

NNT 2016SACLS550

 université
PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE

Innovation thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué

Instituts
thématiques 

 Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Thèse de doctorat
De
L'Université Paris-Saclay

Ecole Doctorale n° 569

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

Spécialité de doctorat :

IMMUNOLOGIE ET BIOTHÉRAPIES

Présentée par

Pasquale CUTOLO

Etude de l'interaction structurelle et fonctionnelle entre la chimiokine
CXCL12 et ses récepteurs : CXCR4 et ACKR3/CXCR7

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 16 septembre 2016

Composition du Jury :

Françoise BACHELERIE
Esther KELLENBERGER
Eric REITER
Philippe DETERRE
Thierry DURROUX
Sandrine ONGERI

DR, Inserm UMR-S 996, Clamart
Prof., Faculté de Pharmacie de Strasbourg
DR, INRA, Tour
DR, Inserm UMR-S 945, Paris
DR, CNRS – IGF, Montpellier
Prof. de l'Université Paris-Saclay

Directrice de thèse
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examinatrice

Etude de l'interaction structurelle et fonctionnelle entre la chimiokine CXCL12 et ses récepteurs : CXCR4 et CXCR7/ACKR3

L'axe formé par la chimiokine CXCL12 et son récepteur CXCR4 est conservé chez les vertébrés où il joue un rôle important dans l'embryogenèse et la vie adulte, et régule de nombreux processus des réponses immunitaires grâce à ses fonctions dans la migration cellulaire, la survie et la prolifération. En outre, cet axe est impliqué dans les processus pathologiques tels que les cancers (croissance et métastase) et immunodéficiences, ainsi que des dysfonctionnements (par exemple l'expression dérégulée, polymorphismes ou mutations) et il est également détourné par certains agents pathogènes (par exemple le virus de l'immunodéficiences humaine, virus du papillome humain).

Un grand groupe de travail est consacré à cette paire comme cible thérapeutique, mais seulement un composé (Plérixafor) a atteint l'approbation pour une utilisation clinique, faisant du potentiel de cet axe une cible des médicaments encore inexploré.

Bien que cet axe est l'objet d'un grand intérêt, des questions demeurent quant aux déterminants structurels impliqués dans l'interaction CXCL12/CXCR4. La structure cristalline de CXCR4, résolue en 2010, a été une percée majeure bien qu'elle ait laissé de nombreuses questions sans réponse telles que les déterminants, la stochiométrie et les mécanismes de l'interaction entre le récepteur CXCR4 et son ligand CXCL12.

De plus, malgré le grand intérêt pour la structure tridimensionnelle de CXCR4, très peu d'informations structurelles sont connues sur CXCR7/ACKR3, le second récepteur récemment découvert de CXCL12. Ce récepteur est un autre acteur clé de la signalisation dépendante de CXCL12/CXCR4 et contribue à la formation d'un gradient fonctionnel de CXCL12 par son activité de « balayage ». Bien que, en accord avec cette fonction, CXCR7/ACKR3 se comporte comme un récepteur atypique qui ne parvient pas à activer les protéines G lors de la liaison avec son agoniste (CXCL11 ou CXCL12), il active la signalisation des MAPK via le recrutement des β -arrestines et peut ainsi contribuer aux fonctions CXCL12-dépendantes.

Outre la formation du gradient de CXCL12, CXCR7/ACKR3 a également la propension à modifier la signalisation dépendante de CXCR4 (protéines G et β -arrestines) par des hétérodimères avec CXCR4, dont la formation en environnement endogène reste néanmoins une question ouverte. Le rôle de CXCR7/ACKR3 dans les fonctions CXCL12-dépendantes et, derrière, son importance dans les processus physiologiques et pathologiques, ont stimulé la recherche à se consacrer sur ce récepteur atypique. Cependant, les connaissances restent limitées, notamment en ce qui concerne les aspects moléculaires liés à la liaison et à la signalisation de l'axe CXCL12-CXCR7/ACKR3.

Ce projet de thèse a été développé en trois parties :

1. La résolution des possibles formes stochiométriques de l'interaction CXCR4/CXCL12 (modélisation moléculaire, docking et dynamique);
2. L'étude et la caractérisation de nouveaux outils innovants pour la détection de l'oligomérisation de ces récepteurs en conditions endogènes. (Nanobodies, HTRF);

3. La modélisation de la structure du récepteur CXCR7/ACKR3 et son interaction avec CXCL12 (homology modeling et docking), avec caractérisation des domaines et des résidus clef de l'activation des la signalisation en aval du récepteur (mutants CXCR7/ACKR3).

