

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé ED_414
**EA3430 : Progression tumorale et microenvironnement. Approches
translationnelles et Epidémiologie**

THÈSE présentée par :

Radhia BENBRIKA

soutenue le **12 Décembre 2018**

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

**Etude des Mécanismes Impliqués dans le Processus
Métastatique dans le Cancer Colique Humain: Implication de
l'Axe CXCL12/CXCR4/CXCR7**

THÈSE dirigée par :

Madame GUENOT Dominique DR, INSERM U1113, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur BALABANIAN Karl CR, INSERM UMR_S996, Paris
Madame PLATEROTI Michelina DR, INSERM UMR_1052, Lyon

EXAMINATEUR

Monsieur ROMIER Christophe DR INSERM, IGBMC, Strasbourg

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury de cette thèse, Madame le docteur Michelina PLATEROTI, Monsieur le docteur Karl BALABANIAN, Monsieur le docteur Christophe ROMIER, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer mon travail. Je remercie également chaleureusement Monsieur le docteur Erwan Pencreach pour son enthousiasme et ses conseils avisés.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à ma directrice de thèse, le Docteur Dominique GUENOT, sans qui rien n'aurait été possible. Elle m'a fait confiance en me recrutant et a maintenu sa confiance pendant toute la période de ma thèse. Elle a su me guider, me diriger, me motiver, et optimiser mes compétences et performances. Elle a toujours gardé sa porte ouverte pour moi, même si nous avons eu des moments difficiles, notamment pendant ma grossesse, elle a toujours su trouver les mots et arguments pour nous permettre d'accomplir ce projet de recherche. Elle m'a aussi permis d'être libre et autonome, et pour tout cela ma thèse fut une expérience formidable. Dominique, pour tout ce que vous m'avez appris, UN GIGANTESQUE MERCI.

Me voilà maintenant arrivée au moment où je regarde derrière moi avec un peu de mélancolie et beaucoup de nostalgie. C'est là que je réalise que le travail que j'ai accompli n'aurait pas été possible sans les personnes qui ont été à mes côtés tout au long de cette période.

Je remercie Elisabeth, Audrey, Cyril, Christelle et Aurélie pour tout ce que j'ai appris à leur contact et leur sympathie quotidienne. Car débiter une thèse dans une ville que je ne connaissais pas et à l'étranger, était pour moi une véritable aventure. Par chance, j'ai trouvé des gens formidables qui m'ont immédiatement mis à l'aise. Ils ont répondu à mes questions (qui étaient nombreuses), m'ont orientée et j'ai pu compter sur eux à chaque fois que j'en ai eu besoin. Ils m'ont tout simplement montré comment fonctionne un laboratoire de recherche.

Je remercie également les membres du laboratoire INSERM 1113 qui m'ont accueillie pour que je puisse réaliser ma thèse en ayant accès au matériel et à l'infrastructure. Je remercie particulièrement Jean-Noël, Isabelle et Isabelle, Claire, Christian et Georg ainsi que toutes les personnes qui m'ont encouragé et ont entretenu ma détermination avec leurs questions pertinentes, leurs remarques justes et l'orientation qu'ils ont donné au projet. Je n'oublie pas le soutien bienveillant de Michèle, Pierre et Solène pour leur aide à l'animalerie.

Dès mes premiers jours, j'ai eu l'occasion de suivre des expériences avec quasiment tout le monde. Tout particulièrement avec Damien qui fait preuve de rigueur et d'une dévotion sans faille pour la science. Nous avons longuement travaillé ensemble, aussi bien sur des techniques maîtrisées au laboratoire que sur des techniques que nous avons mises au point à partir de zéro. Je te remercie infiniment pour toutes nos discussions (scientifiques ou pas), tes conseils, tes astuces, de m'avoir suivie lors des manip *in vivo* souvent compliquées et que j'étais incapable de réaliser seule, pour tout cela et bien plus, MERCI.

Je remercie aussi Anne Florence. Bizarrement, je pense que la grande partie de nos discussions ont eu lieu à la cafétéria, lors de la pause déjeuner/café. Ces discussions m'ont permis, certes de m'améliorer d'un point de vue scientifique, mais nos sujets de discussion étaient variés et parfois même philosophiques, sans aucune limite!

Je remercie aussi Léonor, la personne que j'appelais au secours à chaque fois que j'avais des questions administratives et (comme par magie) elle gérait les choses qui me paraissaient bien compliquées avec une totale sérénité.

Je remercie aussi tous les doctorants, ingénieurs, techniciens, post doctorants et stagiaires, que j'ai pu croiser durant cette période, et qui ont mis une bonne ambiance dans mes journées au laboratoire.

Je pense que je pourrai écrire plusieurs pages sur chaque membre de l'unité Inserm 1113, car chacun à sa façon, a participé à mon parcours. J'ai partagé avec vous une période importante de ma vie et cela m'a permis de grandir. A vous tous Merci.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai collaboré pour aboutir à cette thèse : Patrice Laquerrière pour l'imagerie (IPHC), Laetitia POIDVIN pour les analyses bioinformatiques (ICube), Mélanie ROGIER et le Dr Bernardo REINA pour mon initiation à la technique Crispr-Cas9 (IGBMC).

Il faut aussi que je remercie la personne qui m'a été de la plus grande aide durant cette période, bien sûr mon époux Ramzi. Il m'a soutenue sans relâche, il m'a supportée quand je n'étais pas bien, il m'a remonté le moral quand je ne croyais plus en moi, il m'a encouragé quand j'en ai eu besoin. Il a su être à mes côtés durant ma grossesse et même si elle a été compliquée, sa présence m'a rassurée. Il m'a transmis sa force et grâce à lui j'ai surmonté les périodes les plus difficiles durant cette thèse. Tu es le meilleur et Merci.

Je remercie bien sûr ma famille, en commençant par mon père, qui a largement participé à mon parcours et qui m'a encouragée et aidée. Je sais que je ne pourrai jamais te rendre tout ce que tu as fait pour moi mais j'espère que tu seras fière de moi.

Je remercie ma maman qui a été un soutien morale et physique, elle a fait des milliers de kilomètres pour venir m'aider après mon accouchement compliqué. Elle est toujours d'un naturel optimiste et voit le bon côté dans toute chose. Ses conseils m'ont beaucoup aidé dans ma vie passée, actuelle, et je pense qu'elle va encore être d'une grande aide dans mon futur.

Je ne pourrais oublier mon rayon de soleil, ma petite fille Dina, qui a décidé de nous rejoindre pendant cette thèse. J'ai commencé cette thèse sans toi et je la finis avec toi à nos côtés, encore un signe que cette période a été une des meilleures et des plus importantes de ma vie. Je t'aime mon petit cœur.

Table des matières

	Introduction	1
1.	Généralités sur le cancer colorectal	2
1.1.	Physiologie du côlon	2
1.2.	Cancer colorectal : Epidémiologie	4
1.3.	Physiopathologie du cancer colorectal	5
1.3.1.	Les lésions précurseurs	5
1.3.1.1.	Les différents types d'adénomes	5
1.3.1.1.1.	Les adénomes conventionnels	7
1.3.1.1.2.	Les adénomes festonnés	7
1.3.2.	Les carcinomes colorectaux	7
1.4.	Classification des CCR (classification TNM)	9
1.5.	Facteurs de risque	9
1.5.1.	Risque moyen	9
1.5.2.	Risque élevé	9
1.5.3.	Risque très élevé	11
1.5.3.1.	Polypose adénomateuse familiale (FAP)	11
1.5.3.2.	Syndrome de Lynch (HNPCC)	12
1.5.4.	Syndromes rares	12
1.5.4.1.	Peutz-Jeghers syndrome (PJS)	12
1.5.4.2.	Serrated polyposis syndrome (SPS)	12
1.6.	Les autres facteurs de risque	12
1.6.1.	Facteurs épigénétiques	13
1.6.2.	Facteurs sociétaux et environnementaux	13
1.7.	Diagnostic	13
1.8.	Thérapies actuelles	14
1.8.1.	Résection de la tumeur primaire	14
1.8.2.	Résection des métastases	15
1.8.3.	Traitements du cancer colique	15
1.8.3.1.	Traitements des cancers de stade I à III	15
1.8.3.2.	Traitement des cancers de stade métastatique	15
1.9.	Carcinogénèse des CCR et mécanismes moléculaires	16
1.10.	Les trois formes d'instabilité du génome tumoral	18
1.10.1.	Le phénotype d'instabilité chromosomique CIN	18
1.10.1.1.	Origine et gènes cibles	20
1.10.1.2.	Impact clinique	20
1.10.2.	Phénotype d'instabilité des microsatellites	20
1.10.2.1.	Origine	22
1.10.2.2.	Gènes cibles	22
1.10.2.3.	Impact clinique	24
1.10.3.	Phénotype hyperméthylateur (CIMP)	24
1.10.3.1.	Origine	26
1.10.3.2.	Impact clinique	27

1.11.	Voies de signalisation impliquées dans le CCR	29
1.11.1.	Voie Wnt/wingless (ou voie APC/β-caténine)	29
1.11.2.	Voie PI(3)K/Akt/mTOR	29
1.11.3.	Voie RAS/MAPK	31
1.11.4.	Voie TGF-β/SMAD	31
1.11.5.	Voie p53	33
1.12.	Classification moléculaire des CCR	33
1.13.	Mécanismes et voies impliqués dans la formation des métastases	35
1.13.1.	La transition épithélio-mésenchymateuse	37
1.14.	Modèles animaux	39
1.14.1.	Modèles de carcinogenèse colique	39
1.14.1.1.	Carcinogenèse chimiquement induite	41
1.14.1.2.	Carcinogenèse génétiquement induite	41
1.14.1.2.1.	Modèles APC	41
1.14.1.2.2.	Modèles MMR	42
1.14.1.3.	Modes d'implantation tumorale	42
1.14.1.3.1.	Greffes ectopiques ou sous-cutanées	43
1.14.2.	Modèles de métastases coliques <i>in vivo</i> pour le CCR	43
1.14.2.1.	Greffes orthotopiques	43
1.14.2.2.	Injections intrasplénique et vasculaire	43
2.	Chimiokines et leurs récepteurs	45
2.1.	Généralités	45
2.2.	Les chimiokines, structure et classification	45
2.3.	Modifications post-traductionnelles des chimiokines	49
2.4.	Récepteurs des chimiokines	51
2.5.	Rôles des chimiokines	55
2.5.1.	Rôle dans le développement	55
2.5.2.	Migration cellulaire	55
2.5.3.	Inflammation	57
2.5.4.	Hématopoïèse	57
2.5.5.	Angiogenèse	58
2.5.6.	Les chimiokines dans l'intestin	59
2.6.	Chimiokines et cancer	60
2.6.1.	Progression tumorale	60
2.6.2.	Angiogenèse tumorale	61
2.6.3.	Processus métastatique	62
2.6.4.	Réponse immunitaire anti tumorale	62
2.7.	Les chimiokines dans le CCR	65
2.8.	La chimiokine CXCL12	65
2.8.1.	CXCL12 dans le CCR	66
2.8.2.	Récepteurs de la chimiokine CXCL12	66
2.8.2.1.	CXCR4	68
2.8.2.2.	CXCR7	69
2.8.2.3.	Rôle de CXCR4 et CXCR7 dans le CCR	71

2.8.2.4.	Signalisation dite équilibrée ou biaisée des récepteurs à 7 domaines transmembranaires	71
3.	Régulation de l'expression génique	73
3.1.	Régulation au niveau génomique	73
3.2.	Régulation épigénétique	74
3.2.1.	La méthylation et la déméthylation	76
3.2.1.1.	Les ADN méthyl transférases (DNMTs)	76
3.2.1.2.	Les histones lysine méthyl transférases (KMTs)	78
3.2.1.3.	Les ADN déméthylases	78
3.2.1.4.	Les histones déméthylases	78
3.2.2.	L'acétylation	79
3.2.2.1.	Les histones acétyl transférases (HAT)	79
3.2.2.2.	Les histones déacétylases (HDACs)	79
3.3.	L'épigénétique dans le CCR	81
3.4.	Régulation post-transcriptionnelle (miRNA)	83
3.5.	Régulation de l'expression des éléments de m'axe CXCL12-CXCR4/CXCR7 dans les pathologies	83
	Objectifs	86
	Matériel et méthodes	87
1.	Etude sur les tumeurs humaines	87
1.1.	Echantillons biologiques	87
1.2	Expression des ARNm	87
1.2.1	Extraction des ARN	87
1.2.2.	Qualification des ARNs	87
1.2.3.	Analyse de l'expression génique par PCR quantitative relative	87
1.2.3.1.	PCR quantitative relative	89
1.2.3.2	PCR Arrays	89
1.2.4.	Expression protéique dans les tumeurs par IHC	90
2.	Etude in vitro	90
2.1.	Lignées cellulaires	90
2.1.1.	Lignées coliques	90
2.1.2.	Autres lignées	92
2.2.	Invalidation des récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7	92
2.2.1	Principe de la technique CRISPR-Cas9	92
2.2.2.	Design des ARNg	95
2.2.3.	Clonage des ARNg	95
2.2.4	Transformation bactérienne	99
2.2.5.	Validation du clonage des ARNg	99
2.2.6.	Construction du vecteur final exprimant l'ARN guide et la Cas9	101
2.2.7.	Validation des vecteurs assemblés	101
2.2.8	Transfection cellulaire	101
2.2.9.	Tri cellulaire	103
2.2.10.	Dilution limite et culture des clones	103

2.2.11.	Validation des invalidations génomiques	103
2.2.11.1.	PCR génomique	103
2.2.11.2	Expression des ARNm	104
2.2.11.3.	Expression protéique	104
2.2.12.	Plasmides utilisés	104
2.2.12.1.	Plasmide lentiviral exprimant la luciférase	104
2.2.12.2.	Plasmides : pLP1, pLP2, and pLP/VSVG	106
2.2.12.3.	Plasmide contrôle EGFP	106
2.2.13.	Amplification des plasmides	106
2.2.13.1.	Préparation des bactéries compétentes	106
2.2.13.2.	Transformation bactérienne et purification plasmidique	107
2.2.14.	Transfection	107
2.2.15.	Transduction des particules virales	107
2.3.	Etude de la migration cellulaire in vitro	108
2.4.	Test de prolifération cellulaire	108
2.5.	Transfection directe de siRNA	108
3.	Souris immunodéficientes	109
3.1.1.	Nudes	109
3.1.2.	NSGs	109
3.2.	Types d'injection	109
3.2.1.	Model intrasplénique	109
3.2.2.	Modèle orthotopique	109
3.4.	Suivi des cellules tumorales humaines in vivo	110
3.4.1.	Détection par imagerie TEP-FDG	110
3.4.2.	Détection par chimiluminescence	110
3.5.	Histologie	110
3.5.1.	Coloration H&E	110
3.5.2.	Immunohistochimie	111
3.6.	Mise en culture de cellules dérivées de métastases hépatiques	111
3.6.1.	Dissociation et mise en culture	111
3.7.	Inclusion des sphères pour l'immunofluorescence	111
3.8.	Quantification des métastases par expression de séquences Alu	112
3.8.1.	Extraction d'ADN génomique des tissus murins	112
3.8.2.	PCR quantitative des séquences Alu	113

Résultats

	Partie I	114
1.	Introduction	114
2.	Publication	115
3.	Conclusion partie I	133
	Partie II Identification des gènes régulateurs des processus épigénétiques	135
1.	Expression évaluée par PCR Array	135

2.	Validation de la dérégulation des gènes sélectionnés par PCR Array dans la cohorte du CIT	137
3.	Etude de corrélation entre l'expression de CXCL12 et les gènes sélectionnés	139
	Conclusion partie II	139
	Partie III Rôle des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans la dissémination métastatique	141
1.	Invalidation de l'exon 2 des gènes codant CXCR4 et CXCR7	141
1.1.	Validation des KO par PCR génomique	141
1.2.	Validation des KO par la mesure de l'expression des transcrits	143
1.3.	Validation des KO par immunofluorescence	143
2.	Etude fonctionnelle des cellules invalidées pour CXCR7 ou CXCR4/CXCR7	143
2.1.	Migration <i>in vitro</i> en chambre de Boyden	143
2.2.	Effet sur la prolifération cellulaire	144
2.3.	Effet sur la dissémination métastatique <i>in vivo</i>	144
2.3.1.	Mise au point du modèle de développement de métastases <i>in vivo</i>	144
2.3.2.	Détection des tumeurs et des métastases	146
2.3.3.	Caractérisation des métastases	148
2.3.4.	Quantification des métastases par recherche des séquences Alu	150
2.3.4.1.	Mise au point de la quantification	150
2.3.4.2.	Quantification des métastases	150
	Conclusion partie III	151
	Discussion	152
	Conclusion générale	161
	Références bibliographiques	162
	Annexe	186

Liste des figures

Figure 1	Anatomie et histologie du côlon	1
Figure 2	Incidence du cancer colorectal dans le monde. WHO 2015.....	3
Figure 3	Cancer colorectal :Incidence et mortalité en Europe en 2015.....	3
Figure 4	Différents types histologiques des adénomes.....	6
Figure 5	De la muqueuse intestinale normale vers un adénocarcinome.....	6
Figure 6	Survie à 5 ans des patients ayant un CCR en fonction de la classification TNM et du stade clinique.....	8
Figure 7	Structure du gène codant la protéine APC et différents modèles de mutations germinales chez le rongeur	10
Figure 8	Altérations génétiques au cours de la progression du CCR	17
Figure 9	Schéma des différentes instabilités dans le CCR	19
Figure 10	Les voies moléculaires de carcinogenèse colorectale de phénotype CIN (ou MSS) et MSI (ou MIN)	21
Figure 11	Fréquences de mutations dans le CCR.....	21
Figure 12	Impact décisionnel du statut MSI sur la chimiothérapie adjuvante	23
Figure 13	Survie globale après traitement par immunothérapie	23
Figure 14	Phénotype CIMP : Hyper-méthylation des îlots CpG	25
Figure 15	Voie Wnt/APC/ β -caténine	28
Figure 16	Voie oncogénique PI3K/Akt/mTOR et RAS/MAPK	30
Figure 17	Voie du Transforming Growth Factor β (TGF β)	31
Figure 18	Classifications moléculaires des CCR	32
Figure 19	Résumé des résultats des quatre sous-types consensus	34
Figure 20	Associations clinicopathologiques et pronostiques des groupes de sous-types moléculaires consensus	34
Figure 21	Principales étapes du développement d'une tumeur et de la cascade métastatique	36
Figure 22	Processus de dissémination métastatique	36
Figure 23	Processus de dissémination métastatique	38
Figure 24	Transition épithélio-mésenchymateuse et dissémination métastatique	40
Figure 25	Sites de mutations APC dans différents modèles de souris APC	40
Figure 26	Structure type d'une chimiokine	46
Figure 27	Caractéristiques structurales de différentes classes de chimiokines et nomenclature	46
Figure 28	Le réseau des récepteurs de chimiokines humaines	50
Figure 29	Activation d'un récepteur de chimiokine conventionnel	52
Figure 30	Voies de signalisation associées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires	54
Figure 31	Représentation schématique du recrutement des leucocytes sur un site inflammatoire.	56
Figure 32	Cellules inflammatoires responsables du développement de la tumeur	63
Figure 33	Chimiokines qui participent aux interactions entre les cellules tumorales colorectales et les cellules myéloïdes dans le microenvironnement tumoral	63
Figure 34	Isoformes CXCR4-A et CXCR4-B	67

Figure 35	Évolution du concept d'agonisme	72
Figure 36	Les modifications apportées aux histones et à l'ADN affectent l'espacement des nucléosomes	75
Figure 37	Méthylation de l'ADN	77
Figure 38	Les différentes isoformes de HDAC	80
Figure 39	Mécanisme d'action des HAT et des HDAC	82
Figure 40	Méthode de quantification relative	88
Figure 41	La Cas9 in vivo: Immunité adaptative bactérienne	91
Figure 42	Différents mécanismes d'action du système CRISPR/Cas9 pour insérer ou déléter une séquence d'ADN à une localisation spécifique	93
Figure 43	Utilisation du système CRISPR/Cas pour éliminer une séquence d'ADN	94
Figure 44	Séquences en bases et localisation des ARNguides ciblant l'exon 2 du gène CXCR4	96
Figure 45	Séquence nucléotidique et localisation des ARNguides ciblant l'exon 2 du gène CXCR7	97
Figure 46	Vecteur de clonage pUC57	98
Figure 47	Étapes de construction des vecteurs pX234 et pX235	100
Figure 48	Tailles des fragments attendus lors de la digestion enzymatique des plasmides pX234 et pX235	100
Figure 49	Plasmide exprimant la luciférase pLenti CMV	105
Figure 50	Plasmides de la capsidie lentivirale (Plp1, pLP2, pLP/VSVG)	105
Figure 51	Plasmide pEGFP contrôle	105
Figure 52	: Scatter plots présentant les gènes surexprimés et sous exprimés	134
Figure 53	Résultats du transcriptome du CIT. Analyse de l'expression de l'ARNm de AURKA, DNMT3B, HDAC9 et RPS6KA5	136
Figure 54	Analyse de l'expression des ARNm	138
Figure 55	Corrélations entre l'expression de CXCL12 et : AURKA, DNMT3B, HDAC9 et RPS6KA5	138
Figure 56	Tri des cellules SW480 transfectées par pX234 et/ou pX235	140
Figure 57	Exemple de validation d'un clone délété pour l'exon 2 du gène codant CXCR7 (SW480-CXCR7KO) et d'un clone délété pour l'exon 2 des gènes CXCR4 et CXCR7	140
Figure 58	Marquage des récepteurs CXCR4 et CXCR7 par immunofluorescence dans les cellules SW480, SW480-dKO et SW480-CXCR7KO	142
Figure 59	Migration des cellules SW480 sauvages, SW480-CXCR7KO et SW480-dKO en chambre de Boyden	142
Figure 60	Mise au point du modèle de développement de métastases	145
Figure 61	Détection de cellules tumorales dans le caecum, le foie, les poumons et les ganglions lymphatiques	147
Figure 62	Métastases hépatiques de SW480	147
Figure 63	Courbe étalon pour la quantification des séquences Alu.....	149
Figure 64	Présence de métastases coliques humaines dans le foie et les poumons des souris injectées.....	149

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification des cancers colorectaux	8
Tableau 2	Liste des gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes impliqués dans le CCR	10
Tableau 3	Liste des gènes impliqués dans des formes héréditaires de CCR	17
Tableau 4	Différents panels de gènes proposés pour caractériser les CCR de phénotype CIMP	25
Tableau 5	Caractéristiques moléculaires des tumeurs CCR de phénotype CIMP	25
Tableau 6	Nomenclature des chimiokines, leur nom commun et de leurs récepteurs associés	44
Tableau 7	Récepteurs des chimiokines conventionnels et atypiques	48
Tableau 8	Références et séquences des amorces utilisées en PCR quantitative	88
Tableau 9	Séquences des oligonucléotides des ARN guides ciblant l'exon 2 des gènes CXCR4 et CXCR7 et utilisés pour la technologie Crispr-Cas9	94
Tableau 10	Amorces de PCR génomique pour la détection des délétions de l'exon 2 des gènes codant CXCR4 et CXCR7	102
Tableau 11	Couples d'amorces utilisés pour rechercher les délétions de l'exon 2 des gènes codant CXCR4 et CXCR7	102
Tableau 12	Gènes dérégulés dans les tumeurs par rapport à la muqueuse saine associée dans 30 tumeurs coliques humaines	135

Liste des abréviations

5FU: 5-fluorouracil	EGF: Epidermal Growth Factor
ACKR: Atypical chemokine Receptor	ELR: Motif Glu-Leu-Arg
ACVR2: activin type 2 receptor	EMT: transition épithélio-mésenchymateuse
ADN : Acide désoxyribonucléique	ERK: Extracellular signal-regulated kinases
AJCC - UICC : American Joint Committee on Cancer-Union internationale contre le cancer	EZH2: Enhancer of zeste homolog 2
AKT: Protéine Kinase B	FAP: polypose adénomateuse familiale
AMPC: Adénosine monophosphate cyclique	FDG-F ¹⁸ : fluorodeoxyglucose-F ¹⁸
AOM: azoxymethane	FGF: Fibroblast Growth Factor
APC: Adenomatous Polyposis Coli	FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor
ARN: Acide ribonucléique	Fos: Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
ARNm: ARN messenger	GADD45: Growth Arrest And DNA Damage Inducible
ATM: ataxia telangiectasia mutated	GDP: guanosine-diphosphate
ATP: Adénosine triphosphate	GRK: récepteurs kinases des protéines G
ATR: ATM- and Rad3 related	GSK3β: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
AURKA: Aurota kinase A	GTP: guanosine-triphosphate
BAX: Bcl-2-associated X	H&E : Hématoxyline Eosine
BMDC: bone marrow-derived cells	HAT: histone acetyl transferases
BRCA: BRCA1 and BRCA2	HDAC: histone déacetylases
BUB1: Budding Uninhibited By Benzimidazoles 1	HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer
CACNA1G: Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G	HRAS (p21): HRas Proto-Oncogene, GTPase
CBP: CREB Binding Protein	IFNα: Interferon Alpha
cCKR: conventional chemokine receptor	IGF2: Insulin Like Growth Factor 2
CCR: cancer colorectal	IL-10: interleukine-10
CD26: Cluster de différenciation 26	KAT2B (PCAF): Lysine Acetyltransferase 2B
CDKN2A(p16): Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A	KO: Knock out
Cdx2: Caudal Type Homeobox 2	KRAS: Kirsten rat sarcoma oncogene
CENPA: Centromere Protein A	LEF: Lymphoid Enhancer Binding Factor
c-fos: Fos Proto-Oncogene	LKB1: Liver kinase B1
CIMP: CpG Island Methylator Phenotype	LOH: Loss Of Heterozygosity
CIN: Chromosomal INstability	LUC: Luciférase
c-jun: Jun Proto-Oncogene	MAPK: mitogen activated proteins kinase
CMS: consensus molecular subtypes	Mdm2: Mouse double minute 2 homolog
c-MYC: Myelocytomatosis oncogene	MDSC: cellules myéloïdes suppressives
CRABP1: Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1	MGMT: O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat	MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
CSH: cellules souches hématopoïétiques	Min: Multiple Intestinal Neoplasia
CTC: cellules tumorales circulantes	MINT (SPEN): Spen Family Transcriptional Repressor
CTNNB1: Catenin beta 1	miRNA : Micro ARN
DARC: Duffy antigen/chemokine receptor	
DNMT: ADN méthyltransférase	

MLH1: MutL Homolog 1
MMP: métalloprotéinases matricielles
MMR: Mismatch Repair
MRE11: Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease
MSH: MutS Homolog 2
MSI: MicroSatellite Instability
mTOR: Mamalian target of rapamycin
MYH: MutY DNA Glycosylase
NEUROG1: Neurogenin 1
NK: Natural Killer
NRAS: Proto-Oncogene, GTPase
NSG: Nod Scid Gamma
O.C.T.: Optimal Cutting Temperature compound
PAM: protospacer adjacent motif
PBGD: porphobilinogène deaminase
PD-1: Programmed Cell Death 1
PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDX: Patient Derived Xenograft
PFA: Paraformaldéhyde
PLK1: polo-like kinase 1
pLP : Lentiviral packaging plasmide
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
PTTG: Pituitary Tumor-Transforming 1
RIN: RNA Integrity Number
RNF43: Ring Finger Protein 43
RUNX3: Runt Related Transcription Factor 3
SCID: Severe Combined ImmunoDeficiency
SDF-1: Stromal Cell Derived Factor 1
SIDA: syndrome d'immunodéficience acquise
SMAD: small body size
SSA: sessile serrated adenomas
STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
STK11: Serine thréonine kinase 11
SV40: Simian Virus 40
SVF: Sérum de veau foetal
TAM: Macrophage associés à la tumeur
TEM: Migration Trans Endothéliale
TEP: Tomographie par Emission de Postitons
TET: ten eleven translocation
TGF- β : transforming growth factor β
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TNM: Tumor, Nodes, Metastasis

TP53: Tumor protein 53
Treg: Lymphocyte T régulateur
TSA: traditional serrated adenomas
TWIST: Twist Family BHLH Transcription Factor 1
VEGF: Vascular endothelial growth factor
Wnt: Wingless-type
ZEB1: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

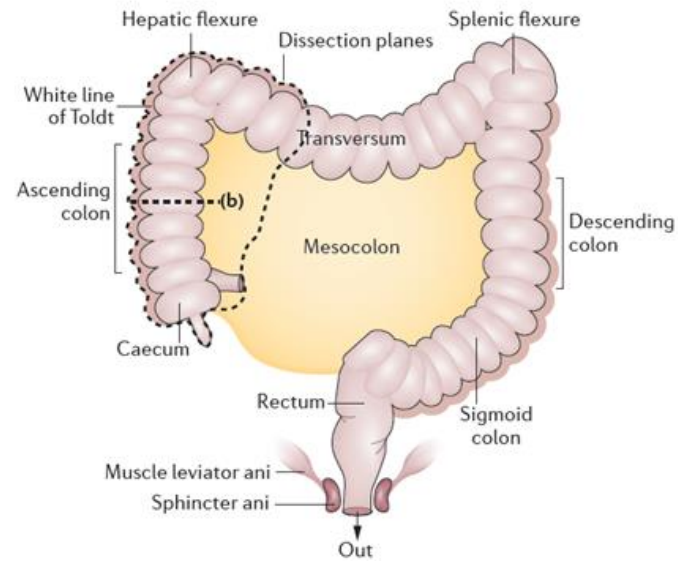
Avant-propos

Le cancer colorectal (CCR) est la deuxième cause de mortalité par cancer. Il cause près de 700 000 décès par an. Malgré les avancées thérapeutiques, ce taux de mortalité élevé est dû principalement aux métastases dans les organes à distance, notamment le foie et les poumons. La compréhension du processus de dissémination métastatique et les molécules impliqués dans ce processus, est nécessaire afin de développer des thérapies plus efficaces pour les stades cliniques avancées.

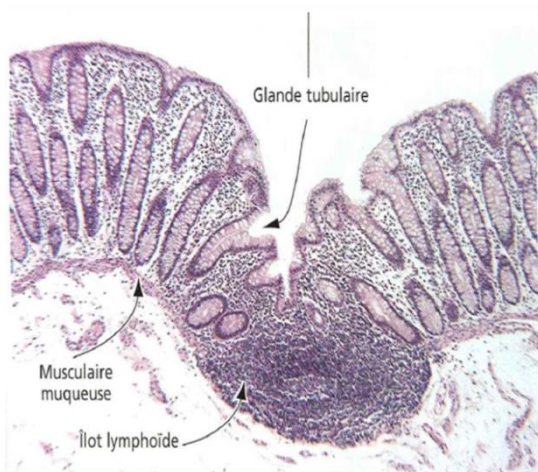
Plusieurs études ont montré l'implication des chimiokines et leurs récepteurs dans la dissémination métastatique de divers types de cancers. Parmi lesquels on cite la chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7. Dans cette étude, je me suis intéressée à l'implication de ce trio dans le processus métastatique colique en se basant sur des données déjà établies. D'abord, une perte d'expression de CXCL12 a été constatée dans les cellules tumorales coliques. Cette perte d'expression de CXCL12 est accompagnée d'une surexpression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans les stades tardifs. Ces données nous ont emmenés à émettre une hypothèse concernant la dissémination métastatique dans le cancer colique. En effet, les cellules tumorales coliques, qui perdent l'expression de CXCL12 et surexpriment les récepteurs CXCR4 et CXCR7, pourraient être attirées vers d'autres sites exprimant le ligand CXCL12 (foie et poumons par exemple) en suivant un gradient de concentration et former des métastases. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai choisi de suivre le schéma expérimental détaillé dans la figure ci-contre.

Introduction

A-



B-



C-

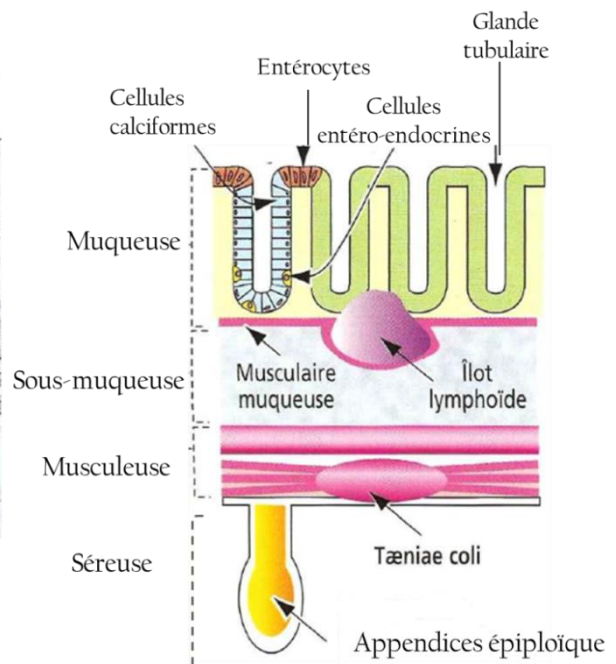


Figure 1 : Anatomie et histologie du côlon : A- Différentes parties du côlon.

Le côlon droit est constitué du caecum, côlon ascendant et du côlon transverse. Le côlon gauche est constitué du côlon descendant et du côlon sigmoïde. D'après Kuipers et al., 2015.

B-C- Coupe histologique du côlon.

On distingue 5 couches : la **muqueuse** constituée de glandes tubulaires ou cryptes elles-mêmes constituées de cellules entéro-endocrines, d'entérocytes et de cellules calciformes. La **musculaire muqueuse** interrompue par des îlots lymphoïdes qui pénètrent dans la **sous-muqueuse**. La couche **musculeuse** où se forment des « taenie coli » à partir de la fusion des couches musculaires longitudinales superficielles. La couche **séreuse** où on distingue des appendices épiploïques (Kierszenbaum, 2002).

1. Généralités sur le cancer colorectal

1.1. Physiologie et anatomie du côlon

Le tractus digestif se compose de l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le gros intestin et le rectum.

Le côlon est la partie du tube digestive qui est responsable de la transformation du reste de l'alimentation non digérée, puisque la majorité des nutriments sont absorbés dans l'intestin grêle. Il est constitué du caecum, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde (**Figure 1-A**).

Il a pour fonction la déshydratation du bol alimentaire (absorption de l'eau et des électrolytes), la digestion terminale de la cellulose, la production de plusieurs vitamines (B et K) par la flore intestinale et l'évacuation des déchets alimentaires. Le côlon permet également de former et propulser les fèces vers le rectum. La paroi du côlon est formée de quatre couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la couche musculaire et la séreuse (Azzouz and Sharma, 2018).

Dans l'épithélium de la muqueuse colique, dépourvu de villosités contrairement à l'intestin grêle, on distingue des glandes tubulaires ou cryptes de Lieberkühn, constituées de divers types cellulaires : principalement des cellules caliciformes ou cellules en gobelet ou mucipares qui sont responsables de la sécrétion de mucus servant à la lubrification et la protection de la surface de la muqueuse. On distingue également des entérocytes (ou cellules absorbantes) qui assurent l'absorption des ions et de l'eau. Enfin, on distingue les cellules entéro-endocrines qui produisent des hormones et des neuropeptides comme la somatostatine, la sérotonine et le glucagon, permettant de réguler le métabolisme des cellules intestinales, et les cellules souches intestinales localisées à la base des cryptes qui se divisent à un rythme constant pour renouveler l'épithélium tous les 4-5 jours (**Figure 1-B-C**) (Kierszenbaum, 2002).

La sous-muqueuse est un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que le plexus nerveux de Meissner.

La musculature est composée de 2 couches de cellules musculaires lisses, avec des discontinuités de la couche longitudinale externe qui forme des bandelettes antérieure et postérieures (tænia coli) reliées par de fins faisceaux musculaires longitudinaux. Entre les deux couches se trouve le plexus nerveux myentérique d'Auerbach et des cellules de Cajal (cellules « pacemaker » qui contrôlent le rythme du péristaltisme).

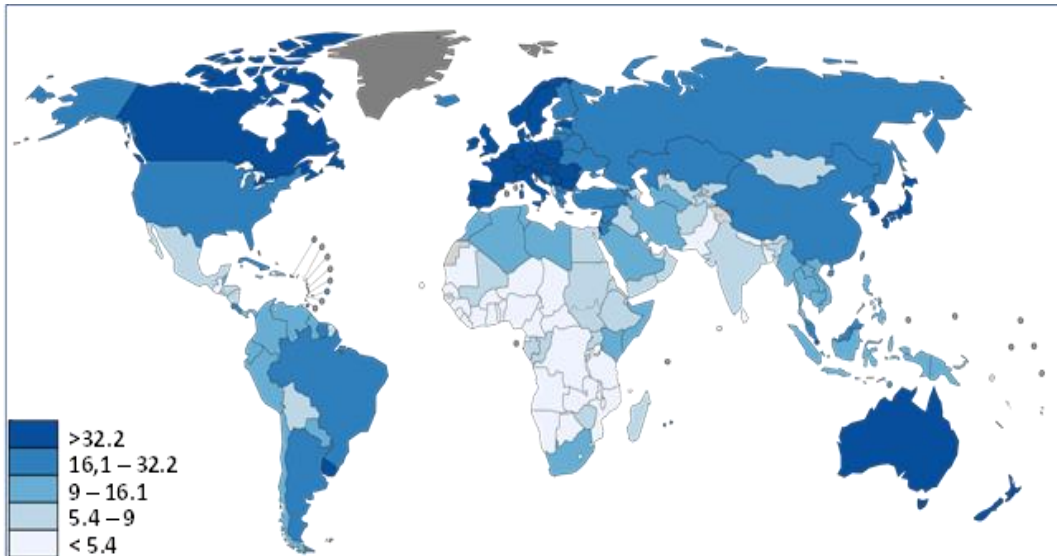


Figure 2 : Incidence du cancer colorectal dans le monde. WHO 2015. D’après Globocan 2017.

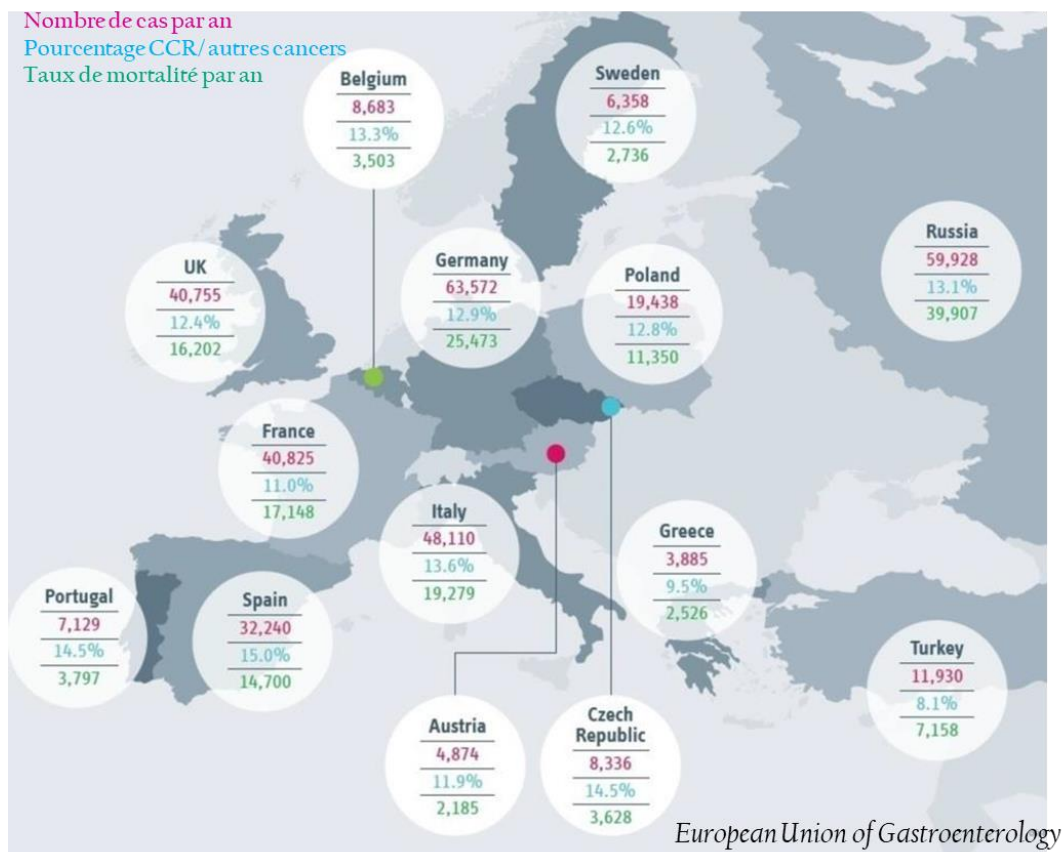


Figure 3 : Cancer colorectal. Incidence et mortalité en Europe en 2015. Union European Union of Gastroenterology

La séreuse contient des appendices épiploïques qui sont des excroissances de péritoine viscéral, remplies de graisse. Elles sont physiologiques mais, on ne connaît pas leur rôle. **(Figure 1-B-C)**.

Tout dysfonctionnement dans la physiologie du côlon ou du rectum peut détériorer la qualité de vie des individus et avoir des conséquences cliniques. Parmi les pathologies diverses qui touchent cette partie de l'intestin, le cancer colique (atteinte du côlon) ou cancer rectal (atteinte du rectum) est considéré comme la deuxième cause de mortalité par cancer (Recio-Boiles and Cagir, 2018). De façon générale, ces deux pathologies sont regroupées sous le terme de cancer colorectal (CCR).

1.2. Cancer colorectal : Epidémiologie

Le CCR est le troisième cancer le plus diagnostiqué avec 1,36 million de nouveaux cas estimés en 2012 dans le monde. Il est également considéré comme la quatrième cause de mortalité par cancer avec 694 000 décès par an selon de rapport de 2014 de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) (Bernard and Christopher, World Cancer Report, 2014), les taux étant nettement plus élevés chez les hommes que chez les femmes. Les incidences les plus élevées se trouvent en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Europe et en Amérique du Nord et récemment au Japon. Et les taux les plus faibles se trouvent en Afrique et en Asie centrale du Sud **(Figures 2-3)**. En France, le nombre de nouveaux cas estimés de cancer colorectal en 2015 est de 43 068. D'après les estimations de différentes études, ce nombre devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 45 000 nouveaux cas annuels en 2020 (source : Les cancers en France en 2016).

Soixante-cinq pour cent des nouveaux cas sont constatés dans les pays industrialisés, ce qui donne une probabilité de 4 à 5% de développer un cancer colorectal dans cette population (Mármol et al., 2017). En revanche, l'incidence est relativement basse dans beaucoup de pays africains. Mais elle augmente ces dernières années dans les pays qui sont en voie de développement (Bernard and Christopher, 2014). Ces données statistiques ne prennent pas en compte l'espérance de vie qui est plus élevée dans les pays industrialisés, la disponibilité des programmes de diagnostic précoce, les systèmes de santé plus développés dans certains pays et enfin la collecte de données statistiques plus au moins présentes selon les pays.

Cependant, le taux de mortalité a diminué ces dernières années, en partie, grâce au développement de nouvelles modalités thérapeutiques comme l'association des chimiothérapies à des thérapies ciblées. De même, un diagnostic plus précoce proposé pour les personnes de 50 ans et plus, par un test de dépistage immunologique permet la détection

de lésions précoces, qui seront ensuite confirmées ou invalidées par coloscopie (Mármol et al., 2017). La majorité des patients atteints d'un cancer sporadique sont âgés de plus de 50 ans. Parmi ces patients, 75% ont un cancer du rectum et pour ceux ayant un cancer colique, 80% ont 60 ans ou plus au moment du diagnostic (Kuipers et al., 2015).

1.3. Physiopathologie du cancer colorectal

Les tumeurs colorectales sont très hétérogènes et cette terminologie est indicative de la topographie seulement. En effet, le cancer peut se développer soit dans le côlon, soit dans le rectum. Il est important de connaître cette localisation puisque les approches thérapeutiques dans le côlon et le rectum sont différentes. De plus, les tumeurs du côlon droit et du côlon gauche sont biologiquement différentes, puisque chaque structure est d'origine embryologique différente, est irriguée et innervée de façon différente. De même, les caractéristiques moléculaires et la réponse aux traitements des tumeurs sont différentes.

La transformation maligne des cellules de la muqueuse colorectale nécessitent l'intervention de plusieurs facteurs qui vont perturber l'homéostasie cellulaire. En effet, une accumulation de mutations permet le passage d'une muqueuse saine à des lésions précancéreuses puis à un carcinome. Certaines de ces mutations sont acquises au cours de la vie de l'individu alors que l'autre partie peut être héritée. L'accumulation de ces mutations permet aux cellules d'acquérir des caractéristiques malignes leur conférant ainsi la résistance à l'apoptose, la capacité de prolifération, la survie, l'invasion et la capacité à former des métastases (Bernard and Christopher, 2014).

