaction avec plusieurs résidus du domaine TM4 importants pour sa fonction de composé anti-VIH.

4.1.4 Comparaison avec la structure cristallographique du récepteur CXCR4

En 2010, le groupe de Stevens est parvenu à cristalliser le récepteur CXCR4 purifié et à résoudre sa structure par diffraction aux rayons X (Wu et al., 2010). Deux ligands dont

la molécule synthétique IT1t et le CVX15, un analogue du T140, furent utilisés pour cristalliser le récepteur. L'utilisation de trois constructions du CXCR4 furent générées en employant des mutations thermostabilisantes telles que Leu125^{3.41}Trp et Thr240^(6.36)Pro. L'insertion du lysozyme T4L entre les domaines TM5 et TM6 permet de stabiliser le récepteur afin de favoriser une purification homogène et faciliter sa cristallisation. L'architecture générale du CXCR4 est d'abord caractérisée par une pochette de liaison ouverte et profonde, typique des récepteurs peptidergiques (Figure 14). Si l'on compare ce récepteur avec les autres structures cristallographiques, on dénote que la portion extracellulaire du domaine TM1 se rapproche davantage du cœur du récepteur. Le résidu Pro92^(2.58) induit un angle plus serré que prévu au sein du domaine TM2 ce qui altère l'accessibilité des résidus basés sur une identité de séquence. La Pro254^(6.50) induit une déviation de la portion extracellulaire du domaine TM6 de 3 Å vers l'extérieur du récepteur par rapport au récepteur β 2-adrénergique (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007) et au récepteur A_{2A} de l'adénosine (Jaakola et al., 2008). Le domaine TM4 est probablement l'un des domaines qui divergent le plus par rapport aux structures du récepteur β 2-adrénergique, A_{2A} de l'adénosine et la rhodopsine avec une déviation de 5 Å pour la portion intracellulaire et 3 Å pour la portion extracellulaire. Les domaines TM5 et TM7 ont respectivement un tour et deux tours d'hélice α supplémentaires par rapport à la prédiction basée sur l'identité de séquence (Wu et al., 2010). La portion de la région ECL2 adopte une structure formée de deux feuillets β antiparallèles situés en périphérie de la pochette de liaison. La structure nous permet aussi de visualiser la contribution des ponts disulfure (Cys109^(3.25)-Cys186^(ECL2), Cys28^(N-term)-Cys274^(7.25)) qui permettent de réguler l'accès à la pochette de liaison en stabilisant les domaines extracellulaires (Wu et al., 2010).

La pochette de liaison de l'IT1t se compose principalement des domaines TM1, TM2, TM3 et TM7 (Figure 14 A, C). On y remarque notamment une interaction avec les résidus Asp97^(2.63), Asp187^(ECL2) et Glu288^(7.39) (Figure 14 A, C) qui participent à la fonction de co-récepteur du VIH-1 et qui explique l'efficacité de IT1t comme composé anti-VIH (Thoma et al., 2008). Lorsque l'on analyse la structure obtenue avec le ligand CVX15, on constate que ce peptidomimétique englobe presque la totalité de la pochette de liaison avec

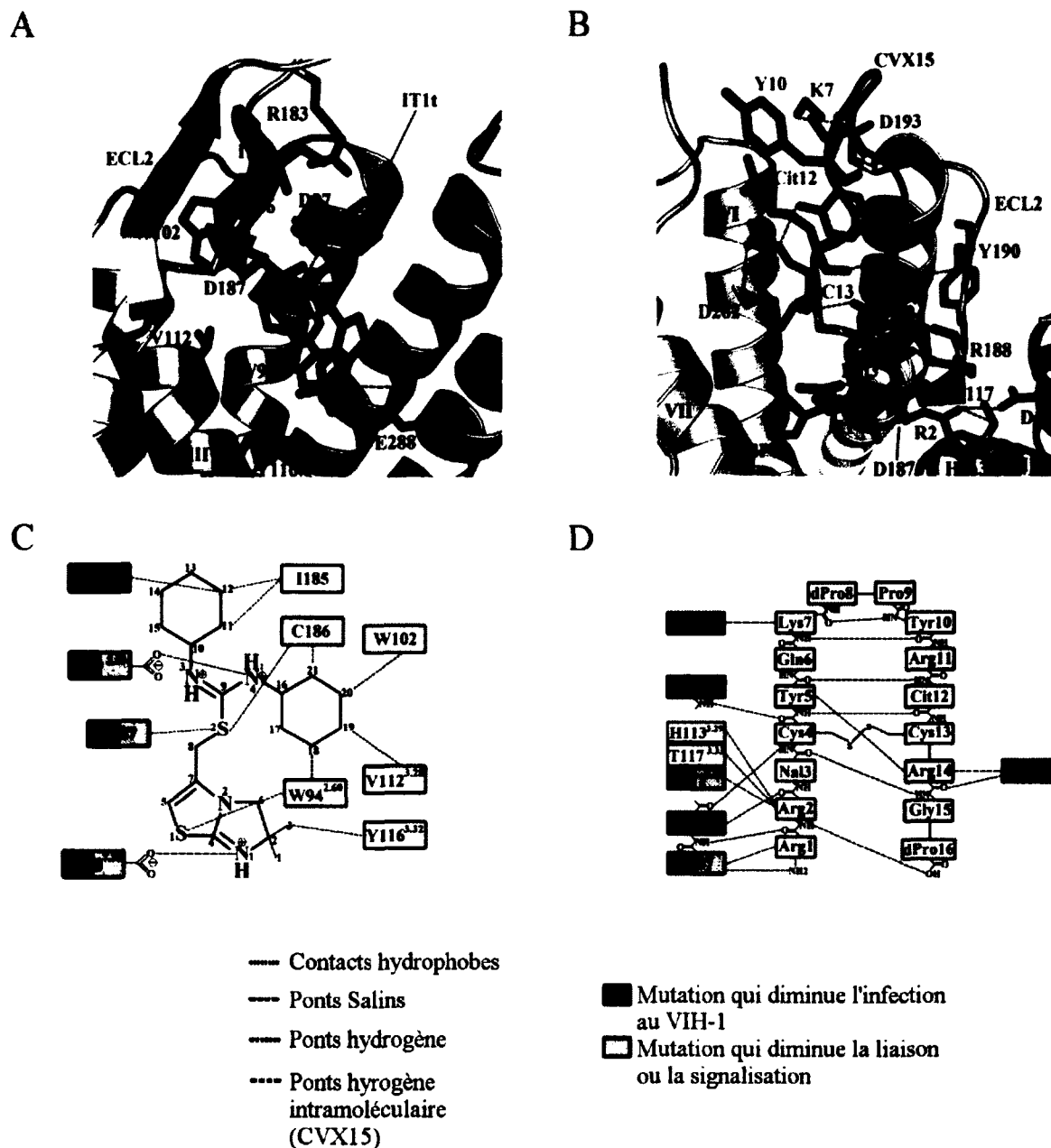


Figure 14. Structure cristallographique de la poche de liaison du récepteur CXCR4

(A) Structure de la poche de liaison du récepteur CXCR4 en complexe avec la molécule IT1t (magenta). Les résidus du récepteur interagissant avec IT1t sont représentés en vert. Les atomes d'azote, de soufre et d'oxygène sont représentés en bleu, jaune et rouge respectivement (B) Structure de la poche de liaison du récepteur CXCR4 en complexe avec le peptide CVX15 (brun). Les résidus du récepteur interagissant avec CVX15 sont représentés en vert. (C) Schéma qui regroupe toutes les interactions entre IT1t et le récepteur CXCR4 (D) Schéma qui regroupe toutes les interactions entre le CVX15 et le récepteur CXCR4. Figure modifiée de Wu et al., 2010.

des interactions principalement au niveau des domaines TM3, TM4, l'ECL2, TM5 et TM6 (Figure 14 B, D). On dénote une fois de plus la présence de résidus impliqués dans l'infection au VIH-1 et qui contribue à la liaison de composés (p. ex. : T140 et AMD3100) ou à la signalisation du récepteur CXCR4 tel que Asp171^(4.60), Arg187^(ECL2), Arg188^(ECL2), Tyr190^(ECL2) et Asp262^(6.58) (Figure 14 B, D).

Il est intéressant de comparer la structure cristallographique du CXCR4 en complexe avec le CVX15 avec notre modèle décrit précédemment pour le T140 (Boulais et al., 2009) vu qu'ils sont deux analogues très similaires. Lorsque l'on superpose la structure cristallographique avec notre modèle par homologie de séquence, nous observons que la pochette de liaison est très similaire dans les deux cas (Figure 15A). C'est plutôt au niveau des domaines extracellulaires que l'on dénote des différences étant donné la nature très dynamique de ces régions (Figure 15B). Nous retrouvons au sein de la région ECL2 la présence de deux feuillets β anti-parallèles pour la structure cristallographique alors que ce motif est absent dans notre modèle par homologie (Figure 15B). Ce domaine situé à proximité du domaine TM4 et pourrait expliquer certaines différences entre les deux modèles. Par contre, l'espace occupé par les résidus de la région ECL2 est similaire pour les deux structures. Lorsque l'on analyse la séquence du CVX15 (Figure 14 D), nous pouvons observer un résidu arginine en position 6 au lieu d'un résidu glutamine pour le T140, un résidu D-lysine en position 8 au lieu d'un résidu D-proline et une portion C-terminale qui s'arrête au résidu arginine en position 14. Pour sa part, le CVX15 possède un résidu glycine en position 15 et un résidu proline en position 16. L'orientation du peptide CVX15 est inverse par rapport à ce que l'on observe avec le T140 en complexe avec le récepteur CXCR4 (Figure 15 C, D). Les résidus Tyr⁵ et Tyr¹⁰ du T140 font face au domaine TM4 (Figure 15 C) tandis que ces résidus se situent davantage dans les environs des domaines TM5 et TM6 pour le résidu Tyr⁵ et face au milieu extracellulaire pour le résidu Tyr¹⁰ pour le CVX15 (Figure 15 D). Du côté des similarités plusieurs interactions avec des résidus du CXCR4 sont retrouvées au niveau des deux modèles soit avec les résidus

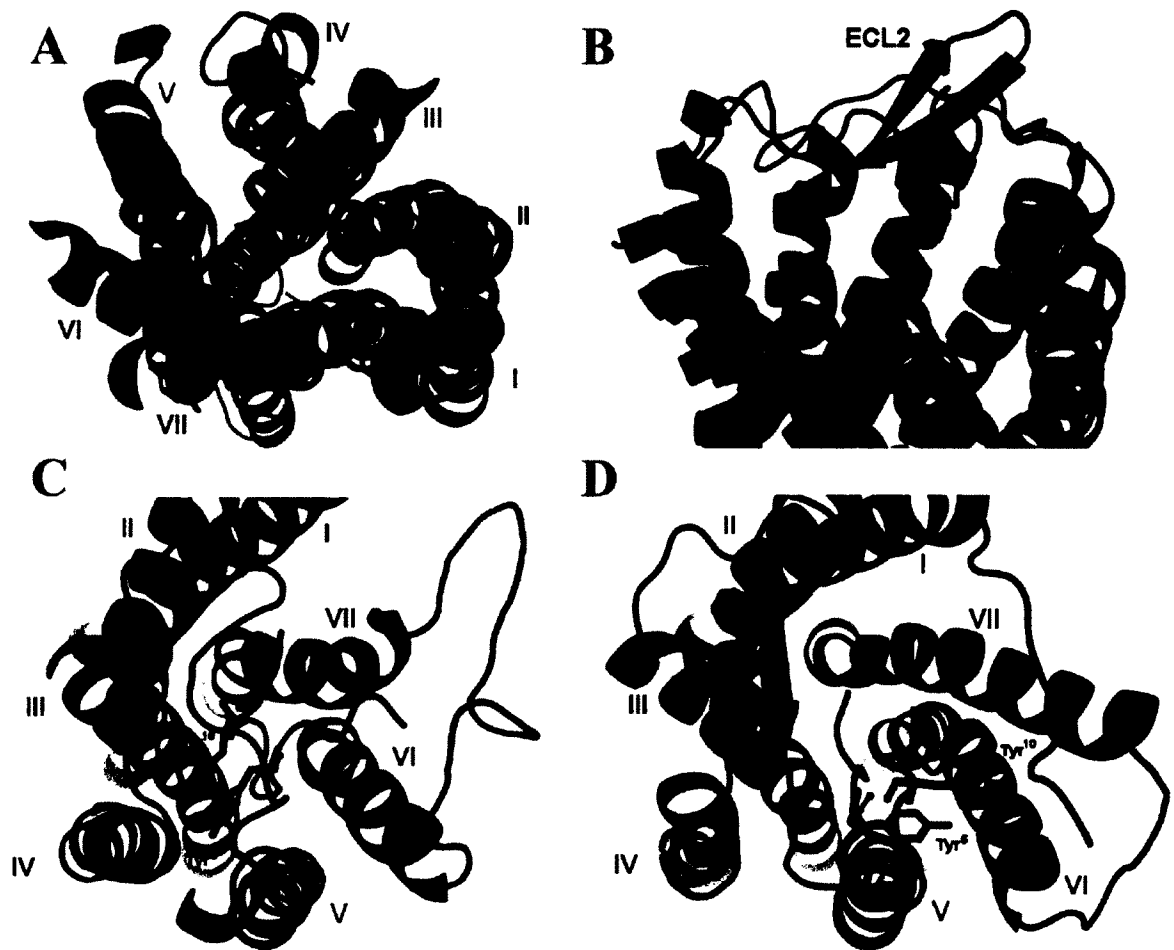


Figure 15. Comparaison du modèle de liaison du T140 sur CXCR4 par homologie de séquence avec la structure cristallographique.

La modélisation du récepteur CXCR4 par homologie de séquence est représentée en vert. La structure cristallographique du récepteur CXCR4 est représentée en bleu. (A) Structure de la pochette de liaison du récepteur CXCR4. (B) Structure des domaines extracellulaires du récepteur CXCR4. (C) Modélisation de la liaison du T140 avec le récepteur CXCR4 par homologie de séquence. Le domaine TM4 est représenté en rouge et le T140 en orange. (D) Structure cristallographique du récepteur CXCR4 en complexe avec le CVX15. Le domaine TM4 est représenté en cyan et le CVX15 en rouge.