Partie 1

Le premier objectif de mon projet de thèse était de modéliser la stochiométrie de l'interaction CXCR4/CXCL12 à partir de la structure cristalline du récepteur, sous forme de monomère et dimère. Pour générer un modèle complet de la structure de CXCR4 en interaction avec la chimiokine CXCL12 nous avons utilisé des outils de modélisation moléculaire : peptide-peptide docking et simulations de dynamique moléculaire. Notre but était d'étudier les différences de stabilité, d'interaction et de conformation en comparant la structure du modèle de la stochiométrie 1:1 par rapport à celle 2:1. Par conséquent, nous avons concentré notre attention sur les résidus de CXCR4 qui se sont révélés importants pour la liaison et l'activation des protéines G, en analysant les distances et les positions entre l'extrémité N-terminale de la chimiokine (Lys1 et Pro2) et les résidus clé du récepteur (Asp97, Asp187 et Glu288).

La simulation en dynamique moléculaire de l'un des complexes 1:1 converge vers une conformation dans laquelle l'extrémité N-terminale de la chimiokine occupe principalement la sous-poche secondaire transmembranaire du récepteur, les résidus de chimiokine Lys1 et Pro2 forme des contacts stables avec les résidus Asp97, Asp187 et Glu288. Ces résultats sont cohérents avec la plupart des études de mutagenèse dirigée sur CXCR4, ainsi qu'avec la structure cristallographique de CXCR4 en complexe avec la chimiokine virale vMIP-II.

Motivée par l'hypothèse soulevée sur les dimères de CXCR4, nous avons ensuite généré un complexe CXCR4-CXCL12 2:1 très stable, dans lequel le corps de la chimiokine couvre partiellement la cavité de l'un des deux protomères CXCR4. Dans ce modèle, on trouve que l'extrémité N-terminale de la chimiokine est située dans la sous-poche secondaire transmembranaire de l'autre protomère, avec des contacts très stables entre les résidus clés du récepteur (Asp97, Asp187 et Glu288) et les premiers résidus CXCL12 (Lys1 et Pro2). De façon plus générale, nos résultats ont démontré que le CXCR4, en forme de monomère et dimère, peut se lier à une chimiokine monomère CXCL12 d'une manière (c'est-à-dire avec son extrémité N-terminale dans la cavité transmembranaire) qui serait fonctionnelle en ce qui concerne le déclenchement des activités de signalisation CXCR4.

Partie 2

Le deuxième objectif de mon travail de thèse a été de caractériser de nouveaux outils pour étudier la biologie de CXCR4 sur les systèmes natifs et les tissus. Nous avons choisi d'étudier trois clones différents de nanobodies (NBs) ciblant les domaines extracellulaires de CXCR4, en raison de leur haute affinité et de leur sélectivité qui peuvent servir d'excellents outils de diagnostic et, potentiellement, de thérapeutique. Ils combinent les avantages des petites molécules (par exemple, liaison à la cavité, coûts de production faibles) et mAb (par exemple, une affinité et une spécificité élevées). Nous avons effectué des expériences in vitro et

in silico afin de décrire leur activité pharmacologique sur les voies de signalisation de CXCR4 et leur mécanisme d'interaction avec le récepteur. Nos études ont révélé que les NBs présentent différentes capacités à s'associer à CXCR4 et à moduler la signalisation induite par CXCL12, ce qui se traduit par des effets antagonistes et agonistes différentiels sur l'internalisation de CXCR4 et la migration cellulaire dépendante, soulignant ainsi leur utilité comme nouveaux outils pour étudier CXCR4.