1.3.1. Les lésions précurseurs

1.3.1.1. Les différents types d'adénomes

Toute excroissance au-dessus de la muqueuse adjacente est communément appelée polype. Tout polype n'est pas précancéreux, seuls les adénomes sont néoplasiques. Initialement deux grands groupes étaient classiquement définis : les polypes adénomateux, dysplasiques et potentiellement précancéreux, et les polypes hyperplasiques, non néoplasiques. Mais dans les années 2000, avec la mise en évidence de polypes hyperplasiques qui peuvent être précurseurs de tumeurs, et à la présence d'anomalies moléculaires dans ces polypes (dont l'instabilité de microsatellites, des aberrations de méthylation, des mutations des oncogènes *BRAF* et *KRAS*), une nouvelle voie de carcinogenèse à partir de polype hyperplasique a été proposée, la voie « festonnée ou *serrated* ». A partir de ces observations, 2 grands groupes ont émergé: les adénomes conventionnels (ou adénomateux) et les adénomes festonnés incluant les polypes hyperplasiques et une diversité de polypes néoplasiques. Suivant les publications, de 65 à

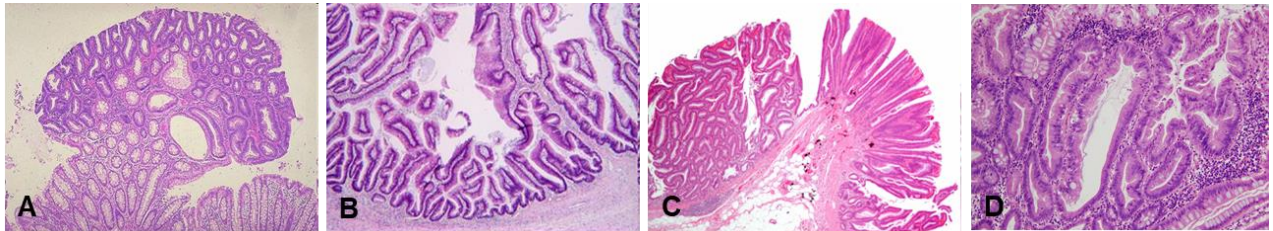


Figure 4: Différents types histologiques des adénomes. Coloration Hématoxyline Eosine de coupes tissulaires d'adénomes (A) Adénome tubuleux, (B) vilieux, (C) tubulo-villeux et (D) festonné.

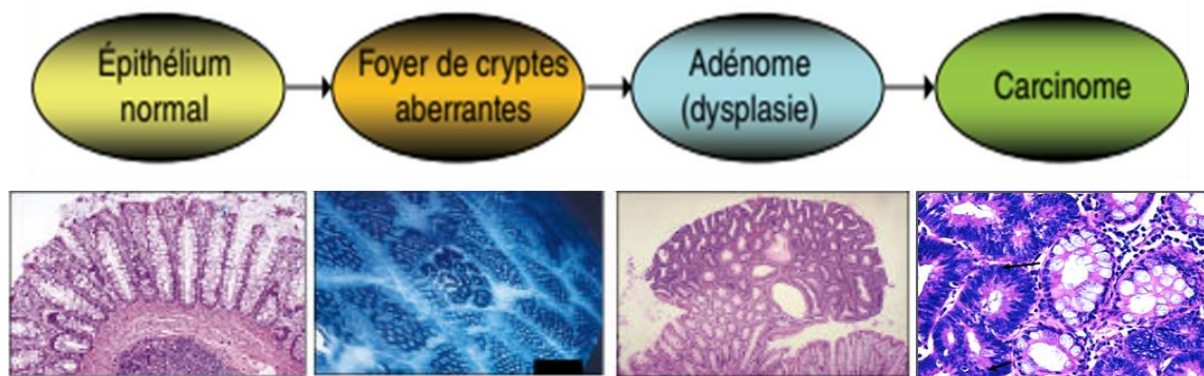


Figure 5: De la muqueuse intestinale normale vers un adénocarcinome. Coloration H&E de l'intestin normal, d'un foyer de cryptes aberrantes (FCA) d'un adénome tubuleux, d'un adénocarcinome.

90% des CCR proviendraient d'adénomes conventionnels et de 10 à 35% d'adénomes festonnés (Snover, 2011).

1.3.1.1.1. Les adénomes conventionnels

Trois grands types se distinguent (Fleming et al., 2012) (**Figure 4**):

- les tubuleux (75%). Ils sont les plus petits et les plus communs des adénomes mais sont les moins susceptibles de se transformer en cancer
- les tubuleux vilieux (20%). Ils présentent à la fois des caractéristiques de l'adénome vilieux et de l'adénome tubuleux. Le risque de se transformer en cancer semble être à mi-chemin entre celui de l'adénome vilieux et celui de l'adénome tubuleux
- les vilieux (5-10%). Ils ont le plus de risque de devenir cancéreux.

Le risque de cancer croît avec le nombre, la taille des adénomes (> 1 cm) et la proportion du contingent vilieux. La présence de foyers cancéreux dans un adénome est de l'ordre de 1 % dans les adénomes tubuleux, de 12 % dans les adénomes tubulo-vilieux et de 15 % dans les adénomes vilieux (Neuville et al., 2011; Snover, 2011).

1.3.1.1.2. Les adénomes festonnés

Les adénomes festonnés ont une morphologie en dent de scie. On distingue 3 grands types : les hyperplasiques non néoplasiques (HP), les "traditional serrated adenomas" avec une dysplasie cytologique (TSA) et les "sessile serrated adenomas" (SSA) qui ont une histologie festonnée mais ne présentent pas de dysplasie cytologique. Les tumeurs issues de ces adénomes ont des caractéristiques moléculaires et cliniques différentes puisqu'elles ont un moins bon pronostic et sont plus associées aux mutations de BRAF et KRAS et au phénotype d'instabilité de microsatellites (voir §1.10.2.). Les SSA sont plus associés à la mutation de l'oncogène BRAF, et les TSA à la mutation de l'oncogène KRAS (Liang et al., 2013).

1.3.2. Les carcinomes colorectaux

L'évolution vers la malignité d'une tumeur bénigne dans la muqueuse colique concerne 3% des adénomes (**Figure 5**). Plus de 95% des CCR sont des adénocarcinomes (du grec adéno qui signifie glande et carcino, cancer) dont 17% sont des adénocarcinomes colloïdes mucineux, un sous type d'adénocarcinome.

Les autres 5% de CCR sont :

- des tumeurs carcinoïdes originaires des cellules intestinales productrices d'hormones
- des tumeurs stromales gastrointestinales originaires des cellules interstitielles

A

T	Tis : Carcinome in situ : tumeur restreinte à la muqueuse (+/- envahissement du chorion) T1 : Envahissement de la sous muqueuse T2 : Envahissement de la musculuse T3 : Envahissement de la sous séreuse et/ou le tissu péri-rectal T4 : Envahissement des structures de voisinages
N	N0 : Pas d'envahissement ganglionnaire N1 : Envahissement de 1 à 3 ganglions régionaux N2 : Envahissement de 4 ganglions ou plus
M	M0 : Pas de métastases M1 : Présence de métastases à distance

B

Stades	T	N	M	Survie globale à 5 ans
I	T1 ou T2	N0	M0	>90%
IIa	T3	N0	M0	>80%
IIb	T4	N0	M0	72%
IIIa	T1 ou T2	N1	M0	83%
IIIb	T3 ou T4	N1	M0	64%
IIIc	Tout N	N2	M0	44%
IIId	Tout N	N3	M0	NR
IIIe	Tout N	N4	M0	NR
IV		Tout N	M1	<10%

Tableau 1: Classification des cancers colorectaux. (A) Classification TNM (UICC). **(B)** Nouvelle proposition de classification basée sur celle de l'AJCC (6 et 7ème éditions) et qui sous-classe le stade N en fonction du nombre de ganglions envahis : N1 (un à trois ganglions lymphatiques positifs), N2 (quatre ou cinq ganglions lymphatiques positifs), N3 (six à huit ganglions lymphatiques positifs) et N4 (neuf ganglions lymphatiques positifs ou plus) NR : non renseigné. La gradation en stades (I à IV) est associée à la survie globale à 5 ans prenant en compte la mortalité liée au cancer uniquement. (O'Connell et al., 2004).

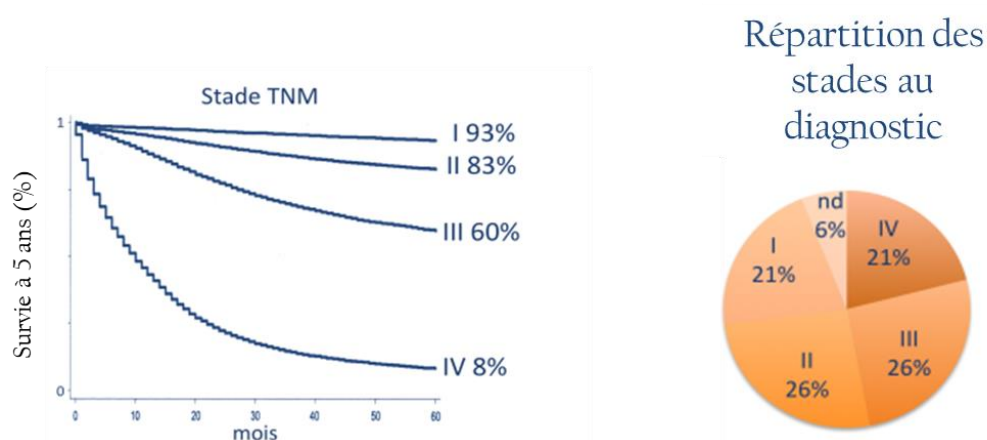


Figure 6 : Survie à 5 ans des patients ayant un CCR en fonction de la classification TNM et du stade clinique. D'après O'Connell et al., 2004

- des lymphomes qui se développent dans les organes lymphoïdes et notamment dans les ganglions lymphatiques.
- des sarcomes des tissus mous, ayant pour point de départ les vaisseaux sanguins mais occasionnellement se forment à partir de la paroi intestinale du côlon ou du rectum.

Un petit adénome mettrait 6 ans à devenir un adénome de plus de 1 cm; et cet adénome mettrait environ 17 ans à se transformer en adénocarcinome, puis environ 2 ans à acquérir les propriétés aboutissant à la dissémination métastatique (Jones et al., 2008).

1.4. Classification des CCR (classification TNM)

Afin de mieux caractériser les tumeurs et définir les besoins des patients en termes de thérapie, une classification des tumeurs est nécessaire. La classification dite « Tumor, Nodes, Metastasis » ou TNM est utilisée. Elle est basée sur 3 paramètres distincts : T qui définit la taille et l'extension de la tumeur (classification clinique et non pathologique), N pour « Lymph Node Metastasis » qui indique l'invasion des ganglions lymphatiques par les cellules tumorales et M pour « Distant Metastasis » qui indique des métastases dans les organes à distance (Bernard and Christopher, 2014); **Tableau 1A**). Il existe d'autres classifications que la classification TNM, par exemple la classification par stade (**Tableau 1B**) généralement exprimé par un chiffre romain allant de 0 à IV (O'Connell et al., 2004).

L'intérêt majeur de la classification TNM est sa forte association au pronostic puisque la survie à 5 ans est de 93% pour les stades I, 83% pour les stades II, 60% pour les stades III et seulement de 8% pour les stades IV (**Figure 6**) (O'Connell et al., 2004).

1.5. Facteurs de risque

Comme beaucoup de cancers, l'étiologie du cancer colorectal fait intervenir divers facteurs de risque environnementaux et d'autres liés aux caractéristiques individuelles, notamment les causes génétiques, les maladies chroniques, le mode de vie et l'âge (Mármol et al., 2017).

1.5.1. Risque moyen

Le risque moyen est attribué aux hommes et femmes ayant plus de 50 ans sans facteur de prédisposition connu (facteurs génétiques, antécédents). Dans ce cas, les facteurs environnementaux comme l'alimentation, l'hygiène de vie (pratique ou non d'une activité sportive) et la consommation d'alcool et de tabac influenceront le développement d'un cancer (Burt, 2007; Jasperson et al., 2010). Ces personnes sont surveillées dans le cadre d'un dépistage organisé.

1.5.2. Risque élevé

Gene or biomarker	Chromosome	Function	Molecular lesion	Frequency (%)	Predictive?	Prognostic?	Diagnostic?
Tumour suppressors							
APC	5	Regulates the WNT signalling pathway	Inactivating mutations	40–70	No	No	Familial adenomatous polyposis
ARID1A	1	Member of the SWI/SNF family, and regulates chromatin structure and gene transcription	Inactivating mutations	15	No	No	N/A
CTNNB1	3	Regulates the WNT signalling pathway	Activating mutations	1	No	No	No
DCC	18	Netrin receptor; regulates apoptosis, is deleted but not mutated in colorectal cancer, and its role in primary cancer is still unclear	Deletion or LOH	9 (mutation); 70 (LOH)	No	Possible	No
PTEN	10	Regulates the PI3K–AKT pathway	Inactivating mutations and loss of protein (assessed by immunohistochemistry)	10 (mutation); 30 (loss of expression)	Possible	No	Cowden syndrome [†]
SMAD4	18	Regulates the TGF β and BMP pathways	Inactivating mutations and deletion	25	Possible	Possible	Juvenile polyposis
TGFBR2	3	Regulates the TGF β pathway	Inactivating mutations	20	No	No	No
TP53	17	Regulates the expression of target genes involved in cell cycle progression, DNA repair and apoptosis	Inactivating mutations	50	Possible	Possible	Li–Fraumeni syndrome
Proto-oncogenes							
BRAF	7	Involved in the MAPK signalling pathway	V600E-activating mutation	8–28	Probable	Probable	Lynch syndrome
ERBB2	17	Involved in the EGF–MAPK signalling pathway	Amplification	35	No	No	No
KRAS	12	Regulates intracellular signalling via the MAPK pathway	Activating mutations in codons 12 or 13 but rarely in codons 61, 117 and 146	40	Yes	Possible	N/A
MYC	8	Regulates proliferation and differentiation	Amplification	2 (mutation); 10 (CNV gain)	No	No	No
NRAS	1	Regulates the MAPK pathway	Mutation in codons 12 or 13	2	Yes	No	No

Tableau 2 : Liste des gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes impliqués dans le CCR. D'après Kuipers et al., 2015.

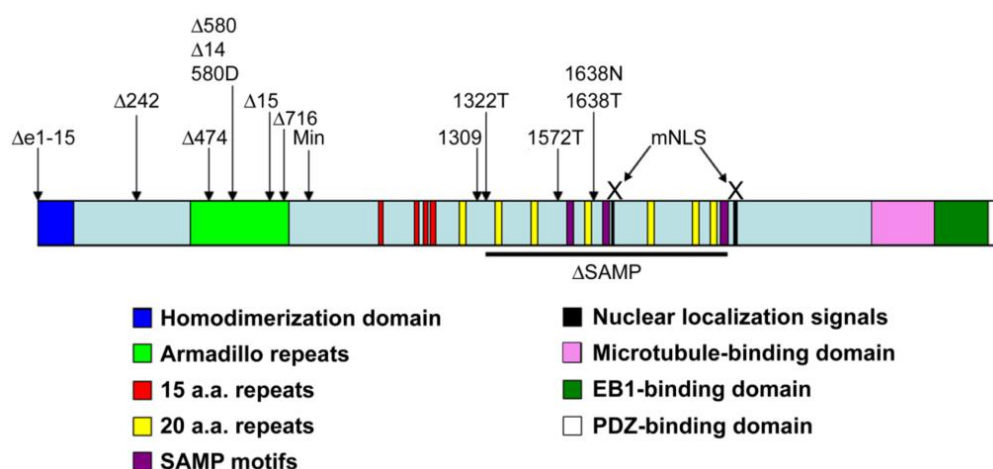


Figure 7 : Structure du gène codant la protéine APC et différents modèles de mutations germinales chez le rongeur. D'après (Zeineldin and Neufeld, 2013a)

Le risque élevé (environ 20% de la population générale) prend en compte les antécédents familiaux et personnels. Les personnes ayant au moins un parent du 1er degré atteint d'un CCR ou d'un adénome de > 1 cm, ayant développé lui-même un CCR ou des adénomes colorectaux, ou ayant une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI type rectocolite hémorragique ou maladie de Crohn) ont un risque 2 à 5 fois supérieur au risque moyen de développer un CCR. Le risque de développer un cancer dépend aussi des caractéristiques histologiques des adénomes colorectaux développés initialement. Les personnes ayant eu un cancer de l'ovaire, de l'utérus, du sein ou de l'intestin sont aussi à risque élevé. Ces personnes seront surveillées par coloscopie tous les 5 ans à partir de 60 ans (Burt, 2007; Kuipers et al., 2015).

1.5.3. Risque très élevé

Dix à 15 % des CCR se manifestent chez des personnes ayant des antécédents familiaux, c'est-à-dire plusieurs cas de cancer du côlon ou du rectum dans la famille proche. Le risque d'être atteint de ce cancer peut doubler lorsqu'un membre de la famille au premier degré (parent, frère, sœur ou enfant) a déjà eu un CCR ou tripler si ce parent a été diagnostiqué à un âge inférieur à 50 ans (Jasperson et al., 2010).

Un autre risque très élevé (environ 5% de la population générale) correspond aux syndromes héréditaires dont les plus fréquents sont la polypose adénomateuse familiale (FAP) et le Syndrome de Lynch ou Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer (HNPCC). Ces personnes ont 80 à 100% de risque de développer un CCR et sont surveillées par coloscopie annuelle dès la puberté et jusqu'à l'âge de 40 ans pour les FAP, et tous les 2 ans dès l'âge de 25 ans, ainsi que par un examen gynécologique annuel après 30 ans, pour les HNPCC (**Tableau 2**).

1.5.3.1. Polypose adénomateuse familiale (FAP)

Parmi les cas héréditaires fortement pénétrants, la polypose adénomateuse familiale ou FAP (pour Familial Adenomatous Polyposis) est responsable d'1% des CCR et a pour cause des mutations du gène codant la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) (**Figure 7**). Cette pathologie se transmet selon le mode autosomique dominant et est causée par une mutation hétérozygote de la lignée germinale dans le gène *APC* (« premier hit »), d'après la théorie de (Knudson, 1996), situé sur le chromosome 5q21. La protéine codée par le gène *APC* est un suppresseur de tumeur qui contrôle la voie de signalisation oncogénique Wnt. Chez les patients FAP, une mutation ou une perte (LOH) de l'allèle *APC* sauvage (ou « second hit ») est nécessaire pour la formation de l'adénome.

Les patients atteints de ce syndrome développent vers l'âge de 10-12 ans, plusieurs centaines voire des milliers de polypes adénomateux qui, s'ils ne sont pas réséqués, entraînent l'apparition d'un cancer vers l'âge de 35-40 ans (Kuipers et al., 2015).

Dans moins de 5% des cas de polyposes, ce n'est pas le gène *APC* qui est porteur d'une anomalie, mais un autre gène appelé *MYH*. Le gène *MYH* joue un rôle dans la réparation de l'ADN et les polyposes liées à ce gène ont des caractéristiques spécifiques (le nombre de polypes peut être restreint par exemple). Dans ce cas, la transmission se fait sur le mode autosomique récessif (Goodenberger and Lindor, 2011).

1.5.3.2.Syndrome de Lynch (HNPCC)

Ce syndrome est responsable de 3 à 5% des CCR (Burt, 2007; Nojadeh et al., 2018). Cette pathologie se transmet également sur le mode autosomique dominant. L'anomalie touche les gènes qui contrôlent la réparation des erreurs survenant lors de la réplication de l'ADN. Des mutations dans 5 gènes (*hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1*, *hPMS1*, et *hPMS2*) sont associées à ce syndrome et 45% à 70% des familles HNPCC sont porteuses de mutations sur au moins l'un de ces gènes. Les plus fréquemment mutés étant *hMLH1* et *hMSH2* (Liu et al., 1996).

1.5.4. Syndromes rares

1.5.4.1.Peutz-Jeghers syndrome (PJS)

Ce syndrome est autosomal dominant, caractérisé par de nombreux polypes bénins tout au long du tractus gastro intestinal. Son incidence est moins élevée que les deux précédents mais les polypes causés par ce syndrome sont présents depuis l'enfance. La cause en est l'existence de plusieurs mutations du gène *STK11* (Serine thréonine kinase 11) également nommé *LKB1*. C'est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 19p13.3. La mutation affecte la structure et /ou la fonction de la protéine et perturbe le contrôle de la division cellulaire en perdant l'activité kinase (Nojadeh et al., 2018).

1.5.4.2.Serrated polyposis syndrome (SPS)

Ce syndrome rare est caractérisé par de multiples polypes festonnés dans le côlon (également connu comme syndrome de polypose hyperplasique). Ce type de syndrome est causé par un ensemble de mutations germinales de gènes impliqués dans la senescence induite par des oncogènes par exemple le gène *RNF43* (Nojadeh et al., 2018).

1.6.Les autres facteurs de risque

Les autres facteurs de risque sont l'âge (la moyenne d'âge au diagnostic est de 71 ans), la présence de polypes, les MICI comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn.

Cependant, ces pathologies MICI ne sont à l'origine que de 1% des cas de CCR. De plus, cette proportion aurait tendance à diminuer ces dernières années, avec l'amélioration de la surveillance de ces maladies et l'efficacité des traitements anti-inflammatoires (Kuipers et al., 2015). Le risque de développer un CCR semble également augmenter chez les individus souffrant d'un diabète de type 2 (Kuipers et al., 2015).

1.6.1. Facteurs épigénétiques

Dans les cancers, la transformation maligne des cellules est accompagnée par une expression aberrante de certains gènes responsables des modifications épigénétiques entraînant l'activation ou l'inhibition de l'expression de gènes impliqués à différents stades de la carcinogenèse (apoptose, prolifération...) (Okugawa et al., 2015).

D'autres facteurs tels que les microsARN (miRNA) agissent en aval de la transcription, en inhibant la traduction des ARNm (ARN messagers) (Ding et al., 2018).

1.6.2. Facteurs sociétaux et environnementaux

La majorité des nouveaux cas de CCR apparaissent dans les sociétés occidentales. Différentes études ont estimé que 16 à 71% des CCR en Europe et aux Etats unis sont liés au style de vie. Ces sociétés sont caractérisées par un mode de vie très sédentaire et une alimentation très calorique et riche en graisses animales. Il a été démontré que la viande rouge est source d'un cocktail de carcinogènes, tels que les amines hétérocycliques (HCAs), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs) qui se forment dans les viandes cuites à très fortes températures (Brevik et al., 2010). Une consommation importante d'alcool augmente le risque de 50%, et même une consommation modérée (2 à 3 unités par jour) augmenterait ce risque de 20% (Kuipers et al., 2015).

En revanche, une corrélation négative a été démontrée concernant la consommation de végétaux, la prise prolongée d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et l'activité physique (Mármol et al., 2017). Par contre, l'association entre la consommation de fibres alimentaires et le faible risque de cancer colorectal n'a pas été prouvée.

Selon plusieurs études, une prise quotidienne d'aspirine réduit la formation d'adénomes colorectaux, l'incidence de CCR et la mortalité due à ce cancer. Il a été rapporté que la consommation journalière de 600 mg d'aspirine pendant 25 mois réduit de 40% le risque de CCR dans une population à risque (syndrome de Lynch) (Thun et al., 2012). De même, une corrélation négative a été démontrée entre les quantités élevées de vitamines D dans le sang et un faible risque de CCR dans la population européenne (Jenab et al., 2010).

1.7. Diagnostic

Le diagnostic d'un CCR peut se faire de deux manières différentes. Dans le premier cas, le patient présente des symptômes cliniques et est diagnostiqué sur la base de ces symptômes. Le second cas correspond au résultat d'un dépistage régulier effectué par le patient.

En général, le CCR est associé à une multitude de symptômes comprenant : la présence de sang dans les selles, des changements perçus dans les habitudes intestinales et des douleurs abdominales. D'autres symptômes moins spécifiques peuvent être perçus, tels que l'anémie, l'essoufflement et la perte de poids. Toutefois, ces symptômes ne peuvent en aucun cas affirmer ou prédire la présence d'un CCR, mais peuvent orienter le diagnostic pour réaliser des tests plus approfondis.

Les avancées réalisées dans le domaine du dépistage précoce du CCR, permet de diagnostiquer beaucoup de patients au stade précoce de la maladie. A l'origine du dépistage, un premier test « Hemocult » était proposé dès l'âge de 50 ans, et jusqu'à 74 ans, tous les 2 ans. Il permettait de dépister la présence de sang dans les selles et donc l'existence éventuelle d'un polype ou d'une tumeur colorectale. Cependant, ce test est remplacé depuis mai 2015 par un nouveau test immunologique (FIT ou Fecal Immunological Test) plus sensible qui permettrait de détecter 2 à 2,5 fois plus de cancers et 3 à 4 fois plus d'adénomes. Ce test est également plus fiable puisqu'il ne peut être rendu positif par la présence d'hémoglobine d'origine animale qui proviendrait de l'alimentation. Si ce test est positif, il est suivi par une coloscopie. Mais cette dernière reste la méthode d'investigation privilégiée dans le cas où le diagnostic est effectué chez des patients symptomatiques (Kuipers et al., 2015).

1.8. Thérapies actuelles

La survie des patients atteints de CCR métastatique a largement augmenté ces dernières années, grâce aux progrès réalisés dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, ayant pour cibles des marqueurs moléculaires spécifiques. Mais malgré cela, les patients rechutent après quelques mois de traitement, particulièrement ceux qui ont été diagnostiqués à des stades métastatiques. En effet, le CCR est caractérisé par une hétérogénéité moléculaire qui rend difficile le ciblage de biomarqueurs pour le développement de traitements et permettre aux patients de bénéficier de traitements personnalisés.

1.8.1. Résection de la tumeur primaire

Le traitement standard du CCR est la résection chirurgicale de la tumeur primitive associée à un curage ganglionnaire d'au moins 12 ganglions. Quel que soit le stade, le diagnostic est d'autant plus fiable que le nombre de ganglions prélevés et analysés est au moins ≥ 12 (Le Voyer et al., 2003).

1.8.2. Résection des métastases

Au moment du diagnostic, seulement 10-15% des patients ont des métastases initialement résecables. Dans ce cas, la survie à 5 ans après résection, est de l'ordre de 35% à 40% (Ruers and Bleichrodt, 2002). Par contre, les patients n'ayant pas eu de résection des métastases hépatiques ont une médiane de survie de 5 à 10 mois et une survie à 5 ans de l'ordre de 8% (Stangl et al., 1994).

1.8.3. Traitements du cancer colique

La classification TNM constitue la base du choix thérapeutique pour les oncologues. Globalement, les stades I et II, de meilleur pronostic, ne subissent qu'une simple chirurgie et les stades III, une chirurgie suivie d'une chimiothérapie adjuvante. Pour les stades IV métastatiques, le traitement est adapté en fonction du patient avec, en général, une chimiothérapie couplée à une thérapie ciblée selon les caractéristiques moléculaires de la tumeur. Ces protocoles ne concernent pas les cancers du rectum qui sont dans la majorité des cas, irradiés avant la résection (Sebag-Montefiore et al., 2009).

1.8.3.1. Traitements des cancers de stade I à III

Pour les cancers de stade I, la chirurgie seule est indiquée. Pour un cancer de stade II, l'indication d'une chimiothérapie adjuvante est à discuter au cas par cas, avec une évaluation du rapport bénéfice/risque d'une chimiothérapie adjuvante à base de 5-fluorouracil (5FU, inhibiteur de synthèse de la pyrimidine conduisant à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose) associé à la leucovérine (LV ou acide folinique, métabolite actif de l'acide folique utilisé pour contrecarrer la toxicité du 5FU) (Kelly and Goldberg, 2005) et en connaissant le statut MSI/MSS de la tumeur.

Concernant les stades III, la chimiothérapie adjuvante associe le 5FU, la LV et l'oxaliplatine (FOLFOX 4 ou FOLFOX 4 simplifié). Ce protocole améliore significativement la survie sans récurrence à 3 ans de 6,2% et diminue le risque relatif de mortalité à 5 ans de 12 à 16% (Zaniboni et al., 1998). Elle est indiquée en particulier pour les stades III associés à un risque élevé de récurrences (T3-4, N1 ou Tx, N2) (Yothers et al., 2011). Pour ces cancers, les thérapies ciblées (bevacizumab, anticorps monoclonal ciblant le VEGF ou le panitumumab/cetuximab ciblant le récepteur de l'EGF), n'apporteraient pas d'effet bénéfique en plus de la chimiothérapie (Kuipers et al., 2015).

1.8.3.2. Traitement des cancers de stade métastatique

Des métastases hépatiques sont observées dans 40 à 60 % des cas de CCR et dans 25 % des cas, elles sont synchrones (Société Nationale Française de Gastro-Entérologie, 2018). Le foie

représente le site de 75,7% des métastases synchrones. Enfin, 50% des patients opérés d'un adénocarcinome colique avec envahissement ganglionnaire présenteront des métastases à distance au cours de l'évolution de la pathologie (Manfredi et al., 2006). Concernant le traitement adjuvant des stades IV, la LV et le 5FU en combinaison avec l'irinotécan ou l'oxaliplatine (protocole FOLFIRI et FOLFOX respectivement) en première ou seconde ligne ont démontré une amélioration de la survie globale et de la survie sans progression. L'association de l'irinotécan et du 5FU permet un taux de réponse plus important par rapport au 5FU seul (49% vs 31%, $p < 0.001$) (Douillard et al., 2000; Saltz et al., 2000). Des données expérimentales montrent l'effet synergique de l'association 5FU- oxaliplatine (de Gramont et al., 1997) avec un effet significatif en termes de survie sans progression chez les patients ayant un CCR métastatique (de Gramont et al., 2000). Depuis quelques années, l'association de la chimiothérapie à des thérapies ciblées utilisant des anticorps monoclonaux ciblant le VEGF ou l'EGFR a démontré son efficacité, et ces molécules ont amélioré significativement les taux de réponse aux chimiothérapies (Hurwitz, 2004; Van Cutsem et al., 2009).

La réponse aux anti-EGFR est conditionnée par la présence de cellules tumorales exprimant un gène *KRAS* sauvage. En effet, la présence d'une mutation activatrice sur les codons 12, 13 (exon 2, 40% des cas), 59, 61 (exon 3, 10% des cas) et 117, 146 (exon 4, 10% des cas) du gène *KRAS* ou *NRAS* (autre isoforme de la protéine RAS) est un facteur prédictif de résistance aux traitements à base d'anticorps anti-EGFR (Douillard et al., 2013; Lièvre and Laurent-Puig, 2008; Sorich et al., 2015).

Pour les protocoles associant le bevacizumab au FOLFOX ou au FOLFIRI, la survie sans progression et la survie globale augmentent (Giantonio, 2006; Kopetz et al., 2010).

Plus récemment, deux autres molécules sont utilisées dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques. Il s'agit de l'aflibercept, indiqué en seconde ligne du traitement des CCR métastatiques. Il agit d'un récepteur leurre soluble qui lie le VEGF-A et B avec une plus forte affinité que les récepteurs natifs. Le regorafenib, un inhibiteur de tyrosines kinases multicibles (VEGFR1, 2 et 3, TIE2, RET, RAF-1, PDGFR et FGFR) est indiqué en troisième ligne de traitement.

L'ensemble des recommandations tient compte des critères de résecabilité, du grade de la tumeur, de son statut mutationnel, du phénotype et des lignes thérapeutiques déjà réalisées.

Les dernières recommandations nationales sont éditées dans le thésaurus national de cancérologie digestive (Thesaurus National de cancérologie digestive, 2018).

1.9.Carcinogenèse des CCR et mécanismes moléculaires

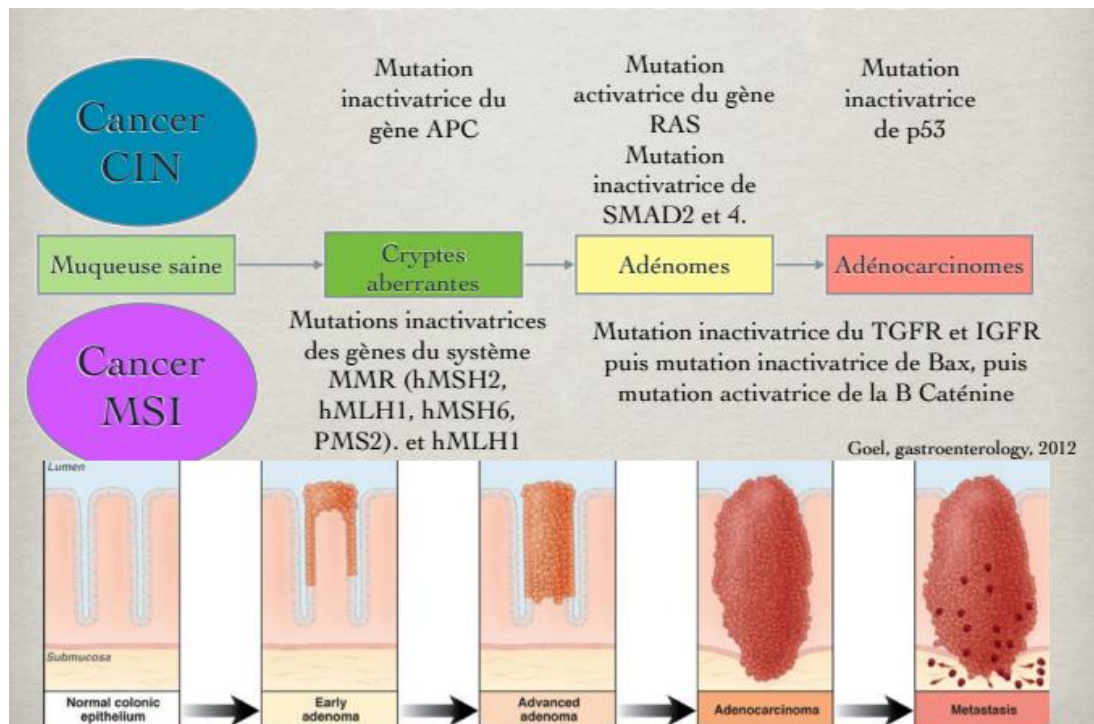


Figure 8 : Altérations génétiques au cours de la progression du CCR

Tableau 3 : Liste des gènes impliqués dans des formes héréditaires de CCR. D'après (Burt, 2007; Fearon, 2011)

Gènes	Syndromes associés
APC	Polypose Adénomateuse familiale (FAP) Syndrome de Gardner Syndrome de Turcot FAP atténuée
MLH1	Syndrome de Lynch Syndrome de Turcot
PMS2	Syndrome de Turcot Syndrome de Lynch
MSH2	Syndrome de Lynch
MSH6	Syndrome de Lynch
STK11	Syndrome de Peutz-Jeghers
PTEN	Syndrome de polypose juvénile Maladie de Cowden
MYH	Polypose associée à MYH
SMAD4	Syndrome de polypose juvénile

Les cancers ont été décrits comme des maladies dues à l'accumulation progressive d'altérations génétiques ou épigénétiques notamment dans des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur (**Figure 8; Tableau 3**). Les oncogènes sont généralement impliqués dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire, leur activation induit la transformation tumorale. Les gènes suppresseurs de tumeurs, à l'inverse, inhibent la croissance et la prolifération dans les conditions physiologiques. Leur inactivation lève donc cette inhibition et favorise le développement tumoral.

Concernant la carcinogenèse colorectale, Fearon et Vogelstein ont proposé en 1990, une séquence de transformation d'un épithélium colique sain en adénocarcinome invasif (**Figure 8**). Ils montrent que le processus requiert l'accumulation progressive en plusieurs étapes de mutations diverses touchant des gènes clés. Depuis la publication de ce modèle, d'autres mutations mais surtout plusieurs formes d'instabilité génomique ont été découvertes et décrites pour ce cancer (Fearon and Vogelstein, 1990).

1.10. Les trois formes d'instabilité du génome tumoral

En considérant la faible fréquence de mutations dans les cellules normales, la fréquence élevée de mutations dans les tumeurs humaines, ne s'explique pas uniquement par le taux de mutations spontanées. Les travaux de Loeb et coll. ont permis de montrer que les cellules cancéreuses acquièrent un phénotype mutateur qui est le résultat de mutations dans des gènes impliqués dans la stabilité du génome (Loeb, 2001, 2016).

Dans les CCR, trois formes d'instabilité du génome sont observées (**Figure 9A**, verso page suivante):

- l'instabilité chromosomique (phénotype CIN, Chromosomal INstability),
- l'instabilité de microsatellites (phénotype MSI, MicroSatellite Instability)
- le phénotype hyperméthylateur (phénotype CIMP, CpG Island Methylator Phenotype)

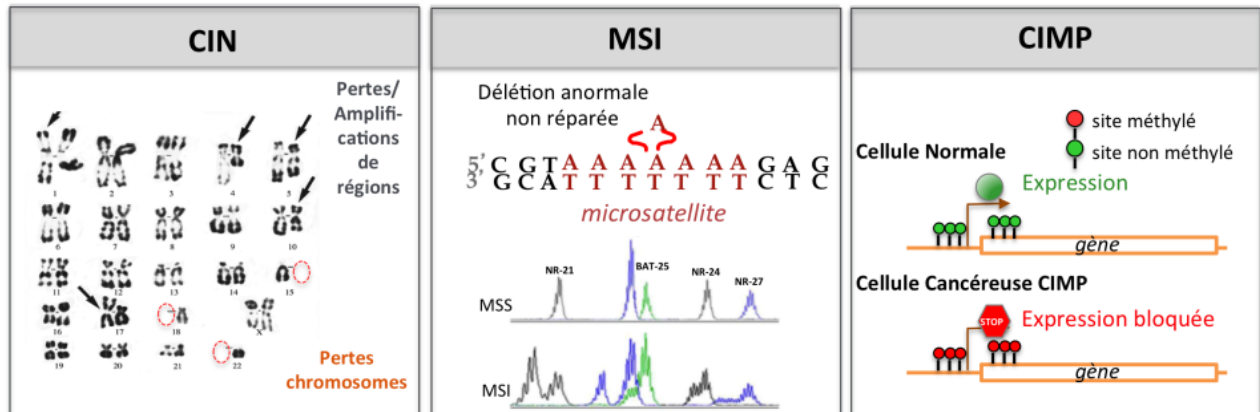
Ces 3 formes sont retrouvées dans les CCR dans des proportions distinctes (**Figure 9B**, verso page suivante).

L'instabilité CIN est la forme majoritaire avec 75-85% des cas, et l'instabilité MSI compte pour 15-20%, ces 2 formes étant quasiment exclusives. La forme CIMP, observée dans 20-30% des cas, se retrouve essentiellement associée au phénotype MSI (75% des tumeurs MSI sont CIMP). Un certain nombre de tumeurs ne présenteraient aucune des 3 instabilités et pourraient avoir d'autres formes d'instabilité non encore identifiées (Geigl et al., 2008).

1.10.1. Le phénotype d'instabilité chromosomique CIN

Le terme instabilité chromosomique désigne des conditions dans lesquelles l'intégrité de

A-



B-

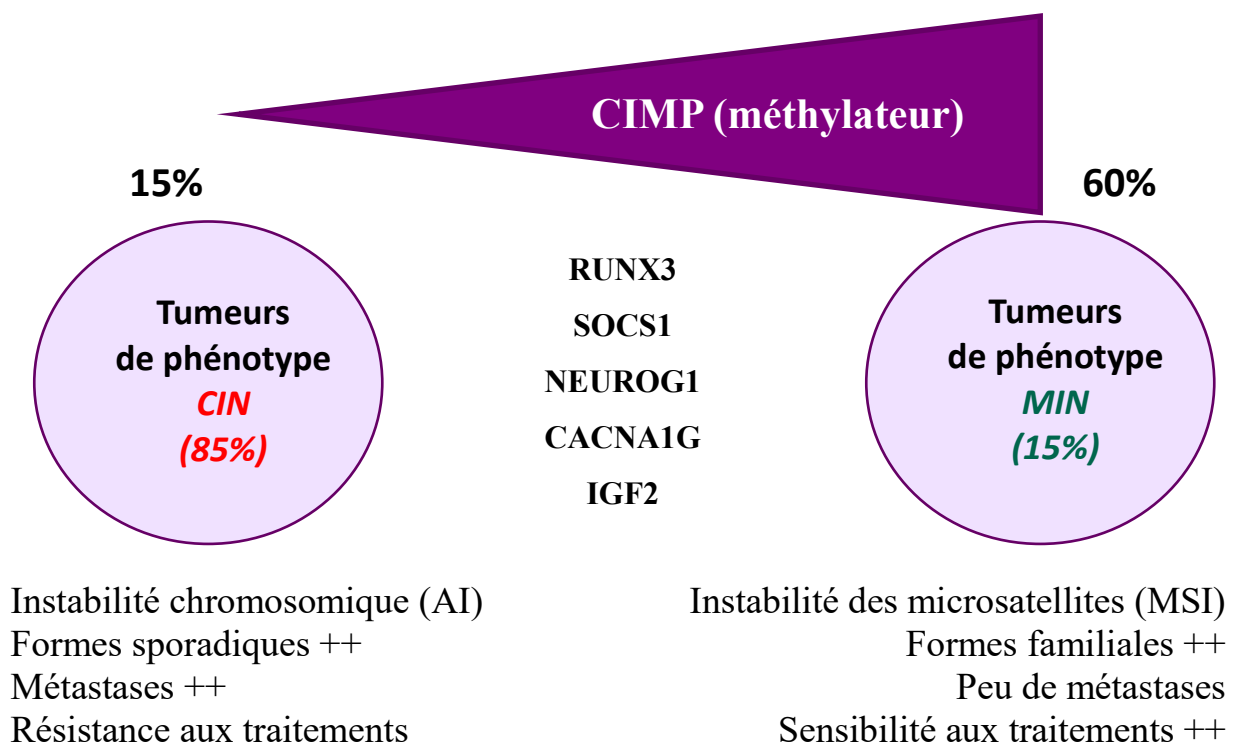


Figure 9 : A) Schéma des différentes instabilités. B) Répartition des différentes instabilités dans les CCR. CIN : « chromosomal instability » ; MSI : « microsatellite instability » ; CIMP « CpG Island Methylator Phenotype » : hyperméthylation des îlots CpG ; panel de gènes définissant le statut CIMP. Environ 5% des CCR n'ont aucune des 3 instabilités.

l'ADN est perturbée. Une grande majorité des CCR, comme d'autres cancers, ont un contenu chromosomique anormal et sont donc aneuploïdes ou polyploïdes. Dans le CCR, les pertes de matériel chromosomique sont plus importantes que les gains. Les pertes chromosomiques induisent une perte d'hétérozygotie (LOH pour Loss Of Heterozygosity) suggérant un rôle plus important des gènes suppresseurs que des oncogènes dans la pathologie (Goel et al., 2007).

1.10.1.1. Origine et gènes cibles

Le phénotype CIN est un phénotype dans lequel des chromosomes ou de larges portions de chromosomes sont gagnés ou perdus. Cette instabilité se traduit par des LOH de chromosome entier ou de bras entier comme pour les chromosomes 1, 5 (gène *APC*), 8, 17 (gène *TP53*) et des gènes de la voie du TGF- β en 18q (gènes *SMAD-2* et *SMAD-4*). D'autre part, l'instabilité CIN est retrouvée dans les adénomes suggérant son importance pour l'initiation et/ou la maintenance du cancer (Geigl et al., 2008; Pino and Chung, 2010).

Trois mécanismes sont connus pour induire ce type d'instabilité (Pino and Chung, 2010):

- un défaut de la ségrégation chromosomique au niveau de leur centromère lors de la division cellulaire avec une distribution des chromosomes déséquilibrée dans les cellules filles. Une possible implication des gènes *APC*, *AURKA*, *BUB1*, *BUBR1*, *CENPA*, *PLK1* et *PTTG* est proposée (**Figure 10**, verso page suivante).

- un défaut de stabilité des télomères avec la possible implication des gènes *TP53*, *MRE11*, *BRCA*, *ATM/ATR*
- une déficience du système de réponse aux dommages de l'ADN avec la possible implication du gène *TERC*.

1.10.1.2. Impact clinique

Une méta-analyse de 63 études ayant évalué l'impact pronostique du statut CIN a montré qu'il est associé à un mauvais pronostic, surtout pour les stades II et III. D'après cette étude, le statut CIN devrait être évalué, avec le statut MSI, comme un marqueur pronostique (Walther et al., 2008).