Asp171^(4.60), Arg188^(ECL2), Tyr190^(ECL2) et Asp262^(6.58). Ces interactions dénotent aussi l'importance des résidus chargés qui composent la pochette de liaison et qui jouent des rôles importants dans la liaison au T140 et au CVX15.

La détermination de la structure du récepteur CXCR4 en complexe avec le CVX15 fut réalisée en utilisant un récepteur muté (Leu125^{3.41}Trp et Thr240^(6.36)Pro) avec une insertion du lysozyme T4L entre les domaines TM5 et le TM6. Malgré que la caractérisation de l'affinité du CVX15 pour ce récepteur semble être la même que pour le récepteur de type sauvage, ces expériences de radioliasion se font en présence de *bis(imidazolylmethyl) amine analog* (BIMA) utilisé comme radiotracteur. Ce composé est décrit comme un antagoniste par les auteurs, mais aucune caractérisation n'est retrouvée dans la littérature concernant ce ligand. Les auteurs ont mesuré l'affinité du CVX15 pour le site du BIMA sans savoir si ce site représente la pochette orthostérique. De plus, l'insertion du lysozyme T4L entre les domaines TM5 et TM6 stabilise le récepteur pour la cristallisation, mais inhibe totalement l'activité du récepteur en bloquant la liaison avec la protéine G. La mutation Thr240^(6.36)Pro à elle seule prévient l'activation du récepteur CXCR4. Malgré la conservation de l'affinité, il est important de prendre en compte que ces modifications pourraient modifier la conformation globale du récepteur et la façon dont il interagit avec son ligand. De plus, il est intéressant aussi de constater que la Tyr¹⁰ de CVX15 ne semble pas former d'interactions spécifiques avec le récepteur ce qui est relativement incompatible avec nos données de photomarquage avec le [Bpa¹⁰]T140 et celles du groupe de Sakmar (Boulais et al., 2009; Grunbeck et al., 2011).

Concernant notre modèle (Boulais et al., 2009), il aurait été préférable d'avoir davantage de photoanalogues afin de positionner à l'aide de preuves directes l'orientation du T140. L'utilisation de techniques complémentaires (p.ex. : *methionine proximity assay*, spectrométrie de masse) permettant de mieux définir le site de marquage des photoanalogues aurait permis de mieux définir le modèle de liaison du T140. Les photoanalogues utilisés possèdent des affinités similaires mais ils présentent des IC₅₀ significativement différents pour l'infection au VIH-1. Ces résultats suggèrent que l'utilisation des photoanalogues du T140 contrairement au peptide natif pourrait engendrer

des différences au niveau de la conformation du ligand en complexe avec le récepteur. De plus, lors de l'élaboration du modèle de liaison du T140, le récepteur présentant la meilleure homologie tout en permettant d'accomoder les résultats de la littérature était l'opsine (Park et al., 2008a; Scheerer et al., 2008). Il est possible que ce paramètre ait modifié la modélisation du récepteur CXCR4 en complexe avec le T140.

Les récentes structures cristallographiques nous permettent de suggérer d'autres hypothèses quant à la divergence entre les deux modèles de liaison du récepteur CXCR4. La structure du récepteur muscarinique M3 obtenue par le groupe de Kobilka leur a permis d'effectuer des simulations dynamiques où ils ont constaté que le ligand tiotropium peut adopter plusieurs conformations stables au courant de la simulation (Kruse et al., 2012). Le tiotropium semblerait se lier au niveau des domaines extracellulaires du M3 où l'on retrouve le site allostérique du M3 (Gregory et al., 2007; Haga et al., 2012; Haga et al., 2012). Ces données confirment les observations de certaines études démontrant que des ligands orthostériques peuvent lier le site allostérique des récepteurs muscariniques (Redka et al., 2008). Ces études ne font qu'appuyer l'hypothèse selon laquelle un même ligand peut adopter plusieurs conformations au sein d'un récepteur (Dror et al., 2011b). Il est donc possible que notre modèle de la liaison du T140 avec le récepteur CXCR4 représente un état conformationnel différent de celui de la structure cristallographique ce qui expliquerait les différences observées.

4.2 Caractérisation du rôle du domaine TM4 dans la pochette de liaison du récepteur CXCR4

Notre étude précédente (Boulais et al., 2009) ainsi que d'autres ont démontré une implication du domaine TM4 dans la pochette de liaison du récepteur CXCR4 (Brelot et al., 1997; Brelot et al., 1997; Brelot et al., 1999; Brelot et al., 1999; Brelot et al., 2000; Brelot et al., 2000; Labrosse et al., 1998; Reeves et al., 1998; Trent et al., 2003). Ce domaine transmembranaire est particulièrement intéressant puisque peu d'études ne mentionnent sa contribution au site de liaison des GPCR. Les structures moléculaires de GPCR démontrent que le domaine TM4 est souvent situé loin du cœur du récepteur et se retrouve

partiellement masqué de la pochette de liaison par le domaine TM3. De plus, il existe peu de données sur la participation du domaine TM4 aux changements conformationnels suite à l'activation des GPCR. À l'opposé, des études démontrent l'importance de la région TM4/ECL2 pour la liaison (Boulais et al., 2009; BreLOT et al., 1997; BreLOT et al., 1999; BreLOT et al., 2000; Labrosse et al., 1998; Reeves et al., 1998; Trent et al., 2003), pour le processus d'infection au VIH-1 (BreLOT et al., 2000; Chabot et al., 1999; Doranz et al., 1999; Lu et al., 1997) et ainsi qu'au niveau de l'interface de dimérisation (Guo et al., 2003; Guo et al., 2005; Taddese et al., 2012; Wu et al., 2010). Nous avons alors émis l'hypothèse que certains résidus du domaine TM4 participent à la pochette de liaison et que ces résidus subissent des changements conformationnels au sein du récepteur actif. À cette fin, nous avons repris le fragment Glu179^(4.68)-Lys154^(4.43) photomarké lors de notre première étude (Figure 1, article 2) et nous avons substitué individuellement chaque résidu du domaine TM4 en cystéine pour effectuer des études par *substituted cysteine accessibility method* (SCAM). Ces mutants furent exprimés dans les cellules COS-7 et soumis à un traitement au méthaneithiosulfonate hydrobromide (MTSEA) qui alkyle spécifiquement les résidus cystéine en milieu hydrophile. L'alkylation spécifique d'un résidu cystéine qui résulte en une perte de liaison du ligand ¹²⁵I-FC131 permet de confirmer la présence ou non d'un résidu dans la pochette de liaison. Afin de vérifier l'accessibilité des résidus du domaine TM4 dans un état actif, nous avons utilisé le mutant constitutivement actif Asn119^(3.35)Ser au sein duquel nous avons transposé nos mutants cystéine et effectuer des études de SCAM.

4.2.1 Accessibilité des résidus du domaine TM4 dans un état inactif

Les propriétés pharmacologiques des mutants cystéine du domaine TM4 ont d'abord été évaluées par des études de radioliasion avec le FC131. Le FC131 est un analogue cyclique du T140 et agit comme agoniste inverse de CXCR4 (Evans et al., 2009). Les résidus cystéine introduits dans le récepteur de type sauvage ne semblent pas altérer la constante de dissociation (K_d) du FC131 ni l'expression (B_{max}) de ces mutants à l'exception de Asn176^(4.65)Cys et Ala175^(4.64)Cys (Table 1, article 2). Le résidu Asn176^(4.65) fait partie d'un motif consensus de glycosylation (N-X-S/T), mais des études confirment que ce site n'est pas glycosylé au niveau du récepteur CXCR4 dans des cellules de mammifères

(Chabot et al., 2000; Wang et al., 2004a). Des mutants du CXCR4 en position 176 avaient déjà présenté des affinités réduites pour le SDF-1 α , mais aucun changement au niveau de l'expression n'avait été reporté (Thorsen et al., 2002; Zhou and Tai, 1999). Des études ELISA nous ont permis de mesurer l'expression des mutants ne présentant aucune liaison au ^{125}I -FC131. Le mutant Asn176^(4.65)Cys ne présente qu'une très faible expression de surface comparativement au mutant Ala175^(4.64)Cys (Figure 2, article 2). Il est probable que le remplacement d'un résidu alanine par un résidu cystéine en position 175 ait altéré l'accessibilité ou la liaison du FC131 au récepteur.

À partir des mutants présentant une affinité et un niveau d'expression similaire au récepteur de type sauvage, nous avons procédé aux études de SCAM à l'aide du MTSEA comme agent alkylant. Le récepteur CXCR4 possède neuf résidus cystéine endogènes dont 4 sont reliés pour former 2 ponts disulfure (Cys109^(3.25)-Cys186^(ECL2), Cys28^(N-term)-Cys274^(7.25)). Il reste donc 5 résidus cystéine endogènes potentiellement accessibles à l'alkylation par le MTSEA. Lorsque l'on regarde la structure du récepteur CXCR4 (Wu et al., 2010), nous remarquons que ces résidus cystéine ne sont pas orientés de manière à faire face à la pochette de liaison. Lorsque l'on soumet le récepteur de type sauvage au traitement MTSEA, nous remarquons que des doses croissantes jusqu'à 4 mM de MTSEA ne causent aucune inhibition de la liaison du FC131 ce qui suggère que ces résidus cystéine ne sont pas alkylés ou ne sont pas orientés vers le site de liaison du FC131 (Figure 3, article 2). Le mutant Asp171^(4.60)Cys fut employé comme contrôle positif sachant que le résidu Asp¹⁷¹ est connu pour participer à la liaison de plusieurs composés du CXCR4 (Gerlach et al., 2001; Hatse et al., 2001; Trent et al., 2003). Le mutant Asp171^(4.60)Cys présente une excellente sensibilité au MTSEA même à partir de 0,5 mM MTSEA démontrant que ce résidu se retrouve dans un milieu hydrophile et propice à l'alkylation, c'est-à-dire dans la pochette de liaison (Figure 3-4, article 2). Les autres mutants furent criblés pour leur sensibilité à 0,5 mM et 2 mM MTSEA nous permettant d'identifier l'inhibition de la liaison du FC131 pour les mutants Asp171^(4.60)Cys et Pro170^(4.59)Cys. Lorsque l'on effectue des études de protection, c'est-à-dire que l'alkylation se produit en présence d'un excès de FC131 non radiomarqué, nous observons une diminution marquée de la sensibilité des mutants Asp171^(4.60)Cys et Pro170^(4.59)Cys au MTSEA confirmant que

ces résidus se situent au niveau du site de liaison du FC131 (Figure 6A, article 2). Pour ces récepteurs mutants qui présentent une sensibilité au MTSEA, nous avons voulu mesurer leur capacité à activer une voie de signalisation suite à la stimulation au SDF-1 α . La réponse G α_i de ces mutants fut mesurée en utilisant le biosenseur EPAC mesurant la présence d'AMPc par la technique de BRET². Lorsque stimulé au SDF-1 α , les mutants Asp171^(4.60)Cys et Pro170^(4.59)Cys ont présenté une activité similaire au récepteur de type sauvage (Figure 7, article 2). Ces expériences nous permettent de confirmer que ces mutations n'affectent pas la conformation globale du CXCR4 ce qui permet aux récepteurs mutants de conserver leur activité.

Il est intéressant de noter que les résidus identifiés par SCAM sont effectivement retrouvés dans la pochette de liaison du récepteur CXCR4 cristallisé en présence du CVX15, un analogue du T140 tout comme le FC131 (Figure 8, article 2). L'Arg² du CVX15 interagit d'ailleurs avec le résidu Asp171^(4.60) au même titre que les résidus Arg187^(ECL2), Thr117^(3.33) et possiblement His113^(3.29). Des études de modélisation suggèrent que le FC131 et ses dérivés pourraient interagir directement avec le résidu Asp171^(4.60) (Kobayashi et al., 2012; Yoshikawa et al., 2012). Notons aussi que la substitution du résidu Pro170^(4.59) en résidu cystéine entraîne un changement relativement drastique au niveau de la chaîne latérale ce qui malgré tout n'affecte pas l'affinité et l'activité de ce mutant pour FC131.

4.2.2 Accessibilité des résidus du domaine TM4 dans un état actif

Le mutant constitutivement actif Asn119^(3.35)Ser nous permet de transposer nos mutants cystéine au sein d'un récepteur en conformation active. Nous avons caractérisé ces mutants pour leur propriété à lier le FC131 et nous remarquons une plus grande proportion de mutants qui ne présentent aucune liaison dans le cas du mutant constitutivement actif (Table 2, article 2). On retrouve d'abord les mutants Asn176^(4.65)Cys et Ala175^(4.64)Cys qui en ELISA démontrent des niveaux d'expression pourtant similaires au mutant constitutivement actif (Figure 3, article 2). Les mutants Phe174^(4.63)Cys, Asp171^(4.60)Cys, Pro170^(4.59)Cys et Trp161^(4.50)Cys ne présentent aucune affinité pour le FC131 ainsi qu'un

niveau faible d'expression par ELISA. Ces mutations causeraient des altérations au niveau de la conformation générale du récepteur CXCR4 ce qui pourraient affecter leur affinité pour le FC131 ou le routage intracellulaire et la maturation du récepteur.