Le ciblage de l'activité du récepteur CXCR4 présente un potentiel énorme en recherche et en thérapeutique étant donné les rôles importants des voies de signalisation mobilisées par l'engagement de CXCL12-CXCR4 dans la régulation d'une vaste gamme de processus physiologiques et pathologiques. Cette diversité, cependant, complique le développement de médicaments et soulève des préoccupations pour les effets secondaires de l'utilisation à long terme des antagonistes. Pour le seul antagoniste CXCR4 approuvé en clinique, AMD3100, pour la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques, son utilisation dans les maladies chroniques est entravée par la possibilité d'apparition d'effets indésirables. Les structures cristallines récemment résolues de CXCR4 ont fourni un support pour le modèle à deux sites de CXCL12 se liant à CXCR4 qui sépare les fonctions de liaison et de signalisation de CXCL12. Il existe un intérêt croissant pour le développement de modulateurs allostériques capables d'agir indépendamment ou en coopération avec le ligand endogène pour stabiliser ou potentiellement induire des changements conformationnels. Nos observations suggèrent que NB1 et NB2 inhibent l'activation de la protéine G- α -i et le recrutement de la β -arrestine 2 par différents mécanismes. Bien que le NB1 affiche un comportement compétitif pour CXCL12 dans les expériences de liaison, NB2 n'a pas concurrencé CXCL12 ouvrant la possibilité qu'il se lie à d'autres régions du récepteur agissant ainsi comme un antagoniste allostérique. A l'appui de cette possibilité, des expériences visant à modéliser les complexes NB / CXCR4 ont indiqué que le NB1'CDR pouvait interagir au sein du CRS2 du récepteur tandis que le NB2'CDR interagirait le plus favorablement avec la boucle extracellulaire 2 (ECL2) de CXCR4. Par conséquent, compte tenu de la capacité signalée des récepteurs à résider dans un réseau de conformations, NB2 pourrait stabiliser des récepteurs spécifiques qui ne sont pas conducteurs au couplage effecteur et conduiraient à une inhibition de la signalisation CXCR4. Cette hypothèse est étayée par nos conclusions selon lesquelles la capacité de NB2 à inhiber le recrutement de la β -arrestine 2 et l'internalisation de CXCR4 induite par CXCL12 est associée à une interférence dans la cinétique d'activation induite par CXCL12 des complexes CXCR4 / G- α -i, conduisant à la stabilisation des états conformationnels qui pourraient échouer la désensibilisation.

Le fait que le NB3 non compétitif n'interfère pas avec le recrutement de la β -arrestine 2 induite par CXCL12, mais a néanmoins inhibé l'internalisation de CXCR4 induite par CXCL12 avec la même amplitude que NB2 peut s'expliquer par son effet agoniste sur l'activation ERK1 / 2 qui peut impliquer donc la stabilisation de certaines conformations des complexes actifs CXCR4 / G- α -i1 spécifiques. Ce comportement rappelle la découverte que la signalisation de la β -arrestine peut se produire indépendamment de l'activation de la protéine G, ce qui conduit au concept que la voie de signalisation spécifique d'un récepteur peut être pharmacologiquement isolée, appelée sélectivité fonctionnelle ou agonisme ou antagonisme biaisé.

NB3 peut inhiber l'internalisation de CXCR4 induite par CXCL12 tout en augmentant l'activité de CXCL12 dans la promotion de la chimiotaxie des lymphocytes T suggérant que le biais observé peut être lié à des interactions sélectives entre la β -arrestine et CXCR4. En effet, l'activité du NB3 confirme que l'exigence de la β -arrestine dans la chimiotaxie dépendante de CXCR4 n'est pas liée au rôle de la β -arrestine dans l'internalisation des récepteurs mais plutôt aux voies de signalisation dépendantes de la β -arrestine associées à l'activation de ERK1 / 2, au recrutement de molécules impliquées dans la réorganisation du cytosquelette et à la liaison de la β -arrestine au récepteur ICL3. Ici, les changements de conformation dans les complexes de protéines CXCR4 / G-alpha-i qui se sont produits en présence de NB3 peuvent sous-tendre la stabilisation des conformations actives du complexe, en accord avec le fait que la chimiotaxie dépendante de CXCR4 nécessite également l'activation des protéines G. Bien que d'autres travaux, y compris avec des récepteurs mutants pour l'expression et / ou l'activation, seront nécessaires pour délimiter les mécanismes moléculaires régissant ce biais, NB3 représente un outil original pour disséquer l'importance relative des voies de signalisation spécifiques en aval CXCR4 et approfondir notre compréhension de CXCR4 physiopathologie. Les NBs ciblant l'ECL2 de CXCR4 ont été signalés comme étant des antagonistes puissants des voies de signalisation dépendantes de CXCR4 et de sa fonction et affichent une application thérapeutique potentielle dans des maladies associées à CXCR4. Outre la capacité des trois NBs à moduler positivement ou négativement la chimiotaxie des lymphocytes T murins primaires, ils fournissent de nouveaux outils pour analyser la contribution des voies dépendantes de CXCR4 aux processus physiologiques, mais représentent également des outils thérapeutiques potentiels dans les modèles murins de maladies humaines causées par le dysfonctionnement CXCR4.