1.10.2. Phénotype d'instabilité des microsatellites

Les microsatellites, également connus sous le nom de répétitions courtes en tandem (STR), sont des répétitions de segments d'ADN de petites tailles (1 à 6 paires de bases), dispersées dans tout le génome et représentant environ 3% du génome humain (Nojadeh et al., 2018). Ils sont très polymorphes entre individus mais au sein d'un même individu, ils sont invariants (Duval and Hamelin, 2002). Environ 15 à 20% des CCR présentent ce phénotype avec des

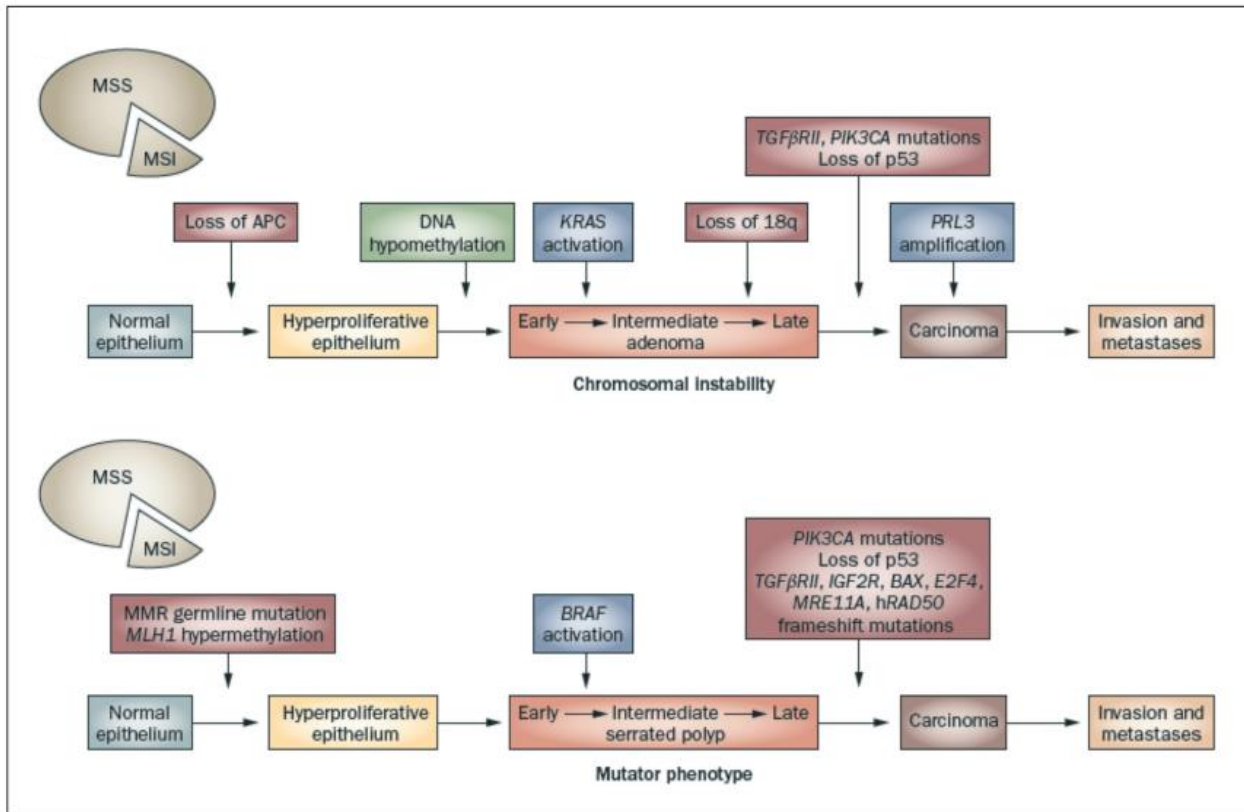


Figure 10 : Les voies moléculaires de carcinogénèse colorectale de phénotype CIN (ou MSS) et MSI (ou MIN). D’après Vilar and Gruber, 2010.

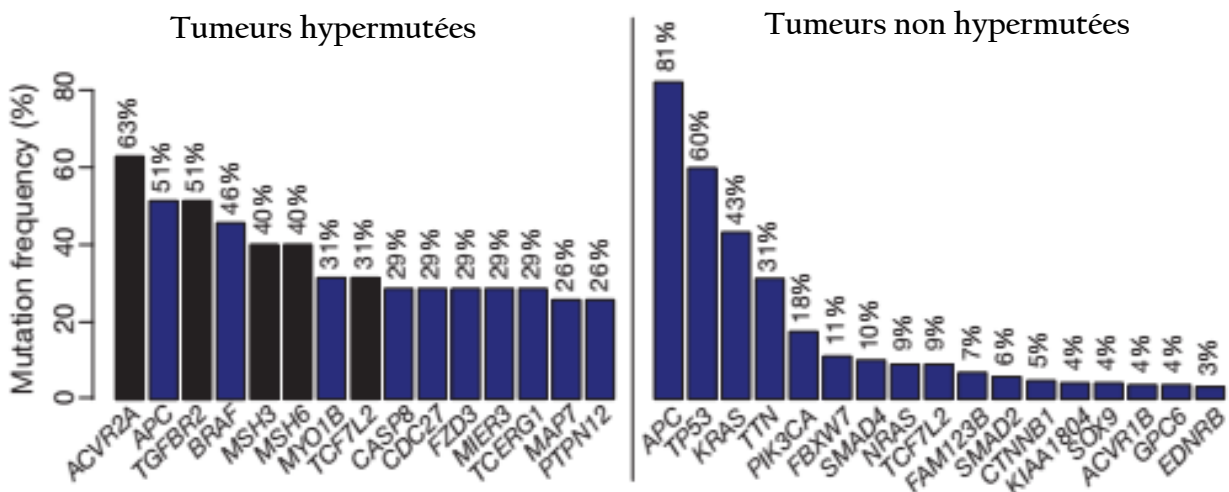


Figure 11 : Fréquences de mutations dans le CCR. Gènes significativement mutés chez les patients hypermutés et non hypermutés. Les barres bleues représentent les gènes identifiés par l’algorithme MutSig et les barres noires représentent les gènes identifiés par l’examen manuel des données de séquence.

cellules tumorales diploïdes. Cette instabilité est due à une défaillance du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR pour Mismatch Repair) qui entraîne une hyper-mutabilité. On parle également de tumeurs hypermutées. Sur le plan pronostique, les cancers colorectaux MSI sont de bon pronostic, notamment au stade II. Sur le plan thérapeutique, ils sont résistants au 5-FU, mais sensibles à l'oxaliplatine (Fishel et al., 1993).

1.10.2.1. Origine

L'acquisition de la déficience du système MMR dans ces cancers repose sur 2 voies principales : l'inactivation par mutation et l'inactivation par méthylation des gènes du MMR (**Figure 11**). Les formes héréditaires passent par une mutation dans un allèle des gènes responsables du MMR et un second événement au cours de la vie dans le même gène qui va alors inactiver le système MMR. Le syndrome de Lynch est associé à des mutations germinales des gènes MLH1 ou MSH2, moins fréquemment de MSH6 et très rarement de PMS2 (20% des CCR MSI).

Les formes sporadiques passent par l'inactivation des gènes MMR par méthylation biallélique (80% des CCR MSI) dont MLH1 principalement. Cependant, d'autres événements épigénétiques comme l'implication de certains microARN ou la méthylation d'histones pourraient également engendrer un phénotype MSI (Yamamoto and Imai, 2015).

Dans ces CCR hypermutés, on retrouve des mutations du gène *APC* (53%), *BRAF* (47%), *KRAS* (30%), *CTNNB1* (7%) et *PIK3CA* (37%) (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Elles pourraient avoir un rôle important dans l'initiation de la tumorigenèse. La mutation activatrice de *BRAF* (une serine/thréonine kinase de la voie MAP/ERK) se retrouve très majoritairement dans les CCR MSI et 5% des CCR totaux et est mutuellement exclusive des mutations du gène *KRAS* (Cancer Genome Atlas Network, 2012). En situation métastatique seulement, cette mutation confère à la tumeur un très mauvais pronostic et nécessite d'intensifier la chimiothérapie.

1.10.2.2. Gènes cibles

Des insertions ou délétions de nucléotides aux niveaux de ces séquences entraînent un décalage dans le cadre de lecture et potentiellement l'apparition d'une protéine tronquée, le plus souvent non fonctionnelle, comme c'est le cas pour la protéine APC (Smith et al., 1993). Le premier gène identifié comme cible de l'instabilité de microsatellites est le récepteur du TGF- β (TGFBR2) (Markowitz et al. 1995).

D'autres gènes ont également été montrés comme étant fréquemment la cible de MSI, notamment *ACVR2*, *AXIN2*, *BAX*, *IGF2R*, *TCF7L2* (ou *TCF4*), ainsi que d'autres gènes

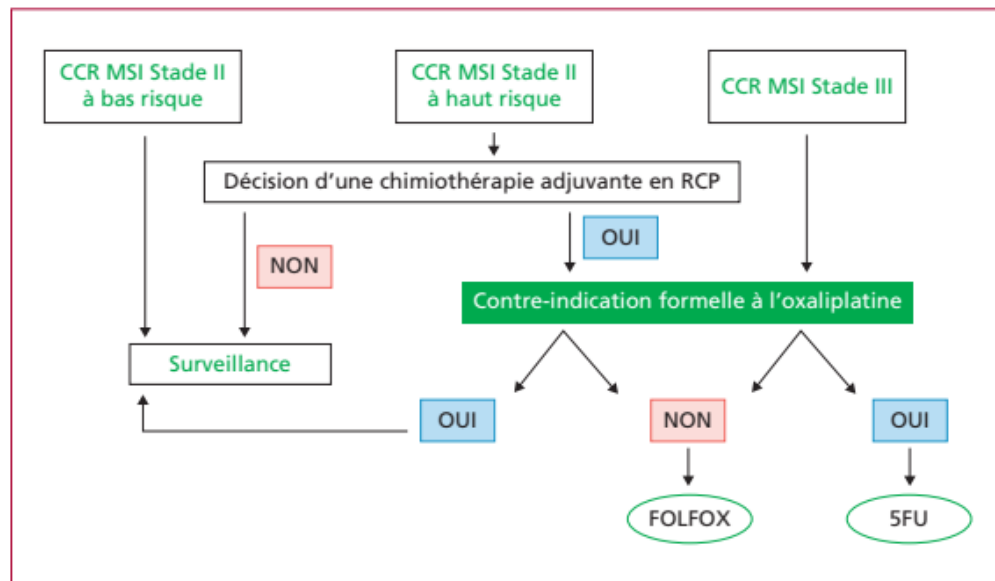


Figure 12 : Impact décisionnel du statut MSI sur la chimiothérapie adjuvante. CCR : cancer colorectal ; MSI : « microsatellite instability » ; RCP : réunion de concertation multidisciplinaire ; 5-FU : 5-fluoro-uracile ; FOLFOX : 5-FU + oxaliplatine. D'après de Guillebon et al., 2015.

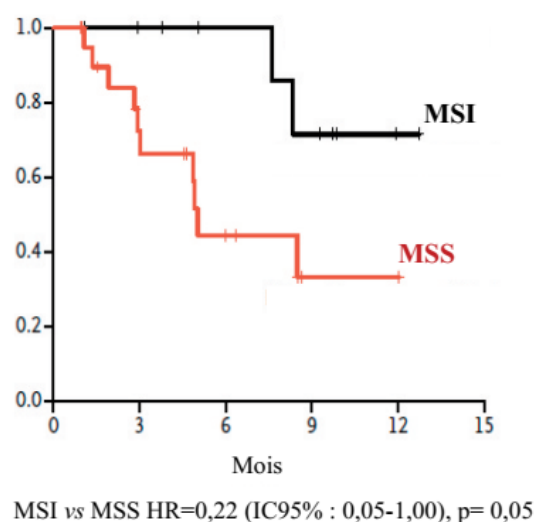


Figure 13 : Survie globale après traitement par immunothérapie (pembrolizumab, anti PD-1) pour les CCR métastatiques de phénotype MSI et des tumeurs MSS après échappement à la chimiothérapie. D'après Le et al., 2015.

impliqués dans l'apoptose et l'inflammation, la régulation de la transcription (Duval and Hamelin, 2002; Hamelin et al., 2008).

Toutefois, les cancers MSI générant beaucoup de mutations, le défi n'est plus de découvrir de nouveaux gènes mutés mais de déterminer ceux qui jouent un rôle significatif au cours de l'initiation et de la progression tumorale.

1.10.2.3. Impact clinique

La détermination du phénotype moléculaire de la tumeur a un impact important sur le pronostic ainsi que sur la décision thérapeutique. En effet, les patients ayant des tumeurs MSI présentent un meilleur pronostic que les tumeurs CIN et sont moins sujets au développement de métastases dans les ganglions lymphatiques ou à distance (5% des CCR métastatiques). Une méta-analyse réalisée par Popat et coll. (2005), regroupant les données de 32 études, soit au total 7642 patients dont 16% de CCR MSI, a confirmé l'avantage pronostique du phénotype MSI (Popat et al., 2005).

Sur le plan thérapeutique, les décisions thérapeutiques diffèrent selon le stade (**Figure 12**). Les CCR MSI sont caractérisés par un infiltrat inflammatoire important et par une charge importante en néo-antigènes tumoraux. Les stratégies thérapeutiques ciblant les points de contrôle immunitaires semblent efficaces chez ces patients. En effet, récemment, des preuves de l'efficacité de l'immunothérapie dans les cancers digestifs dont le CCR, ont été apportées par les résultats de premiers grands essais cliniques. La première publication convaincante a évalué le pembrolizumab en monothérapie dans le traitement des tumeurs colorectales ou non colorectales métastatiques MSI et quelques tumeurs MSS échappant au traitement conventionnel. Un taux de réponse élevé, une survie sans progression et une survie globale exceptionnellement longues ont été observés chez les patients avec des tumeurs MSI, comparés aux patients avec des tumeurs MSS (CIN) (**Figure 13**) (Le et al., 2015).

Une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France est attendue et un essai de phase III académique va comparer une immunothérapie à une chimiothérapie conventionnelle en deuxième ligne chez des patients avec des tumeurs MSI métastatiques (essai PRODIGE 54 – SAMCO).

1.10.3. Phénotype hyperméthylateur (CIMP)

Ce phénotype est décrit dans 15% des CCR comme un phénotype qui présente une hyperméthylation des îlots CpG de promoteurs de gènes habituellement non méthylés dans des cellules normales. Dans le CCR, cette hyperméthylation cible environ 10% de gènes qui sont normalement exprimés dans les cellules épithéliales saines et en particulier des gènes

Etudes	Panel de gènes	CIMP+
Toyota et al, 1999	CDKN2A (p16), MLH1, MINT 1, MINT 2, MINT 12, MINT 17	≥3 promoteurs méthylés
Ogino et al, 2006	CACNA1G, CDKN2A (p16), CRABP1, MLH1, NEUROG1	≥4-5 promoteurs méthylés
Ogino et al, 2007	CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1, CDKN2A (p16), CRABP1, MLH1	≥ 6-8 promoteurs méthylés
Weisenberger et al, 2007	CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1	≥3-5 promoteurs méthylés

Tableau 4 : Différents panels de gènes proposés pour caractériser les CCR de phénotype CIMP.

	Non-CIMP	CIMP-low	CIMP-high
Localisation	distal > proximal	-	proximal > distal
Sex ratio	hommes = femmes	hommes > femmes	femmes > hommes
Mutations			
<i>BRAF</i>	sauvage	sauvage	muté
<i>KRAS</i>	muté	muté	sauvage
<i>TP53</i>	70%	30%	10%
Statut MSI	CIN	CIN	MSI

Tableau 5 : Caractéristiques moléculaires des tumeurs CCR de phénotype CIMP.

D'après Ogino et al., 2007

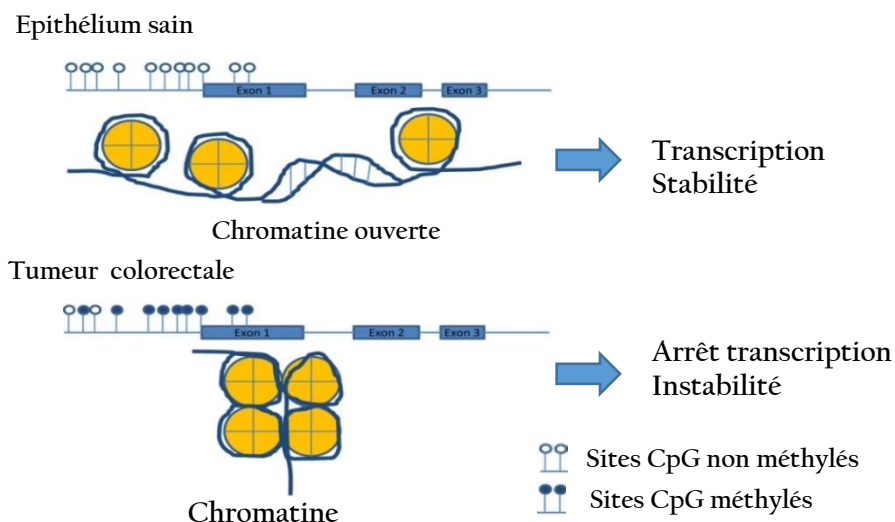


Figure 14: Phénotype CIMP : Hyper-méthylation des îlots CpG. Lorsqu'ils sont non méthylés, Les îlots CpG des régions promotrices des gènes, permettent le maintien d'une structure ouverte de la chromatine ou euchromatine. En cas de méthylation des îlots CpG, la chromatine sous forme d'hétérochromatine adopte une structure repliée qui bloque la transcription. D'après Lao and Grady, 2011.

suppresseurs de tumeurs tels que *p16*, *p14*, *MGMT* et *hMLH1* (Issa et al., 2005), favorisant la prolifération cellulaire et/ou en inhibant les processus d'apoptose ou de sénescence (Rhee et al., 2017).

A l'origine, ce phénotype se définissait comme un phénotype apparenté au phénotype MSI, mais il est maintenant reconnu comme un sous type moléculaire avec des caractéristiques cliniques et moléculaires bien spécifiques (Issa et al., 2005; Samowitz et al., 2005). Par exemple, les tumeurs CIMP ont une localisation plutôt proximale, sont plus fréquentes chez les femmes, se retrouvent chez des patients d'un âge avancé, sont d'un grade tumoral élevé et sont majoritairement associées au phénotype MSI (75% des tumeurs MSI sont CIMP et 25-60% des CCR CIMP sont MSI suite à l'hyperméthylation du promoteur de *MLH1*) (Rhee et al., 2017). A noter que ce phénotype est très peu retrouvé dans les formes héréditaires. Il a déjà été observé dans les polypes où il est plutôt associé aux polypes festonnés de type "sessile serrated polyps".

La définition de ce phénotype varie considérablement entre les études pour définir le panel de gènes à considérer et le seuil à partir duquel phénotype de CCR est CIMP. Les groupes de Weisenberger et Ogino ont proposé une classification des CCR en fonction de la fréquence de méthylation des îlots CpG de 5 et 8 gènes respectivement, dont les gènes: *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1* (Weisenberger et al., 2006; Ogino et al., 2007). Ces panels permettent de distinguer des tumeurs CIMP+ et CIMP-, et CIMP-high et CIMP-low respectivement selon la classification (**Tableau 4**). L'ensemble de ces études indiquent que les CCR CIMP-high sont plutôt associés à des mutations du gène *TP53* et *BRAF* alors que les CCR CIMP-low sont associés à des mutations du gène *KRAS* (**Tableau 5**).

1.10.3.1. Origine

Les îlots CpG sont des régions génomiques enrichies en dinucléotides CG, représentant 1 à 2% du génome et sont présents dans 50% à 60% des gènes dans la région 5'. Les sites CpG sont normalement non méthylés. Le processus de méthylation est réalisé par des DNA méthyl-transférases (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) qui induisent l'addition enzymatique d'un groupement méthyl sur le carbone en position 5' d'une cytosine. Lorsque certains des îlots CpG sont méthylés, cela entraîne une répression transcriptionnelle du gène par un changement de structure et l'accessibilité de la chromatine (**Figure 14**).

A ce jour, la difficulté de définir le phénotype CIMP est liée la difficulté à déterminer les mécanismes responsables de sa survenue. Deux hypothèses non exclusives sont avancées :

La première suggère que l'accumulation de méthylations aberrantes d'îlots CpG résulterait d'un défaut de régulation de la méthylation, soit par activation des méthyl-transférases, soit par altération des mécanismes de contrôle protégeant l'ADN d'une méthylation aberrante (Turker, 2002). Dans les cancers, des altérations de type surexpression, mutation et délétion ont été décrites pour les enzymes DNMT (Zhang and Xu, 2017). Dans le CCR, une surexpression de DNMT3B a été rapportée comme associée au phénotype CIMP-high, alors que la mutation de DNMT1 (dans 7% de CCR) entraîne un déséquilibre du niveau global de la méthylation du génome (Kanai et al., 2003; Nosho et al., 2009). De même, des souris *Dnmt1*^{+/-} ont une l'hypométhylation de l'ADN qui contribue à la carcinogénèse en induisant une instabilité génomique (Laird et al., 1995). Plus récemment, Karpf et Matsui ont montré que la perte de DNMT1 et 3B dans la lignée colique MSI HCT116, induit l'hypométhylation de l'ADN associée à une instabilité chromosomique (Karpf and Matsui, 2005).

Les mutations de ces gènes d'ADN méthyltransférases se retrouvent dans les CCR à des fréquences <8% et principalement dans les CCR MSI-H (Gao et al., 2013 ; Cerami et al., 2012) mais pas dans les CCR CIMP-H / non-MSI-H, ce qui indique que les mutations du gène DNMT sont secondaires aux défauts de réparation (Rhee et al., 2017).

Le deuxième modèle associe la méthylation aberrante des îlots CpG à une exposition à des facteurs environnementaux dits épimutagènes. L'étude de Kikuchi et coll montre que l'exposition au tabac est significativement associée à une hyperméthylation du gène *CDKNN2A/p16* dans les cancers du poumon non à petites cellules (Kikuchi et al., 2006).

1.10.3.2. Impact clinique

L'impact pronostique du phénotype CIMP + reste difficile à établir car de nombreux facteurs confondants sont présents dans les études publiées; en effet, les populations ne sont pas homogènes pour des facteurs pronostiques importants tels que le stade tumoral, le statut mutationnel KRAS et BRAF, le statut MSI et les traitements de chimiothérapie (Jia et al., 2016). De plus, le manque de standardisation et de consensus pour la définition du statut de CIMP induit un autre biais important (combien de gènes méthylés pour attribuer le statut CIMP par ex). À ce jour, il n'est pas possible de conclure que le phénotype CIMP-high est un facteur pronostique indépendant pour les patients. Cependant, il semble qu'il soit associé à une diminution de la survie globale et de la progression sans événement chez les patients ayant un CCR MSS, indépendamment d'une mutation *BRAF*.

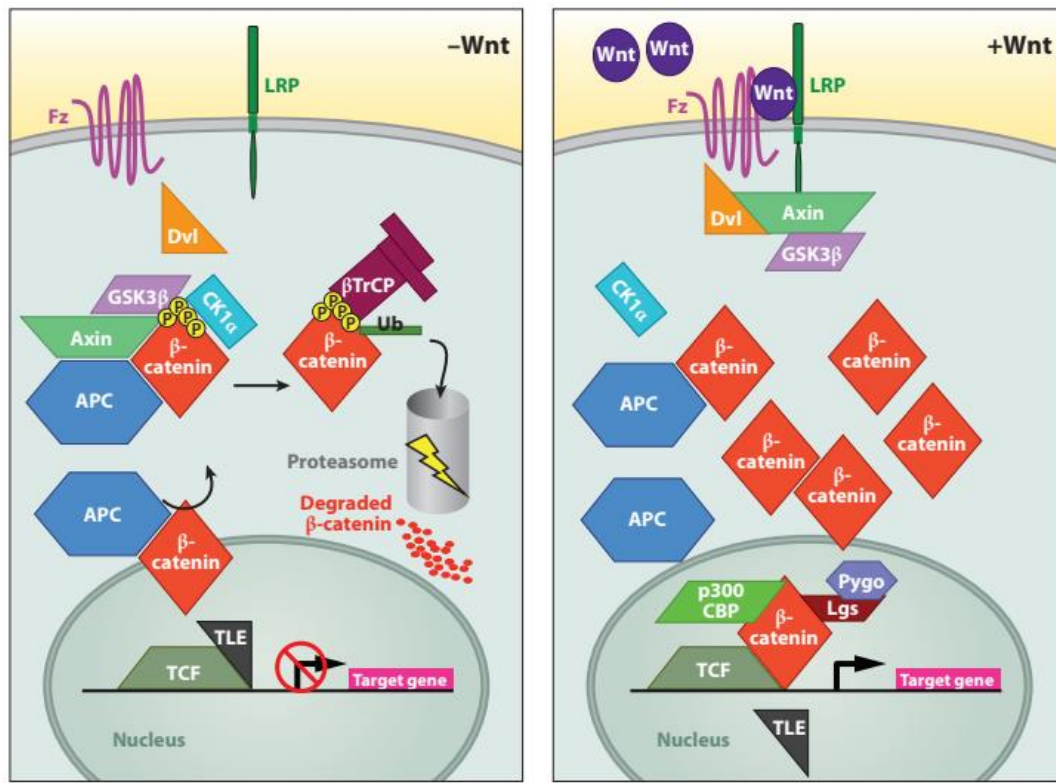


Figure 15 : Voie Wnt/APC/ β -caténine. (A) En l'absence de Wnt, la β -caténine est incluse dans un complexe protéique comprenant l'axine, APC et la kinase GSK3- β . La phosphorylation de la β -caténine par la GSK3- β entraîne sa dégradation par le protéasome. La β -caténine peut aussi être liée à la cadhérine et contrôler l'adhérence intercellulaire. (B) En présence du ligand Wnt (B), β -caténine se dissocie du complexe APC/Axine/GSK, n'est plus phosphorylée et migre dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription LEF/TCF pour déclencher la transcription de gènes cibles. D'après (Fearon, 2011).

CIMP aidera à la prise de décision thérapeutique, en particulier pour les tumeurs de stade II (Gallois et al., 2016). Pour les maladies métastatiques, les tumeurs CIMP-high semblent être associées à un mauvais pronostic avec une survie globale plus courte et une résistance aux traitements (5FU, irinotecan, gefitinib et cetuximab) (Gallois et al., 2016).

1.11. Voies de signalisation impliquées dans le CCR

L'instabilité génétique est une caractéristique des cellules cancéreuses. Quel que soit le mécanisme de cancérogenèse impliqué, (CIN, MSI ou CIMP), la dérégulation des gènes ciblés entraîne l'activation ou l'inactivation de voies de signalisation oncogéniques.

1.11.1. Voie Wnt/wingless (ou voie APC/ β -caténine)

La voie Wnt est une voie de signalisation majeure dans l'embryogenèse et la régulation de l'homéostasie intestinale. L'élément central de cette voie sont les protéines APC et la β -caténine (**Figure 15**). La perte de fonction de la protéine implique la mutation du premier allèle puis l'inactivation du deuxième allèle soit par une seconde mutation, soit par la perte d'un des deux bras longs du chromosome 5. Les mutations somatiques sont des mutations non-sens conduisant à l'apparition d'un codon stop et à la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Cette protéine, à fonctions multiples, présente plusieurs domaines de liaison lui permettant d'interagir avec de nombreuses molécules. Une des fonctions de la protéine APC est le contrôle négatif du taux et de l'activité de la β -caténine (Gregorieff et al., 2005). En l'absence de signal mitotique, la β -caténine est séquestrée dans le cytoplasme avec la protéine APC, l'axine, et la sérine-thréonine glyco-gène-kinase (GSK3 β) pour faire dégrader la β -caténine par le protéasome. Lorsqu'un signal mitotique est délivré par l'activation du proto-oncogène *WNT* (homologue du gène *wingless* de la drosophile), la GSK3 β est inhibée, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis transloquée dans le noyau où elle s'associe au facteur de transcription TCF4 et forme un complexe permettant la transcription de gènes de la prolifération cellulaire, comme l'oncogène *c-MYC*.

Dans les cancers CIN, la voie de signalisation WNT est principalement activée par une inactivation biallélique du gène *APC* alors que dans les cancers MSI des mutations activatrices de la β -caténine ou inactivatrices de l'axine2 sont observées (Laurent-Puig et al., 2010).

1.11.2. Voie PI(3)K/Akt/mTOR

La voie PI(3)K/Akt transmet des signaux provenant de nombreux récepteurs à tyrosine kinase. Les mutations des différents composants de cette voie sont très fréquentes dans la majorité des cancers et leur caractère oncogénique est démontré. La voie PI(3)K/Akt joue un rôle

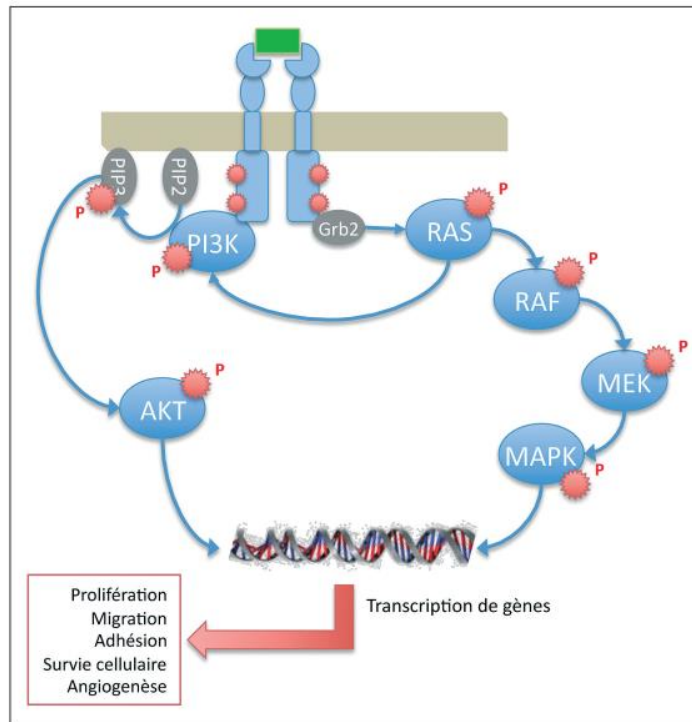


Figure 16: Voie oncogénique PI3K/Akt/mTOR et RAS/MAPK

La stimulation des récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR et VEGFR par exemple) par des ligands extrinsèques induit des cascades de signalisation impliquant Ras/Raf/MEK/Erk afin de réguler la croissance, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. L'activation implique également la voie PI3K/AKT. PI3K catalyse la réaction de conversion du PIP2 membranaire en PIP3. Ce dernier assure le recrutement d'AKT à la membrane pour être phosphorylé par PDK1, puis AKT phosphoryle par la suite, divers effecteurs du cycle cellulaire et de l'apoptose (p21, Bad...).

mitogène et inducteur de la survie cellulaire (McCubrey et al., 2007). Quarante pourcent des CCR ont une mutation sur l'un des acteurs de la voie PI(3)K/Akt, dont PTEN, Akt2 (Parsons et al., 2005). Ces mutations sont généralement exclusives, suggérant qu'une atteinte unique de la voie est suffisante pour procurer un avantage de sélection du clone muté.

La kinase Akt possède de très nombreux substrats/cibles ayant un rôle mitogène ou d'induction de la survie cellulaire, directe ou indirecte. Cette voie PI(3)K/Akt est essentielle à la survie des cellules tumorales mais également des cellules saines (**Figure 16**) (Thelen, 2001).

1.11.3. Voie RAS/MAPK

La cascade Ras/Raf/MEK/Erk transmet des signaux extrinsèques venant de récepteurs situés à la surface des cellules, en particulier de signaux mitogéniques, via les récepteurs à tyrosine kinase comme l'EGFR ou le VEGFR (**Figure 16**). Cette voie est importante pour la croissance et la prolifération des cellules tumorales mais également pour l'induction de signaux proangiogéniques (McCubrey et al., 2007). La famille des gènes *RAS* comprend trois membres : *HRAS* (11p 15,5), *NRAS* (1p13,2) et *KRAS2* (12p12,1) chacun codant pour une protéine de 21 kDa. Les protéines RAS sont des GTPases qui oscillent entre un état actif où elles sont liées au GTP (guanosine-triphosphate) et un état inactif où elles sont liées au GDP (Guanosine Diphosphate). Leur surexpression affecte l'adhésion et le cycle cellulaires. La majorité des mutations du gène *KRAS* sont des mutations faux-sens ciblant les codons 12 et 13. La mutation de l'oncogène *KRAS* est un événement précoce dans la carcinogenèse puisqu'elle est observée avec la même fréquence dans le cancer et les adénomes de plus de 1 cm. Une mutation de *KRAS* est observée dans approximativement 50% des carcinomes colorectaux sporadiques. L'activation de cette voie survient essentiellement dans les tumeurs du côlon de phénotype CIN.

1.11.4. Voie TGF- β /SMAD

Une des fonctions essentielles des protéines de la superfamille du TGF- β est l'inhibition de la prolifération de l'épithélium digestif par ralentissement du cycle cellulaire en G1 (Heldin et al., 1997). Deux gènes suppresseurs de tumeurs codant pour les facteurs de transcription *SMAD4/DPC4* (*Deleted in Pancreatic Carcinoma*) et *SMAD2* ont été identifiés sur le chromosome 18 (18q21). Le « *transforming growth factor β* » (TGF β) se lie au récepteur de type II du TGF- β ; il se forme alors un complexe protéique avec le récepteur de type I du TGF β . Ce complexe phosphoryle SMAD2 qui forme alors un hétérodimère avec SMAD4 (Heldin et al., 1997). Le complexe SMAD2/ SMAD4 est transloqué dans le noyau et induit la

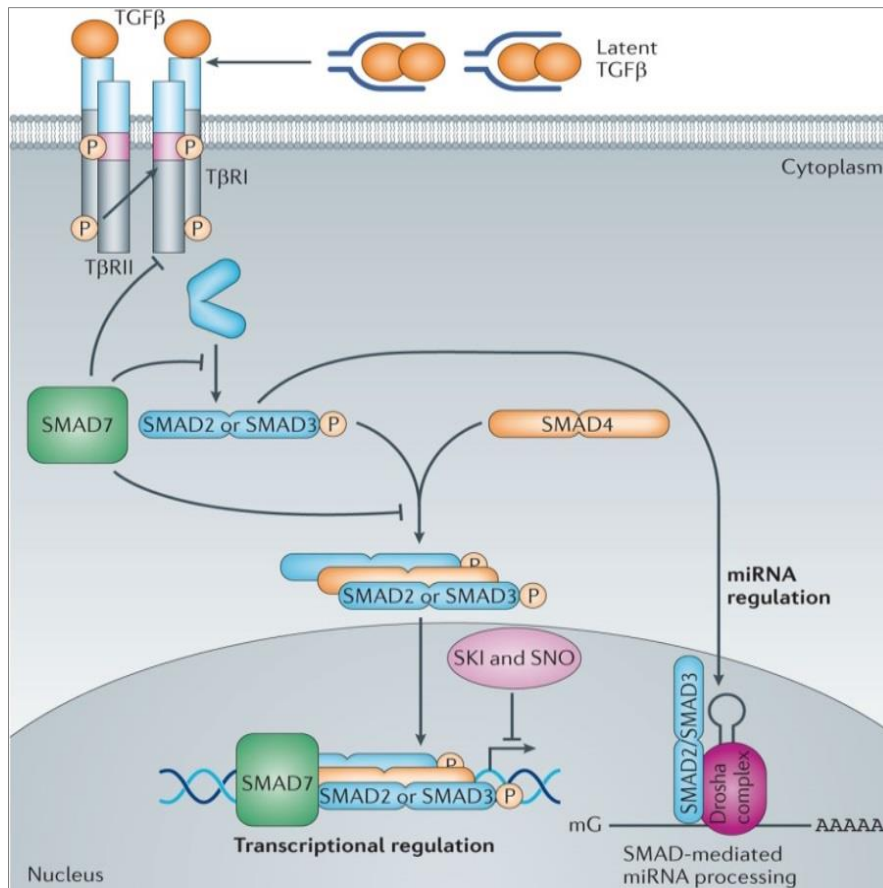


Figure 17 : Voie du Transforming Growth Factor –beta (TGF–β). La fixation du ligand TGFβ sur son récepteurs active TβRII par phosphorylation, ce dernier phosphoryle à son tour TβRI qui active SMAD2 ou SMAD3. Les SMAD sont transloqué dans le noyau afin de réguler la transcription génique.

reference	Marisa et al.	Bundinska et al.	Roepman et al.	De Sousa e Melo et al.	Sadanandam et al.	Schlicker et al.
train set size	443	1113	188	90	445	62
preprocessing	RMA+combat	RMA+batch+RSE filtering	Loess	fRMA	RMA	RMA
clustering	Consensus HCL	Consensus HCL on Metagenes	K-means	HCL	NMF	iNMF
classifier	Centroid (57 gènes)	LDA (54 gènes)	Centroid (187 gènes)	PAM (146 gènes)	PAM (786 gènes)	2-step HCL (1049 gènes)
n subtypes	6	5	3	3	5	5
subtypes names (main features)	CIN Immune down dMMR KRASm Cancer stem cell CIN WNT up CIN normal-like	Surface crypt (KRASm, Serrated) Lower crypt (TP53m) CIMP (MSI, BRAFm) Mesenchymal (BRAFm, mucinous) Mixed Surface crypt	Atype (MSI, BRAF) Btype (Epithelial) Ctype (Mesenchymal)	Inflammatory (MSI) Enterocyte Transit-amplifying Globet-like Stem-like	CCS1 (CIN, TP53) CCS2 (MSI) CCS3 (KRASm/ BRAFm, mesenchymal)	1.1 (mesenchymal) 1.2 (MSI) 1.3 2.1 2.2

fRMA : frozen RMA; HCL : hierarchical clustering; i)NMF : (iterative) negative matrix factorization

Figure 18 : Classifications moléculaires des CCR. D’après Doctorat d’Université de Laetitia Marisa, 2015, HAL Id: tel-01230962 - <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01230962>.

transcription de gènes qui inhibent le cycle cellulaire (**Figure 17**). Des mutations inactivatrices de *SMAD2* et *SMAD4* sont mises en évidence dans plus de 25% des CCR de phénotype CIN. Dans les cancers MSI, une inactivation biallélique du gène du récepteur de type II du TGF- β est observée dans la majorité des cas (Grady et al., 1999).

1.11.5. Voie p53

Le gène *TP53*, situé en 17p, code pour un facteur de transcription qui permet l'intégration du stress cellulaire et la régulation du programme de mort cellulaire (Levine, 1997). En réponse aux différents stress cellulaires, la protéine p53 induit l'expression de gènes cibles essentiels au maintien de l'intégrité du génome :

- des gènes régulateurs du cycle cellulaire dont *p21*, *14-3- σ* et *GADD45* (Jin et al., 2002)
- des gènes régulateurs de l'apoptose
- des gènes régulateurs du métabolisme cellulaire (Bensaad et Vousden, 2007).

La protéine p53 joue ainsi un rôle de « gardien du génome » et sa mutation conduit à la survenue d'altérations génétiques multiples. Le gène *TP53* est muté dans environ 70% des cas de cancers colorectaux CIN. La présence de ces mutations accroît l'instabilité génétique ainsi que la résistance à l'induction de la mort cellulaire et participe à l'initiation de la tumorigenèse.

1.12. Classification moléculaire des CCR

Les CCR sont hétérogènes sur le plan moléculaire en termes de mutations et de mécanismes d'instabilité génomique. Plusieurs classifications ont été proposées à partir de ces marqueurs moléculaires. La caractérisation de ces classes moléculaires est importante car elles reflètent des scénarios oncogéniques distincts.

Globalement, six publications ont proposé des classifications moléculaires sur la base de données de transcriptome (Schlicker et al., 2012; De Souza et al., 2013; Sadanandam al., 2013; Budinska et al., 2013; Marisa et al., 2013; Roepman et al., 2014; **Figure 18**). Cependant, chacune propose un nombre de sous-types différents et des associations cliniques et moléculaires différentes. Aussi, grâce au groupe Sage Bionetwork, une organisation promouvant la science ouverte ("open science") et la collaboration entre équipes, un consortium s'est organisé, regroupant les acteurs des 6 classifications publiées afin de proposer une classification consensus. Cette démarche a donné lieu à une publication parue en 2015 (Guinney et al., 2015). La classification consensus établie sur 3962 tumeurs se compose de 4 sous-types consensus : 14% ont été classées CMS1 (MSI immune), 37% CMS2 (Canonical), 13% CMS3 (Metabolic), 23% CMS4 (Mesenchymal). 13% n'ont pas été

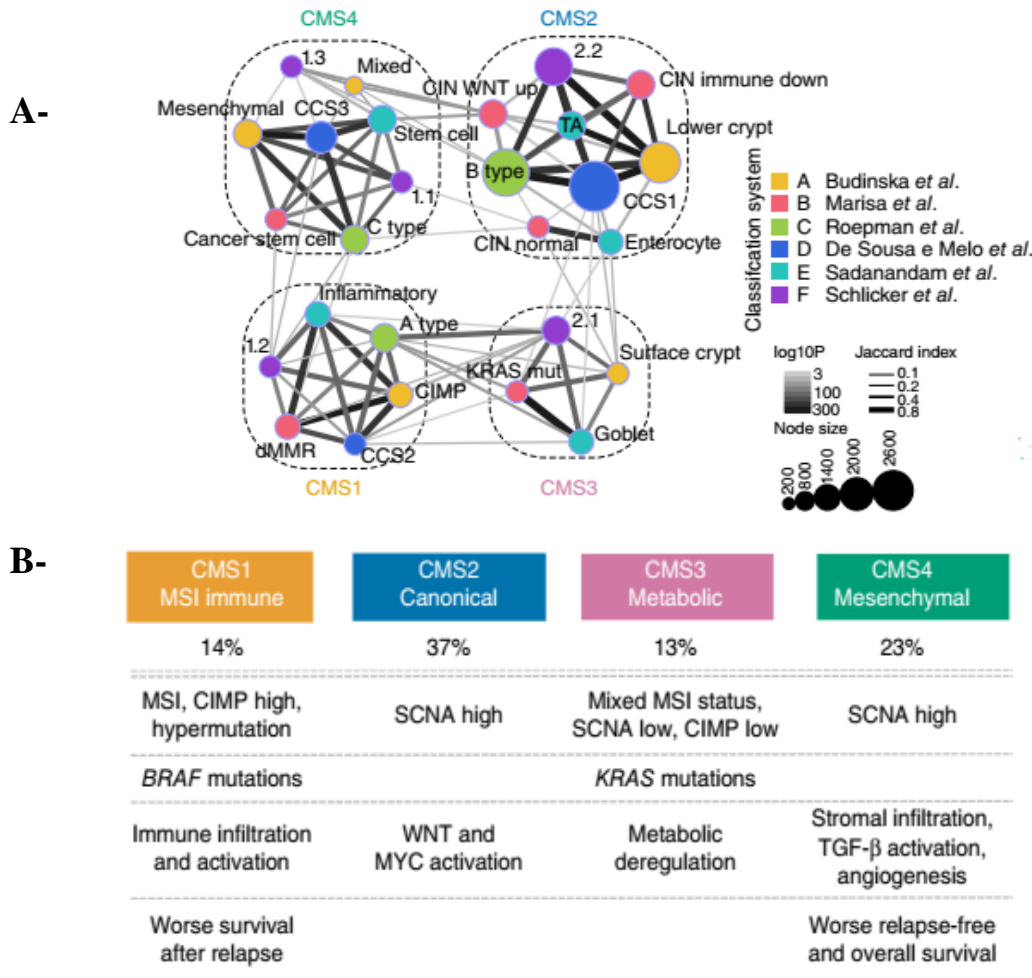


Figure 19 : Résumé des résultats des quatre sous-types consensus. A- Réseau de l'ensemble des sous-types, basé sur les 6 systèmes de classification. Chaque couleur correspond à un groupe de classification. Les quatre clusters correspondent aux quatre groupes CMS B) Principales caractéristiques des sous-types moléculaires de CCR. D'après Guinney et al., 2015.

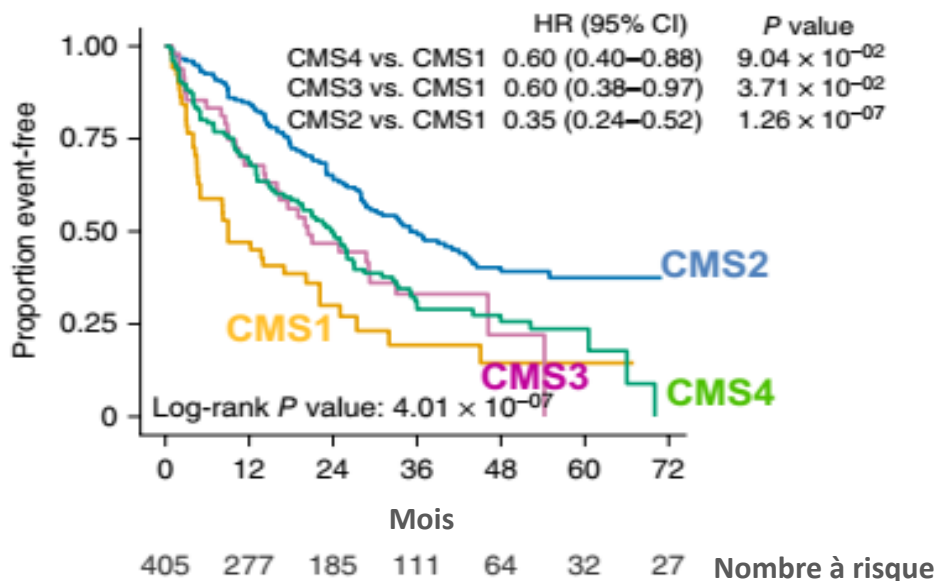


Figure 20 : Associations clinicopathologiques et pronostiques des groupes de sous-types moléculaires consensus.

assignés car ils étaient trop discordants dans les différents systèmes de classification. Les principales caractéristiques sont résumées sur la **Figure 19**.