Nous avons ensuite effectué une analyse SCAM des mutants ayant retenus une affinité et un niveau d'expression similaire au mutant constitutivement actif. Ce dernier fut d'abord soumis au traitement au MTSEA pour vérifier si cette conformation active du récepteur aurait permis l'accessibilité des résidus cystéine endogènes libres. Comme pour le récepteur de type sauvage, le mutant constitutivement actif ne présente aucune inhibition significative de la liaison du FC131 radiomarqué après traitement au MTSEA (Figure 5, article 2). Pour les mutants cystéine sur le mutant Asn119^(3.35)Ser, nous retrouvons Ser178^(4.67)Cys, Val177^(4.66)Cys et Ile173^(4.62)Cys qui démontrent une sensibilité significative au MTSEA à partir de 2 mM (Figure 5, article 2). Ceux-ci ne présentent aucune sensibilité au niveau du récepteur de type sauvage ce qui suggère que l'activation du récepteur modifierait l'accessibilité de ces résidus au sein du mutant constitutivement actif. Des études de protection ont confirmé la présence de ces résidus dans la poche de liaison du CXCR4 (Figure 6B, article 2). En comparaison avec le mutant constitutivement actif, l'activité constitutive ainsi que l'activité obtenue par stimulation au SDF-1 α sont conservées pour ces mutants (Figure 7, article 2). Les résidus Ser178^(4.67) et Val177^(4.66) sont situés davantage au sein de la région ECL2 qu'au niveau du domaine TM4, ce qui représente une région plus flexible et exposée au milieu extracellulaire favorisant probablement l'alkylation de leur homologue cystéine (Figure 8, article 2). Nous ne pouvons exclure que l'alkylation des mutants Ser178^(4.67)Cys et Val177^(4.66)Cys cause une modification de la conformation de la région ECL2 ce qui inhiberait indirectement la liaison du FC131. Il est donc difficile d'interpréter avec précision le mouvement de la région ECL2 dû à son côté dynamique. L'orientation du résidu Ile173^(4.62) à l'état inactif fait face à la membrane plasmique (Figure 8, article 2) ce qui explique l'absence de sensibilité pour Ile173^(4.62)Cys contrairement à cette mutation chez le mutant Asn119^(3.35)Ser. Cette observation suggère qu'un mouvement antihoraire de la portion extracellulaire du domaine TM4 lors de l'activation est à l'origine de l'accessibilité du mutant Ile173^(4.62)Cys dans le mutant constitutivement actif (Figure 8, article 2). Nous

aurions apprécié retrouver d'autres mutants sensibles au traitement MTSEA afin de confirmer ce mouvement, mais il est tout de même important de noter que les résidus en périphérie de la position 173 n'ont présenté qu'une très faible expression à la surface cellulaire (Figure 2, article 2). Le résidu Phe174^(4.63) est d'ailleurs important pour l'activité anti-VIH de l'AMD3100 et du T140. Lorsque muté en résidu alanine, ce résidu permet une meilleure infection par les souches VIH-1 spécifique à CXCR4 (Labrosse et al., 1998; Trent et al., 2003). Les mutants Asp171^(4.60)Cys et Pro170^(4.59)Cys dans le mutant constitutivement actif n'ont présenté que de très faible niveau d'expression contrairement au récepteur de type sauvage (Figure 2, article 2) ce qui nous empêche de conclure sur leur accessibilité en conformation active. Ces mutants nous permettent de supposer que la position de ces résidus est importante pour la stabilité structurelle du récepteur empêchant celui-ci d'être maturé et exporté correctement à la membrane.

4.2.3 Comparaison des changements conformationnels du domaine TM4 avec d'autres GPCR de classe A

L'importance du domaine TM4 se limite souvent à maintenir la stabilité structurelle des GPCR sans toutefois y attribuer de rôle précis. Malgré les récents progrès concernant la cristallisation et la détermination de la structure des GPCR, le domaine TM4 demeure une région sous-estimée par rapport aux autres domaines transmembranaires. La cristallisation du récepteur β 1-adrénergique a permis de constater qu'il y avait une interaction entre le résidu Val172^(4.56) du domaine TM4 et le résidu Ser215^(5.46) du domaine TM5 à l'état inactif (Warne et al., 2008; Warne et al., 2011). L'ajout d'un agoniste partiel ou complet permet de diminuer progressivement l'interface entre ces deux domaines transmembranaires. Fait notable, un polymorphisme du récepteur β 2-adrénergique (Thr164^(4.56)Ile) réduit l'activité basale ainsi qu'après stimulation (Green et al., 2001). Ces études suggèrent que le domaine TM4 peut stabiliser le domaine TM5 dans un état inactif et qu'il est nécessaire de briser cette interaction pour enclencher l'activation. Dans le même sens, il fut démontré qu'un peptide correspondant à la séquence du domaine TM4 de CXCR4 peut inhiber l'activation induite par SDF-1 α (Percherancier et al., 2005). Il fut démontré lors de l'activation de la rhodopsine que des changements au sein du domaine TM4 sont couplés au mouvement

important de la région ECL2 (Ahuja et al., 2009) ainsi que dans la structure cristallographique de la métrarhodopsine II couplée au fragment C-terminal de la transducine (Deupi et al., 2012). Le domaine TM3 est considéré comme étant l'un des pôles importants pour la structure et la fonction de GPCR. La mutation Asn119^(3.35)Ser du CXCR4 supporte cette notion. Le domaine TM3 participe à plusieurs interfaces conservées dont celle impliquant les domaines TM4 et le TM6 (Venkatakrisnan et al., 2013). Ces études vont de pair avec notre modèle confirmant l'importance des changements structuraux du domaine TM4 de lors de l'activation. L'implication du domaine TM4 dans le maintien de l'état inactif représente un nouvel aspect important au niveau des GPCR de la classe A.

Conclusions et perspectives

Au courant de mes travaux de thèses, nous avons démontré qu'il était possible de photomarquer de manière spécifique le récepteur CXCR4 à l'aide de photoanalogues du T140. Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'implication du domaine TM4 dans la formation de la pochette de liaison du récepteur CXCR4. Nous avons par la suite effectué des études de SCAM nous permettant d'identifier la présence de résidus spécifiques du domaine TM4 constituant la pochette de liaison. En utilisant un mutant constitutivement actif, nous avons démontré que le domaine TM4 subit des changements conformationnels significatifs lors de l'activation et que l'accessibilité de certains de ses résidus est modifiée. À l'aide d'un modèle moléculaire, nous proposons que le domaine TM4 participe activement à la formation de la pochette de liaison du récepteur CXCR4 ainsi qu'au réarrangement structurel de ce récepteur lors de l'activation.

Ces dernières années ont été marquées par de nouvelles structures moléculaires à haute définition ce qui permet d'élargir notre compréhension des GPCR et de mettre en contexte des études comme celle présentée au sein de cette thèse. Nous croyons que les techniques biochimiques sur l'analyse structurale des GPCR demeurent tout de même essentielles afin de confirmer dans un contexte cellulaire la structure et la fonction de ces GPCR. Les GPCR non-olfactifs qui ont une structure moléculaire résolue représentent 4% de l'ensemble de ces récepteurs ce qui joue en faveur des modèles par homologie basés sur des résultats à l'aide de techniques biochimiques ou biophysiques (Shoichet and Kobilka, 2012). Certaines études démontrent que la modélisation de GPCR par homologie à l'aide de données expérimentales permettrait de générer des structures de qualité comparable aux structures cristallographiques et pourraient être utilisées pour des criblages virtuels de ligands (Kufareva et al., 2011; Michino et al., 2009). La modélisation par homologie du récepteur D3 a même permis de découvrir davantage de composés spécifiques par rapport à la structure cristallographique lors d'un criblage virtuel (Carlsson et al., 2011). La plupart de ces études se sont concentrées sur l'étude de l'état inactif et actif alors que nous savons qu'il existe probablement plusieurs conformations actives ou inactives. Il serait intéressant de caractériser d'autres états intermédiaires en utilisant des récepteurs mutants qui

pourraient refléter des états où la signalisation serait biaisée (Bonde et al., 2010; Proulx et al., 2008) ou encore que la liaison serait exclusive au site allostérique que ce soit au sein du même récepteur ou au niveau d'une unité oligomérique (Audet and Bouvier, 2012). Mes travaux ont contribué à l'élaboration d'un modèle moléculaire de la pochette de liaison du récepteur CXCR4, lequel nous a permis de générer les premiers agonistes synthétiques de haute affinité pour ce récepteur (Lefrancois et al., 2011). Ces agonistes pourront grandement aider à comprendre les déterminants moléculaires impliqués dans l'activité du récepteur CXCR4 et permettre la synthèse de composés utiles dans la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques vers le sang à des fins de transplantation autologues ou dans des cas de cancer (Ratajczak and Kim, 2012).

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche Dr. Richard Leduc pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir légué sa confiance, son soutien et son savoir pour permettre la réalisation de ces travaux. Nos nombreuses discussions m'ont grandement permis de développer mon ouverture d'esprit ainsi que mon sens critique ce qui a fait de moi un meilleur scientifique.

J'aimerais aussi remercier mon co-directeur de recherche Dr. Emanuel Escher pour m'avoir accueilli également dans son laboratoire et m'avoir fait part de ses connaissances sans fin et son esprit de synthèse qui saura toujours m'impressionner.

Je voudrais remercier aussi Dr. Stéphane Angers, Dr. Fernand-Pierre Gendron et Dr. Jean-Bernard Denault pour avoir pris le temps d'évaluer ma thèse.

Je voudrais remercier tous mes collègues et amis qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de recherche : Marie-Reine Lefebvre, Antoine Désilets, François Béliveau, Éric Béliveau, Brian Holleran, Dany Fillion, Christophe Proulx, Jean-Michel Longpré, Patrice Leclerc, Jérôme Cabana, Jason Arsenault, Martin Clément, Xavier Sainsily, Nicolas Perzo, Marilou Lefrançois, Christine Mona, Nikolaus Heveker, Stéphanie Gravel, Cédric Brûlé, Élie Besserer-Offroy, Kelly Maurice, Éloïc Colombo.

J'aimerais remercier ma famille, mes parents Paul et Ginette pour m'avoir encouragé dans mon cheminement.

Véronik, merci de partager ta vie avec moi, de m'avoir soutenu tout au long de ces années et de m'avoir permis de m'accomplir tant au niveau scientifique qu'en tant que père. Merci à Patrick de m'avoir fait réaliser ce qui est important dans la vie et d'avoir fait de moi une meilleure personne.

Liste des références

- AbdAlla, S., Lothar, H., and Quitterer, U. (2000). AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407, 94-98.
- Adler, M.W., Geller, E.B., Chen, X., and Rogers, T.J. (2006). Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *AAPS J.* 7, E865-70.
- Ahuja, S., Hornak, V., Yan, E.C., Syrett, N., Goncalves, J.A., Hirshfeld, A., Ziliox, M., Sakmar, T.P., Sheves, M., Reeves, P.J., Smith, S.O., and Eilers, M. (2009). Helix movement is coupled to displacement of the second extracellular loop in rhodopsin activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 168-175.
- Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185, 111-120.
- Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., *et al.* (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat. Chem. Biol.* 6, 587-594.
- Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 787-820.
- Amara, A., Gall, S.L., Schwartz, O., Salamero, J., Montes, M., Loetscher, P., Baggiolini, M., Virelizier, J.L., and Arenzana-Seisdedos, F. (1997). HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med.* 186, 139-146.
- Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J.L., Delepierre, M., Baleux, F., Lortat-Jacob, H., and Arenzana-Seisdedos, F. (1999). Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J. Biol. Chem.* 274, 23916-23925.
- Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 409-435.
- Attwood, T.K., and Findlay, J.B. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 7, 195-203.
- Audet, M., and Bouvier, M. (2012). Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell* 151, 14-23.

- Audet, M., Lagace, M., Silversides, D.W., and Bouvier, M. (2010). Protein-protein interactions monitored in cells from transgenic mice using bioluminescence resonance energy transfer. *FASEB J.* 24, 2829-2838.
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005a). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 35760-35766.
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., *et al.* (2005b). WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 105, 2449-2457.
- Balkwill, F. (2004a). Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 540-550.
- Balkwill, F. (2004b). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin. Cancer Biol.* 14, 171-179.
- Ballesteros, J.A., and Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci* 25, 366-428.
- Ballesteros, J., Kitanovic, S., Guarnieri, F., Davies, P., Fromme, B.J., Konvicka, K., Chi, L., Millar, R.P., Davidson, J.S., Weinstein, H., and Sealfon, S.C. (1998). Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 10445-10453.
- Ballesteros, J.A., Jensen, A.D., Liapakis, G., Rasmussen, S.G., Shi, L., Gether, U., and Javitch, J.A. (2001). Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* 276, 29171-29177.
- Bamberg, C.E., Mackay, C.R., Lee, H., Zahra, D., Jackson, J., Lim, Y.S., Whitfeld, P.L., Craig, S., Corsini, E., Lu, B., Gerard, C., and Gerard, N.P. (2010). The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 285, 7633-7644.
- Beider, K., Begin, M., Abraham, M., Wald, H., Weiss, I.D., Wald, O., Pikarsky, E., Zeira, E., Eizenberg, O., Galun, E., *et al.* (2011). CXCR4 antagonist 4F-benzoyl-TN14003 inhibits leukemia and multiple myeloma tumor growth. *Exp. Hematol.* 39, 282-292.
- Berger, E.A., Doms, R.W., Fenyo, E.M., Korber, B.T., Littman, D.R., Moore, J.P., Sattentau, Q.J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., and Weiss, R.A. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature* 391, 240.

Blaszczyk, J., Coillie, E.V., Proost, P., Damme, J.V., Opdenakker, G., Bujacz, G.D., Wang, J.M., and Ji, X. (2000). Complete crystal structure of monocyte chemoattractant protein-2, a CC chemokine that interacts with multiple receptors. *Biochemistry* 39, 14075-14081.

Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996a). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.

Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., and Springer, T.A. (1996b). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 184, 1101-1109.

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

Bonde, M.M., Hansen, J.T., Sanni, S.J., Haunso, S., Gammeltoft, S., Lyngso, C., and Hansen, J.L. (2010). Biased signaling of the angiotensin II type 1 receptor can be mediated through distinct mechanisms. *PLoS One* 5, e14135.

Bonecchi, R., Savino, B., Borroni, E.M., Mantovani, A., and Locati, M. (2010). Chemokine decoy receptors: structure-function and biological properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 341, 15-36.

Boucard, A.A., Sauve, S.S., Guillemette, G., Escher, E., and Leduc, R. (2003). Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem. J.* 370, 829-838.