Partie 3

La troisième partie de mon projet de thèse a été centrée sur la modélisation de la structure et l'analyse de CXCR7/ACKR3 et l'étude comparative avec l'interaction CXCR4/CXCL12. Nous avons d'abord proposé un modèle de la structure tridimensionnelle de CXCR7/ACKR3 en utilisant la modélisation par homologie, puis analysé les mécanismes d'interaction possibles avec CXCL12, par couplage peptide-peptide et simulation de dynamique moléculaire, pour étudier les déterminants moléculaires de cette interaction. Nous avons pu identifier deux résidus possibles de CXCR7/ACKR3 impliqués dans l'interaction avec CXCL12 et inversement les résidus à l'extrémité N-terminale de CXCL12 importants pour la liaison et l'activation de CXCR7/ACKR3. Avec ces connaissances ainsi que celle des résidus CXCR4 importants pour l'activation des protéines G induites par CXCL12, nous avons réalisé des études de mutagenèse sur les domaines CRS1 et CRS2 hypothétiques de CXCR7/ACKR3 pour comparer l'interaction et les propriétés de signalisation de l'engagement CXCL12 à ses deux récepteurs. Nos résultats ont confirmé l'importance de l'extrémité N-terminale de CXCL12 pour l'interaction et l'activation de ses récepteurs et ont donné de nouvelles connaissances sur les résidus impliqués dans l'interaction entre CXCL12 et CXCR7/ACKR3, montrant non seulement les déterminants potentiels de l'interaction, Des résidus de récepteurs pour polariser les voies d'activation consécutives. Dans notre cas, la modification des résidus D179 et D275 de CXCR7/ACKR3,

modélisée en interaction avec le N terminale de CXCL12, est capable d'inverser complètement la signalisation en aval de CXCR7/ACKR3 lorsqu'ils sont mutés en alanine. Par conséquent, la possibilité d'activer la protéine G peut être la conséquence d'une réorganisation des hélices trans-membranaires due à une conformation différente du complexe CXCL12-CXCR7/ACKR3. De plus, le motif DRYLAIV semble ne pas être essentiel pour l'activation de la protéine G, expliquant l'incapacité dans d'autres études avec mutations du DRYLAIV de CXCR7/ACKR3 à activer la voie des protéine G.

Pour affirmer nos résultats, nous devons étudier nos modèles d'interaction par des simulations de dynamique moléculaire et améliorer nos résultats sur l'activation des protéine G et arrestines. Tout d'abord, les simulations de dynamique moléculaire seront performées pour les complexes entre CXCL12 et le récepteur sauvage, alors il sera intéressant d'analyser les conformations du complexe en utilisant les analogues K1R et P2G de CXCL12 et les mutants CXCR7 LAIDDE et D179A-D275A. Des expériences en transfert d'énergie par bioluminescence (BRET) entre le mutant D179A-D275A et la sous-unité G alpha-i ou la β arrestine 2 peuvent nous permettre de montrer des différences de conformation et de recrutement. D'autre part, nous avons besoin de plus de résultats dans la liaison de CXCL12 sur le mutant D275A pour confirmer son implication dans l'interaction avec le Val4 N-terminal de CXCL12.

Conclusion

Le développement d'un certain nombre d'inhibiteurs puissants de l'axe CXCL12-CXCR4-CXCR7/ACKR3, qui ont une faible toxicité, a ouvert la possibilité que les recherches visant à perturber cet axe auront un bénéfice thérapeutique. Alors que la plupart des études en sont encore à leurs balbutiements, il y a un grand espoir que les agents qui modulent l'axe CXCL12/CXCR4 ou CXCL12-CXCR7/ACKR3 seront utiles en clinique. L'utilisation d'inhibiteurs du complexe CXCL12/CXCR4 dans le traitement du cancer a produit des données précliniques encourageantes, toutefois, pour être réellement efficace, une meilleure compréhension du rôle de CXCL12 et CXCR4 ou CXCR7/ACKR3 dans la tumorigénèse et leurs autres fonctions est nécessaire, ainsi qu'une meilleure connaissance des déterminants moléculaires de cet axe.

Ensemble, les résultats de mon projet de thèse permettront d'une part de mieux comprendre les déterminants structuraux de l'interaction CXCL12/CXCR4 et CXCL12-CXCR7/ACKR3 et de comparer les différents mécanismes de l'interaction entre CXCL12 et ses deux récepteurs, et aussi d'avoir des nouveaux outils innovants pour l'étude de la biologie de ces récepteurs.

Pasquale CUTOLO