CMS1 (MSI immune) : enrichi en tumeurs MSI (76%), hypermutées (94%) et ayant une forte activation des gènes de l'immunité.

CMS2 (Canonical) : enrichi en tumeurs épithéliales, très instables génomiquement et présentant une activation des voies Wnt et MYC ; de fréquents gains de copies d'ADN d'oncogènes et pertes de copies d'ADN de gènes suppresseurs de tumeurs y sont retrouvés.

CMS3 (Metabolic) : enrichi en tumeurs épithéliales très fréquemment mutées KRAS (68%) avec une forte dérégulation des voies métaboliques ; il rassemble des tumeurs aux profils génomiques et épigénomiques particuliers avec peu d'altérations le long du génome et un enrichissement du phénotype CIMP (16%) et CIMP-Low (40%, déterminé par classification non supervisée des données méthylomes du TCGA) et du phénotype CIN hypermuté (28%).

CMS4 (Mesenchymal) : enrichi en tumeurs ayant une activation de la voie TGF- β , de l'angiogenèse et de l'EMT, ayant plus d'invasion stromale et diagnostiquées plus tardivement (TNM III/IV).

Les associations aux mutations *BRAF*, *KRAS* et aux instabilités MSI, CIN et CIMP ont été retrouvées. L'étude de la survie a montré un plus mauvais pronostic du sous-type CMS4 pour la survie globale, survie sans rechute et survie après rechute, et un meilleur pronostic de CMS2 pour la survie après rechute (**Figure 20**).

Ces données sont importantes pour la compréhension de la maladie pour envisager la mise en place de traitements plus personnalisés et pour la recherche de marqueurs pronostiques.

1.13. Mécanismes et voies impliqués dans la formation des métastases

Quatre-vingt-dix pourcent des décès par cancer sont dus au développement de métastases plutôt qu'à l'évolution de la tumeur primaire.

Malgré les avancées réalisées dans la recherche en cancérologie, ce processus de progression métastatique reste le moins bien connu. La dissémination des cellules tumorales vers d'autres tissus se réalise en plusieurs étapes connus sous le nom de la cascade d'invasion métastatique. Ceci commence par une invasion du tissu adjacent de la tumeur primaire puis une intravasation de ces cellules pour rejoindre la circulation sanguine ou le système lymphatique. Les cellules qui auront survécu dans la circulation pourront s'arrêter, traverser la paroi

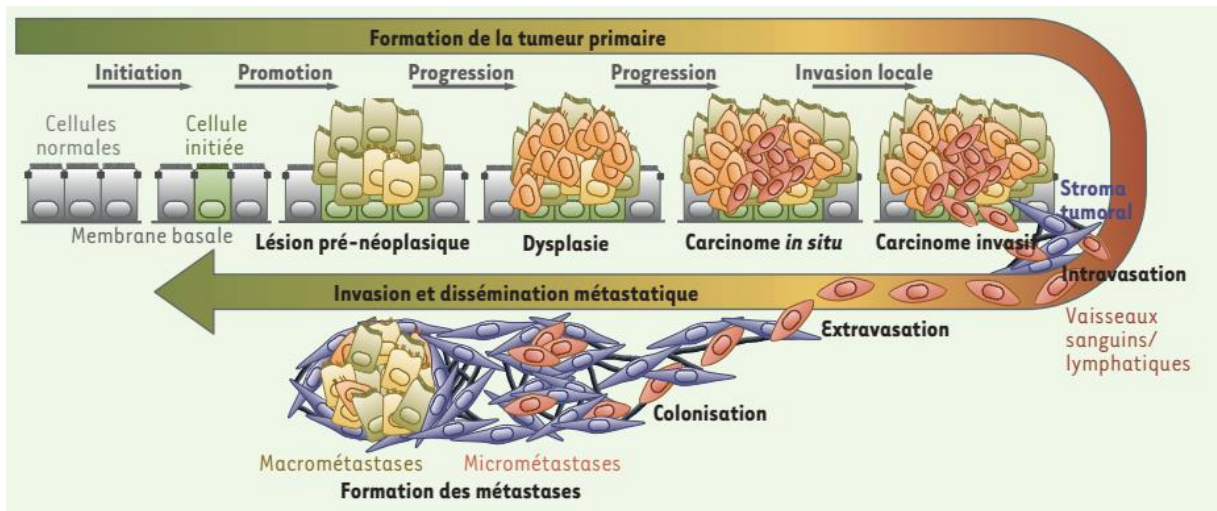


Figure 21 : Principales étapes du développement d'une tumeur et de la cascade métastatique. La cascade métastatique est initiée par une phase d'invasion tissulaire, menant à un carcinome invasif, suivie d'une phase d'intravasation, les cellules cancéreuses pénètrent alors dans la circulation sanguine ou lymphatique. La survie dans la circulation de certaines cellules, et leur extravasation pourront conduire à la colonisation d'un site secondaire pour former des micrométastases puis des métastases détectables dans un site distant de la tumeur primaire. D'après Moyret-Lalle et al., 2016.

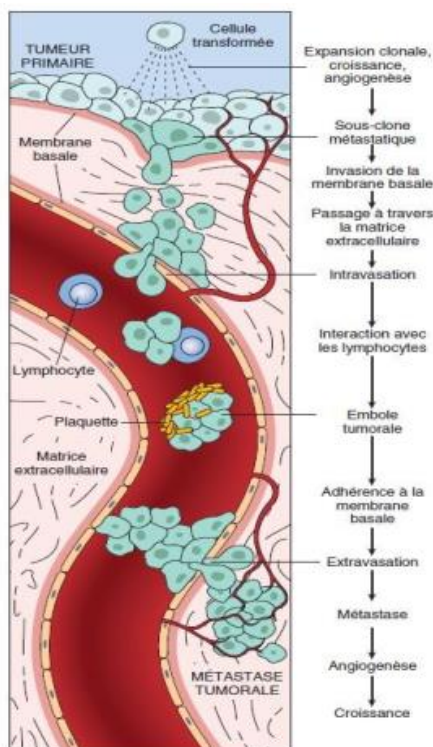


Figure 22 : Processus de dissémination métastatique. D'après le « Collège Français des Pathologistes (Collège Français des Pathologistes) », 2012.

Certaines cellules de la tumeur primitive acquièrent des caractéristiques leur permettant de devenir invasives, traverser la membrane basale, la matrice extracellulaire, la paroi vasculaire (intravasation) pour atteindre la circulation sanguine. Certaines cellules tumorales quittent la circulation sanguine (extravasation) et adhèrent à la membrane basale du tissu hôte pour former des métastases.

vasculaire pour atteindre le parenchyme d'un tissu à distance de la tumeur, c'est l'extravasation. Une fois dans le tissu secondaire, ces cellules vont former des micrométastases, qui vont proliférer pour former des lésions métastatiques cliniquement détectables, on parle alors de colonisation (**Figure 21**) (Lambert et al., 2017).

1.13.1. La transition épithélio-mésenchymateuse

Un des processus intervenant dans cette progression métastatique est la transition épithélio-mésenchymateuse (ou EMT). Ce processus qui intervient naturellement au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte pour la cicatrisation des tissus épithéliaux, est détourné par les cellules cancéreuses qui vont perdre leurs caractéristiques épithéliales et acquérir des propriétés mésenchymateuses favorables au processus de dissémination (Lambert et al., 2017). Le processus d'intravasation nécessite la dégradation de la paroi du vaisseau et cette étape peut être facilitée par les TAM qui ouvrent un passage dans le vaisseau. Les cellules cancéreuses peuvent également pénétrer dans la circulation sanguine en empruntant le réseau vasculaire anarchique de la tumeur. Après l'intravasation, les amas de cellules tumorales qui atteignent la circulation sanguine y restent généralement quelques secondes ou quelques minutes mais peuvent être éliminées. En effet, les cellules rencontrent plusieurs obstacles avant de pouvoir atteindre le parenchyme aux sites de métastases. Ces obstacles sont la résistance au flux sanguin (fortes pressions hydrodynamiques), les attaques des cellules immunitaires circulantes dont les « Natural Killer » (NK) qui assurent leur élimination rapide. Toutefois, d'autres cellules dans la circulation peuvent par contre faciliter la sortie des vaisseaux sanguins (l'extravasation), tels que les plaquettes, les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales (**Figure 22**) (Lambert et al., 2017).

Pour l'extravasation, les cellules traversent la paroi endothéliale par un processus nommé TEM pour « Migration Trans Endothéliale ». Cette étape est facilitée par la libération d'ATP par les plaquettes rendant les parois capillaires plus perméables. En plus de l'ATP, d'autres molécules telles que le VEGF, CCL2, les MMPs et ADAM12, sont décrites comme perturbateurs de l'intégrité de la paroi vasculaire, facilitant l'intravasation comme l'extravasation (**Figure 23**, verso page suivante) (Lambert et al., 2017). Le nouvel environnement n'est pas favorable au développement tumoral et le groupe de cellules cancéreuses métastatiques forme une micrométastase. Pour former une macrométastase, ces cellules doivent s'adapter au nouveau tissu, ce qui peut être très long, par un processus de colonisation. Certains organes vont être plus favorables pour le développement des métastases car ils fournissent un environnement plus avantageux aux cellules tumorales. Par exemple

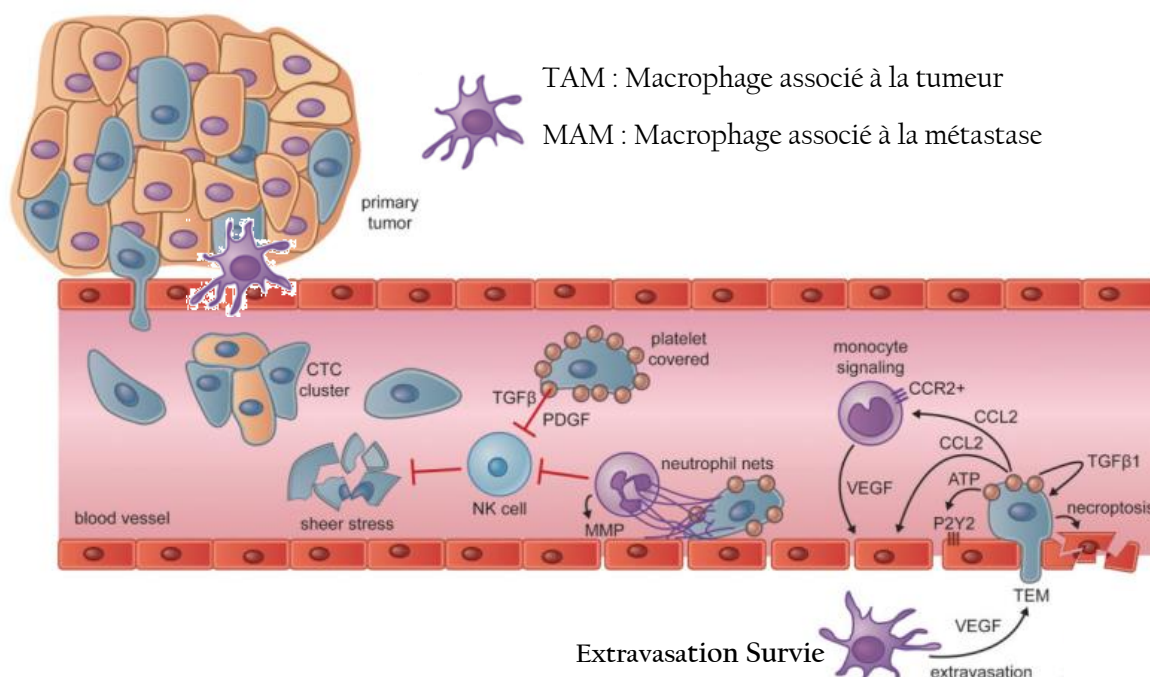


Figure 23 : Les cellules tumorales s'échappant de la tumeur primaire pénètrent dans la circulation par intravasation, soit sous forme de cellules tumorales circulantes (CTC), soit sous forme d'amas multicellulaires de CTC. La circulation sanguine constitue un environnement hostile pour les CTC, les exposant à une élimination rapide par les cellules tueuses naturelles (NK) ou à une fragmentation due aux contraintes physiques rencontrées lors du transit dans la circulation (contrainte de cisaillement). Les cellules acquièrent une protection physique et immunitaire grâce aux actions des plaquettes, qui enrobent les CTC peu après l'intravasation. Les neutrophiles peuvent également fournir une protection contre les attaques de cellules NK, tout en contribuant à la capture physique et à l'extravasation des CTC. Une fois déposées dans un capillaire, les plaquettes et les cellules tumorales sécrètent des facteurs actifs sur les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules elles-mêmes. Les effets collectifs de ces interactions favorisent la migration transendothéliale (TEM) des cellules, processus qui peut être facilité par les macrophages associés aux métastases (MAM) dans le parenchyme du tissu cible. D'après Lambert et al., 2017.

pour le cancer du sein, les sites de métastases sont préférentiellement les os et les poumons alors que pour les CCR, les métastases au niveau du foie sont plus fréquentes.

Bien que les modèles traditionnels de tumorigenèse suggèrent que la dissémination métastatique est un événement tardif en plusieurs étapes au cours de la progression tumorale, certaines études ont montré que l'acquisition de l'EMT et la mise en place du processus de dissémination peuvent, en réalité, se produire relativement tôt, déjà dans certaines lésions pré-néoplasiques (Hüsemann et al., 2008; Rhim et al., 2012). L'EMT est un processus qui est induit par un ensemble de mécanismes gérés par des facteurs de transcription, parmi lesquels: Snail, Slug, Twist et Zeb1. Ces facteurs sont induits par des signaux issus des cellules tumorales elles-mêmes ou de la matrice extracellulaire associée à la tumeur tels que le TGF- β , le PDGF (platelet-derived growth factor), Wnt et le FGF (Fibroblast Growth factor).

L'inflammation, associée à la tumorigenèse, favorise également le franchissement de certaines étapes de la dissémination métastatique. En effet, elle conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène, de protéases, de cytokines et de chimiokines par les cellules immunitaires. Par exemple, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sécrètent de l'IL-10 (interleukine-10) et du TGF- β qui vont moduler la réponse immunitaire et activer la néo-angiogenèse, favorisant simultanément la plasticité cellulaire et la dissémination métastatique (Treppe and Gavard, 2015).

Le caractère polyclonal des colonies métastatiques suggèrent que les cellules qui sont à l'origine des métastases sont génétiquement différentes, ce qui pourrait indiquer que la dissémination à partir de la tumeur primitive s'est faite par une migration collective d'un groupe de cellules tumorales, plutôt que par la dissémination de cellules individuelles comme cela a été décrit dans les cancer du sein (Cheung et al., 2016). Ce groupe de cellules est généralement situé au niveau du front d'invasion, et va suivre le comportement de certaines cellules qui ont subi une EMT, perdu leur capacité d'adhésion et qui libèrent divers protéases permettant de dégrader la matrice extracellulaire. Le reste des cellules restent attachées au groupe par les jonctions cellule/cellule (**Figure 24**, verso page suivante) (Lambert et al., 2017). A noter que l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses confère aux cellules une résistance aux traitements cytotoxiques de chimio- et de radiothérapie (Gupta et al., 2009; Kurrey et al., 2009).

1.14. Modèles animaux

1.14.1. Modèles de carcinogenèse colique

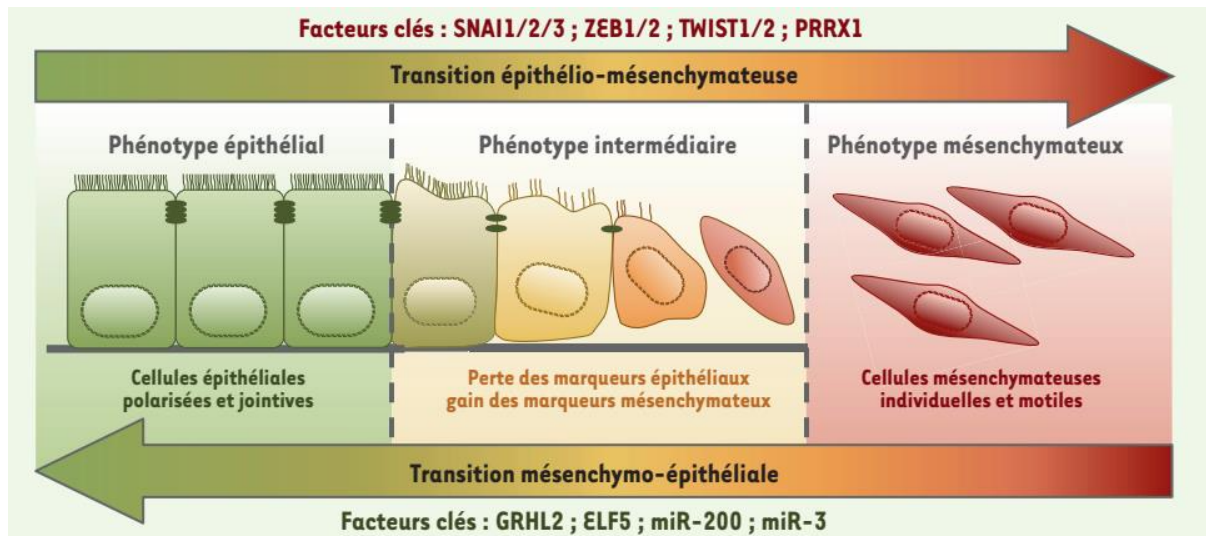


Figure 24 : Transition épithélio-mésenchymateuse et dissémination métastatique. La plasticité des cellules cancéreuses joue un rôle déterminant dans l'adaptation des cellules aux contraintes qui leur sont imposées au cours des différentes étapes de la cascade métastatique. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et son processus réverse (TME) sont impliqués respectivement dans les phases précoces et tardives de cette cascade. L'expression des facteurs de transcription des familles TWIST, ZEB et SNAIL induit une TEM, conduisant à l'apparition de cellules mésenchymateuses motiles et invasives, alors que les facteurs GRHL2 (grainy head-like protein 2 homologue) ou ELF5 (E74-like factor 5) ainsi que certains micro-ARN, tels que les membres de la famille miR-200, favorisent un phénotype épithélial (transition mésenchymateuse-épithéliale). D'après Moyret-Lalle et al., 2016.

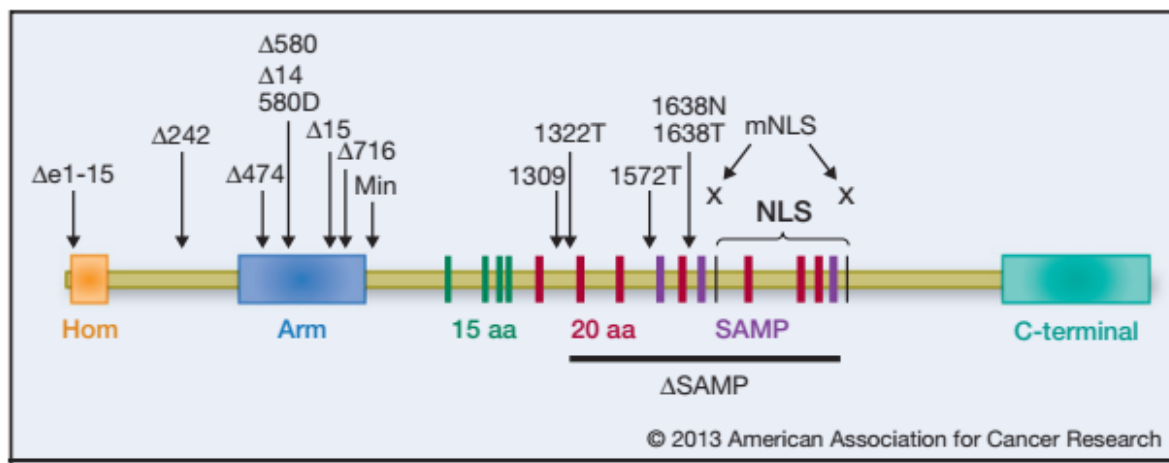


Figure 25 : Sites de mutations APC dans différents modèles de souris APC. Les domaines sont: Hom, homodimérisation; Arm, Armadillo répète; sérine – alanine – méthionine – proline (SAMP), liaison à l'axine; NLS, signaux de localisation nucléaire. C-terminal inclut les domaines microtubule, EB1 et PDZ binding. Le « Mutational Cluster Region » se situe entre les codons 1250 et 1464. D'après (Zeineldin and Neufeld, 2013a).

Dans le CCR, la compréhension de mécanismes moléculaires responsables du développement et de la progression d'une tumeur, ainsi que les réponses à divers thérapies nécessitent l'utilisation de modèles animaux mimant au mieux les caractéristiques des tumeurs.

1.14.1.1. Carcinogénèse chimiquement induite

L'utilisation d'agents carcinogènes chez les rongeurs, est une des méthodes utilisées afin d'induire l'apparition de tumeurs. L'efficacité de cette méthode dépend de la souche de souris choisie, de la dose ainsi que la durée d'exposition à l'agent carcinogène.

Un des agents carcinogènes le plus utilisé dans les modèles d'induction du CCR, est l'azoxymethane (AOM). Cette molécule induit la formation de cryptes aberrantes et de tumeurs en activant les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et EGFR ainsi que l'activation des facteurs de transcription tels que STAT3 et NF- κ B, favorisant l'expression de la NOS inductible (iNOS), COX-2, VEGF et MMP-9 (Lai et al., 2011).

Les amines hétérocycliques sont également des composant génotoxiques utilisés pour induire la formation de tumeurs chez la souris, mais ce composant n'induit pas les mêmes altérations que celles décrites dans les tumeurs humaines et la durée de traitement des animaux est longue (environ 50 semaines) (Evans et al., 2016). Par conséquent, cette méthode est peu adaptée pour les études évaluant l'efficacité des thérapies.

Malgré les avantages du modèle de carcinogénèse induite chimiquement, il reste peu adapté aux études des stades métastatiques puisque l'induction de la tumorigénèse est longue et la formation de métastases reste rare.

1.14.1.2. Carcinogénèse génétiquement induite

Depuis l'identification des mutations responsables de la polypose adénomateuse et du syndrome de Lynch, plusieurs modèles transgéniques ont été mis au point pour mieux comprendre la progression du CCR et développer de nouvelles thérapies :

1.14.1.2.1. Modèles APC

Les souris hétérozygotes pour certaines mutations du gène APC développent de multiples adénomes et adénocarcinomes le long du tube digestif, mimant ainsi la polypose adénomateuse humaine (Kobaek-Larsen et al., 2000). De nombreuses souches portant des mutations ont été développées (**Figure 25** ; (Zeineldin and Neufeld, 2013b):

- Les souris Min (Multiple Intestinal Neoplasia) sont obtenues par traitement à l'éthylnitrosourée, un puissant mutagène qui entraîne une mutation non-sens au codon 851 du gène APC (Moser et al., 1990). Cette mutation est autosomique et dominante. Les souris Min homozygotes sont létales et les souris hétérozygotes développent de 20 à 100 polypes dans le

tractus gastro-intestinal, essentiellement dans l'intestin grêle, avec quelques polypes dans le côlon et l'estomac. Ces polypes sont bénins et n'évoluent en adénocarcinomes que chez certaines souris âgées. La raison étant que l'espérance de vie de ces souris est limitée et elles n'ont pas le temps d'accumuler d'autres anomalies nécessaires à la carcinogénèse.

- Les souris knockout APC Δ 716 expriment un gène APC tronqué au niveau du codon 716 et développent jusqu'à 300 polypes principalement dans l'intestin grêle (Kobaek-Larsen et al., 2000).

- Les souris knockout APC 1638N expriment un gène APC tronqué dans le codon 1638 mais contrairement aux souris APC Δ 716, elles développent peu de polypes intestinaux. Enfin, chez les souris APC Δ 14, le nombre de polypes et leur histologie est similaire à ce qui est décrit chez les souris APC Min/+.

A noter qu'une mutation hétérozygote du gène codant le facteur de transcription Cdx2 chez des souris APC Δ 716 permet le développement de nombreux polypes dans le colon (Aoki et al., 2003), de même qu'une mutation du gène BubR1 des souris Min/+ (Rao et al., 2001).

1.14.1.2.2. Modèles MMR

Les gènes MMR (Mismatch Repair) sont les gènes responsables de la correction des mésappariement de l'ADN. Parmi eux, les gènes *MSH2* et *MLH1* jouent un rôle important.

Puisque des mutations au niveau de ces gènes sont à l'origine du syndrome de Lynch chez l'Homme. Chez la souris, l'inactivation des gènes *MSH2* et *MLH1* provoque de manière similaire l'apparition d'adénomes et d'adénocarcinomes colorectaux. Les adénomes sont plans et différent de ceux obtenus avec une mutation APC, qui sont pédiculés (Boivin et al., 2003). Il existe des modèles qui combinent des mutations MMR avec des mutations APC, permettant ainsi d'explorer les relations entre les gènes (Edelmann et al., 1999; Kuraguchi et al., 2001).

1.14.1.3. Modes d'implantation tumorale

Les cellules de lignées tumorales ou issues de tumeurs humaines peuvent être injectées par différentes voies chez des souris immunodéficiences (nu/nu, Severe Combined ImmunoDeficiency SCID ou Nod Scid Gamma NSG) : en implantation ectopique, orthotopique, par injection intraveineuse ou intrasplénique. Ces PDX pour « Patient Derived Xenograft », conservent les caractéristiques moléculaires et génétiques de la tumeur du patient même après plusieurs passages (Guenot et al., 2006; Evans et al., 2016).

Pour les expériences nécessitant l'existence d'un système immunitaire comme par exemple des tests d'immunothérapies, des souches de souris immunocompétentes sont utilisées mais ne permettent que des xénogreffes syngéniques en utilisant des cellules d'origine murine.

1.14.1.3.1. Greffes ectopiques ou sous-cutanées

Ce type de greffe constitue le mode de greffe le plus utilisé et le plus simple à réaliser. Il consiste en l'injection d'une suspension cellulaire de cellules tumorales au niveau du flanc de la souris. Cette technique permet de suivre avec facilité la croissance tumorale en mesurant le volume au pied à coulisse. En revanche, le microenvironnement tumoral est clairement différent de celui présent au site de la tumeur primaire du patient, dans le côlon pour le CCR. Cette méthode demande peu d'expertise et permet d'évaluer rapidement la réponse des cellules tumorales, aux thérapies, sur un grand nombre d'animaux (Evans et al., 2016).

1.14.2. Modèles de métastases coliques *in vivo* pour le CCR

Les métastases sont observées dans 40 à 60 % des cas de CCR (métastases synchrones dans 25 % des cas). Cette fréquence élevée suscite le questionnement autour des mécanismes de développement et des thérapies. Afin d'y répondre, des modèles animaux ont été développés de sorte que les cellules tumorales de la tumeur primaire migrent vers la circulation sanguine pour s'implanter dans les sites favorable au développement des métastases tels que le foie et les poumons pour le CCR. Parmi ces modèles, on trouve la greffe orthotopique dans le caecum et les injections intrasplénique (dans la rate) ou dans les veines porte ou caudale (Evans et al., 2016).

1.14.2.1. Greffes orthotopiques

Pour mimer au mieux le microenvironnement tumoral de la tumeur primaire, des greffes orthotopiques sont réalisées. Pour le CCR, cela consiste en la greffe d'un fragment tumoral ou l'injection de cellules tumorales en suspension au niveau de leur site naturel de formation, le caecum. Cette configuration favorise l'invasion et la formation de métastases. Cependant, ce type de greffe nécessite une certaine technicité et l'anesthésie générale de l'animal (Evans et al., 2016).

1.14.2.2. Injections intrasplénique et vasculaire

L'injection d'une suspension de cellules tumorales dans la rate permet de favoriser des métastases dans le foie après 90 jours chez la souris immunodéficente. L'efficacité dépend de la capacité métastatique des cellules injectées mais aussi de la souche de souris, puisque par exemple, 78% de souris NMRI développent des métastases hépatiques après 6 semaines pour

Noms standards	Noms communs
CXCL1	GRO α , MGSA Mouse: KC
CXCL2	Gro β ; MIP-2 α Mouse: MIP-2
CXCL3	Gro γ ; MIP-2 β ,
CXCL4	Platelet Factor-4
CXCL4L1	PF4V1
CXCL5	ENA-78 Mouse: LIX
CXCL6	GCP-2
CXCL7	NAP-2
CXCL8	IL-8
CXCL9	Mig
CXCL10	γ IP-10
CXCL11	I-TAC
CXCL12	SDF-1 α ^a
CXCL13	BLC
CXCL14	BRAK
Cxcl15	lungkine
CXCL16	SR-PSOX
CXCL17	
CCL1	I-309
CCL2	MCP-1 Mouse: JE
CCL3	MIP-1 α
CCL3L1	
CCL3L3	
CCL4	MIP-1 β
CCL4L1	
CCL4L2	
CCL5	RANTES
Ccl6	C10, MRP-1
CCL7	MCP-3
CCL8	MCP-2
Ccl9	MRP-2, MIP-1 γ
CCL10 (reserved)	
CCL11	Eotaxin
Ccl12	Mcp-5
CCL13	MCP-4
CCL14	HCC-1
CCL15	HCC-2
CCL16	HCC-4
CCL17	TARC
CCL18	PARC
CCL19	ELC
CCL20	MIP-3 α , LARC
CCL21	SLC
CCL22	MDC
CCL23	MPIF-1
CCL24	Eotaxin-2
CCL25	TECK
CCL26	Eotaxin-3
CCL27	CTACK
CCL28	MEC
XCL1	Lymphotactin α
XCL2	Lymphotactin β
CX-CL1	Fractalkine

Tableau 6 : Nomenclature des chimiokines, leurs noms communs (Bachelerie et al., 2014)

les cellules HT29 mais 100% chez les souris C57B/6 injectées avec des cellules MCA38. Dans tous les cas, une splénectomie est nécessaire afin d'éviter la formation d'une tumeur au site de l'injection (Evans et al., 2016).

L'injection au niveau de la veine porte nécessite une certaine technicité mais représente un bon modèle mimant la migration des cellules tumorales vers le foie, avec un taux d'efficacité allant jusqu'à 100%. L'injection dans la veine de la queue serait plus adaptée pour la formation de métastases dans les poumons (Szabo et al., 2015).

L'inconvénient de ces derniers modèles est l'absence de formation d'une tumeur primaire (Evans et al., 2016).

2. Chimiokines et leurs récepteurs

2.1. Généralités

Les chimiokines, 50 identifiées à ce jour, font partie de la grande famille des cytokines. Ce sont de petites protéines sécrétées qui assurent la communication entre les cellules en stimulant principalement leur mobilité par un phénomène appelé chimiotactisme. Ce système de chimiotactisme est conservé dans l'évolution, des Gnathostomes aux humains et certaines d'entre elles sont hautement conservées (Legler and Thelen, 2016). Dans la phylogénie, les récepteurs de chimiokines constituent un groupe de la sous famille des récepteurs rhodopsine-like qui ont la particularité commune d'induire la migration cellulaire (Fredriksson et al., 2003).

2.2. Les chimiokines, structure et classification

Les chimiokines ont été connues pour leur implication dans le contrôle de la migration des cellules immunitaires. Elles agissent à travers leur fixation sur des récepteurs à sept segments transmembranaires généralement couplés aux protéines hétérotrimétriques Gi. L'activation de ces protéines induit une cascade de signalisation ayant pour conséquence la migration des cellules vers la source de chimiokines en suivant un gradient de concentration.

Les chimiokines sont constituées de 70 à 125 acides aminés avec un poids moléculaire allant de 6 à 14 kDa (Le et al., 2004).

Il existe 47 chimiokines décrites chez l'homme à ce jour (**Tableau 6**) et elles se subdivisent en fonction de leur activité en deux catégories. La première constitue la famille des chimiokines « inflammatoires ou inductibles », qui sont régulées par des stimuli inflammatoires importants dans les réponses immunitaires innées et adaptatives. La seconde constitue la famille des chimiokines « homéostatiques ou constitutives » qui jouent un rôle clé

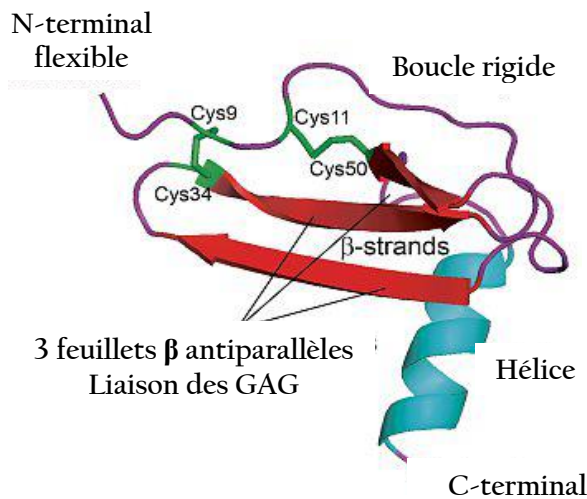
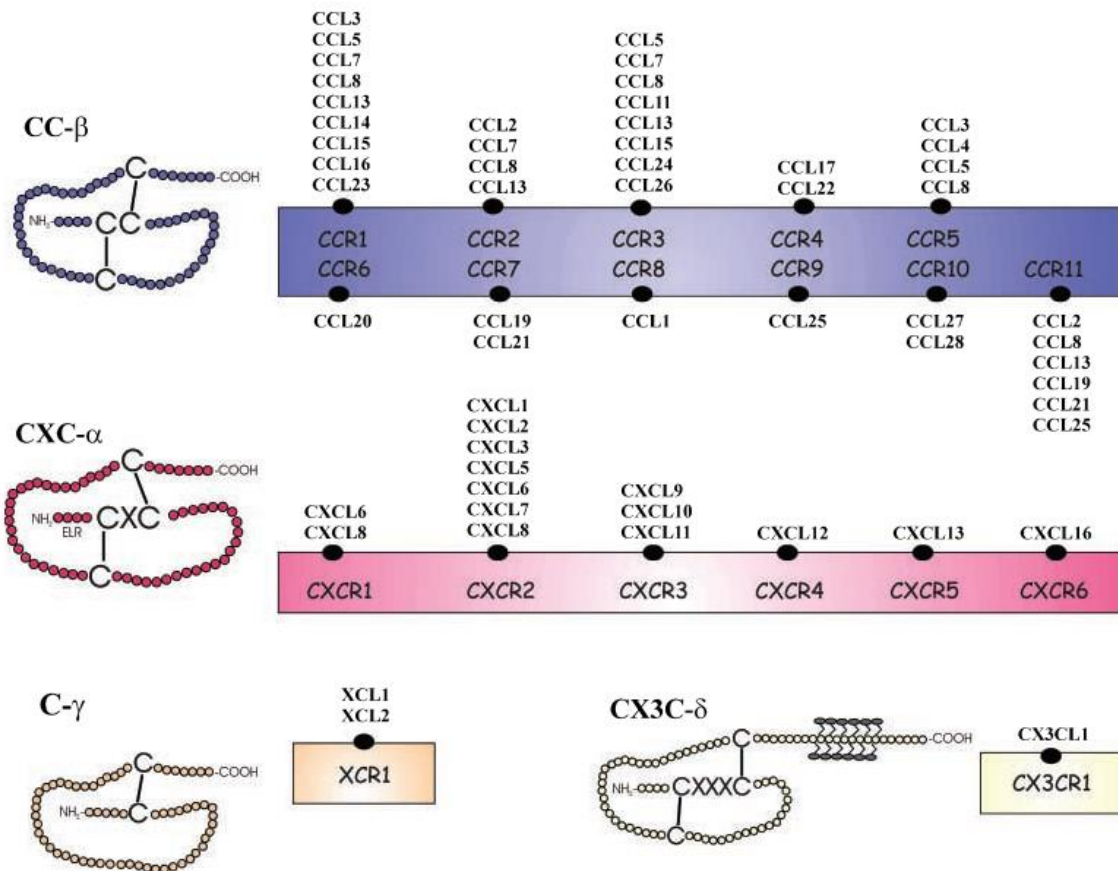


Figure 26 : Structure type d'une chimiokine (ici CXCL12). GAG : Glycosaminoglycanes. D'après Legler et Thelen, 2016.

A-



B-

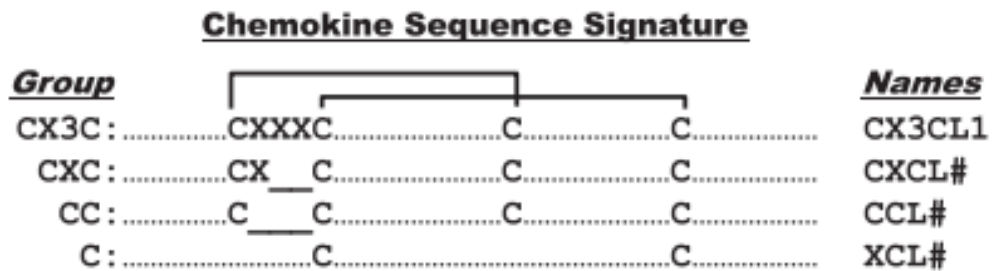


Figure 27 : A) Caractéristiques structurales de différentes classes de chimiokines. D'après Bajetto et al., 2002. B) Nomenclature des chimiokines. D'après Bachelerie et al., 2014.

dans la surveillance immunitaire en orchestrant le trafic des lymphocytes et des cellules dendritiques entre les tissus lymphatiques primaires et secondaires (Zimmerman et al., 2008). Certaines chimiokines (CXCL12/SDF-1) peuvent à la fois appartenir aux deux catégories dépendant du contexte biologique ou de l'état pathologique (Zlotnik, 2006).

La classification des chimiokines se fait également sur la base de leur structure; elles partagent toutes, une structure secondaire et tertiaire similaire, avec deux résidus cystéine au niveau de l'extrémité N-terminal reliées par deux ponts disulfures à deux autres cystéines (**Figure 26**). Les cystéines de l'extrémité N-ter sont utilisées dans leur nomenclature, dans laquelle on retrouve la lettre L qui signifie «ligand», et un nombre qui désigne l'ordre selon lequel la chimiokine a été découverte. Cette structure permet de définir 4 groupes : si les deux cystéines sont adjacentes, la chimiokine est appelée CCL (groupe β). Si elles sont séparées par un acide aminé, elle est alors appelée CXCL (groupe α). On trouve également une chimiokine C (groupe γ) et une chimiokine CX3C (groupe δ) (**Figure 27**, verso page suivante). Cette nomenclature est transposée aux récepteurs correspondant, qui seront alors nommés CCR ou CXCR.

Une autre dichotomie s'établit également au sein de la sous-famille des chimiokines CXC selon la présence (7 chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8,) ou l'absence du motif Glu-Leu-Arg (ELR) à l'extrémité N-terminale. Ce motif ELR n'est pas simplement structurel mais semble être lié à une fonction, donnant une spécificité pour la chimiotaxie des neutrophiles et pour l'angiogenèse (Strieter et al., 1995).

La partie N-terminale de la chimiokine est cruciale pour l'activation du récepteur en induisant un changement de conformation qui permet la transmission du signal. *In vivo*, les chimiokines se retrouvent sous forme monomérique ou oligomérique (Legler and Thelen, 2016). L'extrémité N-terminale de CXCL12 par exemple, notamment les deux premiers acides aminés (Lys-1 et Pro-2), est nécessaire à l'activation du récepteur CXCR4. Il a été démontré que la perte de ces deux résidus diminue l'affinité de CXCL12 pour son récepteur CXCR4 de 10 fois et empêche son activation (Crump et al., 1997)

L'homologie de séquence des acides aminés est de 30% entre les membres des quatre principaux groupes de chimiokines, mais varie de 30 à 99% parmi les membres d'un même groupe, indiquant des évolutions distinctes. La plupart des chimiokines du groupe CXC ciblent les neutrophiles, alors que celles du groupe CC ciblent les monocytes, les lymphocytes T, les basophiles et les éosinophiles mais ont peu d'action sur les neutrophiles.

A noter qu'il existe des différences entre les chimiokines humaines et murines. Par exemple, CXCL8, CCL18, CCL23 sont présentes chez l'homme mais absentes chez la souris (Zlotnik

A-

Receptor	Immune cell expression	Key immune function
G protein-coupled receptors		
CXCR1	Neutrophil > monocyte, NK, mast cell, basophil, CD8 ⁺ T _{EFF}	Neutrophil trafficking
CXCR2	Neutrophil > monocyte, NK, mast cell, basophil, CD8 ⁺ T	B cell lymphopoiesis, neutrophil egress from bone marrow, neutrophil trafficking
CXCR3	Th1, CD8 ⁺ T _{CM} and T _{EM} , NK, NKT, pDC, B cell, Treg, Tfh	Th1-type adaptive immunity
CXCR4	Most (if not all) leukocytes	Hematopoiesis, organogenesis, bone marrow homing
CXCR5	B cell, Tfh, Tfr, CD8 ⁺ T _{EM}	B and T cell trafficking in lymphoid tissue to B cell zone/follicles
CXCR6	Th1, Th17, $\gamma\delta$ T, ILC, NKT, NK, plasma cell	ILC function, adaptive immunity
CCR1	Monocyte, macrophage, neutrophil, Th1, basophil, DC	Innate immunity, adaptive immunity
CCR2	Monocyte, macrophage, Th1, iDC, basophil, NK	Monocyte trafficking, Th1-type adaptive immunity
CCR3	Eosinophil > basophil, mast cell	Th2-type adaptive immunity, eosinophil distribution and trafficking
CCR4	Th2, skin- and lung-homing T, Treg > Th17, CD8 ⁺ T, monocyte, B cell, iDC	Homing of T cells to skin and lung, Th2-type immune response
CCR5	Monocyte, macrophage, Th1, NK, Treg, CD8 ⁺ T, DC, neutrophil	Type 1 adaptive immunity
CCR6	Th17 > iDC, $\gamma\delta$ T, NKT, NK, Treg, Tfh	iDC trafficking; GALT development, Th17 adaptive immune responses
CCR7	naive T, T _{CM} , T _{RCM} , mDC, B cell	mDC, B cell, and T cell trafficking in lymphoid tissue to T cell zone, egress of DC and T cells from tissue
CCR8	Th2, Treg, skin T _{RM} , $\gamma\delta$ T, monocyte, macrophage	Immune surveillance in skin, type 2 adaptive immunity, thymopoiesis
CCR9	Gut-homing T, thymocytes, B, DC, pDC	Homing of T cells to gut, GALT development and function, thymopoiesis
CCR10	Skin-homing T cell, IgA-plasmablasts	Humoral immunity at mucosal sites, immune surveillance in skin
XCR1	Cross-presenting CD8 ⁺ DC, thymic DC	Antigen cross-presentation by CD8 ⁺ DCs
CX3CR1	Resident monocyte, macrophage, microglia, Th1, CD8 ⁺ T _{EM} , NK, $\gamma\delta$ T cell, DC	Patrolling monocytes in innate immunity, microglial cell and NK cell migration, type 1 adaptive immunity

B-

Name	Alternative names	Ligands	Demonstrated signalling mechanisms	Sites of expression
ACKR1	DARC, CD234, Duffy antigen	CCL1,2,5,7,8,11,13,14,16,17,18 CXCL1,2,3,4,5,6,8,9,10,11,13	None defined	Red blood cells, vascular endothelial cells, Purkinje cells.
ACKR2	Ccbp2, D6, CMKBR9	CCL2,3,3L1,4,5,6,7,8,11,12,13,14,17,22,23,24,26	β -arrestin	Lymphatic endothelial cells, B1 B cells, trophoblastic cells, keratinocytes.
ACKR3	RDC1, CXCR7, CMKOR1	CXCL11, 12. Adrenomedullin, opioid peptides	β -arrestin	Vascular endothelial cells, haematopoietic cells, neurons, various developmental cell types.
ACKR4	CCRL1, CCXCKR, CCR11	CCL19, 21, 25. CXCL13	β -arrestin	Lymphatic endothelial cells, germinal centre B cells, thymic epithelial cells.

Tableau 7 : A) Récepteurs des chimiokines convetionnels et B) récepteurs des chimiokines atypiques. D'après Bachelierie et al., 2014, 2015.

and Yoshie, 2000) et donc toutes les observations dans les modèles de souris ne peuvent pas être généralisées chez l'homme.

2.3.Modifications post-traductionnelles des chimiokines

La plupart des chimiokines sont sécrétées sous forme soluble excepté CX3CL1 et CXCL16 qui restent associées à la membrane cellulaire pour être libérées après clivage par des métalloprotéases (Le et al., 2004).