Boucard, A.A., Wilkes, B.C., Laporte, S.A., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2000). Photolabeling identifies position 172 of the human AT(1) receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure. *Biochemistry* 39, 9662-9670.

Boulais, P.E., Dulude, D., Cabana, J., Heveker, N., Escher, E., Lavigne, P., and Leduc, R. (2009). Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site. *Biochem. Pharmacol.* 78, 1382-1390.

Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 274-286.

Brelot, A., Heveker, N., Adema, K., Hosie, M.J., Willett, B., and Alizon, M. (1999). Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 73, 2576-2586.

- Brelot, A., Heveker, N., Montes, M., and Alizon, M. (2000). Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J. Biol. Chem.* *275*, 23736-23744.
- Brelot, A., Heveker, N., Pleskoff, O., Sol, N., and Alizon, M. (1997). Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J. Virol.* *71*, 4744-4751.
- Bulenger, S., Marullo, S., and Bouvier, M. (2005). Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol. Sci.* *26*, 131-137.
- Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., *et al.* (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.* *203*, 2201-2213.
- Butcher, E.C., and Picker, L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* *272*, 60-66.
- Calandra, G., McCarty, J., McGuirk, J., Tricot, G., Crocker, S.A., Badel, K., Grove, B., Dye, A., and Bridger, G. (2008). AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34+ cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: compassionate use data. *Bone Marrow Transplant.* *41*, 331-338.
- Carlsson, J., Coleman, R.G., Setola, V., Irwin, J.J., Fan, H., Schlessinger, A., Sali, A., Roth, B.L., and Shoichet, B.K. (2011). Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 769-778.
- Chabot, D.J., and Broder, C.C. (2000). Substitutions in a homologous region of extracellular loop 2 of CXCR4 and CCR5 alter coreceptor activities for HIV-1 membrane fusion and virus entry. *J. Biol. Chem.* *275*, 23774-23782.
- Chabot, D.J., Chen, H., Dimitrov, D.S., and Broder, C.C. (2000). N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* *74*, 4404-4413.
- Chabot, D.J., Zhang, P.F., Quinnan, G.V., and Broder, C.C. (1999). Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates. *J. Virol.* *73*, 6598-6609.
- Chackerian, B., Long, E.M., Luciw, P.A., and Overbaugh, J. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus

- replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* *71*, 3932-3939.
- Chang, W., Chen, T.H., Pratt, S., and Shoback, D. (2000). Amino acids in the second and third intracellular loops of the parathyroid Ca²⁺-sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* *275*, 19955-19963.
- Cheng, Z.J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y.L., Cen, B., Wu, G.X., and Pei, G. (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*, 2479-2485.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., and Stevens, R.C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* *318*, 1258-1265.
- Chien, E.Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G.W., Hanson, M.A., Shi, L., Newman, A.H., Javitch, J.A., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2010). Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* *330*, 1091-1095.
- Choe, H.W., Kim, Y.J., Park, J.H., Morizumi, T., Pai, E.F., Krauss, N., Hofmann, K.P., Scheerer, P., and Ernst, O.P. (2011). Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* *471*, 651-655.
- Choi, W.T., Duggineni, S., Xu, Y., Huang, Z., and An, J. (2012). Drug discovery research targeting the CXC chemokine receptor 4 (CXCR4). *J. Med. Chem.* *55*, 977-994.
- Christopoulos, A., and Kenakin, T. (2002). G protein-coupled receptor allostery and complexing. *Pharmacol. Rev.* *54*, 323-374.
- Clark, A.J. (1933). *The Mode of Action of Drugs on Cells*. Edward Arnold & Co. , London
- Clore, G.M., Bax, A., Driscoll, P.C., Wingfield, P.T., and Gronenborn, A.M. (1990). Assignment of the side-chain ¹H and ¹³C resonances of interleukin-1 beta using double- and triple-resonance heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* *29*, 8172-8184.
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Cara, A., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1996). The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat. Med.* *2*, 1244-1247.
- Costa, T., and Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 7321-7325.

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

Crump, M.P., Rajarathnam, K., Kim, K.S., Clark-Lewis, I., and Sykes, B.D. (1998). Solution structure of eotaxin, a chemokine that selectively recruits eosinophils in allergic inflammation. *J. Biol. Chem.* *273*, 22471-22479.

Czaplewski, L.G., McKeating, J., Craven, C.J., Higgins, L.D., Appay, V., Brown, A., Dudgeon, T., Howard, L.A., Meyers, T., Owen, J., *et al.* (1999). Identification of amino acid residues critical for aggregation of human CC chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and RANTES. Characterization of active disaggregated chemokine variants. *J. Biol. Chem.* *274*, 16077-16084.

D'Angelo, D.D., Sakata, Y., Lorenz, J.N., Boivin, G.P., Walsh, R.A., Liggett, S.B., and Dorn, G.W., 2nd. (1997). Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 8121-8126.

Davis, C.B., Dikic, I., Unutmaz, D., Hill, C.M., Arthos, J., Siani, M.A., Thompson, D.A., Schlessinger, J., and Littman, D.R. (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J. Exp. Med.* *186*, 1793-1798.

De Clercq, E. (2010). Recent advances on the use of the CXCR4 antagonist plerixafor (AMD3100, Mozobil) and potential of other CXCR4 antagonists as stem cell mobilizers. *Pharmacol. Ther.* *128*, 509-518.

De Lean, A., Stadel, J.M., and Lefkowitz, R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *255*, 7108-7117.

DeFea, K.A., Vaughn, Z.D., O'Bryan, E.M., Nishijima, D., Dery, O., and Bunnett, N.W. (2000). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 11086-11091.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* *381*, 661-666.

Deupi, X., Edwards, P., Singhal, A., Nickle, B., Oprian, D., Schertler, G., and Standfuss, J. (2012). Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 119-124.

Deupi, X., and Kobilka, B.K. (2010). Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiology (Bethesda)* *25*, 293-303.

- DiPersio, J.F., Micallef, I.N., Stiff, P.J., Bolwell, B.J., Maziarz, R.T., Jacobsen, E., Nademanee, A., McCarty, J., Bridger, G., Calandra, G., and 3101 Investigators. (2009). Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* *27*, 4767-4773.
- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., *et al.* (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* *321*, 75-79.
- Domanska, U.M., Kruizinga, R.C., Nagengast, W.B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., de Vries, E.G., and Walenkamp, A.M. (2013). A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur. J. Cancer* *49*, 219-230.
- Doms, R.W. (2001). Chemokine receptors and HIV entry. *AIDS 15 Suppl 1*, S34-5.
- Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S.W., Este, J.A., Nagashima, K.A., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J.P. (1998a). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat. Med.* *4*, 72-77.
- Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S.W., Este, J.A., Nagashima, K.A., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J.P. (1998b). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat. Med.* *4*, 72-77.
- Doranz, B.J., Fillion, L.G., Diaz-Mitoma, F., Sitar, D.S., Sahai, J., Baribaud, F., Orsini, M.J., Benovic, J.L., Cameron, W., and Doms, R.W. (2001). Safe use of the CXCR4 inhibitor ALX40-4C in humans. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *17*, 475-486.
- Doranz, B.J., Grovit-Ferbas, K., Sharron, M.P., Mao, S.H., Goetz, M.B., Daar, E.S., Doms, R.W., and O'Brien, W.A. (1997). A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J. Exp. Med.* *186*, 1395-1400.
- Doranz, B.J., Orsini, M.J., Turner, J.D., Hoffman, T.L., Berson, J.F., Hoxie, J.A., Peiper, S.C., Brass, L.F., and Doms, R.W. (1999). Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J. Virol.* *73*, 2752-2761.
- Dore, A.S., Robertson, N., Errey, J.C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., Hurrell, E., Bennett, K., Congreve, M., Magnani, F., *et al.* (2011). Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* *19*, 1283-1293.
- Dorman, G., and Prestwich, G.D. (1994). Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* *33*, 5661-5673.

Drews, J. (2004). Paul Ehrlich: magister mundi. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 797-801.

Dror, R.O., Arlow, D.H., Borhani, D.W., Jensen, M.O., Piana, S., and Shaw, D.E. (2009). Identification of two distinct inactive conformations of the beta2-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4689-4694.

Dror, R.O., Arlow, D.H., Maragakis, P., Mildorf, T.J., Pan, A.C., Xu, H., Borhani, D.W., and Shaw, D.E. (2011a). Activation mechanism of the beta2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18684-18689.

Dror, R.O., Pan, A.C., Arlow, D.H., Borhani, D.W., Maragakis, P., Shan, Y., Xu, H., and Shaw, D.E. (2011b). Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13118-13123.

Dror, R.O., Pan, A.C., Arlow, D.H., Borhani, D.W., Maragakis, P., Shan, Y., Xu, H., and Shaw, D.E. (2011c). Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13118-13123.

Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., and Bergers, G. (2008). HIF1 alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer. Cell.* 13, 206-220.

Durroux, T. (2005). Principles: a model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 376-384.

EHRlich, P. (1909).

Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 42, 17-47.

El-Asmar, L., Springael, J.Y., Ballet, S., Andrieu, E.U., Vassart, G., and Parmentier, M. (2005). Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. *Mol. Pharmacol.* 67, 460-469.

Evans, B.J., Wang, Z., Broach, J.R., Oishi, S., Fujii, N., and Peiper, S.C. (2009). Expression of CXCR4, a G-protein-coupled receptor for CXCL12 in yeast identification of new-generation inverse agonists. *Methods Enzymol.* 460, 399-412.

Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L., and Khorana, H.G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274, 768-770.

Federspiel, B., Melhado, I.G., Duncan, A.M., Delaney, A., Schappert, K., Clark-Lewis, I., and Jirik, F.R. (1993). Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* 16, 707-712.

- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* *272*, 872-877.
- Filipek, S., Stenkamp, R.E., Teller, D.C., and Palczewski, K. (2003). G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annu. Rev. Physiol.* *65*, 851-879.
- Fillion, D., Deraet, M., Holleran, B.J., and Escher, E. (2006). Stereospecific synthesis of a carbene-generating angiotensin II analogue for comparative photoaffinity labeling: improved incorporation and absence of methionine selectivity. *J. Med. Chem.* *49*, 2200-2209.
- Flomenberg, N., Devine, S.M., Dipersio, J.F., Liesveld, J.L., McCarty, J.M., Rowley, S.D., Vesole, D.H., Badel, K., and Calandra, G. (2005). The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* *106*, 1867-1874.
- Fong, A.M., Premont, R.T., Richardson, R.M., Yu, Y.R., Lefkowitz, R.J., and Patel, D.D. (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7478-7483.
- Francesconi, A., and Duvoisin, R.M. (1998). Role of the second and third intracellular loops of metabotropic glutamate receptors in mediating dual signal transduction activation. *J. Biol. Chem.* *273*, 5615-5624.
- Franco, R., Casado, V., Mallol, J., Ferrada, C., Ferre, S., Fuxe, K., Cortes, A., Ciruela, F., Lluís, C., and Canela, E.I. (2006). The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol. Pharmacol.* *69*, 1905-1912.
- Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., and Muller, C.E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol. Rev.* *63*, 1-34.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* *63*, 1256-1272.
- Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* *67*, 1414-1425.
- Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K.P., and Ernst, O.P. (2003). Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2290-2295.
- Fujii, N., Oishi, S., Hiramatsu, K., Araki, T., Ueda, S., Tamamura, H., Otaka, A., Kusano, S., Terakubo, S., Nakashima, H., *et al.* (2003). Molecular-size reduction of a potent

CXCR4-chemokine antagonist using orthogonal combination of conformation- and sequence-based libraries. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *42*, 3251-3253.

Gao, Y., Tang, S., Zhou, S., and Ware, J.A. (2001). The thromboxane A2 receptor activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C-dependent Gi coupling and Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *296*, 426-433.

Garzino-Demo, A., Moss, R.B., Margolick, J.B., Cleghorn, F., Sill, A., Blattner, W.A., Cocchi, F., Carlo, D.J., DeVico, A.L., and Gallo, R.C. (1999). Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory beta-chemokines are associated with AIDS-free status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 11986-11991.

George, S.R., O'Dowd, B.F., and Lee, S.P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 808-820.

Gerlach, L.O., Jakobsen, J.S., Jensen, K.P., Rosenkilde, M.R., Skerlj, R.T., Ryde, U., Bridger, G.J., and Schwartz, T.W. (2003). Metal ion enhanced binding of AMD3100 to Asp262 in the CXCR4 receptor. *Biochemistry* *42*, 710-717.

Gerlach, L.O., Skerlj, R.T., Bridger, G.J., and Schwartz, T.W. (2001). Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 14153-14160.

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

Gether, U., and Kobilka, B.K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* *273*, 17979-17982.

Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, J.A., Weinstein, H., and Kobilka, B.K. (1997). Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *EMBO J.* *16*, 6737-6747.

Gether, U., Lin, S., and Kobilka, B.K. (1995). Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J. Biol. Chem.* *270*, 28268-28275.

Gilman, A. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* *36*, 577-579.

Gong, J.H., and Clark-Lewis, I. (1995). Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues. *J. Exp. Med.* *181*, 631-640.

Gonzalez-Cabrera, P.J., Jo, E., Sanna, M.G., Brown, S., Leaf, N., Marsolais, D., Schaeffer, M.T., Chapman, J., Cameron, M., Guerrero, M., Roberts, E., and Rosen, H. (2008). Full

pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions. *Mol. Pharmacol.* *74*, 1308-1318.

Govaerts, C., Lefort, A., Costagliola, S., Wodak, S.J., Ballesteros, J.A., Van Sande, J., Pardo, L., and Vassart, G. (2001). A conserved Asn in transmembrane helix 7 is an on/off switch in the activation of the thyrotropin receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 22991-22999.

Graham, G.J. (2009). D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur. J. Immunol.* *39*, 342-351.

Granier, S., and Kobilka, B. (2012). A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 670-673.

Granier, S., Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Weis, W.I., and Kobilka, B.K. (2012). Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* *485*, 400-404.