Les chimiokines sont affectées par des modifications post-traductionnelles telles que la citrullination (Loos et al., 2008; Struyf et al., 2009), la nitration/nitrosylation (Molon et al., 2011) et le clivage par des métalloprotéases matricielles (MMP), les cathepsines, la thrombine, la plasmine, l'élastase, des protéases (Proost et al., 2017). Ces changements peuvent sensiblement modifier l'activité de la chimiokine. Par exemple, la nitration des résidus de tyrosine de CCL2 par des espèces réactives de l'azote réduit la capacité de cette chimiokine à attirer les monocytes via CCR2 (Barker et al., 2017). De même, les résidus arginine de nombreuses chimiokines peuvent être convertis en citrulline par la peptidylarginine désaminase. Les conséquences sont une réduction du chimiotactisme de CXCL8, CXCL10 et CXCL11 (Loos et al., 2008) et le blocage de la conversion de CXCL8 en une forme raccourcie plus active (Proost et al., 2008).

Les protéases sont des régulateurs clés des chimiokines. En fonction de la chimiokine, la réduction par CD26 de deux acides aminés de l'extrémité N terminale de la chimiokine peut modifier la spécificité du récepteur, modifier sensiblement l'affinité du récepteur ou convertir les chimiokines en antagonistes (Metzemaekers et al., 2016). Par exemple, CXCL12 est inactivé par des MMP telles que les MMP-2, -3,-9,-13,-14 et cette inactivation est hautement neurotoxique sans affecter directement le chimiotactisme (Van Lint and Libert, 2007). Cependant, il est intéressant de noter que toutes les formes tronquées générées se sont révélées fonctionner comme des antagonistes inflammatoires lorsqu'elles sont administrées *in vivo*. Cela signifie que les MMP peuvent avoir des effets anti-inflammatoires en atténuant l'action des chimiokines.

Parmi les 27 récepteurs décrits, on distingue les récepteurs qui agissent par une signalisation dépendante des protéines G (cCKRs pour conventional chemokine receptor) au nombre de 19 (10 CCRs, 7 CXCRs, un CX3CR1 et un XCR1), (Griffith et al., 2014; Hughes and Nibbs, 2018), et les récepteurs « atypiques ou leurres» (ACKRs), au nombre de 4, décrits comme indépendants des protéines G (**Tableau 7**).

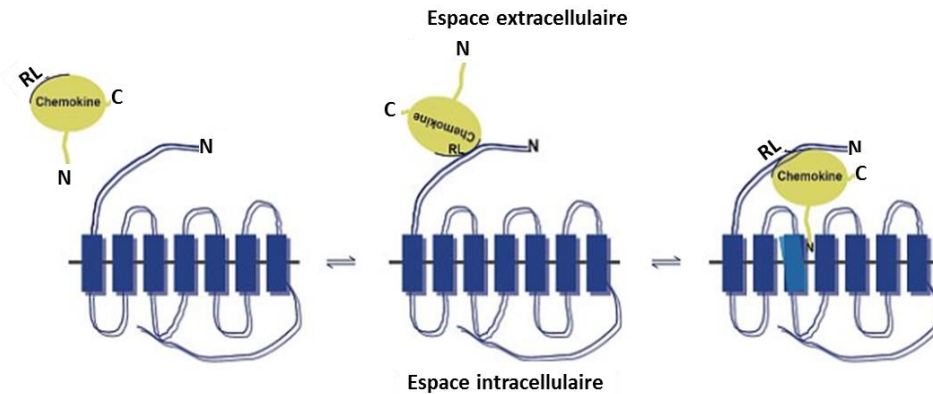
2.4. Récepteurs des chimiokines

Etant donné le grand nombre de chimiokines et un nombre plus restreint de récepteurs, un même récepteur peut lier diverses chimiokines (**Figure 28**) mais parfois avec des affinités différentes. Par exemple, CXCR7 lie la chimiokine CXCL12 avec une affinité 10x supérieure à CXCR4 (Sánchez-Martín et al., 2013). Dans le cas du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), la gp120 est une glycoprotéine de surface située sur la membrane du virus qui permet la liaison aux récepteurs CD4 des cellules cibles et donc le début de l'infection. Cependant, un corécepteur est indispensable. Pour l'infection des lymphocytes T CD4+, le corécepteur est CXCR4, alors que pour les monocytes et les macrophages, il s'agit de CCR5. Ces récepteurs sont constitués de sept domaines riches en résidus hydrophobes sous forme d'hélice α transmembranaire (TM1-TM7), reliées entre elles par 3 boucles hydrophiles extracellulaires (E1-E3) et 3 cytoplasmiques (I1-I3). Ils possèdent un domaine N terminal extracellulaire acide et relativement court (~40 acides aminés), qui contient des sites de glycosylation et de sulfatation des résidus tyrosines et une séquence DRYLAIV (Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ile-Val), séquence hautement conservée localisée entre le troisième domaine transmembranaire et la seconde boucle et assurant le couplage avec les protéines G (**Figure 29A-B**, verso page suivante) (Bockaert and Pin, 1999).

Les chimiokines se lient d'abord à l'extrémité N-terminal du récepteur. Un certain nombre d'acides aminés, notamment des tyrosines sulfatées localisées dans ce domaine N-terminal contribuent à la haute affinité de liaison des chimiokines. Le récepteur CCR5 par exemple, lie la gp120 du « Human Immunodeficiency virus » (HIV) grâce aux tyrosines sulfatées. Les mêmes motifs sont présents au niveau des récepteurs CCR2, CCR3, CCR8, CXCR3, CXCR4 et CX3CR1. D'autres motifs servant à renforcer la liaison entre les récepteurs et leurs ligands. On note la poly-sialylation au niveau du CCR7 qui est nécessaire pour son activation par CCL21 (Hughes and Nibbs, 2018).

La stimulation du récepteur va entraîner la dissociation des sous-unités de la protéine G_i en $G_{\alpha i}$ et sous-unité $\beta\gamma$. Les sous-unités G_{α} vont moduler la production d'AMP cyclique, les voies Ras/MAPK, JAK/STAT et les protéines d'adhésion cellulaires pour réguler la migration et la survie cellulaire. Les sous-unités γ vont activer la phospholipase C (PLC) avec la production d'inositol 3-phosphate (IP3) et de diacylglycerol (DAG) pour mobiliser le calcium et activer la protéine kinase C respectivement. Les sous-unités β vont quant à elles activer la PI3K. L'activation de l'ensemble de ces voies conduit au contrôle de la migration, la survie et la prolifération cellulaires et constitue la signalisation commune à tous les récepteurs de chimiokines (Legler and Thelen, 2018).

A-



B-

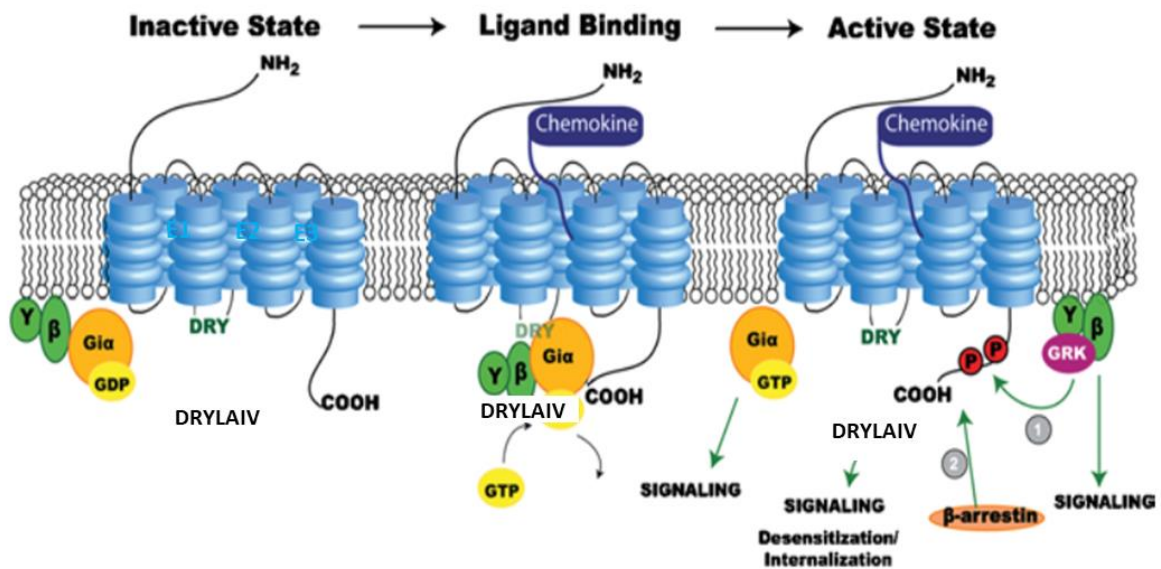


Figure 29 : Activation d'un récepteur de chimiokine conventionnel. A- Modèle de liaison au récepteur de chimiokine en deux étapes (RL : boucle rigide). B- Lorsqu'une chimiokine se lie au côté extracellulaire du récepteur, celui-ci se stabilise dans une conformation qui active les protéines G hétérotrimériques en exposant le motif DRYLAIV. La sous-unité $G\alpha$ interagit directement avec le domaine C-terminal du récepteur, les boucles intracellulaires 2 et 3 et avec la sous-unité β de la protéine G, qui forme un complexe avec la sous-unité γ . À l'état inactif, la sous-unité $G\alpha$ lie le GDP et avec la liaison du ligand et l'activation du récepteur, le GDP se dissocie de $G\alpha$ et est remplacé par le GTP. $G\alpha$ -GTP se dissocie du récepteur et de $G\beta\gamma$. Une stimulation continue du récepteur implique sa désensibilisation et internalisation par phosphorylation par les GRK (kinases des récepteurs couplés aux protéines G), dépendante de l'agoniste et de la queue C-terminale du récepteur. La phosphorylation des récepteurs favorise ensuite la liaison des β -arrestines, qui bloquent toute interaction avec les protéines G et interviennent dans l'internalisation des récepteurs. L'endocytose d'un récepteur peut entraîner sa dégradation par les lysosomes ou un recyclage à la surface de la cellule et une re-sensibilisation. En plus de leur implication dans l'internalisation, les β -arrestines peuvent fonctionner comme transducteur de signal en activant des voies telles qu'Akt, PI3K, MAPK et NF-KB, qui conduisent à une variété de réponses cellulaires. D'après (O'Hayre et al., 2008).

Par ailleurs, l'activation du récepteur induit également la phosphorylation de son extrémité C-terminal par des kinases associées aux récepteurs couplés aux protéines G (GRK). Cette phosphorylation induit le recrutement de β -arrestines. Cependant, en fonction du ligand, les β -arrestines recrutées provoquent l'inactivation et l'internalisation des récepteurs ou le recrutement et l'activation de protéines kinases (**Figure 30**, verso page suivante) (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

Les récepteurs atypiques qui ne sont pas couplés aux protéines G, ont des substitutions dans le domaine DRYLAIV, et on peut supposer que cette variation structurelle contribue à l'échec d'activation des protéines G.

Ces récepteurs n'induisent donc pas une signalisation classique de récepteurs à 7 domaines transmembranaires mais lient les chimiokines avec une haute affinité (Nibbs and Graham, 2013) et, comme les récepteurs conventionnels, utilisent des résidus de tyrosine sulfatés pour améliorer la liaison des chimiokines (Choe et al., 2005; Hewit et al., 2014). Jusqu'à récemment, le rôle des kinases GRK et des β -arrestines se limitait à leur capacité à contrôler la désensibilisation, l'internalisation et le recyclage des récepteurs (Lefkowitz, 1998), mais les GRK et les β -arrestines sont maintenant considérées comme des transducteurs de signal indépendants des protéines G. En particulier, les β -arrestines interagissent avec de nombreux partenaires protéiques et des kinases, conduisant à la phosphorylation de nombreuses cibles intracellulaires (Reiter et al., 2012; Xiao et al., 2010).

Au cours des deux dernières décennies, la notion d'agoniste biaisé a émergé, par opposition à l'agoniste équilibré. Il s'agit de ligands ayant la capacité d'activer sélectivement certaines voies de signalisation tout en bloquant d'autres. Par exemple, CXCL12 est le premier exemple de chimiokines de type CXC pour lesquelles le monomère et le dimère activent le même récepteur pour produire des réponses cellulaires différentes. En effet, le monomère de CXCL12 en interaction avec CXCR4, active des voies de signalisation dépendantes de protéines G (mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire) et de β -arrestines (recrutement de la β -arrestine2 au récepteur), conduisant à la migration cellulaire. Il s'agit alors d'un agoniste équilibré (balanced agonist). Par contre, le dimère de CXCL12 lorsqu'il interagit avec CXCR4 ne stimule que les protéines dépendantes de la signalisation des protéines G, sans recrutement de β -arrestine (Ziarek et al., 2017). Dans ce cas, CXCL12 agit comme un agoniste biaisé.

Concernant le rôle des ACKRs, ils semblent être impliqués dans la régulation de la localisation, de la distribution et de l'abondance des chimiokines, contrôlant ainsi indirectement les interactions entre les chimiokines et les récepteurs conventionnels (Hughes

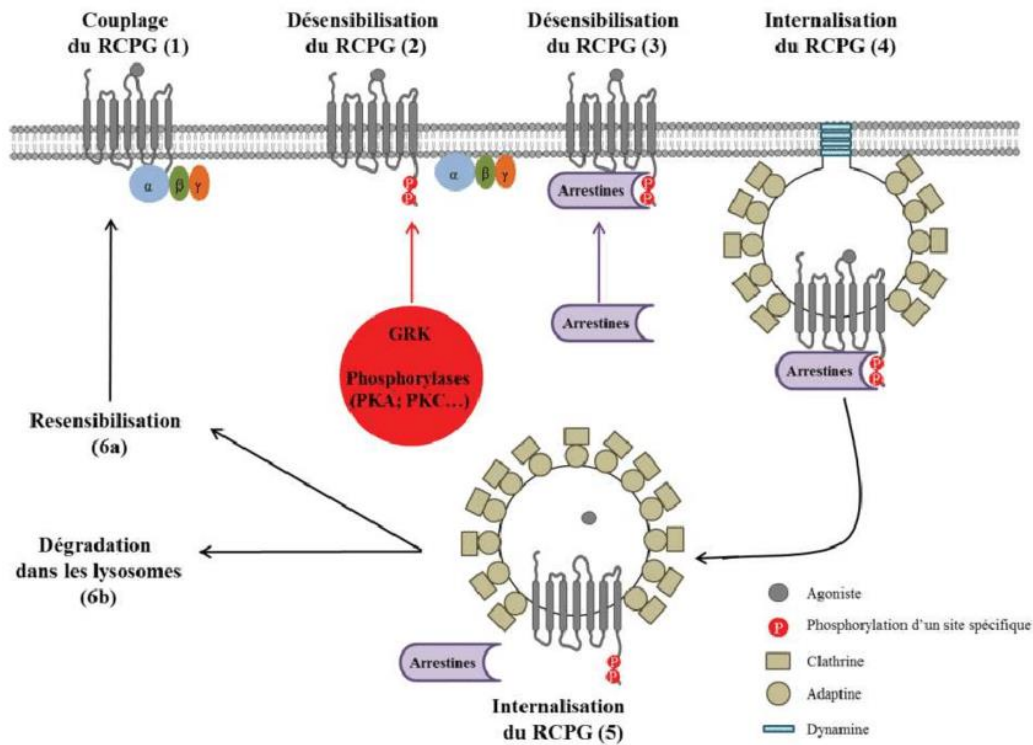


Figure 30 : Voies de signalisation associées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires. En plus de la signalisation via les protéines G hétérotrimériques, l'activation d'un récepteur peut induire une signalisation via les β-arrestines ou la désensibilisation du récepteur. Pour la désensibilisation, le récepteur est phosphorylé par deux classes de protéines kinases, la famille des sérine/thréonine ou "G-protein receptor kinases" (GRK pour la désensibilisation homologue) et la famille des phosphorylases activées par les seconds messagers (protéine kinase C, PKC et protéine kinase A, PKA pour la désensibilisation hétérologue), ce qui conduit au recrutement de la β-arrestine pour désensibiliser le récepteur et arrêter la signalisation. **D'après la thèse S. Murat, 2018.**

and Nibbs, 2018). Par exemple, ACKR1 (ou DARC) transporte les chimiokines à travers les cellules endothéliales pour les présenter aux leucocytes (Lee et al., 2003) et, sur les érythrocytes, ACKR1 tamponne la concentration abondante de chimiokines dans le sang (Fukuma et al., 2003). ACKR2 piège et internalise toutes les chimiokines qu'il rencontre et la chimiokine internalisée est dissociée d'ACKR2 puis dégradée. Ou encore, ACKR3 (CXCR7) qui joue un rôle déterminant dans le contrôle de l'axe CXCL12-CXCR4, soit en piégeant CXCL12, soit en s'hétérodimérisant avec CXCR4 pour réguler son action (Boldajipour et al., 2008; Levoye et al., 2009). De même, ACKR4 (ou CCRL1) est un récepteur piégeant les chimiokines CCL19, CCL21 et CCL25 pour réguler la migration des cellules dendritiques dépendantes de CCR7 et les réponses immunitaires adaptatives (Hughes and Nibbs, 2018; Legler and Thelen, 2018). Ces effets pourraient empêcher les récepteurs conventionnels d'être désensibilisés par l'exposition à un excès de chimiokine. Cependant, les récepteurs conventionnels peuvent également éliminer les chimiokines extracellulaires bien que moins efficacement que les récepteurs atypiques, et l'internalisation des complexes chimiokines de surface/récepteurs conventionnels est un aspect clé de la régulation de ces récepteurs (Cardona et al., 2008).

2.5. Rôles des chimiokines

2.5.1. Rôle dans le développement

Les chimiokines homéostatiques ont de multiples rôles non redondants dans l'organisation spatiale des cellules souches et progénitrices au cours du développement des organes comme l'ont montré les observations du phénotype de souris mutantes. Par exemple, les souris déficientes en CXCL12 et CXCR4 (Ma et al., 1998; Zou et al., 1998) meurent systématiquement en période pré- ou péri-natale et présentent de graves problèmes au niveau de l'hématopoïèse et du développement des systèmes nerveux, vasculaires et du septum cardiaque. Les deux derniers phénotypes ont également été observés chez les souris déficientes en CXCR7/ACKR3 (Tachibana et al., 1998; Yu et al., 2011).

2.5.2. Migration cellulaire

Les chimiokines sont des acteurs chimiotactiques indispensables au recrutement des cellules circulantes sur le site inflammatoire. Ce sont donc des molécules clés du système immunitaire qui jouent un rôle de chef d'orchestre dans le trafic leucocytaire. Ces protéines hautement basiques, adhèrent aux glycosaminoglycanes à la surface des cellules, établissant ainsi des foyers localisés de concentrations élevées en chimioattractants (Zimmerman et al., 2008).

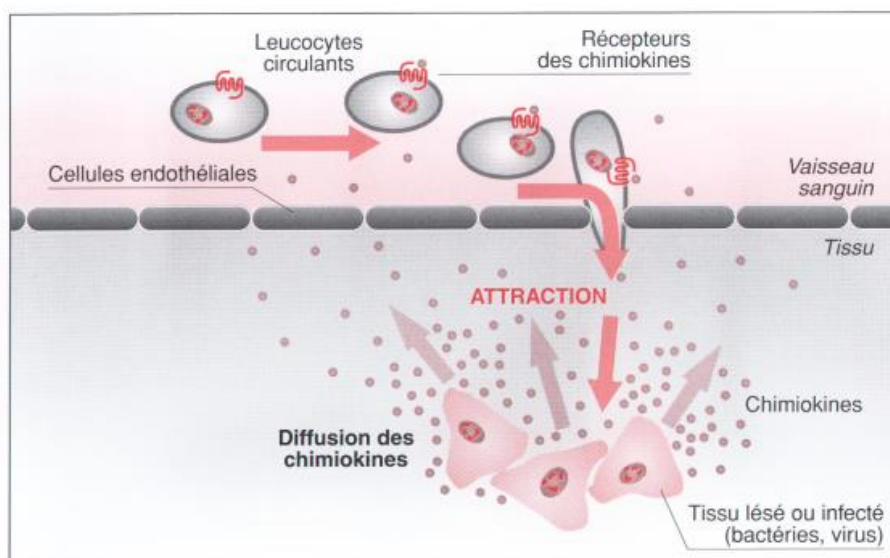


Figure 31: Représentation schématique du recrutement des leucocytes sur un site inflammatoire. D'après Samson et al., 1999.

Certaines chimiokines, comme CCL2 (MCP-1) induisent l'augmentation de la synthèse d'intégrines par les cellules endothéliales des capillaires sanguins, favorisant ainsi l'attachement des leucocytes circulants aux cellules des parois des vaisseaux sanguins (Luster, 1998). L'IL-8 augmente la perméabilité vasculaire, et stimule la diapédèse des leucocytes activés (Luster, 1998). Ces deux processus aboutissent à l'infiltration des leucocytes sur le site inflammatoire (**Figure 31**). La spécificité de certaines chimiokines vis-à-vis de leurs cibles permet d'organiser l'infiltration de façon ordonnée. Il a été également montré que CXCL12 est importante dans la migration des cellules souches myéloïdes depuis le foie fœtal jusqu'à la moelle osseuse (Samson et al., 1999).

2.5.3. Inflammation

De nombreuses chimiokines sont inductibles et produites en grande quantité en réponse à des stimuli infectieux et inflammatoires (Griffith et al., 2014; Nishimura et al., 2009). Les leucocytes recrutés par les chimiokines dans les tissus endommagés ou infectés, produisent à leur tour, d'autres chimiokines qui contribuent à une prochaine vague de leucocytes (Thanabalasuriar et al., 2016).

Le type d'infiltrat inflammatoire caractéristique d'une maladie semble être le reflet de la production de chimiokines spécifiques au tissu affecté. De plus, le profil précis des chimiokines dans un tissu donné dépendra de la nature exacte des stimuli inducteurs. Ainsi, la pneumonie aiguë d'origine bactérienne est accompagnée d'un afflux massif de neutrophiles dans les poumons et, parallèlement, la concentration d'IL-8 est augmentée dans les liquides bronchoalvéolaires (Craig et al., 2009). De même, la présence de cellules inflammatoires dans les articulations de patients souffrants de polyarthrite rhumatoïde a été corrélée à la présence d'IL-8 et de CCL2 dans le liquide synovial (Pavkova Goldbergova et al., 2012). De même, durant la phase chronique de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire de l'intestin, l'infiltrat immunitaire dans la paroi intestinale est constitué essentiellement de lymphocytes et de macrophages; alors que, pendant la phase aiguë, cet infiltrat est constitué de neutrophiles et d'éosinophiles dans une moindre mesure. Au cours de chacune de ces phases, deux cocktails de chimiokines différentes sont produites dans le tissu intestinal des patients. *In vitro*, la plupart des chimiokines ne sont pas produites. Parmi les molécules responsables de l'induction de la plupart des chimiokines on cite l'IL-1 α et β , le TNF α ou les IFN α et γ (Papadakis, 2004).

2.5.4. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus dynamique par lequel les cellules souches hématopoïétiques (CSH) s'auto-renouvèlent, prolifèrent et se différencient en composants cellulaires sanguins matures. A l'âge adulte, les CSH sont principalement localisées dans des zones restreintes de la moelle osseuse appelées niches et constituées de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. A cette étape de l'hématopoïèse, le rôle des chimiokines et de leurs récepteurs se traduit par la régulation de la prolifération, la survie ainsi que la rétention des progéniteurs hématopoïétiques au niveau de la niche (Bonavita et al., 2018).

Plusieurs travaux ont démontré le rôle majeur de l'axe CXCR4/CXCL12 dans la rétention des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse (le homing) et leur mobilisation (Nagasawa, 2000). En effet, dans cette niche, CXCL12 est produite par les cellules stromales mésenchymateuses périverculaires (CSM), les cellules endothéliales, les ostéoblastes, certaines cellules hématopoïétiques et par les cellules progénitrices adipogènes (Mendelson and Frenette, 2014). D'autre part, la niche élabore également de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, tels que le facteur de cellules souches (SCF), l'interleukine-3 (IL-3), l'interleukine-6 (IL-6) et les facteurs stimulant la formation de colonies (CSF) qui sont essentiels pour les phases initiales de division cellulaire et de différenciation des CSH (Metcalf, 2008).

2.5.5. Angiogenèse

Outre les activités pro-inflammatoires, les chimiokines jouent un rôle majeur dans la régulation de l'angiogenèse de façon constitutive mais sont sécrétées en réponse à des agents pro-inflammatoires. Dans certains cas pathologiques (inflammation ou croissance tumorale), les chimiokines agissent à la fois comme régulateurs positifs et négatifs de l'angiogenèse, celle-ci étant activée de manière transitoire par la dérégulation de la balance entre les régulateurs positifs et négatifs qui, dans un état physiologique, la maintiennent à l'équilibre (Le et al., 2004). Il a été rapporté que les 7 chimiokines ELR+ CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8, induisent la formation de vaisseaux au niveau de la cornée du lapin. En revanche, cet effet est bloqué par les chimiokines ELR- telles que CXCL4, CXCL10 et CXCL9. La chimiokine CXCL12 constitue une exception concernant l'angiogenèse, car elle agit comme facteur pro angiogénique malgré son appartenance au groupe ELR- (Strieter et al., 1995). Etant donné leur rôle dans l'angiogenèse, les chimiokines constituent un élément très important dans la croissance tumorale en favorisant la néo vascularisation. Il a été démontré que la production de CXCL8 par les cellules endothéliales favorise leur survie et leur prolifération (Yoshida et al., 1997; Li et al., 2003). Dans le cancer

ovarien, les niveaux d'expression de CXCL8 sont corrélés positivement à la néo-vascularisation et négativement à la survie (Yoneda et al., 1998). Dans des glioblastomes, l'inhibition de CXCL8 réduit de façon significative l'angiogenèse et la croissance tumorale (Garkavtsev et al., 2004). Dans le cancer du poumon de type « non à petites cellules », les niveaux de CXCL5 et CXCL8 sont directement corrélés à l'angiogenèse et à la croissance tumorale (Pöld et al., 2004). De même, une lignée cellulaire de carcinome bronchique qui exprime des taux élevés de CXCL10 mais très faible de CXCL8, ne développe pas de tumeurs chez les souris SCID et le traitement des souris avec un anticorps anti-CXCL8 inhibe la croissance tumorale et les métastases (Arenberg et al., 1997). Enfin, l'inactivation du gène codant pour CXCL12 chez la souris, a permis de montrer son rôle majeur dans l'angiogenèse (Nagasawa et al., 1996).

2.5.6. Les chimiokines dans l'intestin

Les cytokines et les chimiokines peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et peuvent être produites par les cellules immunitaires innées ou adaptatives résidentes, des cellules inflammatoires ou les cellules épithéliales intestinales elles-mêmes. La production de chimiokines par l'épithélium intestinal entraîne le recrutement des cellules immunitaires dans des zones d'inflammation. Dent et al. ont rapporté que des éosinophiles et des cellules épithéliales intestinales co-cultivés peuvent agir en synergie pour augmenter l'activité chimiotactique des neutrophiles et la production de CXCL5 (Dent et al., 2014).

Les chimiokines du groupe homéostatique jouent un rôle clé dans la recirculation des lymphocytes et des leucocytes. D'une manière plus générale, elles participent au développement et à l'organisation des ganglions mésentériques, des plaques de Peyer, des cryptopatches (petits agrégats de cellules lymphoïdes localisés dans la lamina propria) et du compartiment lymphoïde intraépithélial (Zimmerman et al., 2008). L'expression du récepteur de chimiokine CCR7, à titre d'exemple joue un rôle critique dans l'organisation du tissu lymphoïde secondaire (Höpken et al., 2007). De même, l'inactivation du gène codant CXCL13 ou son récepteur CXCR5 entraîne une altération de l'organisation des plaques de Peyer (Ansel et al., 2000), suggérant donc un rôle des chimiokines homéostatiques et de leurs récepteurs dans le développement des tissus lymphatiques secondaires au sein de la muqueuse gastro-intestinale.

L'expression de chimiokines inflammatoires, notamment CXCL8, CCL2, CCL20, CCL5, est élevée dans la muqueuse intestinale de patients atteints de MICI (Papadakis and Targan,

2000). Cette expression est associée à une infiltration massive de neutrophiles, de lymphocytes T, de cellules dendritiques et de monocytes/macrophages dans les tissus inflammatoires intestinaux. En plus des chimiokines inflammatoires, le niveau d'expression des chimiokines homéostatiques, dont CCL19, CCL21, CCL25, CCL28, ainsi que CXCL12 et CXCL13, est également augmenté (Zimmerman et al., 2008). Leur rôle étant de participer à la réorganisation des structures lymphoïdes périphériques observées dans la muqueuse inflammatoire (Kawashima et al., 2005). Outre les lymphocytes T, les neutrophiles et les macrophages, l'intestin des patients atteints MICI est infiltré par une abondance de fibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules épithéliales, qui sont également recrutés par des chimiokines mais ces cellules peuvent elles-mêmes produire des chimiokines participant au processus inflammatoire (Zimmerman et al., 2008).

D'autre part, les chimiokines peuvent également avoir un effet direct sur les cellules épithéliales exprimant les récepteurs, ce qui pourrait potentiellement participer à la transformation des cellules épithéliales, en agissant sur la prolifération et la migration / invasion menant au développement d'une tumeur (Wang et al., 2009).

2.6. Chimiokines et cancer

2.6.1. Progression tumorale

Les chimiokines jouent un rôle important dans la progression des cancers. Elles sont impliquées dans la croissance tumorale, la sénescence, l'angiogenèse, la transition mésenchymateuse épithéliale, les métastases et l'évasion immunitaire (Rezaeeyan et al., 2018). L'expression des chimiokines et de leurs récepteurs est modifiée dans de nombreuses tumeurs et conduit à une signalisation aberrante. Cette altération est due à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou à l'activation d'oncogènes, impliqués dans la régulation de l'expression des chimiokines.

Par exemple, l'expression de nombreuses chimiokines est régulée par des facteurs de transcription de la famille Nucléaire Factor kappa B (NF- κ B) (Richmond, 2002). NF- κ B est activé de manière constitutive par les cellules tumorales dans de nombreuses tumeurs, ce qui conduit à l'expression constitutive des chimiokines favorisant la tumorigenèse (Richmond, 2002). De même, CXCR4, qui n'est pas exprimé par les cellules épithéliales mammaires saines, est souvent exprimé sur les cellules cancéreuses mammaires. Cette surexpression rend les cellules tumorales sensibles à son ligand CXCL12 (Luker and Luker, 2006; Smith et al., 2004).

De plus, les cellules tumorales peuvent stimuler la synthèse et la sécrétion de chimiokines par les cellules stromales, établissant une interaction réciproque tumeur-stroma, favorisant la progression tumorale. Par exemple, les fibroblastes associés au cancer et les macrophages ont aussi la capacité de produire des chimiokines (Mishra et al., 2011). Les chimiokines favorisent la prolifération et la survie des cellules tumorales de plusieurs manières. L'activation des récepteurs sur les cellules tumorales stimule la voie MAPK/ Erk, conduisant à l'expression de gènes stimulant la prolifération, tels que les cyclines D1, Fos et le facteur de croissance épidermique se liant à l'héparine (HB-EGF) (Chow and Luster, 2014). De plus, les chimiokines favorisent la survie des cellules tumorales en modifiant l'équilibre entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques, avec une augmentation de l'expression de Mdm2 et la baisse de l'expression de Bcl-2 ou l'inhibition de la caspase-3 et l'activation de la caspase-9.

2.6.2. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est connue comme une étape limitante de la formation et de la progression d'une tumeur. Les chimiokines et leurs récepteurs sont des régulateurs importants de l'angiogenèse tumorale (Strieter et al., 2005). CXCL12 est la chimiokine angiogénique la plus puissante étant donné que les souris déficientes en CXCL12 ou en récepteur CXCR4 ont des lésions vasculaires létales (Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998).

De façon générale, les chimiokines ELR+ CXC (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8) qui activent CXCR1 et CXCR2 sont angiogéniques alors que les chimiokines sans motif ELR (ELR- ; CXCL4, CXCL9, CXCL9,) sont des inhibiteurs de l'angiogenèse. Cependant, CXCL12 qui est une chimiokine ELR-, a une activité angiogénique (Strieter et al., 2005).

Un des mécanismes permettant le maintien d'un microenvironnement angiogénique est l'activation des cellules endothéliales par le VEGF qui conduit à l'augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, qui favorise l'expression de CXCL8 (Nör et al., 2001). Cette surexpression de CXCL8 fonctionne de manière autocrine et paracrine pour maintenir le phénotype angiogénique de la cellule endothéliale. La capacité de CXCL8 à promouvoir la survie et la prolifération des cellules endothéliales a été démontrée *in vitro* mais également *in vivo*, en utilisant des cellules tumorales humaines qui ne forment normalement pas de tumeurs mais qui, lorsqu'elles sont mélangées à des cellules endothéliales surexprimant Bcl-2, induisent une tumeur dépendante de CXCL8 (Nör et al., 2001). D'autre part, les chimiokines peuvent également attirer des leucocytes producteurs de facteurs angiogéniques, tels que les

macrophages, accélérant ainsi l'angiogenèse (Ueno et al., 2000). Cependant, les chimiokines sont également capables d'inhiber l'angiogenèse. Par exemple, CXCL4 et CXCL10 inhibent l'angiogenèse induite par le bFGF et le VEGF, ainsi que la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Campanella et al., 2010).

2.6.3. Processus métastatique

Certains organes, tels que le foie, les poumons, le cerveau, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse sont des sites communs de métastases, tandis que d'autres, tels que les reins, le pancréas et la peau sont rares. Bien que la formation de métastases soit un processus complexe impliquant plusieurs facteurs, un certain nombre d'études ont montré que les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle clé dans ce processus (Zlotnik et al., 2011).

En effet, les cellules tumorales expriment des récepteurs de chimiokines qui dirigent les cellules tumorales vers des sites anatomiques spécifiques pour former des métastases. Ces sites produisent les chimiokines ligands de ces récepteurs et attirent les cellules tumorales circulantes dans une «niche prémétastatique», dotée d'un microenvironnement essentiel au développement des métastases (Zlotnik et al., 2011). Comme la migration normale des leucocytes, la métastase des cellules tumorales nécessite le passage à travers des barrières vasculaires, l'entrée dans la circulation et l'extravasation à des emplacements distants, spécifiques à un organe. Le trafic de leucocytes étant régulé par les chimiokines et leurs récepteurs, les chimiokines jouent donc un rôle clé dans l'initiation et la régulation de la migration des cellules tumorales et des métastases. Par exemple, Müller et al ont observé des taux élevés de CXCR4 et CCR7 à la surface de cellules de lignées tumorales mammaires humaines (Müller et al., 2001). *In vitro*, des extraits protéiques de poumons et de foie humains induisent la migration de ces cellules, indiquant que ces extraits contiennent des facteurs ayant des propriétés chimiotactiques. Par contre, des extraits d'organes qui sont des cibles rares de métastases du cancer du sein, comme la peau ou le muscle n'ont aucune propriétés chimioattractives sur les cellules mammaires (Müller et al., 2001). De plus, le blocage *in vivo* chez la souris, de l'axe CXCR4/CXCL12 empêche la formation de métastases pulmonaires après injection d'une lignée tumorale mammaire (Müller et al., 2001).

2.6.4. Réponse immunitaire anti tumorale

En plus de leurs altérations cellulaires intrinsèques qui permettent une prolifération non contrôlée, les cellules tumorales interagissent avec leur environnement pour moduler la réponse immunitaire systémique.

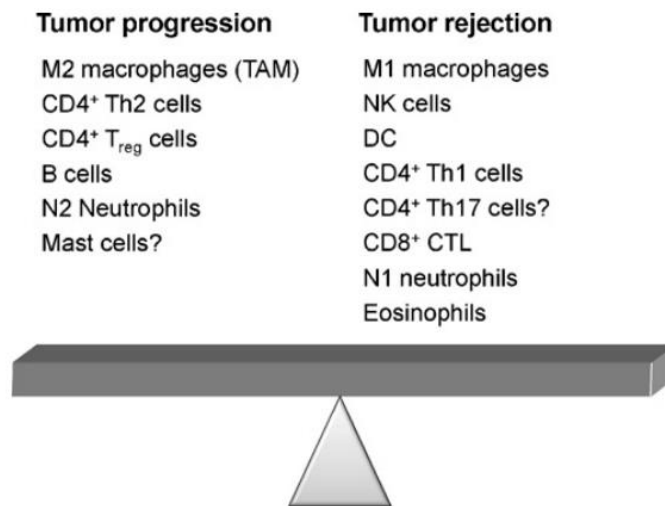


Figure 32 : Cellules inflammatoires responsables du développement de la tumeur. L'immunité tumorale influence le développement de la tumeur et dépend de l'équilibre entre l'infiltration de leucocytes favorisant la progression tumorale et l'infiltration de leucocytes induisant une régression tumorale. Les macrophages associés à la tumeur (TAM), les lymphocytes T helper 2 (Th2), les lymphocytes T régulateurs (Treg), les lymphocytes B, les neutrophiles N2 et les mastocytes favorisent probablement la progression tumorale ; alors que les macrophages M1, les cellules tueuses naturelles (NK), les cellules dendritiques (CD), les éosinophiles, les cellules T helper 1 (Th1), les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), les neutrophiles N1 et les lymphocytes Th17 sont probablement responsables de la régression tumorale.

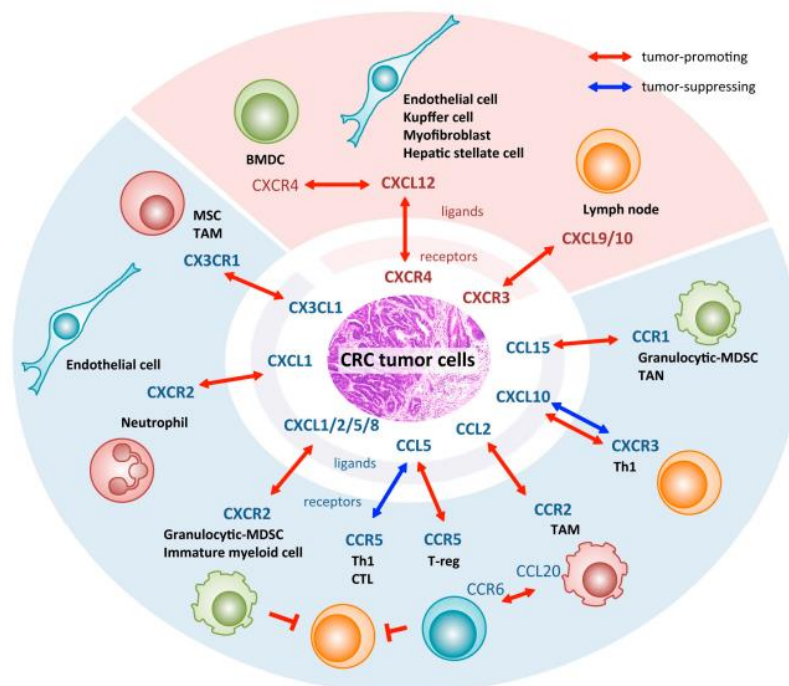


Figure 33 : Chimiockines qui participent aux interactions entre les cellules tumorales colorectales et les cellules myéloïdes dans le microenvironnement tumoral. TAM : Tumor associated macrophage ; BMDC : bone marrow-derived cells; MDSC: cellules myéloïdes suppressives ; TAN: tumor-associated neutrophils; CTL: lymphocytes T cytotoxiques. D'après Itatani et al., 2016.

La plupart des tumeurs solides présentent un infiltrat de cellules immunitaires. Les chimiokines jouent un rôle important dans l'infiltration des leucocytes dans tous les tissus, y compris les tumeurs. Par conséquent, elles jouent un rôle essentiel dans la composition et la présence des cellules immunitaires du microenvironnement (Chow and Luster, 2014). Les cellules immunitaires responsables de l'élimination des cellules cancéreuses sont des «cellules effectrices», capables de contrôler la croissance des cellules tumorales ou de les éliminer. Les principales cellules effectrices sont les cellules tueuses naturelles (NK pour Natural Killer), les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les lymphocytes T effecteurs $CD4^+$ et $CD8^+$. Pour éradiquer une tumeur, les cellules effectrices migrent dans le microenvironnement et leur présence dans les tumeurs peut signifier un pronostic favorable. Des études récentes indiquent que les réponses antitumorales médiées par CXCL9 et CXCL10 via CXCR3 sont obtenues en recrutant des cellules NK, des LT $CD4^+$ Th1 et des LT $CD8^+$ cytotoxiques dans la tumeur. De même, CCR5 et son ligand CCL5 sont impliqués dans le recrutement de cellules immunitaires à activité antitumorale. Le déficit en CCR5 chez la souris accélère la croissance des adénocarcinomes pulmonaires de Lewis, d'adénocarcinomes du pancréas et des lymphomes. L'expression de CCR5 à la fois sur les cellules T $CD4^+$ et sur les cellules T $CD8^+$ est importante pour la génération d'une immunité protectrice contre les tumeurs (González-Martín et al., 2011). A l'opposé, d'autres cellules immunitaires peuvent supprimer la fonction des cellules effectrices et favoriser la croissance tumorale, tels que les macrophages associés à la tumeur (TAM), les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les cellules T régulatrices (Treg). Pour obtenir un avantage de croissance, les tumeurs modifient le profil d'expression des chimiokines permettant alors de recruter les cellules suppressives (**Figure 32**).

Les Treg sont fréquemment présents dans les tumeurs. Leur présence chez les patients cancéreux est associée à un mauvais pronostic. Dans le cancer de l'ovaire, l'expression intratumorale de CCL22 et CCL28 est augmentée et attire les Treg $CCR4^+$ ou $CCR10^+$, qui inhibent les réponses antitumorales et augmentent l'angiogenèse via la sécrétion de VEGF. De plus, dans un modèle spontané de métastases du cancer du sein, les Treg $CCR4^+$ favorisent la formation de métastases en induisant l'apoptose des cellules NK et des LT (Olkhanud et al., 2009). Les TAM et les MDSC sont des populations hétérogènes de cellules myéloïdes ayant des propriétés immunosuppressives et leur infiltration dans différents types de tumeurs est fréquente. Différentes chimiokines et récepteurs, tels que $CCR2/CCL2$, $CCR5/CCL5$, $CXCR2/CXCL5$ et $CXCR4/CXCL12$, favorisent la progression tumorale en augmentant le recrutement et l'activité suppressive des TAM et des MDSC (Mantovani et al., 2004) (**Figure 33**).

2.7. Les chimiokines dans le CCR

Plusieurs chimiokines sont impliquées dans la tumorigenèse du CCR. Des études menées par Lin et coll. montrent qu'une faible expression de CXCL14 dans les tumeurs CCR est corrélée à l'invasion des ganglions lymphatiques ainsi qu'à un faible pronostic (Lin et al., 2014). Cette faible expression est due à une méthylation du promoteur de CXCL14. La restauration de l'expression de cette chimiokine à l'aide d'un plasmide induit la diminution de l'expression de la vimentine et de NFκB et augmente l'expression de la E-cadhérine et de IκB-alpha. Ces résultats indiquent que CXCL14 peut inhiber l'EMT et la formation de métastases en bloquant la signalisation NFκB (Cao et al., 2013).

Dans des adénomes, une dérégulation de chimiokines a été décrite avec des taux élevés de CCL17 et des taux plus faibles de CXCL11 et CCL25 par rapport à la muqueuse normale. Cette dérégulation est associée à une faible présence de Treg CXCR3+ (Akeus et al., 2014), suggérant que des modifications du recrutement lymphocytaire due à une altération de l'expression de chimiokines peut exister à des stades très précoces.

D'autres travaux ont montré que CCL20 et CXCL8 agissent en synergie pour favoriser la progression métastatique du CCR en induisant l'EMT via l'activation de l'axe PI3K/AKT-ERK1/2 (Cheng et al., 2014).

Une forte expression de CXCR4 a été montrée dans plus de 23 cancers humains, dont le CCR (Romain et al., 2014), le cancer gastrique (Rubie et al., 2016) où cette forte expression est associée à une faible expression de CXCL12. De même, la surexpression de CXCR4 est associée à l'agressivité de la tumeur, une baisse de la survie et à la formation de métastases (Zhao et al., 2015; Hattermann and Mentlein, 2013; Sun et al., 2010).

2.8. La chimiokine CXCL12

CXCL12 qui est également appelée SDF-1 pour Stromal Cell Derived Factor 1, a été isolée à partir de cellules stromales de la moelle osseuse murine et caractérisée comme facteur de stimulation des précurseurs des cellules B. Elle est impliquée dans le développement embryonnaire, l'hématopoïèse et l'organogénèse (Janssens et al., 2017). Elle est exprimée de façon constitutive par plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules stromales et les cellules épithéliales de différents organes. Ces organes étant des sites privilégiés d'implantation de métastases (foie, ganglions lymphatiques, poumons, moelle osseuse) (Raman et al., 2007).