Gravel, S., Malouf, C., Boulais, P.E., Berchiche, Y.A., Oishi, S., Fujii, N., Leduc, R., Sinnett, D., and Heveker, N. (2010). The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *J. Biol. Chem.* *285*, 37939-37943.

Green, S.A., Rathz, D.A., Schuster, A.J., and Liggett, S.B. (2001). The Ile164 beta(2)-adrenoceptor polymorphism alters salmeterol exosite binding and conventional agonist coupling to G(s). *Eur. J. Pharmacol.* *421*, 141-147.

Gregory, K.J., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2007). Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr. Neuropharmacol.* *5*, 157-167.

Grunbeck, A., Huber, T., Sachdev, P., and Sakmar, T.P. (2011). Mapping the ligand-binding site on a G protein-coupled receptor (GPCR) using genetically encoded photocrosslinkers. *Biochemistry* *50*, 3411-3413.

Gulino, A.V., Moratto, D., Sozzani, S., Cavadini, P., Otero, K., Tassone, L., Imberti, L., Pirovano, S., Notarangelo, L.D., Soresina, R., *et al.* (2004). Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood* *104*, 444-452.

Guo, W., Shi, L., Filizola, M., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2005). Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17495-17500.

Guo, W., Shi, L., and Javitch, J.A. (2003). The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *J. Biol. Chem.* *278*, 4385-4388.

- Gupta, S.K., and Pillarisetti, K. (1999). Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *J. Immunol.* *163*, 2368-2372.
- Gupta, S.K., Pillarisetti, K., Thomas, R.A., 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*, 29-34.
- Gurevich, E.V., Tesmer, J.J., Mushegian, A., and Gurevich, V.V. (2012). G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol. Ther.* *133*, 40-69.
- Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., Kobilka, B.K., Haga, T., and Kobayashi, T. (2012). Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* *482*, 547-551.
- Handel, T.M., and Domaille, P.J. (1996). Heteronuclear (¹H, ¹³C, ¹⁵N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry* *35*, 6569-6584.
- Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., *et al.* (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* *335*, 851-855.
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J.M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., Aken, B.L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., *et al.* (2012). GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* *22*, 1760-1774.
- Hatse, S., Princen, K., Gerlach, L.O., Bridger, G., Henson, G., De Clercq, E., Schwartz, T.W., and Schols, D. (2001). Mutation of Asp(171) and Asp(262) of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. *Mol. Pharmacol.* *60*, 164-173.
- Hatse, S., Princen, K., Vermeire, K., Gerlach, L.O., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Bridger, G., De Clercq, E., and Schols, D. (2003). Mutations at the CXCR4 interaction sites for AMD3100 influence anti-CXCR4 antibody binding and HIV-1 entry. *FEBS Lett.* *546*, 300-306.
- Hay, D.L., Poyner, D.R., and Sexton, P.M. (2006). GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol. Ther.* *109*, 173-197.
- Heitz, F., Holzwarth, J.A., Gies, J.P., Pruss, R.M., Trumpp-Kallmeyer, S., Hibert, M.F., and Guenet, C. (1999). Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M2 receptor binding site. *Eur. J. Pharmacol.* *380*, 183-195.
- Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Freedman, R., Grunberger, D., Krstenansky, J., Lee, S., McCarley, D., Mulkins, M., *et al.* (1999). Identification of residues

in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* **38**, 13013-13025.

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

Heredia, A., Amoroso, A., Davis, C., Le, N., Reardon, E., Dominique, J.K., Klingebiel, E., Gallo, R.C., and Redfield, R.R. (2003a). Rapamycin causes down-regulation of CCR5 and accumulation of anti-HIV beta-chemokines: an approach to suppress R5 strains of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10411-10416.

Heredia, A., Davis, C., Amoroso, A., Dominique, J.K., Le, N., Klingebiel, E., Reardon, E., Zella, D., and Redfield, R.R. (2003b). Induction of G1 cycle arrest in T lymphocytes results in increased extracellular levels of beta-chemokines: a strategy to inhibit R5 HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4179-4184.

Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., and Diaz, G.A. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet.* **34**, 70-74.

Herzog, H., Hort, Y.J., Shine, J., and Selbie, L.A. (1993). Molecular cloning, characterization, and localization of the human homolog to the reported bovine NPY Y3 receptor: lack of NPY binding and activation. *DNA Cell Biol.* **12**, 465-471.

Heveker, N., Montes, M., Germeroth, L., Amara, A., Trautmann, A., Alizon, M., and Schneider-Mergener, J. (1998). Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides. *Curr. Biol.* **8**, 369-376.

Hill, S.J. (2006). G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl 1**, S27-37.

Holleran, B.J., Beaulieu, M.E., Proulx, C.D., Lavigne, P., Escher, E., and Leduc, R. (2007). Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem. J.* **402**, 51-61.

Holloway, A.C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S., Southwell, B.R., Lew, M.J., and Thomas, W.G. (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Mol. Pharmacol.* **61**, 768-777.

Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T.H., Ankersen, M., and Schwartz, T.W. (2003). High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol. Endocrinol.* **17**, 2201-2210.

Huang, E.H., Singh, B., Cristofanilli, M., Gelovani, J., Wei, C., Vincent, L., Cook, K.R., and Lucci, A. (2009). A CXCR4 antagonist CTCE-9908 inhibits primary tumor growth and metastasis of breast cancer. *J. Surg. Res.* *155*, 231-236.

Huang, X., Shen, J., Cui, M., Shen, L., Luo, X., Ling, K., Pei, G., Jiang, H., and Chen, K. (2003). Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor. *Biophys. J.* *84*, 171-184.

Hubbell, W.L., Altenbach, C., Hubbell, C.M., and Khorana, H.G. (2003). Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv. Protein Chem.* *63*, 243-290.

Huber, T., Menon, S., and Sakmar, T.P. (2008). Structural basis for ligand binding and specificity in adrenergic receptors: implications for GPCR-targeted drug discovery. *Biochemistry* *47*, 11013-11023.

Hulme, E.C., Lu, Z.L., and Bee, M.S. (2003). Scanning mutagenesis studies of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Receptors Channels* *9*, 215-228.

Hunyady, L., and Catt, K.J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* *20*, 953-970.

Hurst, D.P., Grossfield, A., Lynch, D.L., Feller, S., Romo, T.D., Gawrisch, K., Pitman, M.C., and Reggio, P.H. (2010). A lipid pathway for ligand binding is necessary for a cannabinoid G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* *285*, 17954-17964.

Ishii, I., Izumi, T., Tsukamoto, H., Umeyama, H., Ui, M., and Shimizu, T. (1997). Alanine exchanges of polar amino acids in the transmembrane domains of a platelet-activating factor receptor generate both constitutively active and inactive mutants. *J. Biol. Chem.* *272*, 7846-7854.

Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., and Stevens, R.C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* *322*, 1211-1217.

Jarnagin, K., Grunberger, D., Mulkins, M., Wong, B., Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Diehl, F., Freedman, R., *et al.* (1999). Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry* *38*, 16167-16177.

Javitch, J.A., Fu, D., Liapakis, G., and Chen, J. (1997). Constitutive activation of the beta2 adrenergic receptor alters the orientation of its sixth membrane-spanning segment. *J. Biol. Chem.* *272*, 18546-18549.

- Jazin, E.E., Yoo, H., Blomqvist, A.G., Yee, F., Weng, G., Walker, M.W., Salon, J., Larhammar, D., and Wahlestedt, C. (1993). A proposed bovine neuropeptide Y (NPY) receptor cDNA clone, or its human homologue, confers neither NPY binding sites nor NPY responsiveness on transfected cells. *Regul. Pept.* *47*, 247-258.
- Jenkinson, S., Thomson, M., McCoy, D., Edelstein, M., Danehower, S., Lawrence, W., Wheelan, P., Spaltenstein, A., and Gudmundsson, K. (2010). Blockade of X4-tropic HIV-1 cellular entry by GSK812397, a potent noncompetitive CXCR4 receptor antagonist. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 817-824.
- Jensen, A.D., Guarnieri, F., Rasmussen, S.G., Asmar, F., Ballesteros, J.A., and Gether, U. (2001). Agonist-induced conformational changes at the cytoplasmic side of transmembrane segment 6 in the beta 2 adrenergic receptor mapped by site-selective fluorescent labeling. *J. Biol. Chem.* *276*, 9279-9290.
- Jiang, Q., Lee, B.X., Glashofer, M., van Rhee, A.M., and Jacobson, K.A. (1997). Mutagenesis reveals structure-activity parallels between human A2A adenosine receptors and biogenic amine G protein-coupled receptors. *J. Med. Chem.* *40*, 2588-2595.
- Jin, D.K., Shido, K., Kopp, H.G., Petit, I., Shmelkov, S.V., Young, L.M., Hooper, A.T., Amano, H., Avecilla, S.T., Heissig, B., *et al.* (2006). Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat. Med.* *12*, 557-567.
- Kalatskaya, I., Berchiche, Y.A., Gravel, S., Limberg, B.J., Rosenbaum, J.S., and Heveker, N. (2009). AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol. Pharmacol.* *75*, 1240-1247.
- Karnik, S.S., Gogonea, C., Patil, S., Saad, Y., and Takezako, T. (2003). Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol. Metab.* *14*, 431-437.
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *53*, 531-556.
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2012). Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol. Sci.* *33*, 17-27.
- Kauer, J.C., Erickson-Viitanen, S., Wolfe, H.R., Jr, and DeGrado, W.F. (1986). p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *J. Biol. Chem.* *261*, 10695-10700.
- Kenakin, T. (2002). Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 103-110.

Kenakin, T., and Miller, L.J. (2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol. Rev.* *62*, 265-304.

Kessans, M.R., Gatesman, M.L., and Kockler, D.R. (2010). Plerixafor: a peripheral blood stem cell mobilizer. *Pharmacotherapy* *30*, 485-492.

Kim, J., Jiang, Q., Glashofer, M., Yehle, S., Wess, J., and Jacobson, K.A. (1996). Glutamate residues in the second extracellular loop of the human A2a adenosine receptor are required for ligand recognition. *Mol. Pharmacol.* *49*, 683-691.

Kim, J., Wess, J., van Rhee, A.M., Schoneberg, T., and Jacobson, K.A. (1995). Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A2a adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* *270*, 13987-13997.

Kim, J.M., Altenbach, C., Kono, M., Oprian, D.D., Hubbell, W.L., and Khorana, H.G. (2004). Structural origins of constitutive activation in rhodopsin: Role of the K296/E113 salt bridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12508-12513.

Kim, T.H., Chung, K.Y., Manglik, A., Hansen, A.L., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Shaw, D.E., Kobilka, B.K., and Prosser, R.S. (2013). The role of ligands on the equilibria between functional States of a G protein-coupled receptor. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 9465-9474.

Kobayashi, K., Oishi, S., Hayashi, R., Tomita, K., Kubo, T., Tanahara, N., Ohno, H., Yoshikawa, Y., Furuya, T., Hoshino, M., and Fujii, N. (2012). Structure-activity relationship study of a CXC chemokine receptor type 4 antagonist, FC131, using a series of alkene dipeptide isosteres. *J. Med. Chem.* *55*, 2746-2757.

Kobilka, B., Gether, U., Seifert, R., Lin, S., and Ghanouni, P. (1999). Characterization of ligand-induced conformational states in the beta 2 adrenergic receptor. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* *19*, 293-300.

Kobilka, B.K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* *1768*, 794-807.

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

Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraiishi, Y., Kondo, K., Maeda, M., Tsujishita, H., and Shimada, I. (2012). Efficacy of the beta(2)-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat. Commun.* *3*, 1045.

Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., Hirose, M., Maeda, Y., Takahashi, H., Terashima, Y., Matsushima, K., and Shimada, I. (2009). Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* *284*, 35240-35250.

Kolakowski, L.F., Jr. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1-7.

Kondru, R., Zhang, J., Ji, C., Mirzadegan, T., Rotstein, D., Sankuratri, S., and Dioszegi, M. (2008). Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol. Pharmacol.* 73, 789-800.

Koot, M., Keet, I.P., Vos, A.H., de Goede, R.E., Roos, M.T., Coutinho, R.A., Miedema, F., Schellekens, P.T., and Tersmette, M. (1993). Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann. Intern. Med.* 118, 681-688.

Krebs, A., Villa, C., Edwards, P.C., and Schertler, G.F. (1998). Characterisation of an improved two-dimensional p22121 crystal from bovine rhodopsin. *J. Mol. Biol.* 282, 991-1003.

Kruse, A.C., Hu, J., Pan, A.C., Arlow, D.H., Rosenbaum, D.M., Rosemond, E., Green, H.F., Liu, T., Chae, P.S., Dror, R.O., *et al.* (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482, 552-556.

Kufareva, I., Rueda, M., Katritch, V., Stevens, R.C., Abagyan, R., and GPCR Dock 2010 participants. (2011). Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment. *Structure* 19, 1108-1126.

Kwong, J., Kulbe, H., Wong, D., Chakravarty, P., and Balkwill, F. (2009). An antagonist of the chemokine receptor CXCR4 induces mitotic catastrophe in ovarian cancer cells. *Mol. Cancer. Ther.* 8, 1893-1905.

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. *J. Virol.* 72, 6381-6388.

Lack, N.A., Green, B., Dale, D.C., Calandra, G.B., Lee, H., MacFarland, R.T., Badel, K., Liles, W.C., and Bridger, G. (2005). A pharmacokinetic-pharmacodynamic model for the mobilization of CD34+ hematopoietic progenitor cells by AMD3100. *Clin. Pharmacol. Ther.* 77, 427-436.

Lameh, J., Philip, M., Sharma, Y.K., Moro, O., Ramachandran, J., and Sadee, W. (1992). Hm1 muscarinic cholinergic receptor internalization requires a domain in the third cytoplasmic loop. *J. Biol. Chem.* 267, 13406-13412.

Lane, J.R., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2013). Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 59-66.