Le gène codant pour CXCL12 est localisé sur le chromosome 10 en q11 chez l'homme sur le chromosome 1 chez la souris. C'est la seule chimiokine du groupe CXC avec un épissage

alternatif de l'ARNm. Cet épissage produit six isoformes chez l'homme (CXCL12 α à ϕ) et 3 chez la souris (CXCL12 α à γ), qui diffèrent au niveau de la partie C-terminale, avec 90% d'homologie entre la forme humaine et murine pour le gène et la protéine. L'isoforme la plus commune est CXCL12 α (Yu et al., 2006). L'inactivation du gène codant CXCL12 entraîne la mort périnatale des souris (Nagasawa et al., 1996). Chez ces souris, bien que le nombre de progéniteurs des cellules B dans les embryons mutants soit sévèrement diminué dans le foie et la moelle osseuse du fœtus, les progéniteurs myéloïdes sont réduits uniquement dans la moelle osseuse mais pas dans le foie. Ceci indique que CXCL12 régule la lymphopoïèse des cellules B, et la myélopoïèse dans la moelle osseuse. De plus, les mutants présentent une grave anomalie septale ventriculaire cardiaque.

2.8.1. CXCL12 dans le CCR

Dans la muqueuse intestinale saine, CXCL12 régule l'homéostasie, les mécanismes de défense et participerait à l'anoïkis. Ce dernier est un mécanisme d'apoptose consécutif dû à une rupture des communications entre une cellule et le stroma (Smith et al., 2005; Zimmerman et al., 2008). Dans les cancers, plusieurs études ont montré une diminution voire une perte d'expression de CXCL12 dans le CCR, le cancer mammaire ou gastrique (Romain et al., 2017; Rubie et al., 2016; Wendt et al., 2006, 2008a). Dans l'intestin, cette perte d'expression participerait à la résistance à l'anoïkis, favorisant la migration des cellules tumorales et la formation de métastases (Wendt et al., 2008b). Ainsi dans le CCR, il peut être envisagé que les cellules tumorales dépourvues de CXCL12 dans la tumeur primaire migrent vers les sites de forte expression de CXCL12 (foie ou poumons) et forment des métastases. Cette hypothèse est confortée par des travaux montrant que l'implantation chez la souris, d'une lignée mammaire exprimant CXCL12 par transfection stable (Wendt et al., 2008a) ou d'une lignée colique dans laquelle l'expression de CXCL12 est restaurée par déméthylation des histones, diminue le développement de métastases (Wendt et al., 2006).

2.8.2. Récepteurs de la chimiokine CXCL12

CXCL12 agit via les récepteurs CXCR4 et CXCR7, tous deux à 7 segments transmembranaires mais seul CXCR4 est couplé aux protéines G. Le récepteur CXCR7 a une plus forte affinité pour CXCL12 (CXCR7 : $KD \approx 0.4$ nM ; CXCR4 : 5 nM) et peut former un hétérodimère avec CXCR4 et moduler la signalisation de CXCR4 via son rôle de récepteur leurre ou « *decoy receptor* », en séquestrant CXCL12 et bloquant son interaction avec CXCR4 et la voie de signalisation associée à CXCR4 (Levoye et al., 2009; Bachelierie et al., 2014; Sánchez-Alcañiz et al., 2011). Le couple CXCL12/CXCR4 est le premier couple ligand-

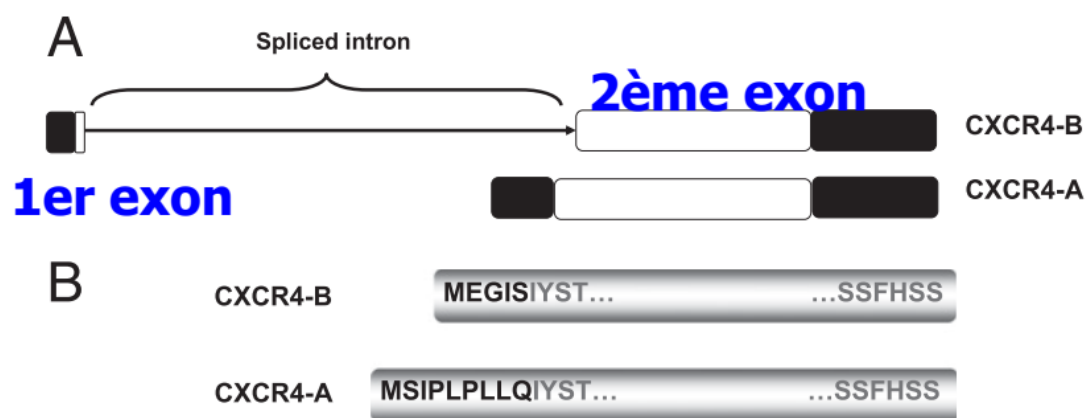


Figure 34 : Isoformes CXCR4-A et CXCR4-B. **(A)** Représentation schématique de l'ARNm codant pour les isoformes CXCR4-B et CXCR4-A. Les cases ouvertes correspondent aux séquences codantes et les cases fermées aux séquences non codantes. **(B)** Séquence d'acides aminés des isoformes CXCR4-A et -B. D'après Duquenne et al., 2014.

récepteur à avoir été décrit avec un rôle essentiel dans l'hématopoïèse, la cardiogenèse, la formation de vaisseaux et le développement neuronal (Nagasawa, 1996). L'hétérodimérisation de CXCR4 et CXCR7 semble dépendre du niveau d'expression de chacun des récepteurs *in vitro*. Le dimère formé va inhiber la signalisation des protéines G associées à CXCR4 mais potentialiser les voies de signalisation dépendantes des β -arrestines dont ERK1/2, p38 MAPK et SAPK (Décaillot et al., 2011; Rajagopal et al., 2010). De façon intéressante, la co-expression de CXCR7 et CXCR4 facilite la migration cellulaire stimulée par CXCL12. Et des siARN ciblant les β -arrestines, annulent la migration dépendante de CXCL12 (Décaillot et al., 2011). Des travaux ont montré que CXCL12 ainsi que CXCR4 et CXCR7 sont régulés par l'hypoxie. En effet, CXCL12 est exprimé d'une manière constitutive dans la moelle osseuse afin d'assurer la rétention des cellules souches hématopoïétiques. Cette expression est régulée par l'hypoxie présente physiologiquement dans la moelle osseuse (Ceradini and Gurtner, 2005; Romain et al., 2014).

2.8.2.1. CXCR4

Le récepteur CXCR4 a été identifié pour la première fois comme cofacteur avec CD4 pour l'entrée du virus de l'immunodéficience humain (Feng et al., 1996). Il est exprimé par une grande variété de cellules dont les lymphocytes, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules cancéreuses en réponse à une seule chimiokine, CXCL12. Cette expression permet aux cellules de migrer en suivant un gradient de concentration de CXCL12 (Meng et al., 2018).

Ce récepteur comme son ligand, a des fonctions dans l'hématopoïèse, la réponse immunitaire, la neurogenèse, la cardiogenèse et la néoformation vasculaire (Tachibana et al., 1998). L'expression basale de CXCR4 est régulée majoritairement par deux facteurs de transcription : le « Nuclear Respiratory Factor 1 » (NRF-1) qui active sa transcription et le Ying Yang 1 qui l'inhibe (Pozzobon et al., 2016). Cette transcription est régulée positivement en réponse aux signaux de seconds messagers (calcium et AMPc) ainsi que des cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, TGF- β) et des facteurs de croissance (bFGF, VEGF). En revanche, elle est régulée négativement par des facteurs tels que le TNF- α , l'INF- γ et l'IL-1 β (Busillo and Benovic, 2007).

Le récepteur CXCR4 existe sous forme de 2 variants, le premier variant A (ou 1) n'est pas épissé (356 acides aminés), le second variant est le plus abondant B (ou 2). Il est épissé (352 acides aminés) et tronqué en N-terminal des 9 premiers acides aminés (**Figure 34**) (Gupta and Pillarisetti, 1999). Ces deux formes de CXCR4 coexistent naturellement, fixant CXCL12 et

sont exprimées par les lymphocytes T et B, les cellules péritonéales, les macrophages et les thymocytes (Heesen et al., 1997). L'étude de la structure de CXCR4 et la cristallographie révèle la présence de CXCR4 sous forme de dimère de façon constitutive, même en absence du ligand CXCL12 *in vitro*. Mais il peut également se présenter sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec d'autres récepteurs tels que CXCR7, CCR5, CCR2 ou le récepteur de lymphocytes T (TCR) (Pozzobon et al., 2016).

Une fois exprimé, CXCR4 subit des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, ubiquitination et sulfatation). Ces modifications modulent la distribution intracellulaire du récepteur, sa signalisation et ses fonctions. En effet, il a été rapporté que la sulfatation de la tyrosine sur la partie N-terminale du récepteur ou la glycosylation sur l'Asn11 est cruciale pour la liaison de CXCL12 (Pozzobon et al., 2016).

Bien que CXCL12 soit la seule chimiokine décrite comme ligand de CXCR4, d'autres ligands non chimiokiniques ont été décrits pour ce récepteur : des ligands endogènes et d'autres exogènes. On cite le facteur inhibiteur de migration des macrophages (MIF), l'ubiquitine extracellulaire (eUb), la glycoprotéine virale gp120, la protéine vMIPII exprimée dans le sacome de Kaposi associé à l'herpes virus 8 et les β -défensines humaines (Pawig et al., 2015)

2.8.2.2.CXCR7

Ce récepteur a été identifié chez des souris invalidées pour l'expression de CXCR4, chez lesquelles il a été montré qu'au 13^{ème} jour de développement embryonnaire, le ligand CXCL12 pouvait encore se lier aux cellules hépatiques (Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006). Ce récepteur est également connu sous le nom d'ACKR3 pour « Atypical chemokine Receptor 3 » et est activé par deux ligands, CXCL12 et CXCL11 mais avec 10 à 20 fois moins d'affinité que pour CXCL12. Il appartient au sous-groupe de récepteurs dits atypiques, puisqu'il n'est pas couplé à une protéine G. Ceci est dû à l'absence de la séquence DRYLAIV nécessaire au couplage et l'activation des protéines G hétérotrimériques (Thelen and Thelen, 2008). Le gène codant pour CXCR7 se situe au niveau du chromosome 2q37.3. Sa séquence en acides aminés présente 90% de similitude avec le CXCR7 murin (Sánchez-Martín et al., 2013a) mais que 35% d'homologie avec CXCR4. L'expression de CXCR7 est régulée positivement par les facteurs de transcription NF- κ B et HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor - 1 α), comme c'est le cas pour CXCL12 et CXCR4 (Sánchez-Martín et al., 2013a). Il existe actuellement deux isoformes de CXCR7, produites par épissage alternatif (Lucchesi et al., 2008) et qui produit deux protéines de 210 et 362 acides aminés décrites dans le génome

humain (Ensembl ; GRCh38.p10). Mais il n'existe aucune mention de ces deux formes dans la littérature.

L'expression de CXCR7 est observée dans les tissus embryonnaires et adultes. Son expression est abondante pendant le développement embryonnaire dans les tissus humains et murins, ainsi que dans les cellules transformés. Cependant, il est peu exprimé dans les cellules somatiques normales (Thelen and Thelen, 2008). CXCR7 est exprimé par les cellules B et T, les monocytes, les neutrophiles et par les cellules dendritiques (Balabanian et al., 2005). L'expression du CXCR7 est en corrélation avec la capacité des cellules B à se différencier en cellules circulantes lors de l'activation, ce qui suggère que CXCR7 est un marqueur des cellules B mémoire, compétentes pour devenir des cellules sécrétrices d'anticorps (Sierro et al., 2007). CXCR7 est également largement exprimé dans les cellules neuronales, les cellules vasculaires et gliales (Schönemeier et al., 2008). Il est exprimé par de nombreuses lignées cellulaires tumorales (sein, poumon, cerveau) et par les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse (Sun et al., 2010).

Des travaux ont décrit la présence de CXCR7 au niveau intracellulaire témoignant de son internalisation avant d'être dégradé ou recyclé à la surface cellulaire pour être actif de nouveau (Sánchez-Martín et al., 2011).

Comme pour CXCR4, la délétion de CXCR7 chez les souris, est létale mais essentiellement à cause d'anomalies de formation des valves cardiaques (Gerrits et al., 2008; Sierro et al., 2007) et ce rôle de CXCR7 est dépendant de son interaction avec CXCL12 (Bachelierie et al., 2014). De la même manière, chez le poisson zèbre, l'inactivation de CXCR7 induit la formation d'un phénotype similaire à celui obtenu lors de l'inactivation du VEGF-A avec un péricarde plus important et des anomalies de vascularisation (Miao et al., 2007).

De nombreuses publications décrivent la signalisation de CXCR7 et les conséquences de son activation. Il a été montré que la stimulation de CXCR7 par la CXCL12 induit le recrutement d'une β -arrestine (Kalatskaya et al., 2009). CXCR7 se présente généralement sous forme d'hétérodimère CXCR7/CXCR4 *in vitro*. La signalisation via ce dimère inhibe la signalisation médiée par les protéines G tout en potentialisant les voies de signalisation en aval dépendantes d'une β -arrestine telles que l'activation de ERK1 / 2, la MAPK p38 et la protéine kinase activée par le stress (SAPK). Cette signalisation module la migration cellulaire et permet la survie et la prolifération (Pozzobon et al., 2016). *In vivo*, la dimérisation des récepteurs est très controversée et mal connue. Très peu d'études ont démontré l'existence de dimères CXCR4/CXCR7 (Luker et al., 2008). De plus, à l'heure actuelle, peu d'outils efficaces sont disponibles afin de décortiquer les mécanismes régulés par CXCR7.

2.8.2.3. Rôle de CXCR4 et CXCR7 dans le CCR

Une forte expression de CXCR4 a été montrée dans plus de 23 cancers humains, dont le CCR (Romain et al., 2014), le cancer gastrique (Rubie et al., 2016) où cette forte expression est associée à une faible expression de CXCL12. De même, la surexpression de CXCR4 est associée à l'agressivité de la tumeur, à une baisse de la survie (Zhao et al., 2015) et à la formation de métastases (Hattermann and Mentlein, 2013; Sun et al., 2010).

Le récepteur CXCR7, qui a une affinité dix fois supérieure pour CXCL12 que CXCR4 (Balabanian et al., 2005), est fortement exprimé dans les lymphocytes T, les cellules endothéliales activées des néovaisseaux et les progéniteurs neuronaux (Sun et al., 2010). Son expression est également augmentée dans de nombreux cancers dont le CCR (Sun et al., 2010; Romain et al., 2014).

Pour préciser le rôle respectif de chacun des récepteurs dans la progression, la migration et la dissémination tumorale, plusieurs approches ont été testées : des ARN interférents (siARN), des antagonistes et des anticorps neutralisants. D'après ces études, il est encore difficile de connaître l'implication spécifique de chaque récepteur ; en effet, la surexpression de CXCR4 dans des cellules mammaires augmente le chimiotactisme et l'invasion cellulaires *in vitro* ainsi que la migration et l'intravasation *in vivo*. À l'opposé, des siARN ciblant CXCR4 inhibent la prolifération, la migration et l'invasion de cellules tumorales bronchiques induites par CXCL12 *in vitro* (Xie et al., 2014). Cependant, la co-expression de l'hétérodimère CXCR4/CXCR7 dans des cellules mammaires *in vitro*, favorise une migration plus importante qu'avec CXCR4 seul (Décaillot et al., 2011). D'autre part, la surexpression de CXCR7 dans des cellules mammaires stimule la croissance tumorale et l'angiogenèse mais diminue l'invasion, l'intravasation et la formation de métastases *in vivo* (Hernandez et al., 2011). Alors que Miao et al., (2007) ont montré, à l'opposé, qu'une surexpression de CXCR7 dans des cellules tumorales mammaires facilite la croissance tumorale et le développement de métastases pulmonaires *in vivo* (Miao et al., 2007). De même, inhiber CXCR7 diminue fortement la migration transendothéliale *in vitro* mais n'affecte pas la migration cellulaire (Zabel et al., 2009, 2011).

2.8.2.3. Signalisation dite équilibrée ou biaisée des récepteurs à 7 domaines transmembranaires

Dans plusieurs pathologies, les récepteurs de chimiokines sont ciblés par différentes molécules pharmacologiques, des antagonistes, des agonistes partiels ou complets, qui servent

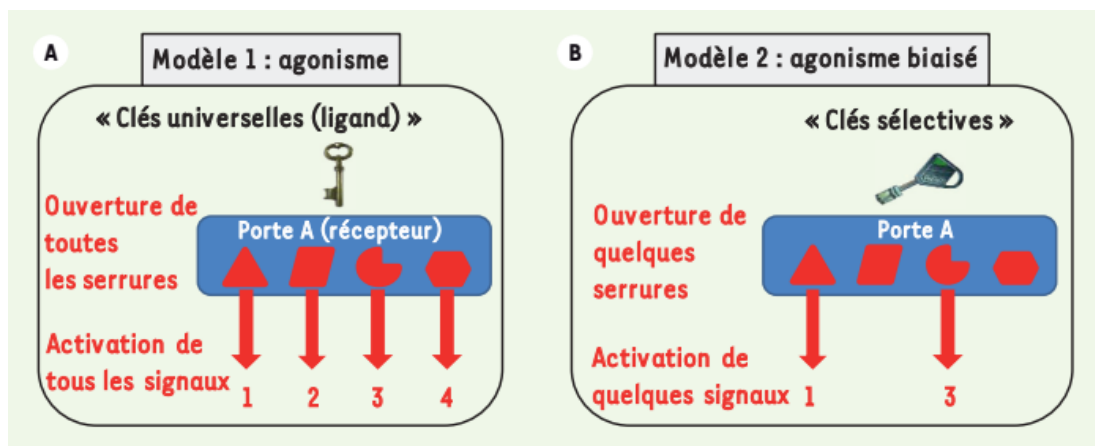


Figure 35 : Évolution du concept d'agonisme. A) Modèle 1 : définition classique d'un ligand agoniste (clefs universelles) d'un récepteur couplé aux protéines G (porte A). Le ligand active simultanément toutes les voies de signalisation intracellulaires (1, 2, 3 et 4) associées au récepteur. B) Modèle 2: il s'agit du concept d'agoniste biaisé, définissant le ligand agoniste comme capable d'activer seulement certaines voies de signalisation (1 et 3). D'après Galés, 2012.

à bloquer complètement, partiellement ou activer la voie de signalisation d'un récepteur donnée. Il existe actuellement un autre type d'agoniste des récepteurs à sept segments transmembranaires, capable d'activer une signalisation dite « biaisée ». Il s'agit des ligands « biaisés ». Ces ligands sont capables d'activer sélectivement une partie de la signalisation seulement, tout en bloquant le reste. Le modèle de base de la signalisation des récepteurs à 7 domaines transmembranaires suggère qu'il existe un équilibre entre les voies de signalisation activées par les protéines G et celles activées par les β -arrestines. La liaison d'un agoniste dit « équilibré » entraîne généralement une signalisation médiée par des protéines G et une désensibilisation et une internalisation qui passent par les β -arrestines (**Figure 35A**). Cette configuration correspond à un ligand et un récepteur « équilibrés » (Gundry et al., 2017). Contrairement à ce type de signalisation, un système de « signalisation biaisée », est celui dans lequel la signalisation cellulaire est transmise par une seule de ces deux voies (**Figure 35B**).

3. Régulation de l'expression génique

Au cours de sa vie, une cellule s'adapte aux conditions dans lesquelles elle se trouve afin de répondre au mieux aux changements de cet environnement. Pour cela, elle synthétise des protéines adaptées à chaque phase de son développement selon les stimuli qu'elle reçoit et la synthèse protéique reflète l'expression des certains gènes transcrits puis traduits. De ce fait, l'expression génique d'une même cellule est différente selon son environnement, son stade de développement et les fonctions qu'elle va acquérir. Cette expression est régulée par divers facteurs afin de permettre aux bons gènes de s'exprimer au bon moment.

3.1. Régulation au niveau génomique

La première ligne de régulation de l'expression génique réside dans l'organisation spatiale de la chromatine. En effet, dans la chromatine, on distingue des régions avec une forte activité transcriptionnelle correspondant à la partie active de la chromatine, appelée euchromatine. Contrairement à l'hétérochromatine qui représente des régions plus condensées et n'ayant pas d'activité transcriptionnelle.

Le maintien de l'intégrité génomique est essentiel pour une transmission correcte de l'information portée par ce génome. Par ailleurs, le génome d'une cellule est constamment soumis au stress génotoxique induit par des facteurs intrinsèques et extrinsèques entraînant des altérations du génome (Terabayashi and Hanada, 2018). Ces altérations se présentent sous forme de modifications de bases dans l'ADN. En s'accumulant, elles entraînent un blocage au niveau de la fourche de réplication puis des cassures double brin. La conséquence d'une

réplication bloquée est la présence de régions non répliquées d'un chromosome donné. Les cassures doubles brin, si elles ne sont pas correctement réparées, induisent l'instabilité du génome par l'introduction de réarrangements sous forme de délétions, d'insertions, d'inversions, de duplications ou encore des mutations ponctuelles. Cette instabilité a des conséquences sur le métabolisme de la cellule et peut entraîner sa transformation maligne dans certains cas (Terabayashi and Hanada, 2018). Ces modifications peuvent survenir sans impacter la quantité du matériel génétique. Ce sont les réarrangements équilibrés. C'est le cas des translocations et des inversions chromosomiques réciproques. En revanche, les réarrangements déséquilibrés sont des modifications qui altèrent la quantité de l'ADN, puisqu'il y a soit une perte, soit un gain du matériel génétique. Le réarrangement, qu'il soit équilibré ou déséquilibré, impacte l'expression génique. Les réarrangements déséquilibrés caractérisés par une perte ou un gain d'un fragment d'ADN, peuvent être détectés grâce à la « comparative genomic hybridization array » (CGH array).

La perte allélique ou LOH pour « loss of heterozygotie » est une conséquence d'une délétion d'un fragment d'ADN dans un chromosome donné. De même, la variation du nombre de copies (CNV) concerne la modification du nombre de copies d'un fragment génique. Ces types de réarrangements sont décrits dans plusieurs cancers, notamment dans le CCR (Druliner et al., 2018).

De petites variations dans la séquence des bases de l'ADN peuvent également modifier l'expression génique, il s'agit des mutations. Par exemple, les insertions ou les délétions de bases nucléotidiques peuvent induire un décalage du cadre de lecture dans les régions codantes. Les substitutions de bases est une petite modification qui peut être sans conséquences sur la séquence en acides aminés dans certains cas. Mais peuvent également induire le changement d'un acide aminé dans le cas des mutations faux sens, ou produire un codant STOP dans le cas des mutations non-sens.

3.2.Régulation épigénétique

Le terme épigénétique est défini comme un changement phénotypique de la cellule qui survient sans changement génétique. Autrement dit, l'épigénétique regroupe l'ensemble des mécanismes qui modifient l'expression des gènes sans altérer l'ADN en adaptant la conformation de la chromatine afin de stimuler ou réprimer l'expression d'un gène donné (Allis and Jenuwein, 2016). La régulation de la transcription passe par la compaction/déroulement de la chromatine sous le contrôle de modifications post-

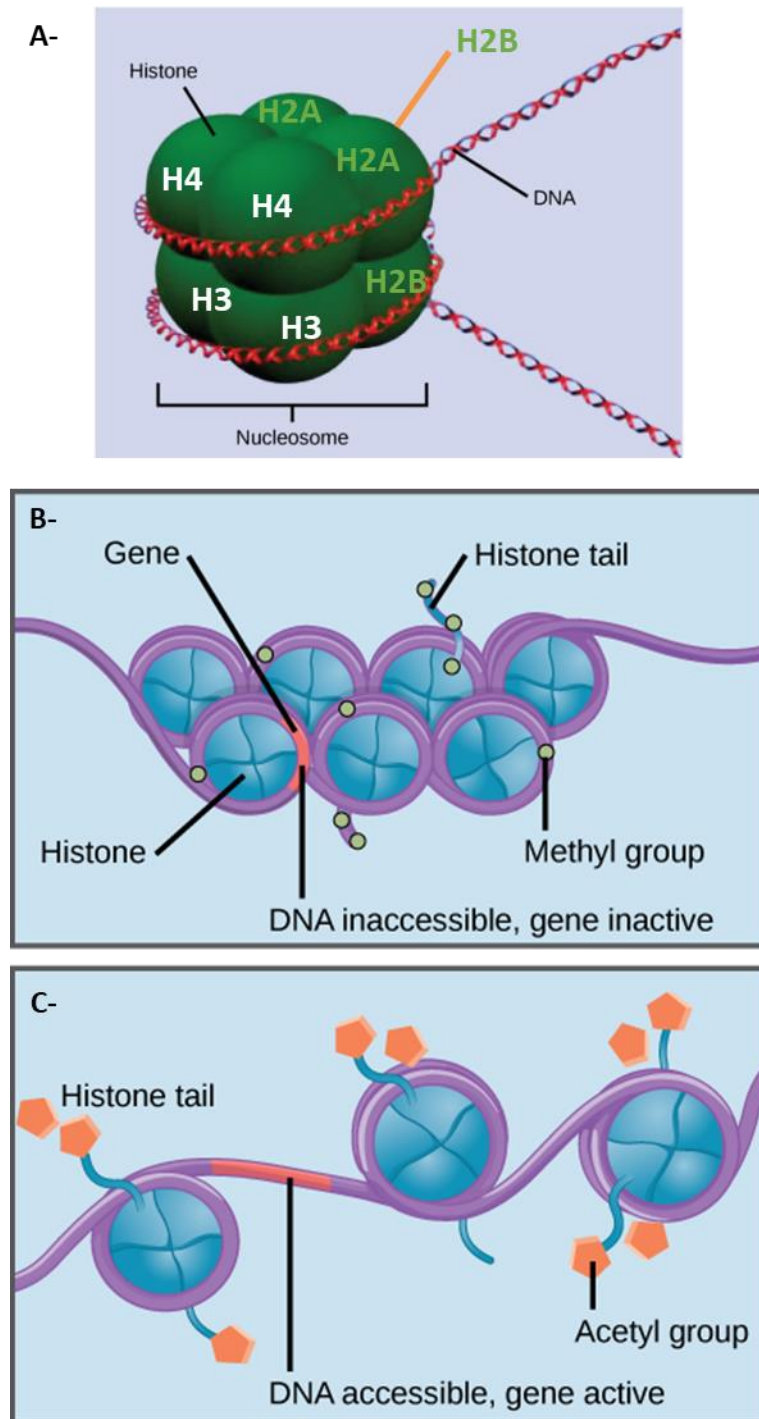


Figure 36 : Les modifications apportées aux histones et à l'ADN affectent l'espacement des nucléosomes. A-L'ADN est plié autour des protéines histones (dimères de H2A, H2B, H3 et H4) pour créer des complexes de nucléosomes. Ces nucléosomes contrôlent l'accès des protéines à l'ADN sous-jacent. D'après Chris Woodcock. B- La méthylation de l'ADN et des histones entraîne la compaction des nucléosomes. Les facteurs de transcription ne peuvent pas accéder à l'ADN et les gènes ne sont pas exprimés. C- L'acétylation des histones relâche la compaction des nucléosomes. Les facteurs de transcription accèdent à l'ADN et les gènes sont exprimés.[https:// courses.lumenlearning.com/ wm-biology1/ chapter/ reading- eukaryotic-epigenetic-gene-regulation/](https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-eukaryotic-epigenetic-gene-regulation/)

traductionnelles des histones afin de former l'unité fondamentale de la chromatine qui est le nucléosome. Ce dernier est composé d'un octamère d'histones (un tétramère de H3 et H4 et deux dimères de H2A et H2B ; **Figure 36**) entouré d'environ 146 paires de bases d'ADN (Strahl and Allis, 2000). Plusieurs facteurs influencent la condensation de cette chromatine, dont les modifications chimiques qui surviennent au niveau des histones ou de l'ADN par l'action de certaines enzymes (Biswas and Rao, 2018). Il existe plusieurs types de modifications post-traductionnelles des histones comprenant : l'acétylation des lysines, la méthylation des lysines et des arginines, la citrullination des arginines, l'ubiquitination des lysines, la sumoylation des lysines, l'isomérisation des prolines et la phosphorylation des résidus sérine/thréonine/tyrosine (Rothbart and Strahl, 2014). La majorité de ces interactions interviennent au niveau des extrémités N et C terminales des histones. Mais, on retrouve également des modifications au niveau du core de l'histone modifiant ainsi son interaction avec les autres histones ou avec l'ADN (Cosgrove et al., 2004). Les deux modifications épigénétiques les plus connues sont la méthylation et l'acétylation. La première peut toucher aussi bien les histones que l'ADN alors que la seconde ne touche que les histones (Biswas and Rao, 2018).

3.2.1. La méthylation et la déméthylation

La méthylation et la déméthylation concernent aussi bien l'ADN que les histones. La méthylation de l'ADN survient principalement au niveau de la position 5 de la cytosine (5-mC) qui se présente sous forme de dinucléotides avec la guanine (CpG). Cette modification est connue pour son rôle réprimant l'expression génique en empêchant l'interaction des facteurs de transcription avec l'ADN (Klose and Bird, 2006; Razin and Riggs, 1980).

3.2.1.1. Les ADN méthyl transférases (DNMTs)

Les DNMT sont une famille d'enzymes hautement conservées chez les mammifères regroupant 5 membres (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L) (Robertson et al., 1999). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyl à partir d'un donneur méthyl S-adénosyl-L-méthionine (SAM), à la position 5' des cytosines dans l'ADN formant la 5-méthyl cytosine. La DNMT1 est l'enzyme la plus abondante parmi les DNA méthyl transférases. Elle a un rôle très important lors de la réplication de l'ADN, où elle catalyse la méthylation du brin néosynthétisé selon les marques déjà existantes dans l'ADN matriciel. Cette enzyme possède un domaine C-terminal catalytique méthyltransférases et une région N-terminale de taille variable qui a pour rôle de maintenir l'activité méthyl transférase de la DNMT1. Contrairement à DNMT1, les DNMT3 peuvent méthyler l'ADN qu'il soit semi-

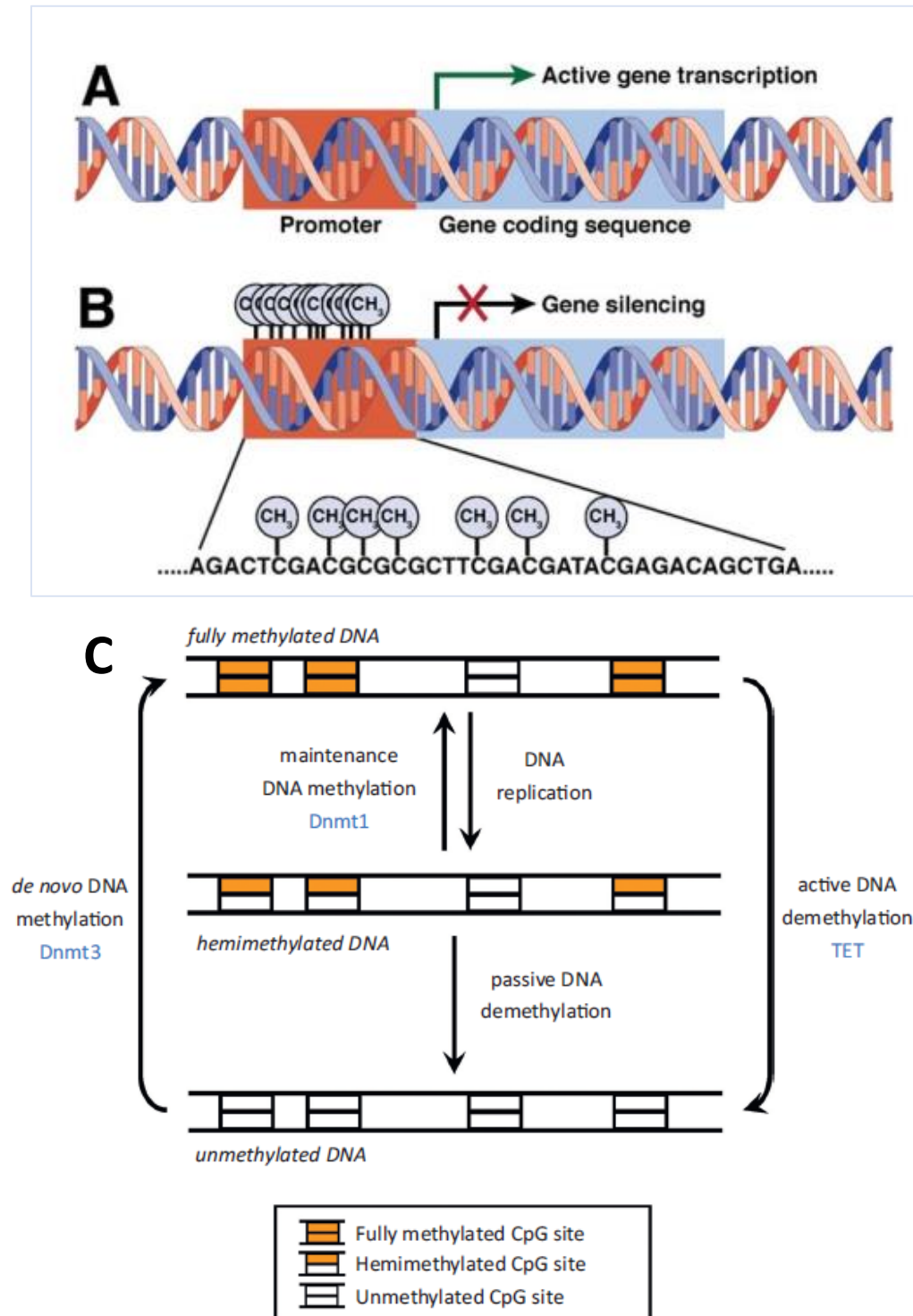


Figure 37: Méthylation de l'ADN. A-B- Le promoteur du gène et les régions codantes d'un gène actif sont indiqués en rouge et en bleu, respectivement. L'addition aberrante de groupements méthyle (CH₃) aux sites CpG dans la région promotrice interfère avec la transcription du gène. D'après Leggett and Whitehall, 2010. C- Modèle classique de méthylation de l'ADN spécifique à un site. Typiquement, Dnmt1 est considéré comme une enzyme de maintenance, alors que Dnmt3a et Dnmt3b sont considérés comme des méthyltransférases *de novo*. Dnmt : ADN méthyltransférase; TET: « ten eleven translocation enzyme ». D'après Jeltsch and Jurkowska, 2014.

méthylé ou non méthylé (**Figure 37**). Il a été rapporté que les DNMT3A et B sont surexprimées dans les cellules embryonnaires où le taux de méthylation est important et sous exprimés dans les cellules adultes (Gowher et al., 2005).

A l'exception des autres DNMTs, DNMT2 n'agit pas sur l'ADN mais stabilise les ARN transporteurs en catalysant leur méthylation (Kaiser et al., 2017).

3.2.1.2. Les histones lysine méthyl transférases (KMTs)

La méthylation est également une des modifications post-traductionnelles qui ciblent les histones. Cette réaction est catalysée par les lysines méthyl transférases qui ajoutent jusqu'à trois groupements méthyl au niveau des résidus lysine des histones. Quelques méthylations

des histones sont associées à des régions transcriptionnellement actives telles que les histones H3 lysines 4, 9 et 27 (H3K4me2, H3K9me1 et H3K27me1). Une modification particulièrement intéressante et importante pour l'expression des gènes d'eucaryotes est la triméthylation de l'histone H3 lysine 4 (H3K4me3), qui est presque exclusivement associée aux promoteurs actifs de l'ARN polymérase II (Vermeulen et al., 2010). Bien que cette association soit admise, les mécanismes permettant la localisation de H3K4me3 sur d'autres promoteurs restent encore peu connus.

3.2.1.3. Les ADN déméthylases

La déméthylation de l'ADN se fait de deux manières : une déméthylation passive et une déméthylation active ou enzymatique. La déméthylation passive survient lors de la réplication de l'ADN après plusieurs cycles de réplication avec un déficit de DNMT1. La déméthylation active ou enzymatique est catalysée par des enzymes qui suppriment un groupement méthyl à partir de la 5mC. Ceci est réalisé par les protéines de la famille TET (ten-eleven translocation) constituée de trois membres : TET1, TET2 et TET3. Ces dernières, catalysent la réaction de déméthylation par leurs domaines C-terminal en oxydant la 5mC à 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) qui donnera ensuite la 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxycytosine après d'autres oxydations (Ito et al., 2011).

3.2.1.4. Les histones déméthylases

La déméthylation des lysines sur les histones est catalysée par deux familles d'enzymes différentes, les déméthylases spécifiques de lysine (LSD) et les dioxygénases dépendantes de l' α -ketoglutarate (JmjC) (Zhou and Ma, 2008). La première famille d'enzymes cible exclusivement les lysines mono ou diméthylées alors que la famille des JmjC regroupe des enzymes capables de déméthyliser les lysines triméthylées. Contrairement aux lysine

déméthylases, très peu d'études concernent les déméthylations des arginines (Biswas and Rao, 2018).

3.2.2. L'acétylation

L'acétylation est une modification post traductionnelle des histones qui active la transcription génique. Comme pour la méthylation, l'acétylation est également régulée par des réactions d'acétylation et de déacétylation catalysées par des familles d'enzymes distinctes : les « histone acetyl transferases » (HAT) et les « histone déacetylases » (HDAC) (Biswas and Rao, 2018).

3.2.2.1. Les histones acétyl transférases (HAT)

Ces enzymes permettent l'acétylation du groupement amine des lysines des histones. Ce qui entraîne l'annulation de la charge positive de ce groupement. Cette réaction affaiblit l'interaction des histones avec l'ADN (chargé négativement) et active la transcription. La réaction est catalysée par les HATs qui transfèrent le groupement acétyl à partir d'un acétyl co-A (Benson et al., 2007). L'acétylation des histones se fait au niveau de la partie N-terminale des résidus Lysine. Les acétylations des Lys9 et 14 de l'histone H3, Lys 5,8,12 et 15 de l'histone H4 sont les modifications les plus décrites (Bjerling et al., 2002).

On distingue deux types de HATs selon leur localisation : le type A nucléaire et le type B cytoplasmique. Les HATs de type A acétylent les histones liées à la chromatine et le type B est responsable de l'acétylation des histones nouvellement synthétisées (Benson et al., 2007).

Selon leur structure et leur fonction, les HATs nucléaires sont subdivisées en 5 familles, dont la famille des GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) qui regroupe 2 sous-types : KAT2A (Gcn5L) et KAT2B (PCAF). Les acétyl transférases peuvent également agir indirectement sur la transcription en interagissant avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple, CBP (KAT3A) et p300 (KAT3B) qui interagissent avec c-fos, c-jun et p53 (York and O'Malley, 2010).

Les acétyl transférases jouent un rôle dans l'activation de la transcription mais également dans d'autres processus cellulaires. KAT8 par exemple, participe à la réponse aux dommages de l'ADN durant le cycle cellulaire en formant un complexe avec hMSL3 (human Msl specific Lethal 3) (Taipale et al., 2005).

3.2.2.2. Les histones déacétylases (HDACs)

La réaction de déacétylation des histones est catalysée par les enzymes « déacétylases des histones (HDACs). Ces dernières enlèvent le groupement amino acétyl des résidus lysines

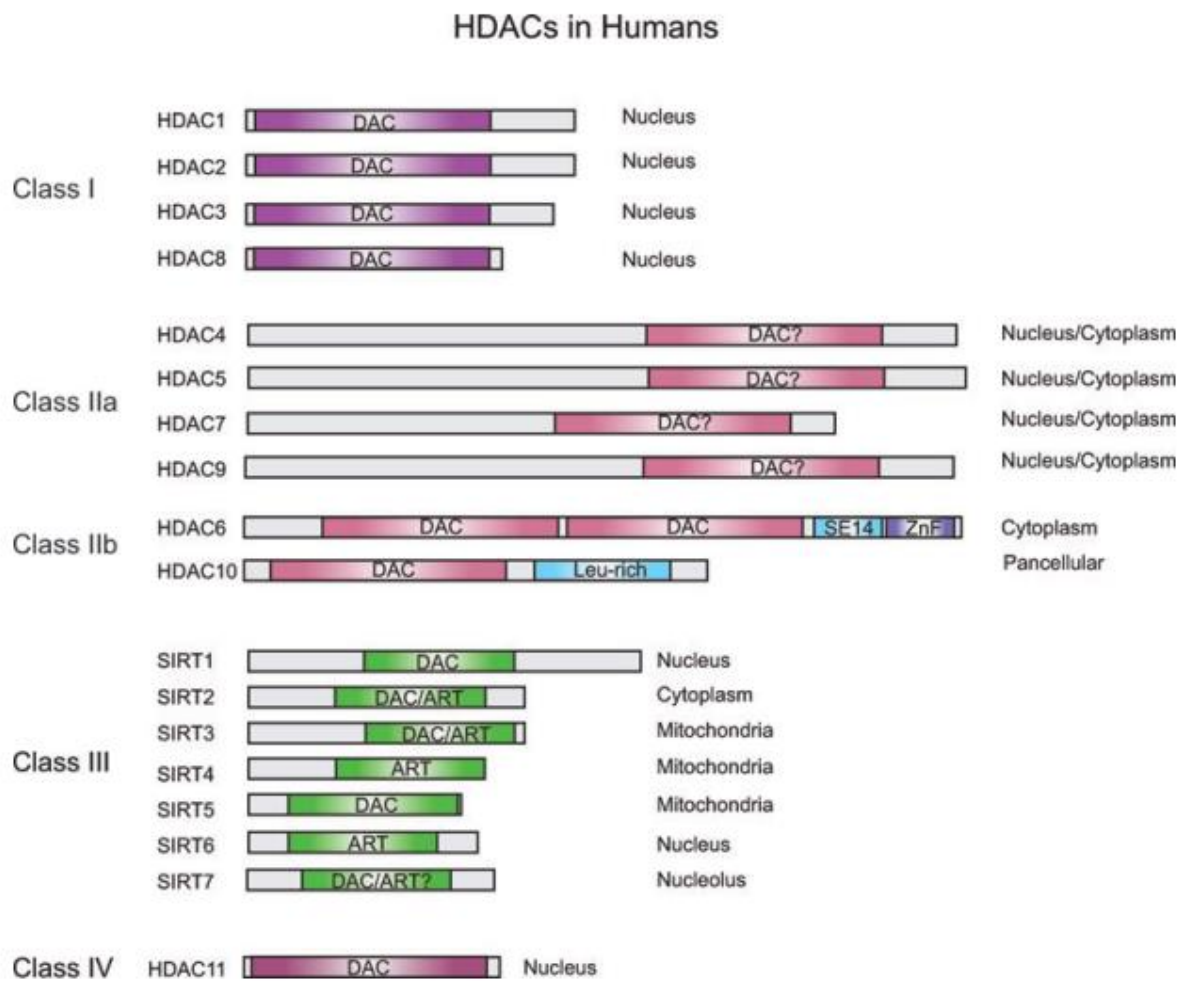


Figure 38 : Les différentes isoformes de HDAC. Les barres décrivent la longueur de la protéine. Le domaine catalytique est indiqué en bleu. Une barre noire représente un signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal, NLS). N : N-terminal, C : C-terminal. D'après Clocchiatti et al., 2011.

des histones. La déacétylation modifie la conformation de la chromatine et réprime la transcription. Selon les propriétés enzymatiques des HDACs, on distingue les HDACs qui sont des déacétylases classiques zinc dépendantes. Elles correspondent à 11 protéines divisées en 4 classes (I, IIa, IIb et IV ; **Figure 38**) (Gregoretta et al., 2004). Les HDACs de classe I (HDAC1, 2, 3 et 8) sont exprimées d'une manière ubiquitaire, avec une expression majoritaire au niveau du noyau. HDAC1, 2 et 3 catalysent leur action de déacétylation dans des complexes protéiques différents. Les HDACs de classe IIa (HDAC4, 5, 7 et 9) possèdent une extrémité N-terminale longue qui facilite leur phosphorylation et leur activation en réponses à diverses voies de signalisation (Clocchiatti et al., 2011). Les HDAC6 et 10 font partie de la classe IIb. L'HDAC6 possède deux domaines catalytiques contrairement aux autres HDACs. Un autre groupe de HDACs agit par un mécanisme faisant intervenir le NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) et rassemble 7 membres qui forment la classe III des HDACs. La HDAC11 est le seul membre de la classe IV (Seto et Yoshida, 2014; Biswas and Rao, 2018). Les mécanismes d'action des HAT et des HDAC sont résumés sur la **Figure 39** (verso page suivante).

3.3.L'épigénétique dans le CCR

Les altérations épigénétiques dans le CCR surviennent à des stades précoces de la tumorigenèse, particulièrement dans le phénotype CIMP décrit précédemment, qui est caractérisé par la méthylation de plusieurs promoteurs dans le génome (Balch et al., 2017).