Langley, J.N. (1909). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances: Part IV. The effect of curari and of some other substances on the

- nicotine response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. *J. Physiol.* *39*, 235-295.
- Langley, J.N. (1908a). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part II. *J. Physiol.* *37*, 165-212.
- Langley, J.N. (1908b). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part III. The reaction of frog's muscle to nicotine after denervation. *J. Physiol.* *37*, 285-300.
- Langley, J.N. (1907). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *J. Physiol.* *36*, 347-384.
- Langley, J.N. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J. Physiol.* *33*, 374-413.
- Lapham, C.K., Ouyang, J., Chandrasekhar, B., Nguyen, N.Y., Dimitrov, D.S., and Golding, H. (1996). Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* *274*, 602-605.
- Laporte, S.A., Boucard, A.A., Servant, G., Guillemette, G., Leduc, R., and Escher, E. (1999). Determination of peptide contact points in the human angiotensin II type I receptor (AT1) with photosensitive analogs of angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* *13*, 578-586.
- Laurence, J.S., Blanpain, C., Burgner, J.W., Parmentier, M., and LiWang, P.J. (2000). CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding. *Biochemistry* *39*, 3401-3409.
- Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P., and Wang, J. (2004). Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell. Mol. Immunol.* *1*, 95-104.
- Lebon, G., Langmead, C.J., Tehan, B.G., and Hulme, E.C. (2009). Mutagenic mapping suggests a novel binding mode for selective agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* *75*, 331-341.
- Lefrancois, M., Lefebvre, M.R., Saint-Onge, G., Boulais, P.E., Lamothe, S., Leduc, R., Lavigne, P., Heveker, N., and Escher, E. (2011). Agonists for the Chemokine Receptor CXCR4. *ACS Med. Chem. Lett.* *2*, 597-602.
- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., and Lagane, B. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* *113*, 6085-6093.

- Li, B., Scarselli, M., Knudsen, C.D., Kim, S.K., Jacobson, K.A., McMillin, S.M., and Wess, J. (2007). Rapid identification of functionally critical amino acids in a G protein-coupled receptor. *Nat. Methods* 4, 169-174.
- Liang, Z., Zhan, W., Zhu, A., Yoon, Y., Lin, S., Sasaki, M., Klapproth, J.M., Yang, H., Grossniklaus, H.E., Xu, J., *et al.* (2012). Development of a unique small molecule modulator of CXCR4. *PLoS One* 7, e34038.
- Liapakis, G., Ballesteros, J.A., Papachristou, S., Chan, W.C., Chen, X., and Javitch, J.A. (2000). The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 37779-37788.
- Libert, F., Parmentier, M., Lefort, A., Dinsart, C., Van Sande, J., Maenhaut, C., Simons, M.J., Dumont, J.E., and Vassart, G. (1989). Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* 244, 569-572.
- Libert, F., Parmentier, M., Lefort, A., Dumont, J.E., and Vassart, G. (1990). Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1. *Nucleic Acids Res.* 18, 1917.
- Liles, W.C., Broxmeyer, H.E., Rodger, E., Wood, B., Hubel, K., Cooper, S., Hangoc, G., Bridger, G.J., Henson, G.W., Calandra, G., and Dale, D.C. (2003). Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102, 2728-2730.
- Lin, G., Bertolotti-Ciarlet, A., Haggarty, B., Romano, J., Nolan, K.M., Leslie, G.J., Jordan, A.P., Huang, C.C., Kwong, P.D., Doms, R.W., and Hoxie, J.A. (2007). Replication-competent variants of human immunodeficiency virus type 2 lacking the V3 loop exhibit resistance to chemokine receptor antagonists. *J. Virol.* 81, 9956-9966.
- Liu, Q., Chen, H., Ojode, T., Gao, X., Anaya-O'Brien, S., Turner, N.A., Ulrick, J., Decastro, R., Kelly, C., Cardones, A.R., *et al.* (2012). WHIM syndrome caused by a single amino acid substitution in the carboxy-tail of chemokine receptor CXCR4. *Blood*
- Liwang, A.C., Wang, Z.X., Sun, Y., Peiper, S.C., and Liwang, P.J. (1999). The solution structure of the anti-HIV chemokine vMIP-II. *Protein Sci.* 8, 2270-2280.
- Lodi, P.J., Garrett, D.S., Kuszewski, J., Tsang, M.L., Weatherbee, J.A., Leonard, W.J., Gronenborn, A.M., and Clore, G.M. (1994). High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science* 263, 1762-1767.
- Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 232-237.

- Loetscher, P., Moser, B., and Baggiolini, M. (2000). Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv. Immunol.* *74*, 127-180.
- Lu, Z., Berson, J.F., Chen, Y., Turner, J.D., Zhang, T., Sharron, M., Jenks, M.H., Wang, Z., Kim, J., Rucker, J., *et al.* (1997). Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6426-6431.
- Lubkowski, J., Bujacz, G., Boque, L., Domaille, P.J., Handel, T.M., and Wlodawer, A. (1997). The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nat. Struct. Biol.* *4*, 64-69.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* *283*, 655-661.
- Luttrell, L.M., Hawes, B.E., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lansing, T.J., and Lefkowitz, R.J. (1996). Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* *271*, 19443-19450.
- Ma, Y.C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W., and Huang, X.Y. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* *102*, 635-646.
- Maeda, K., Das, D., Ogata-Aoki, H., Nakata, H., Miyakawa, T., Tojo, Y., Norman, R., Takaoka, Y., Ding, J., Arnold, G.F., Arnold, E., and Mitsuya, H. (2006). Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J. Biol. Chem.* *281*, 12688-12698.
- Maehle, A.H., Prull, C.R., and Halliwell, R.F. (2002). The emergence of the drug receptor theory. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 637-641.
- Magnon, C., and Frenette, P.S. (2008). Hematopoietic stem cell trafficking. In *StemBook*, (Cambridge (MA): Claire Magnon and Paul S. Frenette)
- Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K., and Granier, S. (2012). Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* *485*, 321-326.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* *27*, 97-106.
- Marie, J., Koch, C., Pruneau, D., Paquet, J.L., Groblewski, T., Larguier, R., Lombard, C., Deslauriers, B., Maigret, B., and Bonnafous, J.C. (1999). Constitutive activation of the human bradykinin B2 receptor induced by mutations in transmembrane helices III and VI. *Mol. Pharmacol.* *55*, 92-101.

- Marinissen, M.J., and Gutkind, J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 368-376.
- Mathiesen, J.M., Ulven, T., Martini, L., Gerlach, L.O., Heinemann, A., and Kostenis, E. (2005). Identification of indole derivatives exclusively interfering with a G protein-independent signaling pathway of the prostaglandin D2 receptor CRTH2. *Mol. Pharmacol.* 68, 393-402.
- McQuibban, G.A., Butler, G.S., Gong, J.H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J. Biol. Chem.* 276, 43503-43508.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289, 1202-1206.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 100, 1160-1167.
- Micallef, I.N., Stiff, P.J., DiPersio, J.F., Maziarz, R.T., McCarty, J.M., Bridger, G., and Calandra, G. (2009). Successful stem cell remobilization using plerixafor (mozobil) plus granulocyte colony-stimulating factor in patients with non-hodgkin lymphoma: results from the plerixafor NHL phase 3 study rescue protocol. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15, 1578-1586.
- Michino, M., Abola, E., GPCR Dock 2008 participants, Brooks, C.L., 3rd, Dixon, J.S., Moul, J., and Stevens, R.C. (2009). Community-wide assessment of GPCR structure modelling and ligand docking: GPCR Dock 2008. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 455-463.
- Mizoue, L.S., Bazan, J.F., Johnson, E.C., and Handel, T.M. (1999). Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1. *Biochemistry* 38, 1402-1414.
- Montaner, S., Kufareva, I., Abagyan, R., and Gutkind, J.S. (2013). Molecular mechanisms deployed by virally encoded G protein-coupled receptors in human diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 331-354.
- Moriguchi, M., Hissong, B.D., Gadina, M., Yamaoka, K., Tiffany, H.L., Murphy, P.M., Candotti, F., and O'Shea, J.J. (2005). CXCL12 signaling is independent of Jak2 and Jak3. *J. Biol. Chem.* 280, 17408-17414.
- Motabi, I.H., and DiPersio, J.F. (2012). Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev.* 26, 267-278.

- Moukhametzianov, R., Warne, T., Edwards, P.C., Serrano-Vega, M.J., Leslie, A.G., Tate, C.G., and Schertler, G.F. (2011). Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonist-bound structures of a beta1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8228-8232.
- Muniz-Medina, V.M., Jones, S., Maglich, J.M., Galardi, C., Hollingsworth, R.E., Kazmierski, W.M., Ferris, R.G., Edelstein, M.P., Chiswell, K.E., and Kenakin, T.P. (2009). The relative activity of "function sparing" HIV-1 entry inhibitors on viral entry and CCR5 internalization: is allosteric functional selectivity a valuable therapeutic property? *Mol. Pharmacol.* *75*, 490-501.
- Murakami, T., Kumakura, S., Yamazaki, T., Tanaka, R., Hamatake, M., Okuma, K., Huang, W., Toma, J., Komano, J., Yanaka, M., Tanaka, Y., and Yamamoto, N. (2009). The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 2940-2948.
- Murphy, P.M. (1993). Molecular mimicry and the generation of host defense protein diversity. *Cell* *72*, 823-826.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* *52*, 145-176.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* *382*, 635-638.
- Nagler, A., Shimoni, A., Avivi, I., Rowe, J.M., Beider, K., Hardan, I., Abraham, M., Wald, H., Galun, E., Shaw, H.L., Eizenberg, O., and Peled, A. (19 novembre)
- Nathans, J., and Hogness, D.S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* *34*, 807-814.
- Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleswar, H., Raz, E., Zerwes, H.G., Rot, A., and Thelen, M. (2010). CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* *5*, e9175.
- Nervi, B., Ramirez, P., Rettig, M.P., Uy, G.L., Holt, M.S., Ritchey, J.K., Prior, J.L., Piwnica-Worms, D., Bridger, G., Ley, T.J., and DiPersio, J.F. (2009). Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* *113*, 6206-6214.

- Noda, K., Saad, Y., Graham, R.M., and Karnik, S.S. (1994). The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J. Biol. Chem.* *269*, 6743-6752.
- Nomura, H., Nielsen, B.W., and Matsushima, K. (1993). Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors. *Int. Immunol.* *5*, 1239-1249.
- Nygaard, R., Frimurer, T.M., Holst, B., Rosenkilde, M.M., and Schwartz, T.W. (2009). Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol. Sci.* *30*, 249-259.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., *et al.* (2013). The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell* *152*, 532-542.
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., *et al.* (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* *382*, 833-835.
- O'Brien, J.A., Lemaire, W., Chen, T.B., Chang, R.S., Jacobson, M.A., Ha, S.N., Lindsley, C.W., Schaffhauser, H.J., Sur, C., Pettibone, D.J., Conn, P.J., and Williams, D.L., Jr. (2003). A family of highly selective allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Mol. Pharmacol.* *64*, 731-740.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 60-71.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335-348.
- Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Marchese, A., and Benovic, J.L. (1999). 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.* *274*, 31076-31086.
- Ott, T.R., Lio, F.M., Olshefski, D., Liu, X.J., Struthers, R.S., and Ling, N. (2004). Determinants of high-affinity binding and receptor activation in the N-terminus of CCL-19 (MIP-3 beta). *Biochemistry* *43*, 3670-3678.
- Ovchinnikov, Y., Abdulaev, N.G., and Bogachuk, A.S. (1988). Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett.* *230*, 1-5.

- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* *5*, 993-996.
- Paavola, C.D., Hemmerich, S., Grunberger, D., Polsky, I., Bloom, A., Freedman, R., Mulkins, M., Bhakta, S., McCarley, D., Wiesent, L., *et al.* (1998). Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *J. Biol. Chem.* *273*, 33157-33165.
- Palczewski, K. (2008). G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 743-767.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* *289*, 739-745.
- Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W., and Ernst, O.P. (2008a). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* *454*, 183-187.
- Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W., and Ernst, O.P. (2008b). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* *454*, 183-187.
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F.M., and Opella, S.J. (2012). Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* *491*, 779-783.
- Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P., and Clauser, E. (2002). Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* *13*, 336-343.
- Parthier, C., Reedtz-Runge, S., Rudolph, R., and Stubbs, M.T. (2009). Passing the baton in class B GPCRs: peptide hormone activation via helix induction? *Trends Biochem. Sci.* *34*, 303-310.
- Peled, A., Wald, O., and Burger, J. (2012). Development of novel CXCR4-based therapeutics. *Expert Opin. Investig. Drugs* *21*, 341-353.
- Percherancier, Y., Berchiche, Y.A., Slight, I., Volkmer-Engert, R., Tamamura, H., Fujii, N., Bouvier, M., and Heveker, N. (2005). Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* *280*, 9895-9903.
- Perez, D.M., Hwa, J., Gaivin, R., Mathur, M., Brown, F., and Graham, R.M. (1996). Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor. *Mol. Pharmacol.* *49*, 112-122.

- Pin, J.P., Galvez, T., and Prezeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 98, 325-354.
- Pin, J.P., Kniazeff, J., Goudet, C., Bessis, A.S., Liu, J., Galvez, T., Acher, F., Rondard, P., and Prezeau, L. (2004). The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol. Cell.* 96, 335-342.
- Povsic, T.J., Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 51334-51339.
- Proulx, C.D., Holleran, B.J., Boucard, A.A., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2008). Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol. Pharmacol.* 74, 552-561.
- Rajagopal, K., Whalen, E.J., Violin, J.D., Stiber, J.A., Rosenberg, P.B., Premont, R.T., Coffman, T.M., Rockman, H.A., and Lefkowitz, R.J. (2006). Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16284-16289.
- Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C.M., Gerard, N.P., Gerard, C., and Lefkowitz, R.J. (2010). Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 628-632.
- Rajagopalan, L., and Rajarathnam, K. (2006). Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci. Rep.* 26, 325-339.
- Rajarathnam, K., Sykes, B.D., Kay, C.M., Dewald, B., Geiser, T., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (1994). Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 264, 90-92.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Fung, J.J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P.S., DeVree, B.T., Rosenbaum, D.M., Thian, F.S., Kobilka, T.S., *et al.* (2011a). Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469, 175-180.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., *et al.* (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., *et al.* (2011b). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
- Rasmussen, S.G., Jensen, A.D., Liapakis, G., Ghanouni, P., Javitch, J.A., and Gether, U. (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*, 175-184.

Ratajczak, M.Z., and Kim, C. (2012). The use of chemokine receptor agonists in stem cell mobilization. *Expert Opin. Biol. Ther.* *12*, 287-297.

Redka, D.S., Pisterzi, L.F., and Wells, J.W. (2008). Binding of orthosteric ligands to the allosteric site of the M(2) muscarinic cholinergic receptor. *Mol. Pharmacol.* *74*, 834-843.

Reeves, J.D., Heveker, N., Brelot, A., Alizon, M., Clapham, P.R., and Picard, L. (1998). The second extracellular loop of CXCR4 is involved in CD4-independent entry of human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol.* *79* (Pt 7), 1793-1799.

Revankar, C.M., Vines, C.M., Cimino, D.F., and Prossnitz, E.R. (2004). Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 24578-24584.

Richert, M.M., Vaidya, K.S., Mills, C.N., Wong, D., Korz, W., Hurst, D.R., and Welch, D.R. (2009). Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. *Oncol. Rep.* *21*, 761-767.

Rihakova, L., Deraet, M., Auger-Messier, M., Perodin, J., Boucard, A.A., Guillemette, G., Leduc, R., Lavigne, P., and Escher, E. (2002). Methionine proximity assay, a novel method for exploring peptide ligand-receptor interaction. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* *22*, 297-313.

Robinson, P.R., Cohen, G.B., Zhukovsky, E.A., and Oprian, D.D. (1992). Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* *9*, 719-725.

Roland, J., Murphy, B.J., Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Delauzun, V., Nye, K.E., Devaux, C., and Biard-Piechaczyk, M. (2003). Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* *101*, 399-406.

Romano, C., Yang, W.L., and O'Malley, K.L. (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* *271*, 28612-28616.

Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Yao, X.J., Weis, W.I., Stevens, R.C., and Kobilka, B.K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* *318*, 1266-1273.

Rosenbaum, D.M., Zhang, C., Lyons, J.A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D.H., Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Devree, B.T., Sunahara, R.K., *et al.* (2011). Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* *469*, 236-240.

Rosenkilde, M.M., Gerlach, L.O., Hatse, S., Skerlj, R.T., Schols, D., Bridger, G.J., and Schwartz, T.W. (2007). Molecular mechanism of action of monocyclam versus bicyclam

non-peptide antagonists in the CXCR4 chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* *282*, 27354-27365.

Rosenkilde, M.M., Gerlach, L.O., Jakobsen, J.S., Skerlj, R.T., Bridger, G.J., and Schwartz, T.W. (2004). Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J. Biol. Chem.* *279*, 3033-3041.

Rovati, G.E., Capra, V., and Neubig, R.R. (2007). The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol. Pharmacol.* *71*, 959-964.

Salahpour, A., Angers, S., and Bouvier, M. (2000). Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* *11*, 163-168.

Schadel, S.A., Heck, M., Maretzki, D., Filipek, S., Teller, D.C., Palczewski, K., and Hofmann, K.P. (2003). Ligand channeling within a G-protein-coupled receptor. The entry and exit of retinals in native opsin. *J. Biol. Chem.* *278*, 24896-24903.

Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., De Benedetti, P.G., and Cotecchia, S. (1996). Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.* *15*, 3566-3578.

Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.W., Hofmann, K.P., and Ernst, O.P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* *455*, 497-502.

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

Schmitt, S., Weinhold, N., Dembowski, K., Neben, K., Witzens-Harig, M., Braun, M., Klemmer, J., Wuchter, P., Ludin, C., Ho, A.D., and Goldschmidt, H. (19 Novembre)

Schols, D., Este, J.A., Henson, G., and De Clercq, E. (1997a). Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. *Antiviral Res.* *35*, 147-156.

Schols, D., Struyf, S., Van Damme, J., Este, J.A., Henson, G., and De Clercq, E. (1997b). Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J. Exp. Med.* *186*, 1383-1388.

Schwartz, T.W., Frimurer, T.M., Holst, B., Rosenkilde, M.M., and Elling, C.E. (2006). Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *46*, 481-519.

Sheikh, S.P., Vilardarga, J.P., Baranski, T.J., Lichtarge, O., Iiri, T., Meng, E.C., Nissenson, R.A., and Bourne, H.R. (1999). Similar structures and shared switch mechanisms of the

beta2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor. Zn(II) bridges between helices III and VI block activation. *J. Biol. Chem.* *274*, 17033-17041.

Sheikh, S.P., Zvyaga, T.A., Lichtarge, O., Sakmar, T.P., and Bourne, H.R. (1996). Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* *383*, 347-350.

Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2011). beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* *32*, 521-533.

Shi, L., Liapakis, G., Xu, R., Guarnieri, F., Ballesteros, J.A., and Javitch, J.A. (2002). Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J. Biol. Chem.* *277*, 40989-40996.

Shieh, B., Yan, Y.P., Ko, N.Y., Liao, Y.E., Liu, Y.C., Lin, H.H., Chen, P.P., and Li, C. (2001). Detection of elevated serum beta-chemokine levels in seronegative Chinese individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Infect. Dis.* *33*, 273-279.

Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., *et al.* (2011). Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* *475*, 65-70.

Shoichet, B.K., and Kobilka, B.K. (2012). Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *33*, 268-272.

Shukla, A.K., Xiao, K., and Lefkowitz, R.J. (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 457-469.

Siciliano, S.J., Rollins, T.E., DeMartino, J., Konteatis, Z., Malkowitz, L., Van Riper, G., Bondy, S., Rosen, H., and Springer, M.S. (1994). Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 1214-1218.

Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R.M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., *et al.* (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14759-14764.

Skelton, N.J., Aspiras, F., Ogez, J., and Schall, T.J. (1995). Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type. *Biochemistry* *34*, 5329-5342.

Sotsios, Y., Whittaker, G.C., Westwick, J., and Ward, S.G. (1999). The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J. Immunol.* *163*, 5954-5963.

- Stadel, J.M., DeLean, A., and Lefkowitz, R.J. (1980). A high affinity agonist . beta-adrenergic receptor complex is an intermediate for catecholamine stimulation of adenylate cyclase in turkey and frog erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* *255*, 1436-1441.
- Standfuss, J., Edwards, P.C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., Oprian, D.D., and Schertler, G.F. (2011). The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* *471*, 656-660.
- Steinberg, M., and Silva, M. (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*, 821-843.
- Steitz, T.A., Goldman, A., and Engelman, D.M. (1982). Quantitative application of the helical hairpin hypothesis to membrane proteins. *Biophys. J.* *37*, 124-125.
- Stenkamp, R.E., Filipek, S., Driessen, C.A., Teller, D.C., and Palczewski, K. (2002). Crystal structure of rhodopsin: a template for cone visual pigments and other G protein coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* *1565*, 168-182.
- Stone, N.D., Dunaway, S.B., Flexner, C., Tierney, C., Calandra, G.B., Becker, S., Cao, Y.J., Wiggins, I.P., Conley, J., MacFarland, R.T., *et al.* (2007). Multiple-dose escalation study of the safety, pharmacokinetics, and biologic activity of oral AMD070, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in human subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 2351-2358.
- Strader, C.D., Candelore, M.R., Hill, W.S., Dixon, R.A., and Sigal, I.S. (1989a). A single amino acid substitution in the beta-adrenergic receptor promotes partial agonist activity from antagonists. *J. Biol. Chem.* *264*, 16470-16477.
- Strader, C.D., Candelore, M.R., Hill, W.S., Sigal, I.S., and Dixon, R.A. (1989b). Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *264*, 13572-13578.
- Strader, C.D., Sigal, I.S., and Dixon, R.A. (1989c). Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J.* *3*, 1825-1832.
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* *277*, 49212-49219.
- Suryanarayana, S., Daunt, D.A., Von Zastrow, M., and Kobilka, B.K. (1991). A point mutation in the seventh hydrophobic domain of the alpha 2 adrenergic receptor increases its affinity for a family of beta receptor antagonists. *J. Biol. Chem.* *266*, 15488-15492.
- Swaminathan, G.J., Holloway, D.E., Colvin, R.A., Campanella, G.K., Papageorgiou, A.C., Luster, A.D., and Acharya, K.R. (2003). Crystal structures of oligomeric forms of the IP-10/CXCL10 chemokine. *Structure* *11*, 521-532.

Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., Kishimoto, T., and Nagasawa, T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.

Taddese, B., Simpson, L.M., Wall, I.D., Blaney, F.E., Kidley, N.J., Clark, H.S., Smith, R.E., Upton, G.J., Gouldson, P.R., Psaroudakis, G., Bywater, R.P., and Reynolds, C.A. (2012). G-protein-coupled receptor dynamics: dimerization and activation models compared with experiment. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 394-399.

Tamamura, H., Hiramatsu, K., Kusano, a., Terakubo, S., Yamamoto, N., Trent, J.O., Wang, Z., Peiper, S.C., Nakashima, H., Otaka, A., and Fujii, N. (2003). Synthesis of potent CXCR4 inhibitors possessing low cytotoxicity and improved biostability based on T140 derivatives. *Org. Biomol. Chem.* 1, 3656-3662.

Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Gotoh, K., Kanamoto, T., Xu, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Hattori, T., Yamamoto, N., *et al.* (2001). Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1897-1902.

Tamamura, H., Omagari, A., Oishi, S., Kanamoto, T., Yamamoto, N., Peiper, S.C., Nakashima, H., Otaka, A., and Fujii, N. (2000). Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 2633-2637.

Tamamura, H., Tsutsumi, H., Masuno, H., Mizokami, S., Hiramatsu, K., Wang, Z., Trent, J.O., Nakashima, H., Yamamoto, N., Peiper, S.C., and Fujii, N. (2006). Development of a linear type of low molecular weight CXCR4 antagonists based on T140 analogs. *Org. Biomol. Chem.* 4, 2354-2357.

Tamamura, H., Xu, Y., Hattori, T., Zhang, X., Arakaki, R., Kanbara, K., Omagari, A., Otaka, A., Ibuka, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., and Fujii, N. (1998). A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 877-882.

Tan, W., Martin, D., and Gutkind, J.S. (2006). The G α 13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J. Biol. Chem.* 281, 39542-39549.

Tang, X., Wang, Y., Li, D., Luo, J., and Liu, M. (2012). Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacologica Sinica* 33, 363-371.

Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 2927-2931.

- Thelen, M., and Thelen, S. (2008). CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J. Neuroimmunol.* *198*, 9-13.
- Thoma, G., Streiff, M.B., Kovarik, J., Glickman, F., Wagner, T., Beerli, C., and Zerwes, H.G. (2008). Orally bioavailable isothioureas block function of the chemokine receptor CXCR4 in vitro and in vivo. *J. Med. Chem.* *51*, 7915-7920.
- Thomas, D.D., and Stryer, L. (1982). Transverse location of the retinal chromophore of rhodopsin in rod outer segment disc membranes. *J. Mol. Biol.* *154*, 145-157.
- Thompson, A.A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., Vardy, E., Huang, X.P., Trapella, C., Guerrini, R., Calo, G., *et al.* (2012). Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* *485*, 395-399.
- Thorsden, I., Polzer, S., and Schreiber, M. (2002). Infection of cells expressing CXCR4 mutants lacking N-glycosylation at the N-terminal extracellular domain is enhanced for R5X4-dualtropic human immunodeficiency virus type-1. *BMC Infect. Dis.* *2*, 31.
- Tian, S., Choi, W.T., Liu, D., Pesavento, J., Wang, Y., An, J., Sodroski, J.G., and Huang, Z. (2005). Distinct functional sites for human immunodeficiency virus type 1 and stromal cell-derived factor 1alpha on CXCR4 transmembrane helical domains. *J. Virol.* *79*, 12667-12673.
- Tilton, B., Ho, L., Oberlin, E., Loetscher, P., Baleux, F., Clark-Lewis, I., and Thelen, M. (2000). Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *192*, 313-324.
- Tota, M.R., and Strader, C.D. (1990). Characterization of the binding domain of the beta-adrenergic receptor with the fluorescent antagonist carazolol. Evidence for a buried ligand binding site. *J. Biol. Chem.* *265*, 16891-16897.
- Trent, J.O., Wang, Z.X., Murray, J.L., Shao, W., Tamamura, H., Fujii, N., and Peiper, S.C. (2003). Lipid bilayer simulations of CXCR4 with inverse agonists and weak partial agonists. *J. Biol. Chem.* *278*, 47136-47144.
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J., and Moore, J.P. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* *384*, 184-187.
- Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A., and Filipek, S. (2012). Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Curr. Med. Chem.* *19*, 1090-1109.
- Ullum, H., Cozzi Lepri, A., Victor, J., Aladdin, H., Phillips, A.N., Gerstoft, J., Skinhoj, P., and Pedersen, B.K. (1998). Production of beta-chemokines in human immunodeficiency

virus (HIV) infection: evidence that high levels of macrophage inflammatory protein-1beta are associated with a decreased risk of HIV disease progression. *J. Infect. Dis.* 177, 331-336.

Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., and Schertler, G.F. (1997). Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 389, 203-206.

Urizar, E., Claeysen, S., Deupi, X., Govaerts, C., Costagliola, S., Vassart, G., and Pardo, L. (2005). An activation switch in the rhodopsin family of G protein-coupled receptors: the thyrotropin receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 17135-17141.

Uy, G.L., Rettig, M.P., Motabi, I.H., McFarland, K., Trinkaus, K.M., Hladnik, L.M., Kulkarni, S., Abboud, C.N., Cashen, A.F., Stockerl-Goldstein, K.E., *et al.* (2012a). A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 119, 3917-3924.

Uy, G.L., Rettig, M.P., Motabi, I.H., McFarland, K., Trinkaus, K.M., Hladnik, L.M., Kulkarni, S., Abboud, C.N., Cashen, A.F., Stockerl-Goldstein, K.E., *et al.* (2012b). A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 119, 3917-3924.

Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., De la Cruz, N.B., Haugner, J.C., 3rd, Basnet, H., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2008a). Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci. Signal.* 1, ra4.

Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., De la Cruz, N.B., Haugner, J.C., 3rd, Basnet, H., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2008b). Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci. Signal.* 1, ra4.

Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2006). Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12). *J. Mol. Biol.* 359, 1400-1409.

Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., and Babu, M.M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185-194.

Vila-Coro, A.J., Rodriguez-Frade, J.M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M.C., Martinez-A, C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* 13, 1699-1710.

Vlahakis, S.R., Villasis-Keever, A., Gomez, T., Vanegas, M., Vlahakis, N., and Paya, C.V. (2002). G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J. Immunol.* 169, 5546-5554.

- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G.W., Huang, X.P., Vardy, E., McCorvy, J.D., Jiang, Y., Chu, M., Siu, F.Y., *et al.* (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* 340, 615-619.
- Wang, C., Jiang, Y., Ma, J., Wu, H., Wacker, D., Katritch, V., Han, G.W., Liu, W., Huang, X.P., Vardy, E., *et al.* (2013). Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science* 340, 610-614.
- Wang, J., Babcock, G.J., Choe, H., Farzan, M., Sodroski, J., and Gabuzda, D. (2004a). N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology* 324, 140-150.
- Wang, J., Babcock, G.J., Choe, H., Farzan, M., Sodroski, J., and Gabuzda, D. (2004b). N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology* 324, 140-150.
- Warne, T., Moukhametzianov, R., Baker, J.G., Nehme, R., Edwards, P.C., Leslie, A.G., Schertler, G.F., and Tate, C.G. (2011). The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature* 469, 241-244.
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G., Tate, C.G., and Schertler, G.F. (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491.
- Weber, C. (2003). Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J. Mol. Med. (Berl)* 81, 4-19.
- Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10782-10787.
- Wess, J. (1993). Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions. *Life Sci.* 53, 1447-1463.
- Wheatley, M., Wootten, D., Conner, M.T., Simms, J., Kendrick, R., Logan, R.T., Poyner, D.R., and Barwell, J. (2012). Lifting the lid on GPCRs: the role of extracellular loops. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1688-1703.
- Wieland, K., Zuurmond, H.M., Krasel, C., Ijzerman, A.P., and Lohse, M.J. (1996). Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9276-9281.
- Wong, R.S., Bodart, V., Metz, M., Labrecque, J., Bridger, G., and Fricker, S.P. (2008). Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocyclam, and

noncyclam small-molecule CXC chemokine receptor 4 inhibitors. *Mol. Pharmacol.* *74*, 1485-1495.

Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* *330*, 1066-1071.

Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G.W., Vardy, E., Liu, W., Thompson, A.A., Huang, X.P., Carroll, F.I., *et al.* (2012). Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* *485*, 327-332.

Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* *384*, 179-183.

Xiang, J., George, S.L., Wunschmann, S., Chang, Q., Klinzman, D., and Stapleton, J.T. (2004). Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet* *363*, 2040-2046.

Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G.W., Jacobson, K.A., Gao, Z.G., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2011a). Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* *332*, 322-327.

Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G.W., Jacobson, K.A., Gao, Z.G., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2011b). Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* *332*, 322-327.

Yagi, H., Tan, W., Dillenburg-Pilla, P., Armando, S., Amornphimoltham, P., Simaan, M., Weigert, R., Molinolo, A.A., Bouvier, M., and Gutkind, J.S. (2011). A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal.* *4*, ra60.

Yin, H., Chu, A., Li, W., Wang, B., Shelton, F., Otero, F., Nguyen, D.G., Caldwell, J.S., and Chen, Y.A. (2009). Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay. *J. Biol. Chem.* *284*, 12328-12338.

Yoder, A., Yu, D., Dong, L., Iyer, S.R., Xu, X., Kelly, J., Liu, J., Wang, W., Vorster, P.J., Agulto, L., *et al.* (2008). HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell* *134*, 782-792.

Yoshikawa, Y., Kobayashi, K., Oishi, S., Fujii, N., and Furuya, T. (2012). Molecular modeling study of cyclic pentapeptide CXCR4 antagonists: new insight into CXCR4-FC131 interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *22*, 2146-2150.

Yu, L., Cecil, J., Peng, S.B., Schrementi, J., Kovacevic, S., Paul, D., Su, E.W., and Wang, J. (2006). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* 374, 174-179.

Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D.H., Fung, J.J., Palmer, D., Zheng, Y., Green, H.F., Pandey, A., Dror, R.O., Shaw, D.E., *et al.* (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* 492, 387-392.

Zhang, K., McQuibban, G.A., Silva, C., Butler, G.S., Johnston, J.B., Holden, J., Clark-Lewis, I., Overall, C.M., and Power, C. (2003). HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 6, 1064-1071.

Zhang, W.B., Navenot, J.M., Haribabu, B., Tamamura, H., Hiramatsu, K., Omagari, A., Pei, G., Manfredi, J.P., Fujii, N., Broach, J.R., and Peiper, S.C. (2002). A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists. *J. Biol. Chem.* 277, 24515-24521.

Zhang, X., Chen, L., Bancroft, D.P., Lai, C.K., and Maione, T.E. (1994). Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry* 33, 8361-8366.

Zhang, Y., Rodriguez, A.L., and Conn, P.J. (2005). Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 1212-1219.

Zhou, H., and Tai, H.H. (1999). Characterization of recombinant human CXCR4 in insect cells: role of extracellular domains and N-glycosylation in ligand binding. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 267-276.

Zlotnik, A. (2008). New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J. Pathol.* 215, 211-213.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

Zuscik, M.J., Porter, J.E., Gaivin, R., and Perez, D.M. (1998). Identification of a conserved switch residue responsible for selective constitutive activation of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 3401-3407.

Annexe A

A.1 Liste des publications

Sainsily, X., Cabana J., **Boulais, P.E.**, Holleran B.J., Escher, E., Lavigne, P., Leduc R., Identification of transmembrane domain 3, 4 & 5 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the Urotensin II receptor, (soumis à *Biochemical Pharmacology*).

Boulais P.E., Escher E., Leduc R., (2012) Analysis by substituted cysteine scanning mutagenesis of the fourth transmembrane domain of the CXCR4 receptor in its inactive and active state. *Biochemical Pharmacology* 2013;15;85(4):541-50

Lefrançois M., Lefebvre M.-R., Saint-Onge G., **Boulais P.E.**, Lamothe S., Leduc R., Lavigne P., Heveker N., Escher E., (2011) Agonists for the Chemokine Receptor CXCR4. *ACS – Medicinal Chemistry Letters* Aug 11;2(8):597-602

Gravel S., Malouf C., **Boulais P.E.**, Berchiche Y.A., Tamamura H., Fujii N., Leduc R., Sinnett D., Heveker N., (2010) The Peptidomimetic CXCR4 inhibitor TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7 – Roles of receptor domains. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285(49):37939-43

Boulais P.E., Dulude D., Cabana J., Heveker N., Escher E., Lavigne P., Leduc R., (2009) Photolabeling identifies transmembrane domain 4 of CXCR4 as a T140 binding site. *Biochemical Pharmacology* 2009;78(11):1382-90

A.2 Liste des communications

***Boulais, P.E.**, Escher E., Leduc R., Characterization of prenylated rab acceptor family of proteins that modulate chemokine receptor trafficking *Gordon Research Conferences : Molecular Pharmacology*, Barga, Lucca, Italy, 2013

***Boulais, P.E.**, Escher E., Leduc R., Activation of the CXCR4 receptor modulates the accessibility of the fourth transmembrane domain in the binding pocket of anti-HIV compound FC131. *4th Edition of Journée Phare de l'Université de Sherbrooke*, Sherbrooke, Québec, Canada 2012.

***Boulais, P.E.**, Escher E., Leduc R., Activation of the CXCR4 receptor modulates the accessibility of the fourth transmembrane domain in the binding pocket of anti-HIV compound FC131. *13TH Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires*. London, Ontario, Canada, 2012

*Lefrançois M., Lefebvre MR., **Boulais, P.E.**, Cabana J., Mona C., Lavigne P., Leduc R., Heveker N., Escher E. Binding, signaling and *in vivo* efficacy of novel peptidic CXCR4 agonists. 32nd *European peptide symposium*, Athens, Greece, 2012

*Lefrançois M., **Boulais, P.E.**, Lefebvre MR., Saint-Onge G., Lamothe S., Lavigne P., Leduc R., Heveker N., Escher E. Agonists for the CXCR4 chemokine receptor. *Faculty of Medicine Symposium, 41th Edition*, Department of pharmacology, Sherbrooke, QC, 2012

*Lefrançois M., Lefebvre MR., Saint-Onge G., **Boulais, P.E.**, Cabana J., Lamothe S., Leduc R., Lavigne P., Heveker N., Escher E., Synthetic agonists for the CXCR4 chemokine receptor, 22nd *American Peptide Symposium*, San Diego, CA, USA, 2011

*Lefrançois M., Lefebvre MR., Saint-Onge G., **Boulais, P.E.**, Cabana J., Lamothe S., Leduc R., Lavigne P., Heveker N., Escher E., Synthetic agonists for the CXCR4 chemokine receptor, 11th *Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires.*, Montebello, Québec, USA, 2011

***Boulais, P.E.**, Escher E., Leduc R., Probing the accessibility of the 4th transmembrane domain of the CXCR4 receptor. *Gordon Research Conferences : Molecular Pharmacology*, Ventura, CA, USA, 2011

*Lefrançois M., Lefebvre MR., Saint-Onge G., **Boulais, P.E.**, Gravel S., Lamothe S., Leduc R., Lavigne P., Heveker N., Escher E., Synthetic agonists for the CXCR4 chemokine receptor, 10th *Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires.*, King City, Ontario, USA, 2010

***Boulais, P.E.**, Escher E., Leduc R., Determination of the 4th transmembrane domain accessibility in the CXCR4 binding pocket. 2nd *Edition of Journée Phare de l'Université de Sherbrooke*, Sherbrooke, Québec, Canada 2010.

*Gravel S., Malouf C., **Boulais P.E.**, Berchiche Y.A., Tamamura H., Fujii N., Leduc R., Sinnott D., Heveker N., CXCR7-mediated activation of the β -arrestin pathway by different CXCR4 inhibitors. 11TH *Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires.* King City, Ontario, Canada, 2010

*Trottier A., Tremblay H., Emond A., **Boulais P.E.**, Langlois M.-F., Leduc R., Marsault E., Polypharmacologie des récepteurs aux acides gras : Activité *in vitro* de nouveaux agonistes mixtes PPAR γ , GPR40 et GP120. *Université de Sherbrooke Symposium*, Sherbrooke, Québec, Canada, 2010.

*Gravel S., Malouf C., **Boulais P.E.**, Berchiche Y.A., Tamamura H., Fujii N., Leduc R., Sinnott D., Heveker N., The peptidomimetic CXCR4 antagonist, TC14012, recruits β -

arrestin to CXCR7. *Gordon Research Conferences : Chemotactic cytokines*, Lucca (Barga), Italy, 2010.

*Lefrançois M., Lefebvre MR., Saint-Onge G., **Boulais, P.E.**, Cabana J., Lamothe S., Leduc R., Lavigne P., Heveker N., Escher E., Caractérisation d'agonistes synthétiques pour le récepteur CXCR4, *Sherbrooke-Montpellier Symposium*, Sherbrooke, Qc, 2010

*Lefrançois M., **Boulais, P.E.**, Lefebvre MR., Saint-Onge G., Gravel S., Heveker N., Escher E. Characterization of new CXCR4 ligands based on T140. *Club de recherches cliniques du Québec Symposium*, Bromont, Qc, 2010

Lefebvre M-R., Saint-Onge G, **Boulais P.E.**, Gravel S., Leduc R., Lavigne P., Heveker N., *Escher E., Synthetic CXCR4 agonists with SDF1-like chemotactic activity, *31st European Peptide Symposium*, Copenhagen, Denmark, 2010.

Lefebvre M-R., Saint-Onge G, **Boulais P.E.**, Gravel S., Leduc R., Lavigne P., Heveker N., *Escher E., Synthetic Agonists for the CXCR4 Chemokine Receptor, *4th International Congress of Natural Peptides to Drugs*, Zermatt, Switzerland, 2010.

***Boulais P.E.**, Dulude D., Cabana J., Heveker N., Escher E., Lavigne P., Leduc R., Identification des domaines de liaison du CXCR4, *CIHR Team in GPCR Allosteric Regulation (CTiGAR) Meeting*, Montréal, Québec, Canada, 2009

***Boulais, P.E.**, Lavigne P., Escher E., Leduc R., Identification of ligand binding domains on CXCR4 domains using photoanalogs of T140. *9TH Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires..* Bromont, Québec, Canada, 2008.

***Boulais, P.E.**, Lavigne P., Escher E., Leduc R., Identification of ligand binding domains on CXCR4 domains using photoanalogs of T140. *Keystone Symposia Conference on G Protein-Coupled Receptors: New Insights in Functional Regulation and Clinical Application..*, Killarney, Co. Kerry, Ireland, 2008.

***Boulais, P.E.**, Lavigne P., Escher E., Leduc R., Identification des domaines de liaison du CXCR4 en utilisant des photoanalogueues du T140. *Faculty of Medicine Symposium, 37th Edition*, Sherbrooke, Québec, Canada, 2008.

***Boulais, P.E.**, Escher E., Leduc R., Labeling the CXCR4 receptor using photoaffinity ligands of T140, an orthosteric antagonist. *8TH Annual Joint Meeting of the Great Lakes G Protein-Coupled Receptor Retreat and le Club des Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires..* London, Ontario, Canada 2007.

***Boulais, P.E.**, Escher E., Leduc R., Labeling the orthosteric pocket of CXCR4 using photoanalogs of T140, *CIHR Team in GPCR Allosteric Regulation (CTiGAR) Meeting*, Montréal, Québec, Canada 2007.