Schuebel et coll. ont démontré que dans une cellule tumorale de CCR, 5% du génome présentent des méthylations anormales (environ 1000 gènes) (Schuebel et al., 2007). D'où l'importance des facteurs épigénétiques dans la tumorigenèse colique à côté des facteurs génétiques, qui induisent des mutations dans des gènes clés, induisant la transformation cellulaire. Ce qui est intéressant, c'est que 50% de ces mutations touchent des gènes codant pour des facteurs régulateurs des processus épigénétiques tels que DNMT3b et EZH2. (Vogelstein et al., 2013).

Ces aberrations au niveau de l'épigénome des tumeurs CCR peuvent induire des résistances aux drogues anticancéreuses conventionnelles telles que le 5-fluorouracil, l'oxaliplatine et l'irinotecan. Dans ce cas de figure, l'utilisation d'une thérapie combinée qui cible également la machinerie épigénétique peut améliorer l'efficacité des traitements par d'autres agents thérapeutiques. On note à titre d'exemple, les agents hypométhylants tels que les inhibiteurs des DNMTs ou les inhibiteurs des HDAC (HDACi) (Baretti and Azad, 2018).

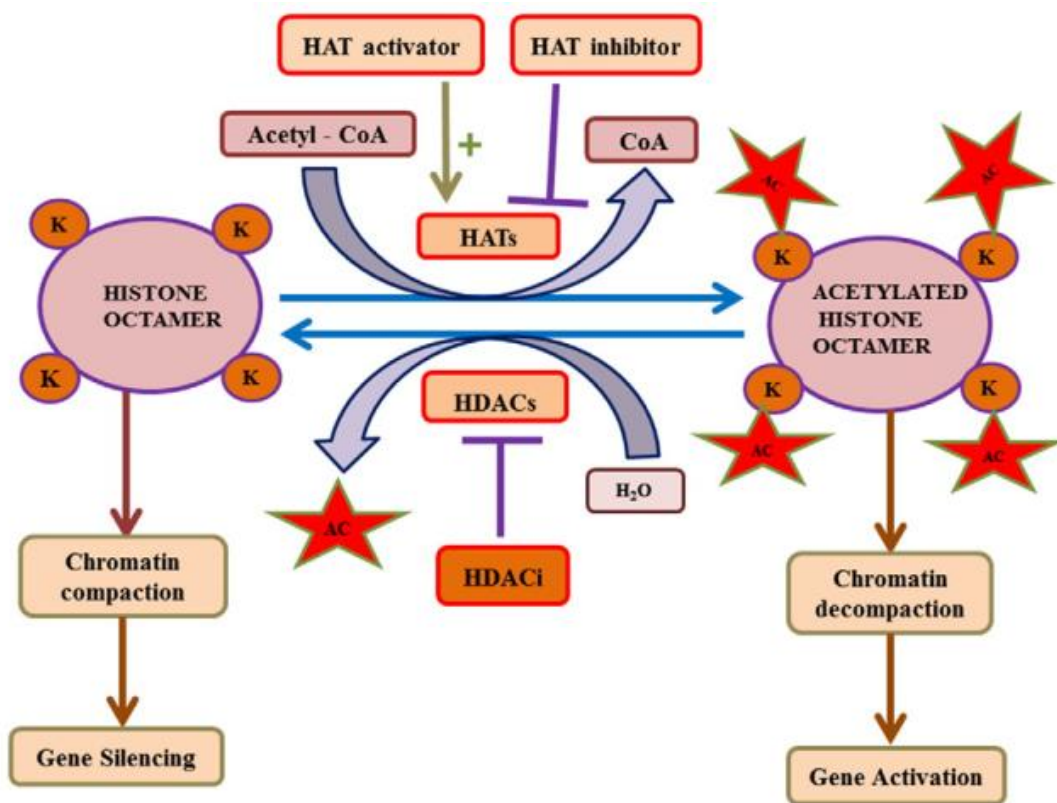


Figure 39: Mécanisme d'action des HAT et des HDAC. Les HAT ajoutent un fragment acétylé aux résidus lysine des histones en utilisant l'acétyl coenzyme A comme cofacteur, ce qui entraîne une décondensation de la chromatine et l'expression du gène. Les activateurs de HAT déclenchent leur activité tandis que les inhibiteurs restreignent leur activité. Les HDAC enlèvent les groupes acétylé des histones, ce qui entraîne un compactage de la chromatine et, par conséquent, un arrêt de la transcription. Les inhibiteurs de HDAC augmentent l'acétylation des histones en favorisant la décompaction de la chromatine, aboutissant à l'activation des gènes. D'après Ganai et al., 2016.

3.4.Régulation post-transcriptionnelle (miRNA)

Les microARN (miRNA) sont de petits ARNs (18-25 nucléotides) non codants. Ils ont pour rôle de réguler l'expression de certains gènes. Soit en empêchant la traduction ou en induisant la dégradation des ARNm. Certains types de miRNA ont été associés à plusieurs types de pathologies notamment dans les cancers. Dans le CCR, plusieurs changements d'expression des miRNA ont été décrits. Par exemple, une expression réduite de miR-142-3p et miR-26a-5p dans les sérums des patients atteints de CCR par rapport aux individus sains. La présence des miRs dans le sérum et leur stabilité dans le temps, fait d'eux, des biomarqueurs de diagnostic et de pronostic non invasifs (Rezasoltani et al., 2017).

3.5.Régulation de l'expression du trio CXCL12, CXCR4, CXCR7 dans les pathologies

Plusieurs études ont décrit des changements d'expression des chimiokines et leurs récepteurs dans des situations pathologiques et ont été associés dans certains cas au pronostic vital des patients.

Dans les cancers, CXCR4 a été décrit comme étant surexprimé dans certains types (les tumeurs bronchiques et mammaires) et sous exprimé dans d'autres (les mélanomes et les tumeurs pancréatiques), où on retrouve une méthylation non habituelle de l'ADN dans la région du promoteur (Ramos et al., 2011).

Dans les glioblastomes par exemple, CXCR4 est sous exprimé en raison d'une hyperméthylation du promoteur. Ceci serait favorable à la survie globale des patients (Ma et al., 2017; Yasmin et al., 2015). De même, dans les lignées cellulaires pancréatiques, où l'absence d'expression de CXCR4 est lié à une méthylation du promoteur (Sato et al., 2005). De plus, dans des tissus présentant une inflammation, l'hyperméthylation de CXCR4 participerait à la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 (Babu et al., 2015).

En revanche, la forte expression de CXCR4 est régulée soit par une déméthylation du promoteur comme dans le cas des douleurs chroniques liées à l'inflammation (Li et al., 2018b), ou pourrait être régulée indirectement par des mécanismes d'acétylation. En effet, Huang et col (2018) ont montré que l'inhibition de HDAC5 induit une surexpression de CXCR4 à la surface des cellules souches hématopoïétiques, en augmentant l'acétylation de p65 qui participe à la transcription de CXCR4, ce qui renforce le « homing » de ces cellules et la prise de greffe (Huang et al., 2018).

La dérégulation de l'expression des récepteur CXCR4 et CXCR7 a pour conséquence une altération de l'axe CXCR4/CXCR7-CXCL12. Par exemple, chez les patients atteints de myélofibrose, la réduction de l'expression de CXCR4 qui est régulée par une

hyperméthylation du promoteur, entraîne la migration constitutive des cellules CD34+ (Bogani et al., 2008).

Contrairement à CXCR4, peu d'étude se sont intéressé la régulation de l'expression de CXCR7 dans les conditions pathologiques. Zheng et col. Ont décrit une sous expression du gène HIC1 dans des tumeurs humaines de la prostate. Cette sous expression est due à une forte méthylation du promoteur. La réexpression de ce gène dans des lignées cellulaires réduit la prolifération et la croissance tumorale ainsi que la formation de métastases. De plus, cette réexpression régule négativement CXCR7, ce qui expliquerait l'agressivité de des tumeurs (Zheng et al., 2013).

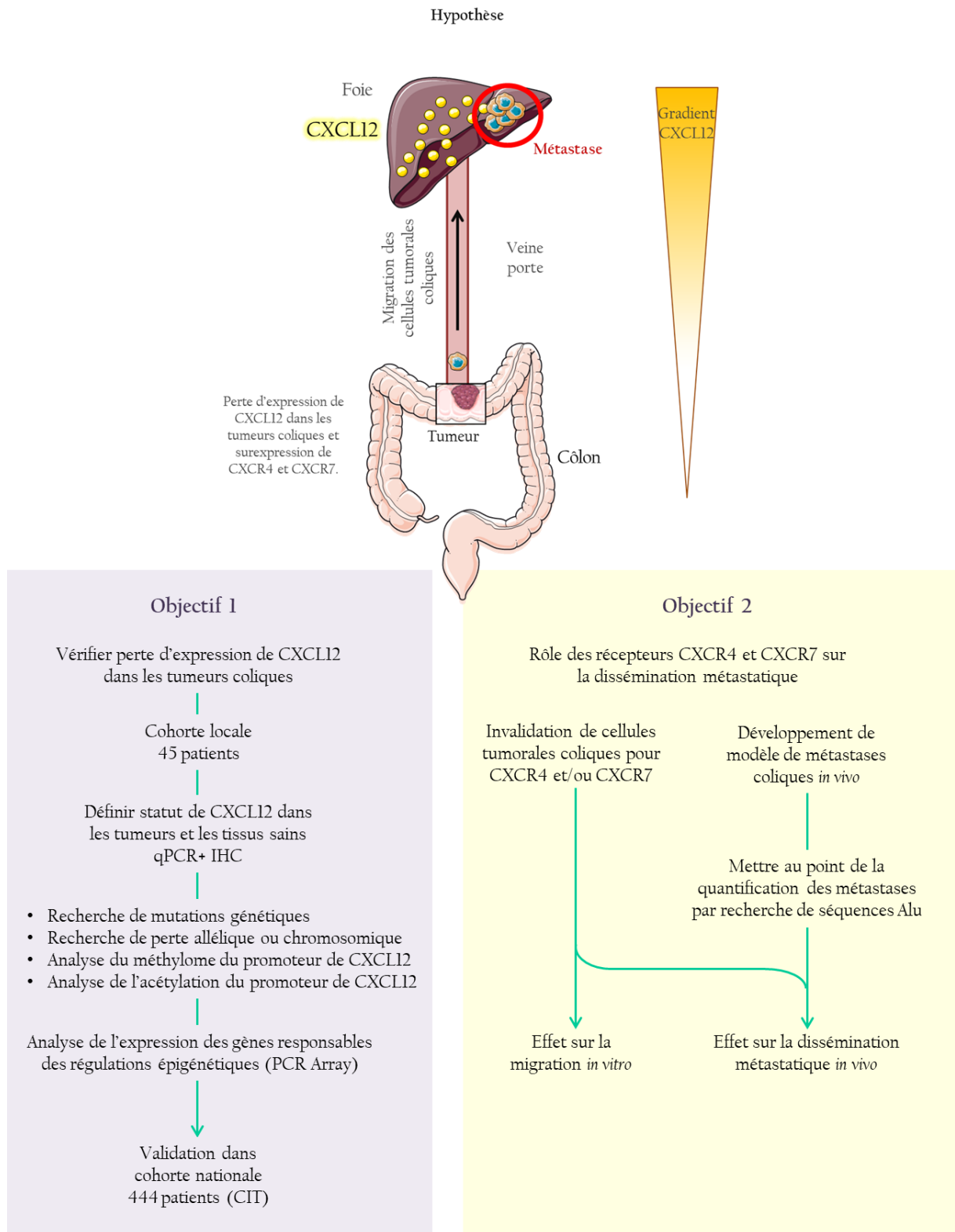
En plus de la dérégulation de l'expression des récepteurs, l'expression de la chimiokine CXCL12 peut également être dérégulée et induire une altération de l'axe CXCL12-CXCR4/CXCR7. Dans les cancers, beaucoup d'études décrivent une sous expression de CXCL12, telles que dans les ostéosarcomes et les tumeurs gastriques (Zhi et al., 2012). Cette sous expression est régulée par une méthylation du gène par l'enzyme DNMT1 (Li et al., 2018a).

D'autres résultats similaires ont été obtenus par Sowinska et Jagodzinski. En effet, l'inhibition de l'expression de DNMT1 et DNMT3B lève l'inhibition de l'expression de CXCL12 sur des lignées pancréatique (AsPC1) et mammaire (MCF-7) (Sowińska and Jagodzinski, 2007).

La méthylation de CXCL12 peut participer à la progression métastatique et influencer la réponse immunitaires antitumorale (Li et al., 2018a), et elle est associée à un mauvais pronostic dans le cancer mammaire et le cancer bronchique non à petites cellules (Ramos et al., 2011; Suzuki et al., 2008).

Dans la polyarthrite rhumatoïde CXCL12 n'est pas méthylé dans les fibroblastes synoviaux contrairement à l'ostéoarthrite. Cette chimiokine agit via CXCR7 afin d'activer les MMP responsables de l'érosion osseuse (Karouzakis et al., 2011).

Objectifs du travail de thèse



Les objectifs principaux des travaux réalisés durant ma thèse ont été de compléter des travaux amorcés dans mon laboratoire et de valider d'autres travaux déjà décrits dans la littérature. En effet, notre équipe avait montré une surexpression des récepteurs de la chimiokine CXCL12, CXCR4 et CXCR7, dans des tumeurs coliques humaines, surexpression corrélée positivement au stade clinique des tumeurs, avec une expression importante au stade métastatique (Romain et al., 2014). En parallèle, des études de Wendt et coll. avaient montré que la perte d'expression de CXCL12 dans des tumeurs coliques, était causée par la méthylation aberrante des îlots CpG du promoteur de CXCL12 (Wendt et al., 2006).

Puisqu'il a été décrit une forte expression du ligand CXCL12 dans des organes connus comme sites privilégiés du développement de métastases, à savoir le foie et les poumons pour les CCR, nous avons cherché à savoir si la surexpression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 par les cellules tumorales coliques, associée à la perte d'expression du ligand, pourrait faciliter la dissémination des cellules coliques vers ces organes à distance, exprimant fortement le ligand CXCL12. De même, la question était de connaître la part respective de chacun des récepteurs dans le processus de dissémination.

Dans ce but, je me suis fixé 2 objectifs :

- 1- Vérifier la perte d'expression de CXCL12 dans des tumeurs coliques issues d'une cohorte locale et valider cette perte dans une cohorte plus large issue de 7 centres hospitaliers nationaux. Il s'est ensuite agi de comprendre l'origine de la perte d'expression de CXCL12 à partir de données de transcriptome de la cohorte nationale et d'une analyse d'expression de gènes régulateurs de l'épigénétique dans la cohorte locale.
- 2- Etudier le rôle respectif des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans la dissémination métastatique en invalidant des cellules tumorales coliques pour l'expression de l'un ou des deux récepteurs. La capacité migratoire des cellules invalidées a été évaluée *in vitro* et leur potentiel métastatique *in vivo*, en quantifiant les métastases hépatiques et pulmonaires chez des souris immunodéficientes chez lesquelles les cellules auront été implantées dans le caecum. Dans ce but, il a été nécessaire de mettre au point le modèle murin de greffe orthotopique mais aussi d'adapter la technique permettant de quantifier les métastases de cellules humaines dans un environnement murin.

Afin de réaliser ces objectifs, j'ai suivi la démarche expérimentale indiquée sur la figure ci-contre.

MATERIEL ET METHODES

Matériel et méthodes

1. Etude sur les tumeurs humaines

1.1. Echantillons biologiques

Des blocs congelés de tumeurs coliques humaines primaires et des muqueuses saines associées ont été utilisés pour l'expression d'ARNm et des échantillons inclus en paraffine (FFPE) pour l'étude histologique. Quarante-cinq échantillons ont été obtenus au Centre de Ressources Biologiques (CRB) des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (tumeurs opérées entre 2012 et 2016). Seules des tumeurs localisées dans le côlon droit et gauche et de phénotype MSS ont été sélectionnées. Les tumeurs rectales ont été exclues pour cause d'irradiation et de chimiothérapie fréquentes avant la résection chirurgicale. Les tissus tumoraux ont été sélectionnés de façon à avoir un pourcentage de cellules tumorales $\geq 50\%$.

1.2. Expression des ARNm

1.2.1. Extraction des ARN

Chaque tumeur est dissociée grâce à un Polytron (Kinematica Polytron PT 1300D) dans un tube en polypropylène contenant 1 ml de Trizol. La suspension cellulaire est incubée pendant 5 minutes à température ambiante. Après l'ajout de 200 μ l de chloroforme, la suspension est homogénéisée puis incubée pendant 3 minutes à température ambiante. Trois phases apparaissent après centrifugation (1400g pendant 15 minutes à 4°C). La phase aqueuse (supérieure) qui contient les ARN est récupérée (500 μ l), à laquelle 500 μ l d'isopropanol sont ajoutés. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, la suspension est centrifugée (1400g pendant 15 minutes à 4°C). Le culot est lavé 3 fois à l'éthanol (75%), puis séché et dissocié dans 40 μ l d'eau ultra pure. La concentration est mesurée au Nanodrop (Nanodrop 1000 ; Thermo Scientific, France) puis les extraits conservés à -80°C.

1.2.2. Qualification des ARNs

Les ARNs sont qualifiés par le « BioAnalyser Agilent » afin de déterminer leur éventuelle dégradation. Après analyse par une électrophorèse capillaire, le RIN (RNA Integrity Number) correspondant à chaque échantillon est obtenu. Seuls les échantillons ayant un RIN > 7 sont retenus.

1.2.3. Analyse de l'expression génique par PCR quantitative relative (RT-qPCR)

Un microgramme d'ARN totaux est rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) simple brin avec la transcriptase inverse SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)

Au nombre de cycle $n = Ct$, on compare $N0$ (cible) et $N0$ (référence) pour définir le nombre absolu de copies :

$$N0(\text{cible}) / N0(\text{référence}) = 2^{-[Ct(\text{cible}) - Ct(\text{référence})]} = 2^{-\Delta Ct}$$

Pour comparer le nombre de copies dans l'ADNc (échantillon) à un ADNc (calibrateur), on calcule le ratio :

$$\frac{[N0(\text{cible}) / N0(\text{référence})]^{ech}}{[N0(\text{cible}) / N0(\text{référence})]^{cal}} = \frac{2^{-\Delta Ct(\text{échantillon})}}{2^{-\Delta Ct(\text{calibrateur})}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Figure 40 : Méthode de quantification relative. Méthode par le calcul du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Cette méthode permet une quantification relative du nombre de copies d'ARNm (Tse and Capeau, 2003). Le calcul se base sur le principe que l'efficacité de la réaction de PCR est de 100%.

ACKR3 (CXCR7)	Qiagen QuantiTect primer Cat no QT00069650
CXCR4	Qiagen QuantiTect primer Cat no QT00223188
CXCL12	Qiagen QuantiTect primer Cat no QT00087591
HMBS (PBGD)	Qiagen QuantiTect primer Cat no QT00014462
AURKA	Qiagen QuantiTect primer Cat no QT00038213
DNMT3B	Qiagen QuantiTect primer Cat no QT00032067
HDAC9	Sens TCCCCCTTCGAAAAAACTGA
	Anti sens GGCCCATTTGTTTGGTGAA

Tableau 8 : Références et séquences des amorces utilisées en PCR quantitative

dans un volume réactionnel final de 20 µl selon le programme : 10 min à 25°C, 60 min à 42°C et 5 min à 85°C avec le système MyCycler™ Thermalcycler (Biorad).

1.2.3.1. PCR quantitative relative

La PCR est réalisée sur 2 µL d'ADNc (dilution au 1/5 avec H₂O ultrapure) dans un volume réactionnel de 20 µL contenant le master mix QuantiTect SYBR Green PCR 2X (Qiagen) et les amorces spécifiques des gènes cibles (CXCR4, CXCR7, AURKA, DNMT3B, HDAC9) (Qiagen- **Tableau 8**) et du gène de référence porphobilinogène déaminase (PBGD ou HMBS, Qiagen **Tableau 8**). La PCR est réalisée selon le schéma suivant: activation de la DNA Taq Polymérase Hot start (contenue dans le mix SYBR Green) à 95°C pendant 15 minutes. Puis 40 cycles avec une dénaturation de 15 secondes à 95°C, l'hybridation pendant 30 secondes à 55°C et l'élongation pendant 30 secondes à 72°C. A la fin de chaque cycle, la fluorescence émise est quantifiée. Le signal est proportionnel à la quantité d'ADNc présente dans la réaction et correspond à la quantité de SYBR Green fixé sur le petit sillon de l'ADN néoformé lors de l'élongation. Pendant la phase exponentielle de l'amplification, la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN initiale. L'expression du gène de référence PBGD, dont l'expression n'est pas impactée quelles que soient les conditions expérimentales, est mesurée afin de normaliser les résultats par rapport à la quantité d'ADN initialement utilisée.

La valeur du cycle seuil Ct (Threshold cycle) est définie par le cycle auquel la fluorescence augmente significativement au-dessus du bruit de fond et est le résultat d'une amplification spécifique. À la fin d'une PCR, une courbe de fusion est réalisée pour s'assurer de l'existence d'un seul produit de PCR formé (pic unique). La valeur de Ct dépend de la quantité initiale de la matrice ADN (ou ADNc) ; ainsi pour 2 quantités initiales différentes on obtiendra 2 Ct différents et la différence des Ct (ΔCt) sera proportionnelle au logarithme du rapport de ces quantités initiales (Tse and Capeau, 2003, **Figure 40**). Les valeurs de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pour lesquelles l'expression de l'ARNm cible est « normale » sont comprises dans l'intervalle [0,5 - 1,7]. Ces calculs sont réalisés avec le logiciel Excel de Microsoft (**Figure 40**).

1.2.3.2. PCR Arrays

Le kit « RT2 profiler PCR array « Human Epigenetic Chromatin Modification Enzyme » (Qiagen) a été utilisé pour évaluer l'expression de 84 gènes impliqués dans des modifications épigénétiques. Le principe de la PCR array est celui d'une PCR quantitative sur plaque de 96

puits. Chaque puits contenant des amorces spécifiques d'un gène donné, auxquelles sont rajoutés du RT² SYBR Green qPCR Mastermix et l'ADNc. L'expression de 5 gènes de ménage est également mesurée et des contrôles permettent de détecter d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique, un contrôle de transcription reverse et un contrôle interne de PCR. L'expression de chaque gène est évaluée pour chaque tumeur et comparée à celle obtenue pour le tissu sain. Les résultats sont analysés par le logiciel en ligne fourni par Qiagen.

1.2.4. Expression protéique dans les tumeurs par IHC

L'expression de la protéine CXCL12, dans les coupes histologiques des tumeurs, a été évaluée par immunohistochimie (IHC) sur des coupes paraffinées de 6µm. Les lames sont conservées à -20°C avant leur utilisation. Après déparaffinage, réhydratation et démasquage des sites antigéniques dans un bain de citrate 10mM (2 × 5 minutes) à 750W au micro-ondes. Les lames sont ensuite rincées (3x 5 minutes) avec du PBS 1x - TRITON 0,1% puis bloquées avec du sérum de chèvre 5% pendant 30min, avant d'être incubées avec l'anticorps primaire dans du PBS 1X – TRITON 0,1% pendant la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 5 minutes avec du PBS 1x-TRITON 0,1%, les coupes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante, avec l'anticorps secondaire biotinylé (anti-lapin ou anti-souris, 200x). Puis 3 lavages de 5 minutes dans du PBS 1X – TRITON 0,1%, avant d'incuber les lames avec le complexe Avidine-Biotine-Peroxydase (kit ABC Vectastain Elite ABC peroxydase standard, Clinisciences, France) 1 heure à température ambiante. L'activité peroxydase est révélée en présence de diaminobenzidine (DAB) (0,3 mg/ml) et H2O2 (0,03%) pendant 5 à 10 minutes à l'obscurité puis les lames sont déshydratées et montées avec l'Eukitt. L'observation des lames se fait au microscope optique. Des contrôles ont été réalisés en absence d'anticorps primaire afin de vérifier la spécificité de la réaction.

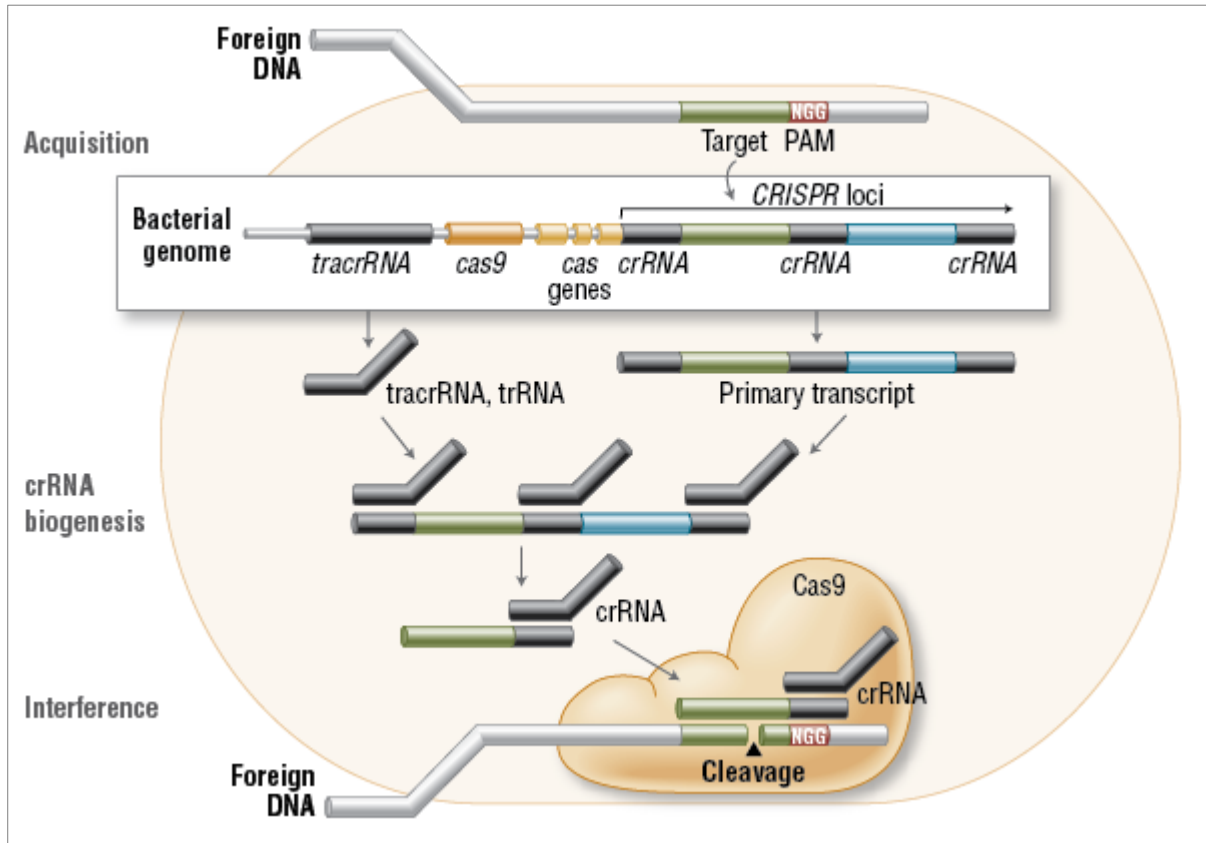
CXCL12: Ac @ SDF1 Mouse n°MAB350 Clone 79018 IgG1 R&D System dilution 1/100

2. Etude *in vitro*

2.1. Lignées cellulaires

2.1.1. Lignées coliques

Les cellules des lignées d'adénocarcinomes coliques humains SW840, SW620, HT29 et proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elles sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et avec 100 U/mL et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Dominique Dutcher, France).



Cas = CRISPR-associated genes

Cas9, Csn1 = a CRISPR-associated protein containing two nuclease domains, that is programmed by small RNAs to cleave DNA

crRNA = CRISPR RNA

dCAS9 = nuclease-deficient Cas9

DSB = Double-Stranded Break

gRNA = guide RNA

HDR = Homology-Directed Repair

HNH = an endonuclease domain named for characteristic histidine and asparagine residues

Indel = insertion and/or deletion

NHEJ = Non-Homologous End Joining

PAM = Protospacer-Adjacent Motif

RuvC = an endonuclease domain named for an *E. coli* protein involved in DNA repair

sgRNA = single guide RNA

tracrRNA, *trRNA* = trans-activating crRNA

TALEN = Transcription-Activator Like Effector Nuclease

ZFN = Zinc-Finger Nuclease

Figure 41 : La Cas9 in vivo: Immunité adaptative bactérienne. En phase d'acquisition, l'ADN étranger est incorporé au génome bactérien au niveau des loci CRISPR. Les loci CRISPR sont ensuite transcrits et transformés en ARNt lors de la biogenèse des ARNt. Au cours de l'interférence, l'endonucléase Cas9 complexée avec un ARNr et un *tracrRNA* séparé clive un ADN étranger contenant une séquence complémentaire d'ARNr de 20 nucléotides adjacente à la séquence PAM (NGG). D'après *New England Biolabs*.

2.1.2. Autres lignées

Les cellules de la lignée HEK293 (Human Embryonic Kidney cells), et de la lignée HE293T (elles expriment de manière stable le grand antigène T du virus simien 40 (SV40), important pour la réplication de plasmides contenant une origine de réplication du SV40) sont cultivées dans le même milieu que les cellules coliques. Les cellules HEK293 sont utilisées comme contrôle positif pour l'expression de CXCL12 alors que les cellules HEK293T n'expriment pas CXCL12 (lignée contrôle négatif, autre qu'une lignée cellulaire colique).

Toutes les cellules sont incubées dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂.

2.2. Invalidation des récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7

2.2.1. Principe de la technique CRISPR-Cas9

Les expériences de cette partie de l'étude a été est réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Bernardo REINA à Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC,Strasbourg).

Le principe de cette technique repose sur un mécanisme de réponse immunitaire adaptative existant chez les bactéries lors de leur défense contre les bactériophages (**Figure 41**). Ce mécanisme a été adapté pour la modification des génomes eucaryotes.

CRISPR pour « Clustered regularly interspaced short palindromic repeat » est un outil utilisé afin d'introduire des modifications dans le génome de manière très précise, des insertions, des délétions ou des mutations ponctuelles. Une coupure double brin de l'ADN est induite par la nucléase Cas9 (dérivée de *streptococcus pyrogenes*). Ce qui active les systèmes de réparation de l'ADN, tels que les systèmes NHEJ (Non Homologous End-Joining) efficace mais sujette aux erreurs, ou la recombinaison homologue (HDR, Homology Directed Repair) moins efficace mais de haute-fidélité (**Figure 42**).

L'enzyme Cas9 est dirigée précisément vers le site voulu grâce à un ARN guide (ARNg) qui possède à son extrémité 3', une séquence tracrRNA (transactivating CRISPR RNA) de 42 nucléotides spécifiques de la Cas9. Cette séquence assure l'interaction entre l'ARN guide et la Cas9. L'ARN guide possède également, à son extrémité 5', une séquence de 20 nucléotides complémentaire à la séquence cible de façon à ce que la coupure double brin assurée par la Cas9 se fasse entre la 17^{ème} et la 18^{ème} base de la séquence génomique. En pratique, pour qu'une coupure double brin soit introduite dans l'ADN génomique, il est nécessaire de faire exprimer dans la cellule, la cas9 et un ARN guide ciblant spécifiquement la séquence

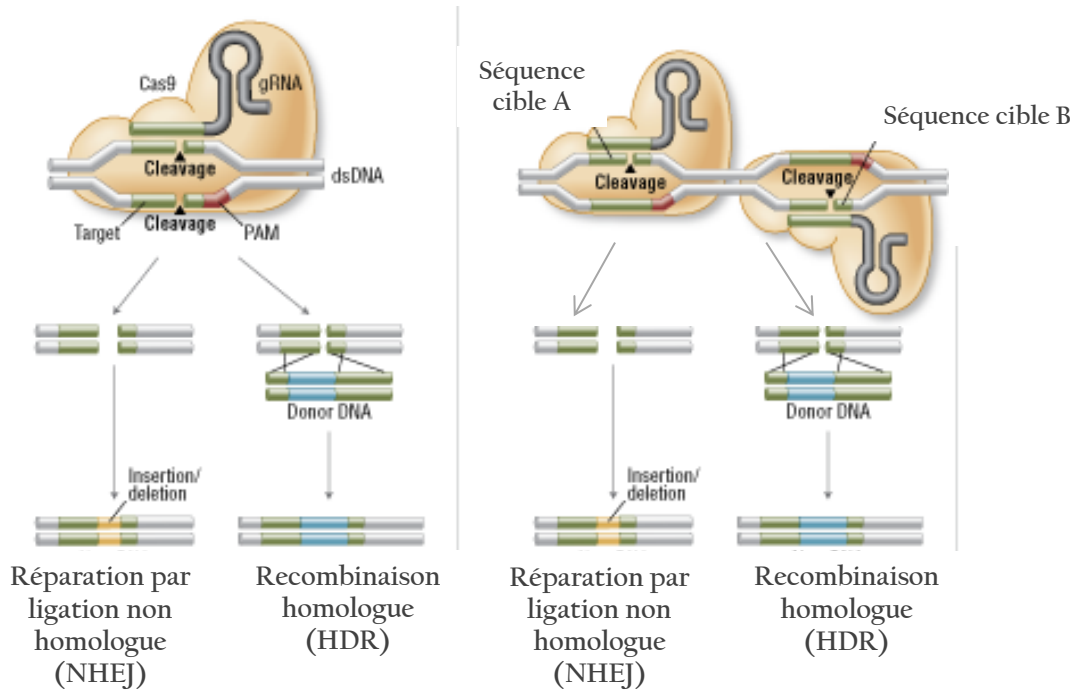


Figure 42: Différents mécanismes d'action du système CRISPR/Cas9 pour insérer ou déléter une séquence d'ADN à une localisation spécifique. Il est possible de couper, en utilisant soit un soit deux ARN guide (ARNg), les deux brins d'ADN à deux endroits différents sur un même locus chromosomique. Ceci permet d'enlever une séquence de quelques nucléotides ou de centaines de milliers de nucléotides. *D'après New England Biolabs.*

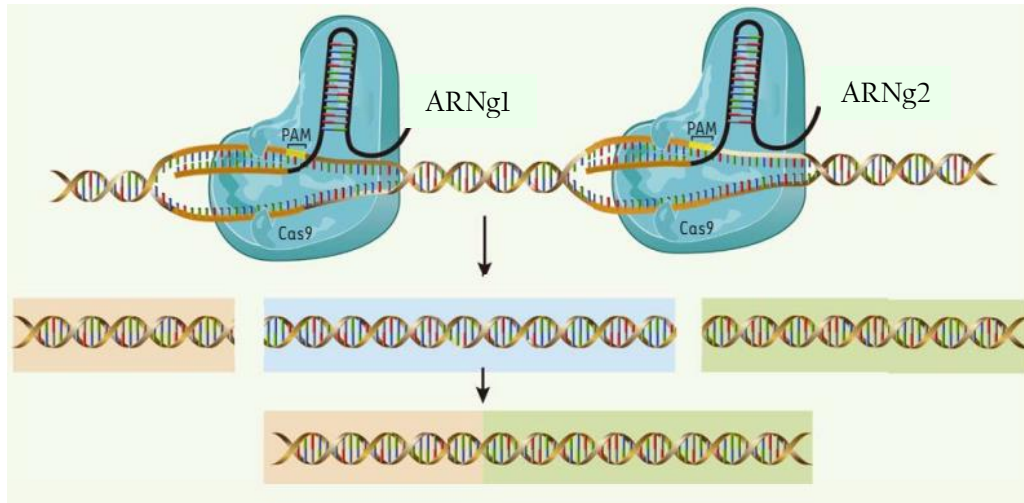


Figure 43 : Utilisation du système CRISPR/Cas pour éliminer une séquence d'ADN. Il est possible de couper, en utilisant deux ARN guide (ARNg), les deux brins d'ADN à deux endroits dans un même chromosome. Ceci permet d'enlever une séquence de quelques nucléotides ou même de centaines de milliers de nucléotides. D'après Tremblay, 2015.

gRNAs	Sequence ADN (5'-3')
hCXCR4-1 Fw	AAAgagacAAaccgGTTAATGCTTGCTGAATgtttAAgtcttcTTT
hCXCR4-1 Rev	AAAgagacTTaacATTCAGCAAGCATTAAACcggfTTgtcttcTTT
hCXCR4-2 Fw	AAAgagacAAaccgTTTTACATCTGTGTTAGCgtttAAgtcttcTTT
hCXCR4-2 Rev	AAAgagacTTaacGCTAACACAGATGTAAAAcggfTTgtcttcTTT
hCXCR7-1 Fw	AAAgagacAAaccgTGCAGATCCATCGTTCTGgtttAAgtcttcTTT
hCXCR7-1 Rev	AAAgagacTTaacCAGAACGATGGATCTGCcggfTTgtcttcTTT
hCXCR7-2 Fw	AAAgagacAAaccgCACCAAATGATCTGCCcgttAAgtcttcTTT
hCXCR7-2 Rev	AAAgagacTTaacGGGCAGATCATTGGTGcggfTTgtcttcTTT

Tableau 9 : Séquences des oligonucléotides des ARN guides ciblant l'exon 2 des gènes CXCR4 et CXCR7 et utilisés pour la technologie Crispr-Cas9. Fw : amorce antisens, Rev : amorce sens.

d'intérêt (**Figure 43**). Cette séquence doit être suivie par une séquence appelée PAM (protospacer adjacent motif) de trois nucléotides NGG. Cette dernière varie selon l'espèce de laquelle la Cas9 a été dérivée.

2.2.2. Design des ARNg

Afin d'invalider CXCR4 et/ou CXCR7 dans les cellules SW480, des ARNs guides spécifiques ont été choisis (brin sens et antisens pour chaque ARNg). Nous avons choisi d'utiliser deux ARNg différents qui sont nécessaires pour supprimer la séquence génomique correspondant à chaque gène. Afin de limiter les effets hors cible (Off targets) des ARN guides, leurs séquences ont été modifiées. En effet, leur séquence ne comprend que 17 ou 18 nucléotides complémentaires à la séquence cible. Selon une étude de Fu et collaborateurs, un ARN guide de 17 ou 18 nucléotides a la même efficacité que celui contenant 20 nucléotides mais génère moins d'effets hors cible (Off targets) (Fu et al., 2014), selon le modèle suivant :

5' **AAAgagacAAaccg**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN**gtttAAgtcttcTTT** 3'

Les séquences au niveau des extrémités 5' et 3' (en bleu et rouge) de l'ARN guide (séquence en noir), sont des séquences contenant des sites capables d'être reconnus et coupés par l'enzyme de restriction BpI, ce qui permettra le clonage de l'ARNg au niveau d'un vecteur contenant le même site de restriction BpI.

Les amorces sens et antisens sont mélangées (Fisher Scientific, 200µM ; 0.625µl de chaque amorce) dans un tampon 10xN2 Buffer (5µl, New England Biolabs, France) et 43.75µl d'H₂O. Cette suspension est incubée à 95°C pendant 5 minutes puis dans un gradient de température de 95°C à 20°C (1°C par minute). Ces séquences présentent également au niveau des extrémités, des séquences cibles de l'enzyme de restriction BpI pour faciliter l'insertion de cette séquence dans un plasmide donneur.

Pour ce qui concerne CXCR4 et CXCR7, les coupures ciblées par les 2 ARNg se retrouvent en amont et en aval de la séquence transcrite (**Figure 44**, voir page suivante). Pour CXCR7, le premier ARNg cible la séquence contenant le codant d'initiation de la transcription au niveau de l'exon 2 également (**Figure 45**-voir page suivante). Les séquences des ARN guides ciblant l'exon 2 des gènes CXCR4 et CXCR7 est indiquée dans le **Tableau 9**.

2.2.3. Clonage des ARNg

Les séquences d'ADN doubles brin (amorces hybridées) qui codent pour les ARNs guides sont insérées dans des plasmides donneurs dérivés du pUC57 (**Figure 46-A**) au niveau du site

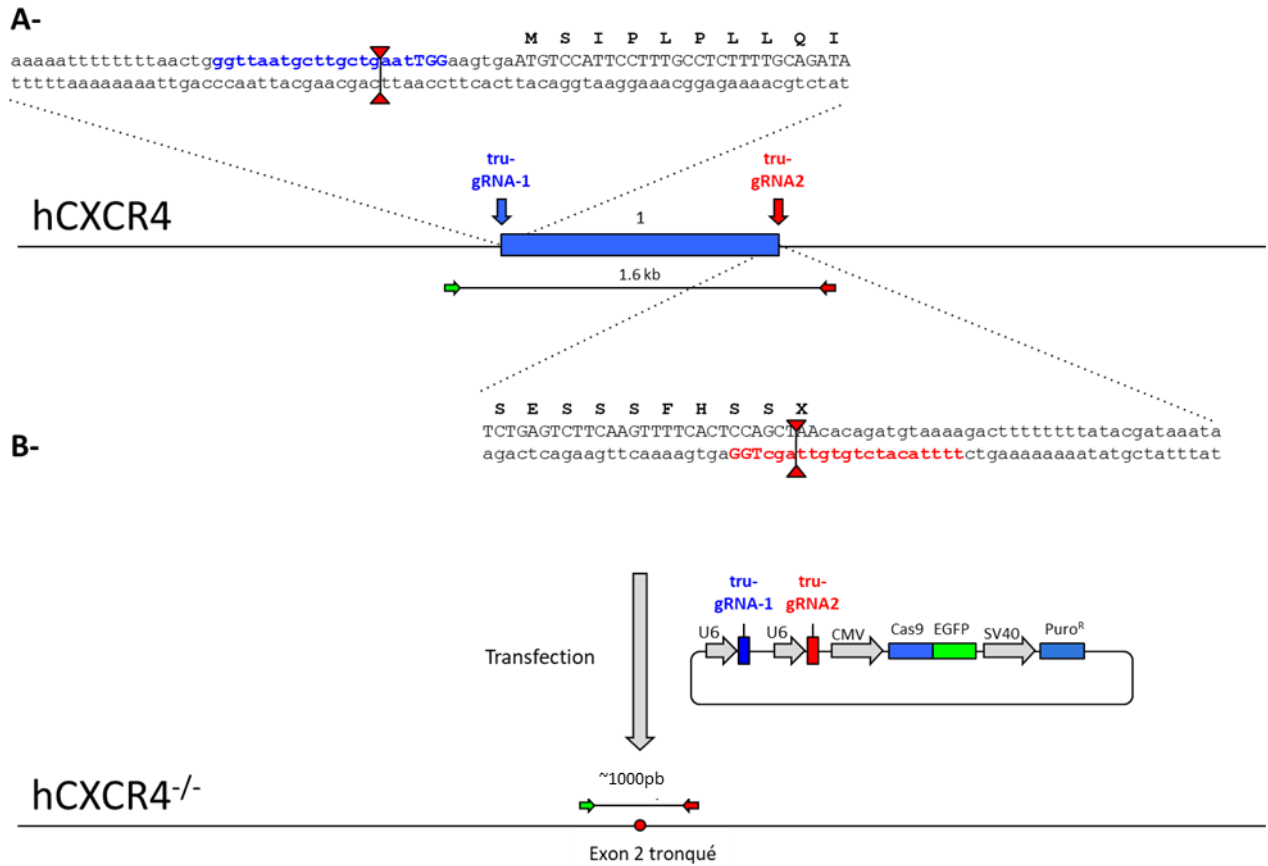


Figure 44 : A) Séquences en bases et localisation des ARNguides ciblant l'exon 2 du gène CXCR4. La séquence des acides aminés de la protéine est indiquée au-dessus des bases pour le début et la fin de la protéine. ATG, codon d'initiation. * : début et fin de la protéine. En italique et soulignée, séquence PAM selon le motif NGG, localisée immédiatement après la séquence d'ADN ciblée (de 5' en 3').

♦ site de coupure 3 nucléotides avant la séquence PAM.

B) Construction du plasmide pour exprimer les ARNguides (tru-gARN1 et 2), la Cas9 sous le contrôle du promoteur CMV, et conférer aux cellules la résistance à la puromycine.

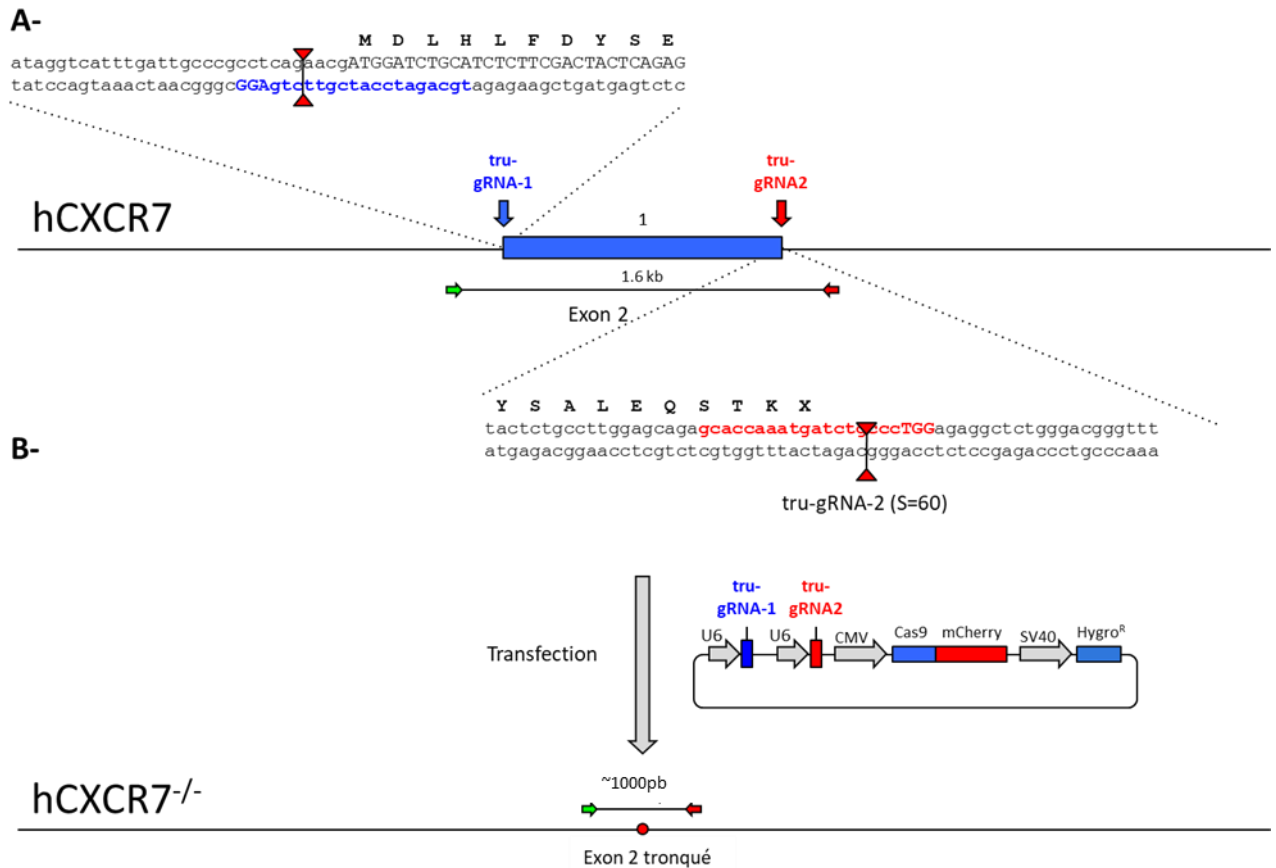
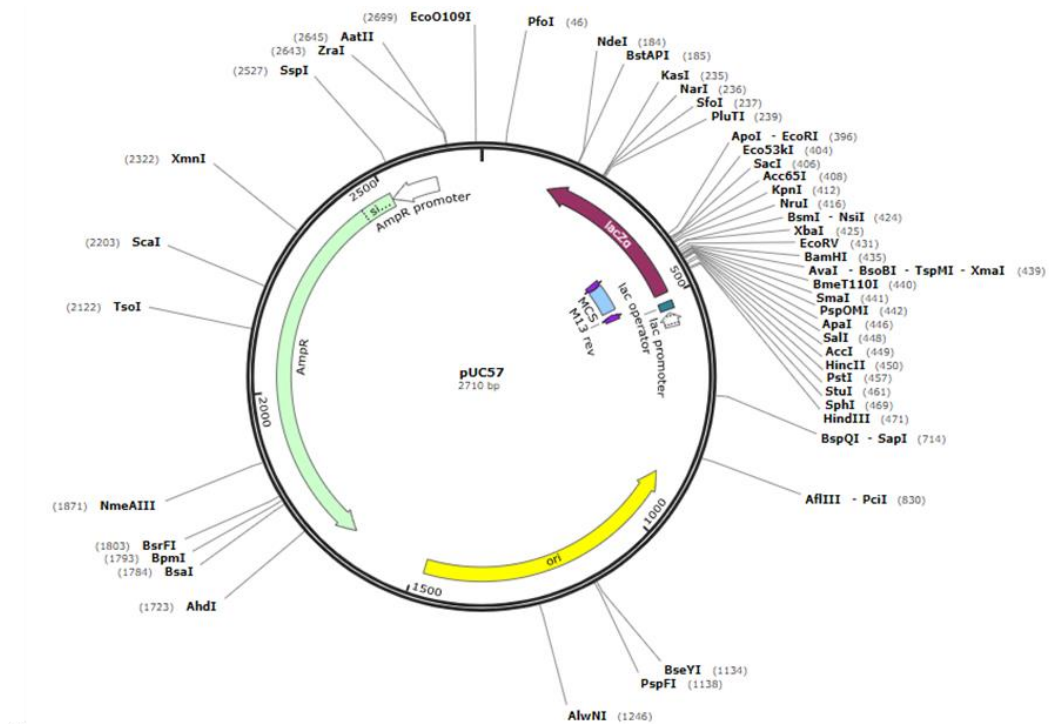


Figure 45 : A) Séquence nucléotidique et localisation des ARNguides ciblant l'exon 2 du gène CXCR7. La séquence des acides aminés de la protéine est indiquée au-dessus des bases pour le début et la fin de la protéine. ATG, codon d'initiation. * : début et fin de la protéine. En italique et soulignée, séquence PAM selon le motif NGG, localisée immédiatement après la séquence d'ADN ciblée (de 5' en 3').

▲ site de coupure 3 nucléotides avant la séquence PAM.

B) Construction du plasmide pour exprimer les ARNguides (tru-gARN1 et 2), la Cas9 sous le contrôle du promoteur du CMV, et conférer aux cellules la résistance à l'hygromycine sous le contrôle du promoteur du SV40.

A-



B-

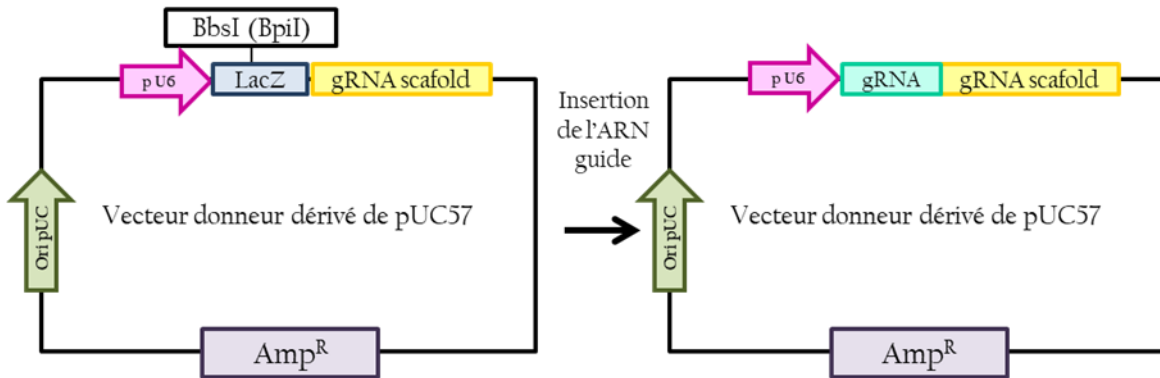


Figure 46 : A) Vecteur de clonage pUC57 et B) Construction pour le clonage des ARN guide dans le vecteur donneur dérivé du pUC57.

de restriction Bpil. Pour cette insertion un mix est réalisé à l'aide de : 2µl de 10x Fast Digest Buffer (Thermo Scientific, France), 2µl d'ATP à 10mM (Thermo Scientific, France), 1µl de pUC57 à 20 ng/µl, 2,5µl d'ARNg hybridé à 5µM, 1 µl de Bpil FD (1u/µl) (New England Biolabs, France), 1µl de T4 DNA ligase (400u/µl) (New England Biolabs, France) et 10.5µl d'eau (**Figure 46-B**). Les réactions de digestion et de ligation se font selon le programme suivant :

3 cycles de : 37°C pendant 10 minute puis 20°C pendant 10 minutes

1 cycle de 10°C pendant 50 minutes

1 cycle de 50°C pendant 20 minutes

1 cycle de 80°C pendant 20 minutes

Refroidissement à 12°C

2.2.4. Transformation bactérienne

Des bactéries Topten ont été transformées par le produit de de la réaction de clonage, puisensemencées dans des boîtes de culture contenant du LB (Lysogeny Broth) Agar et de l'ampicilline à 10µg/ml. Ce milieu a été supplémenté avec 80µl de X-Gal à 40mg/ml. Le X-Gal est le substrat de la β-galactosidase exprimé par le plasmide pUC57. Menant à la formation de colonies bactériennes de couleur bleue. Le vecteur ayant inséré l'ARNg perd l'action de la β-galactosidase et par conséquent, les colonies transformées sont blanches.

Pour réaliser la transformation, 20µl de bactéries sont ajoutés à 10µl de la réaction de clonage et 70 µl de CaCl₂ à 0,1M. Ce mix est incubé pendant 10 minutes sur glace puis 30 secondes à 42°C puis 5 minutes sur glace. 900µl de milieu LB liquide ont été ajoutés avant d'incuber la réaction à 37°C sous agitation pendant 1 heure. Après centrifugation, ensemenecer 100µl du culot sur les boîtes de culture contenant du X-Gal citées précédemment. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant la nuit. Les colonies blanches sont utilisées afin de purifier les plasmides ayant intégré la modification voulue. Des minipreps ont été réalisées pour chaque colonie formée afin de purifier les plasmides à l'aide du kit Plasmid DNA purification, Nucleospin (MACHEREY-NAGEL, France).

2.2.5. Validation du clonage des ARNg

Une PCR a été réalisée en utilisant des amorces sens et antisens ciblant le promoteur M13 afin de vérifier la longueur de la séquence amplifiée.

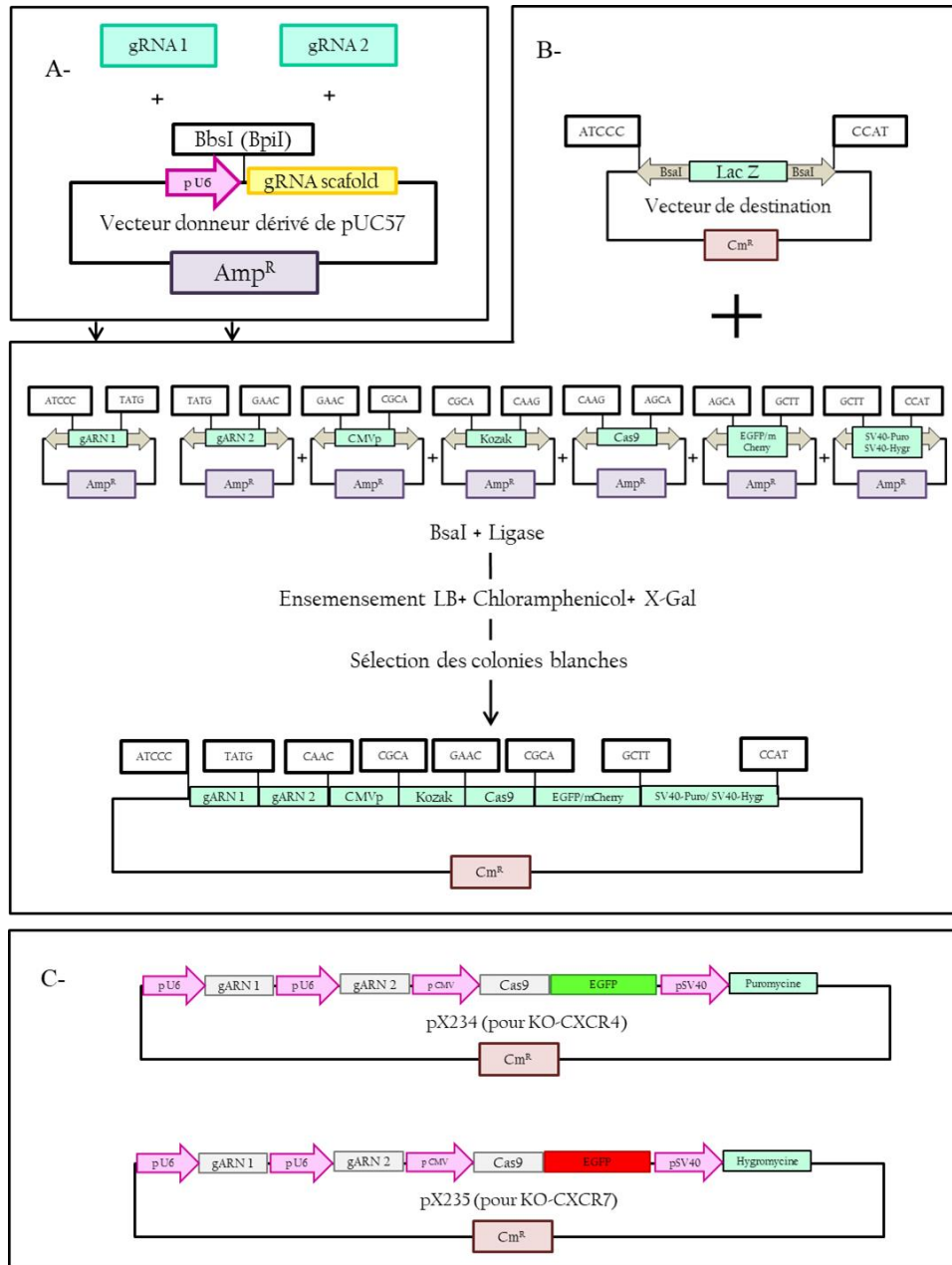


Figure 47: Etapes de construction des vecteurs pX234 et pX235. A) Clonage des ARN guides dans le vecteur donneur dérivé du pUC57 au niveau du site de restriction BbsI. B) Assemblage des différents modules pour la construction du plasmide final. C) Eléments composant les plasmides pX234 et pX235.

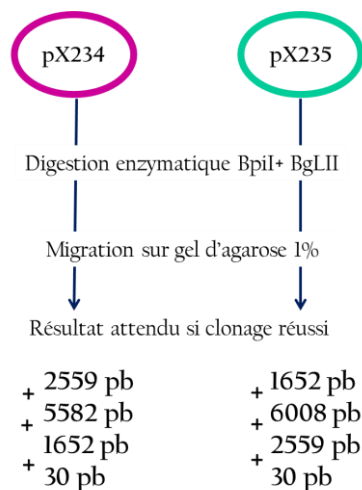


Figure 48 : Tailles des fragments attendus lors de la digestion enzymatique des plasmides pX234 et pX235

Ensuite, le produit des minipreps est également digéré avec BsaI et le produit est migré sur gel. Enfin, un séquençage de Sanger (GATC Biotech, Allemagne) a été réalisé ont utilisant les amorces M13 pour s'assurer de la bonne intégration de la séquence d'intérêt au niveau du vecteur.

2.2.6. Construction du vecteur final exprimant l'ARN guide et la Cas9

Afin d'obtenir le vecteur final nécessaire à la transfection des cellules eucaryotes, un assemblage de plusieurs vecteurs contenant toutes les séquences nécessaires a été réalisé (**Figures 47**).

Le vecteur obtenu possède un gène de résistance au Chloramphénicol (Cm^R). Après transformation bactérienne (même protocole cité précédemment), les bactéries ont étéensemencées dans des boites de milieu LB agar Cm^R. La sélection bleu/blanc est également valable pour ce vecteur. Les colonies blanches sont sélectionnées, et les plasmides sont purifiés en réalisant des minipreps.

2.2.7. Validation des vecteurs assemblés

Les plasmides obtenus (pX234 pour CXCR4-KO et pX235 pour CXCR7-KO) sont digérés (0.5µl de chaque plasmide) en utilisant deux enzymes de restriction BpiI et BgiII (1µl de chaque enzyme), 1,5µl de tampon Fast Digest (10x Green Buffer, Thermo Scientific, France) dans un volume total de 15µl. Une migration sur gel d'agarose 1% du produit de digestion a été réalisée pour vérifier la longueur des séquences obtenues après digestion (**Figure 48**).

2.2.8. Transfection cellulaire

Les cellules SW480 exprimant la luciférase sont transfectées avec les plasmides pX235 et/ou pX234. Pour les transfection simples 2,5 µg d'ADN sont utilisés, et 1,25µg de chaque plasmide pour les double transfections. Les cellules sontensemencées à raison de 400 000 cellules/puits. Les transfections avec la lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, France) sont réalisées 24 heures après ensemencement puis les cellules transfectées sont incubées 48 heures dans un milieu DMEM à 10% de SVF. Deux plasmides contrôles positifs exprimant la Cas9 fusionnée à la Green Fluorescent Protein (GFP) ou la mCherry, et un plasmide contrôle négatif pX199 exprimant 2 ARNg et la Cas9 ont également été transfectés.

48 heures après transfection, les antibiotiques de sélection sont ajoutés au milieu de culture (la puromycine pour pX234 et l'hygromycine pour pX235) afin de sélectionner les cellules contenant le plasmide transfecté.

Amorces de criblage	Séquence (5'-3')
CXCR4-Fwd1	TAGTGGGCGGGGCAGAGGAGTTAGC
CXCR4-Fwd2	CCTCAGCGTCTCAGTGCCCTTTTG
CXCR4-Fwd3	GTTGGCTGCCTTACTACATTGG
CXCR4-Fwd4	ATCAGCATCGACTCCTTCATCC
CXCR4-Rev1	CTGTACTTGTCCGTCATGCTTC
CXCR4-Rev2	CCAGAAGGGAAGCGTGATGAC
CXCR4-Rev3	TCCTACCACGAGACATACAGCAACTAAGAAC
CXCR4-Rev4	GTTCAGTTCCTTTTCTACAGTCCTAC
CXCR4-Rev5	GCCATCTTCTACAGCAAAATCAC

Amorces de criblage	Séquence (5'-3')
CXCR7-Fwd1	GCCCCTGTACTGTGTTGATTTTC
CXCR7-Fwd2	ACACAGTTTCTGTCTTGGAGCACC
CXCR7-Fwd3	GACATCTTCTCCATCCTGCACTACATCC
CXCR7-Fwd4	GCTTCATCAATCGCAACTACAGG
CXCR7-Rev1	AGTGCGTGTGCATAGCCTGTGGTC
CXCR7-Rev2	GCAATGGCCAGGTTCAAGATGTAGCAG
CXCR7-Rev3	GAAACACAGAAAATCCTATC
CXCR7-Rev4	ATATGTCAGCACTATGCCTCCC
CXCR7-Rev5	CAAACTGAAGTCACGCTAACC

Tableau 10 : Amorces de PCR génomique pour la détection des délétions de l'exon 2 des gènes codant CXCR4 et CXCR7.

	CXCR4-Rev1	CXCR4-Rev2	CXCR4-Rev3	CXCR4-Rev4	CXCR4-Rev5
CXCR4-Fwd1	530 bp	582 bp	1604 bp	1624 bp	1753 bp
CXCR4-Fwd2	486 bp	538 bp	1560 bp	1581 bp	1709 bp
CXCR4-Fwd3			553 bp	574 bp	702 bp
CXCR4-Fwd4			530 bp	551 bp	678 bp
	CXCR7-Rev1	CXCR7-Rev2	CXCR7-Rev3	CXCR7-Rev4	CXCR7-Rev5
CXCR7-Fwd1	592 bp	617 bp	1737 bp	1868 bp	1912 bp
CXCR7-Fwd2	504 bp	529 bp	1649 bp	1780 bp	1824 bp
CXCR7-Fwd3			564 bp	695 bp	739 bp
CXCR7-Fwd4			440 bp	571 bp	615 bp

Tableau 11 : Couples d'amorces utilisés pour rechercher les délétions de l'exon 2 des gènes codant CXCR4 et CXCR7.

2.2.9. Tri cellulaire

Au jour 5, les cellules sont lavées au PBS puis trypsinées afin de bien les individualiser. Après centrifugation, les cellules sont reprises dans 200µl de PBS à 3% de BSA. Les cellules ayant été transfectées avec le même plasmide sont récoltées dans le même tube à FACS (FACS ARIA BD Bioscience). Du TO-PRO-3 Stain (Thermofisher, France) est ajouté à cette suspension afin de marquer le noyau des cellules vivantes. Les cellules vivantes sont triées selon qu'elles expriment la GFP (pour CXCR4 KO) ou la mCherry (pour CXCR7 KO) ou les deux (pour les double KO). Chaque type cellulaire trié est récolté dans un tube contenant 500µl de PBS-BSA.

2.2.10. Dilution limite et culture des clones

Les cellules issues du tri cellulaire sont remises en culture dans des plaques de 96 puits après une dilution limite permettant d'ensemencer une cellule chaque 3 puits. Elles sont incubées dans du DMEM à 10% de SVF pendant 2 à 3 semaines. Les clones formés sont trypsinés et repiqués dans une surface de plus en plus importante (plaques 48 puits, puis 24 puits, puis 6 puits) jusqu'à obtention d'un nombre de cellules suffisant qui nous permet de réaliser les tests nécessaires pour s'assurer de l'invalidation des gènes ciblés par les ARNg.

2.2.11. Validation des invalidations génomiques

2.2.11.1. PCR génomique

Un criblage des clones a été réalisé afin de sélectionner les clones présentant une délétion de l'exon 2 dans le gène codant CXCR4 et/ou CXCR7. L'ADN de chaque clone, ainsi que celui des cellules SW480 sauvages a été extrait. L'extraction de l'ADN se fait à partir des culots cellulaires, dans un tampon contenant de la protéinase K à 20mg/ml et incubés 3 heures à 55°C. Après centrifugation, le surnageant est précipité avec 500µl d'isopropanol puis centrifugé à nouveau. Le culot d'ADN est ensuite lavé avec de l'éthanol 70% puis séché et resuspendu dans un tampon Tris 10mM et incubé à 65°C pendant 30 minutes.

Puis une PCR est réalisée pour amplifier les régions génomiques comprenant la délétion prévue. La PCR est réalisée à l'aide du kit DNA Polymerase recombinant (Thermo Fisher, France, 10342-053), selon le protocole en utilisant 0.5µl (5U/µl) de TaqDNA polymerase, 50µM de chaque amorce et 50ng d'ADN génomique.

Plusieurs combinaisons d'amorces ont été testées afin de détecter les délétions homozygotes et hétérozygotes (**Tableaux 10 et 11**).

2.2.11.2. Expression des ARNm

Les clones validés par PCR génomique ont été validés pour l'expression des ARNm spécifiques de CXCR4 et CXCR7, par RT-PCR quantitative relative. Les ARN ont été extraits selon le protocole détaillé au § 1.2.1, La PCR quantitative relative a été réalisée en utilisant les amorces spécifiques de CXCR4, CXCR7 et du gène de référence PBGD.

2.2.11.3. Expression protéique

L'expression de CXCR4 et de CXCR7 a été validée au niveau protéique par immunofluorescence. Les cellules à marquer ont étéensemencées la veille à raison de 50 000 cellules/ puits (Labteck en verre 8 puits-ThermoFisher). Elles ont été fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4%, pendant 20 minutes puis lavées au PBS. Les cellules ont été, ensuite, imperméabilisées et les sites aspécifiques bloqués grâce à la solution PBS-TRITON 0,1%-5%NGS (Normal Goat Serum-Sérum de chèvre) incubée pendant 30 minutes. Les lames sont incubées, toute la nuit dans une chambre humide à 4°C, avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-TRITON 0,1% et 5% NGS.

Anticorps primaire @CXCR4 Millipore AB1847 Rabbit, dilué à 1/200^{ème} –

Anticorps primaire @CXCR7/RDC1 R&D MAB42273, Clone #1168, Mouse, dilué à 1/400^{ème}.

Après lavage au PBS-TRITON, les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, dilué à 1/1000^{ème} dans du PBS-TRITON 0,1%, pendant 1 heure à l'obscurité à température ambiante (Pour CXCR4 : *Anticorps « Goat » @ « Rabbit »-Cy3*- Pour CXCR7 : *Anticorps « Goat » @ « Mouse »-Cy3*). Par la suite, les lames sont lavées au PBS-TRITON 0,1% puis les noyaux des cellules colorées au DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dilué à 1/50000^{ème}). Les lames sont lavées au PBS, séchées puis montées sous lamelle. Les lames sont conservées à l'abri de la lumière à -20°C avant d'être observées au microscope à fluorescence Zeiss Z2.

2.2.12. Plasmides utilisés

2.2.12.1. Plasmide lentiviral exprimant la luciférase

Le plasmide pLenti CMV V5-LUC Blast (gracieusement offert par E. Campeau, Addgene Plasmid # 21474 **Figure 49**). Ce plasmide permet de réaliser un transfection stable en induisant l'intégration de la séquence d'intérêt (luciférase) au niveau du génome de la cellule transfectée. Ce plasmide contient une cassette d'expression de la luciférase (V5-LUC) sous le contrôle du promoteur eucaryote du CMV (cytomégalovirus), ainsi qu'un gène de résistance à

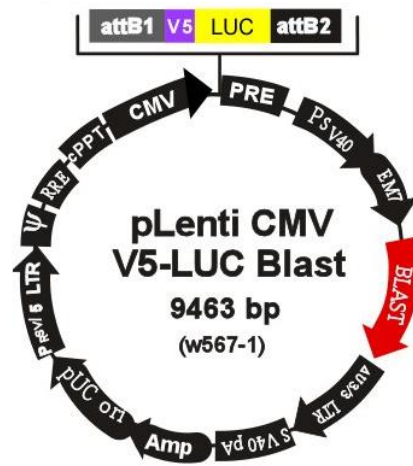


Figure 49: Plasmide exprimant la luciférase pLenti CMV.

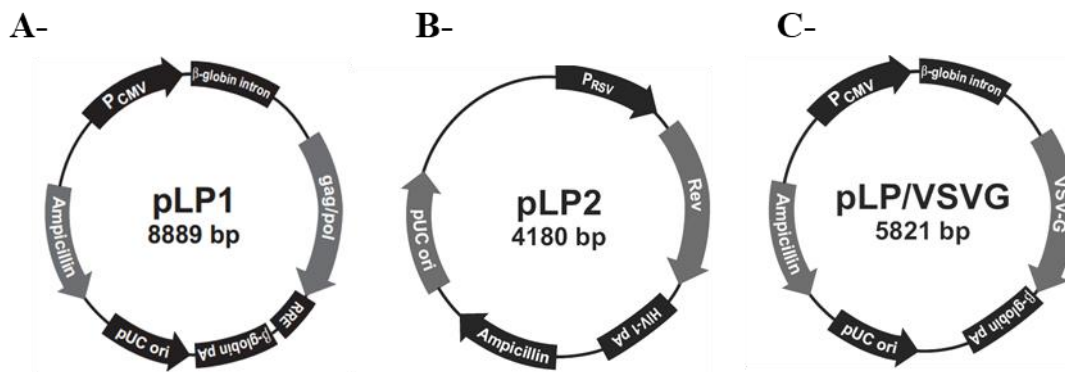


Figure 50: Plasmides de la capside lentivirale (pLP1, pLP2, pLP/VSVG).

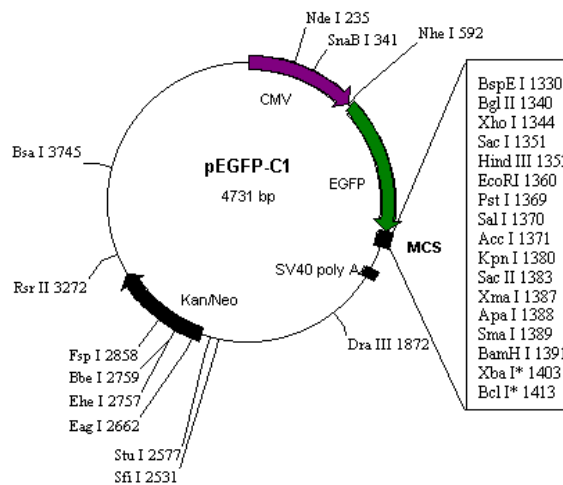


Figure 51: Plasmide pEGFP contrôle.

la blasticidine sous le contrôle du promoteur eucaryote du SV40. Il comprend également un gène de sélection procaryote, Amp^R (ampicilline résistant), une origine de répllication pUC, un promoteur hybride pRSV 5'LTR, qui contrôle l'expression de HIV-1 psi (Ψ) et HIV-1 RRE (reverse response element). Ces deux derniers éléments sont importants pour l'encapsidation du plasmide et la production de virions.

2.2.12.2. Plasmides : pLP1, pLP2, et pLP/VSVG

Les plasmides pLP1, pLP2, and pLP/VSVG (pLP pour Lentiviral packaging plasmide) assurent l'expression des éléments de la capsid virale ainsi que les éléments de répllication virale, lorsqu'ils sont exprimés avec pLentiCMV V5-LUC Blast.

Ils contiennent un gène de résistance à l'ampicilline qui permet leur amplification et leur sélection chez les bactéries. PLP1 (**Figure 50-A**) contient les séquences gag et pol du HIV-1. La première code pour la polyprotéine structurale du HIV et la deuxième pour la polymérase inverse permettant l'intégration du plasmide dans le génome cellulaire.

Le plasmide PLP2 (**Figure 50-B**) contient la séquence Rev du HIV-1 qui code pour une protéine régulatrice permettant le transport de l'ARN du noyau vers le cytoplasme. pLP/VSVG (vesicular stomatitis virus G glycoprotein) code pour une glycoprotéine VSVG, qui permet à la capsid virale de fusionner avec les phospholipides de la membrane de la cellule cible sans avoir recours à un récepteur spécifique (**Figure 50-C**)

2.2.12.3. Plasmide contrôle EGFP

Le plasmide EGFP (Addgene, #U55763) est utilisé comme plasmide contrôle dans les différentes expériences de transfection. Il exprime l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur du CMV ainsi qu'un gène de sélection Néo^R (résistance à la néomycine) sous le contrôle du promoteur du SV40 (**Figure 51**).

2.2.13. Amplification des plasmides

2.2.13.1. Préparation des bactéries compétentes

Pour le clonage, la souche d'*Escherichia coli* utilisée est XL1 Blue, de génotype recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]. Le génotype de ces bactéries garantit la qualité et le rendement des préparations plasmidiques (midipreps), la stabilité des inserts et prévient le clivage de l'ADN (Fiche technique *stratagene*).

Une colonie de XL1 Blue est mise en culture la nuit à 37°C sous agitation dans du LB à 10μg/ml de tétracycline. La pré-culture est diluée à 1/100^{ème} dans du LB+ tétracycline. Après incubation sous agitation à 37°C, la culture est récupérée lorsque la DO₆₀₀ est comprise entre

0,4 et 0,6. La suspension bactérienne est refroidie dans la glace pendant 10 minutes puis centrifugée à 4500 rpm. Le culot est repris dans du CaCl₂ (0,1M) froid. La suspension bactérienne est centrifugée puis reprise dans une solution de 0.1M de CaCl₂ et 10% de glycérol. Les bactéries sont aliquotées et conservées à -80°C avant d'être transformées.

2.2.13.2. Transformation bactérienne et purification plasmidique

50µl de bactéries compétentes sont transformées par 100ng de plasmide. Après avoir laissé le mélange 30 minutes dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique en les mettant à 42°C pendant 90 secondes, puis une minute dans la glace. Après ajout de 800µl de LB et incubation pendant 30 minutes à 37°C, les bactéries sont étalées sur une boîte de culture (LB agar et ampicilline à 10µg/ml). A partir d'une colonie, des midipreps d'ADN plasmidique sont réalisées sur 50 ml de culture bactérienne en utilisant le kit *QIAGEN* Plasmid Plus Midi Kit Qiaquick (Qiagen, France).

2.2.14. Transfection

La production des particules virales nécessite l'utilisation de la lignée HEK293T. Ces cellules ont étéensemencées 24 heures avant la transfection, à raison de 200 000 cellules par puits (plaques 6 puits) dans 2 ml de milieu de culture. Un mix de plasmides est préparé dans 100µl de NaCl 0.9% stérile, contenant 1.48µg de PLP1, 0.72µg de PLP2, 0.88µg de PLP3 et 3 µg de la construction plasmidique pLenti CMV V5-LUC Blast. Une solution de 14µl de JetPEI (Polyplus, France) dans 100µl de NaCl 0.9% est ajoutée au mix des plasmides préalablement préparé. Le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante puis déposé en goutte à goutte sur les cellules HEK293Tensemencées la veille. Ces cellules sont incubées pendant 48 heures à 37°C et 5% de CO₂.

2.2.15. Transduction des particules virales

Le surnageant de culture est récupéré, filtré (0.22µm) puis déposé sur les cellules SW480 sauvagesensemencées la veille à raison de 400 000 cellules par puits (plaque 6 puits).

Afin d'augmenter l'efficacité de transduction, du Polybrène à 1/650^{ème} (bromure d'hexadiméthrine, polymère cationique ; Sigma France) est ajouté dans le milieu. Après 48 heures d'incubation, le milieu de culture est remplacé par le milieu de sélection composé de : DMEM, 10% de SVF et 2,5µg/ml de blasticidine (Gibco, France). D'après les mises au point réalisées, la mort des cellules SW480 sauvages survient sous 10 jours à une concentration de 2,5µg/ml de blasticidine. Après amplification des cellules et plusieurs repiquages, ces dernières sontensemencées dans des plaques 96 puits pour être testées pour leur activité

luciférase en utilisant le kit Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, France). La luminescence est ensuite mesurée au luminomètre Tristar2 (BertholdTech, Allemagne).

2.3. Etude de la migration cellulaire *in vitro*

Les tests de migration sont réalisés dans des chambres de Boyden avec des pores de 8µm (Greiner Bio-One, Autriche). Les cellules sont privées de sérum pendant 4 heures puis trypsinées. 40 000 cellules (350µl) sontensemencées dans les inserts des chambres de Boyden, dans des puits contenant 1200µl de DMEM + 10% SVF.

Après 24 heures de migration, le milieu de culture est éliminé (dans les compartiments supérieur et inférieur de la chambre), les inserts sont lavés au PBS 1x, fixés au PFA 4% puis colorés au cristal violet à 0.1%. Après incubation de 10 minutes, les inserts sont lavés puis séchés la nuit. Enfin, les filtres sont découpés et montés entre lame et lamelle (colle EUKITT[®], Dutscher France) avant d'être observés au microscope (Zeiss, France). Le nombre total des cellules ayant migré du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur est comptabilisé à l'aide du logiciel ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA).

2.4. Test de prolifération cellulaire

Les cellules SW480, SW480-CXCR7KO et SW480-dKO ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 15 000 cellules/puits. Après 3 jours de culture, les cellules sont rincées au PBS, fixées à l'éthanol 70% pendant 15 minutes puis les plaques sont séchées la nuit. Les cellules sont ensuite colorées au Crystal-Violet (0.1%) pendant 20 minutes. Après plusieurs lavages à l'eau, les plaques sont séchées pendant une nuit. Le Crystal-Violet fixé aux cellules est dissout avec 100µl/ puits d'acide acétique (10%). Les plaques sont agitées pendant 10 minutes avant d'effectuer la lecture de la DO 590 au lecteur de plaques Tristar2 (BertholdTech, Allemagne).

2.5. Transfection directe de siRNA

Les cellules SW480, SW480-CXCR7KO et les cellules SW480-dKO ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 500 000 cellules /puits. Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules sont transfectées par un mix de siRNA CXCR4 ou siRNA Scramble (contrôle négatif), contenant 5nM de siRNA dilués dans 200µl de DMEM et 8µl d'Interferine (Polyplus, France). Le mix est incubé pendant 20 minutes à température ambiante avant d'être déposé en goutte à goutte sur les cellules préalablementensemencées.

Vingt-quatre heures après transfection, les ARN sont extraits et après la transcription inverse, une RT-qPCR est réalisée.

Quarante-huit heures après transfection, la migration cellulaire a été évaluée selon le protocole décrit précédemment (§ 2.3).

si RNA CXCR4 : Hs_CXCR4_8 FlexiTube siRNA SI02664242

Scramble : Silencer Negative Control #1 siRNA AM 4611, Ambicon

3. Validation d'un modèle de développement de métastases *in vivo*

Afin de développer un modèle mimant au mieux les métastases nous avons testé plusieurs combinaisons d'éléments, deux types de souris immunodéficientes (Nudes et NOD SCID Gamma, NSG), deux types cellulaires (SW480 et SW620) et deux modèles de métastases (injections intrasplénique et orthotopique).

3.1. Souris immunodéficientes

3.1.1. Nudes

Les souris athymic nu/nu de 6-8 semaines proviennent du fournisseur Janvier Labs, France. L'immunodéficiência est due à une mutation du gène FOXP1 qui perturbe le développement du thymus, et la maturation des lymphocytes T. Ces altérations surviennent sans modifier la fonctionnalité des lymphocytes B et des « Natural Killers » (NK).

3.1.2. NSGs

Les souris NSG sont les souris de laboratoire ayant un système immunitaire le moins performant. Elles proviennent de chez Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France). Elles sont déficientes pour l'expression des lymphocytes B et T matures et des NK.

3.2. Types d'injection

3.2.1. Model intrasplénique

Ce modèle permet la formation de métastases hépatiques plus facilement. Il consiste à injecter des cellules tumorales coliques en suspension, à raison de 5×10^6 cellules/100 μ l dans la rate de la souris (Nude ou NSG). Le site de l'injection est ensuite nettoyé avec du PBS, les vaisseaux sanguins liant la rate sont ligaturés avant être coupés. Enfin, une splénectomie est réalisée afin d'éviter la formation de tumeur au niveau du site de l'injection. Les cellules tumorales passent dans la circulation sanguine avant de s'implanter et former des micrométastases puis des métastases.

3.2.2. Modèle orthotopique

Contrairement au modèle précédent, ce modèle respecte mieux les étapes de formation de métastases. En effet, les cellules sont injectées dans la paroi du caecum de la souris où une

tumeur primitive se forme. A partir de cette dernière, des cellules disséminent via la circulation sanguine et forment des métastases. Les deux modèles d'injection sont évalués par la suite afin de choisir le meilleur modèle permettant le développement métastatique dans les délais les plus courts.

3.4. Suivi des cellules tumorales humaines *in vivo*

3.4.1. Détection par imagerie TEP-FDG

La tomographie par émission de positons (TEP) a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr Patrice Laquerrière à Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (Strasbourg). Le principe de cette imagerie repose sur la détection de zones métaboliquement actives dans l'organisme comme les zones inflammatoires ou les tumeurs. Les souris sont anesthésiées par kétamine/xylazine (injection intraveineuse), puis sont injectées au niveau de la veine jugulaire avec du fluorodeoxyglucose (FDG-^{F18}, à ~0,2 MBq injecté par gramme de souris). Ce dernier est un analogue radioactif du glucose, d'où son assimilation par les zones métaboliquement actives. De cette manière, les tumeurs et les métastases peuvent être localisées après une acquisition de 10 minutes.

3.4.2. Détection par chimiluminescence

Cette technique est utilisée pour le suivi des cellules tumorales exprimant le gène de la luciférase. Les souris sont anesthésiées (anesthésie gazeuse à l'isoflurane, Forane®, Abbott ; 3 % pour l'induction et de 1,0–1,5 % pour le maintien de l'anesthésie), puis injectées par 100µl de substrat de luciférase par voie intra péritonéale (Xénolight Rediject D-Luciferin Ultra (Perkin Elmer, France). Les souris sont ensuite placées dans le système d'imagerie *in vivo* NightOWL LB983 (Berthold, Allemagne). La luminescence émise par les cellules exprimant la luciférase est détectée et permet de localiser les zones présentant des tumeurs.

3.5. Histologie

3.5.1. Coloration H&E

La présence ou l'absence de cellules tumorales dans le foie et les poumons est validée par une coloration hématoxyline/éosine (H&E) des tissus hépatique et pulmonaire prélevés chez les souris après leur mise à mort. Le foie et les poumons de chaque souris sont prélevés, fixés au PFA 4% puis inclus en paraffine. Les blocs de tissus sont ensuite coupés à 6µm d'épaisseur. Les coupes sont montées sur lame en verre puis séchées à 37°C pendant 15 minutes. Elles sont ensuite déparaffinées (2 bains de 15 minutes au toluène), réhydratées (un bain d'alcool pendant 5 minutes, un bain d'alcool 95° pendant 3 minutes, un bain d'alcool 70° pendant 3

minutes puis dans l'eau), colorées à l'hématoxyline Harris (pendant 5 minutes), rincées à l'eau, différenciées à l'alcool acide, puis rincées de nouveau avant d'être colorées à l'éosine (1 bain de 10 minutes). Ces coupes sont déshydratées par la suite (2 bain d'alcool à 70° puis 2 bain d'alcool à 95° puis 2 bains d'alcool à 100°) puis montées sur lamelle après deux bains de toluène. Les lames sont séchées avant d'être observées au microscope photonique (Zeiss Axiophot, France).

3.5.2. Immunohistochimie

Le marquage de la cytokératine 19 (CK19) humaine (DB Biotech, Slovaquie) a été réalisé sur les coupes de foie et de poumons prélevées chez des souris ayant subi une injection de cellules tumorales intrasplénique ou orthotopique. Ce marquage permet de localiser les cellules épithéliales coliques humaines sur des coupes de tissus murins. Le protocole des marquages est identique à celui déjà décrit (§ 1.2.3.3).

3.6. Mise en culture de cellules dérivées de métastases hépatiques

Chez une souris ayant développé des métastases hépatiques après injection de cellules SW480 dans la paroi du caecum, le foie a été prélevé puis dissocié pour être mis en culture.

3.6.1. Dissociation et mise en culture

La dissociation des cellules tumorales issues de la métastase hépatique a été réalisée grâce au gentleMACS™ Dissociator en utilisant le kit de dissociation de tumeurs (MACS Milteny Biotec, ref 130-095-929). La métastase est prélevée puis coupée en petit morceaux de 2-4 mm. Une dissociation enzymatique est ensuite effectuée avec un cocktail d'enzymes suivant le protocole du fournisseur (5 ml de mix d'enzymes pour 1 g de tissu). Après plusieurs cycles de dissociation, la suspension obtenue est centrifugée à 300g pendant 7 minutes et le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu de culture (DMEM à 10% de SVF), puis mis en culture. Toutes les étapes sont réalisées dans des conditions stériles.

3.7. Inclusion des sphères pour l'immunofluorescence

Les cellules LM1 en sphères ont été incluses dans un milieu d'enrobage cryogénique permettant le maintien de l'ultrastructure cellulaire (Optimal Cutting Temperature compound, O.C.T.) afin de réaliser des coupes pour l'immunofluorescence. Les sphères sont mises en suspension dans 100µl de mix PBS/O.C.T. (volume/volume). Le mix est transféré dans un support spécial « Cryostat », placé sur carboglace. Lorsque la préparation commence à se

solidifier, de l'O.C.T. pur est ajouté. Lorsqu'ils sont congelés, les blocs sont conservés à -80°C.

Des coupes de 6µm sont réalisées au cryostat, puis réhydratées au PBS (10 minutes à température ambiante). Les lectines sont bloquées avec 0.2M de methyl α -D mannopyranoside (20 minutes à température ambiante). Les coupes sont ensuite fixées au PFA 4%, bloquées avec de la BSA (5%) puis incubées avec l'anticorps anti-CD133 (*Ac de souris @CD133 Milteny Biotech (AC141), dilution 1/11 dans 5% de BSA*) pendant 1h30 à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire (*Anticorps de chèvre @ souris -Cy3, dilution 1/1000^{ème} dans du PBS*) comme décrit précédemment (paragraphe 2.2.11.3).

3.8. Quantification des métastases par expression de séquences Alu

Les séquences Alu sont des séquences répétées dans l'ADN humain et représentent entre 6 et 13% du génome (Mighell et al., 1997). Leur quantification permet donc d'estimer la quantité d'ADN humain présente dans un tissu murin. Dans notre étude, l'expression de séquences Alu dans le foie et les poumons murins atteste la présence d'ADN humain et donc celle de cellules humaines et donc de métastases. Cette quantification est réalisée par PCR quantitative de l'ADN extrait des tissus (SYBR Green-Qiagen) en utilisant des amorces ciblant des séquences Alu: Sens CACCTGTAATCCCAGCACTTT, Anti-sens CCCAGGCTGGAGTGCACT (Schneider et al., 2002).

Plusieurs mises au point ont été réalisées afin de valider les amorces et s'assurer qu'elles n'amplifient que les séquences Alu (présence d'une seule courbe de fusion).

Il a fallu également déterminer la présence ou l'absence de corrélation entre la quantité d'ADN humain et le nombre de cycles d'amplification nécessaire à sa détection, ainsi que la quantité d'ADN humain minimale pouvant être détectée. Pour cela, une PCR quantitative a été réalisée sur des quantités d'ADN humain (ADN génomique de SW480-Luc+) allant de 1ng à 0,00001ng. Il était également nécessaire de savoir de l'ADN murin quelle que soit sa concentration, pouvait interférer dans la détection de l'ADN humain lors de la PCR quantitative. Pour cette raison l'expérience a été réalisée en maintenant stable la quantité d'ADN humain et en faisant varier la quantité d'ADN murin.

3.8.1. Extraction d'ADN génomique des tissus murins

Les organes (foie et poumons) sont prélevés puis congelés directement dans l'azote liquide. Pour extraire l'ADN, les organes entiers sont broyés congelés au Polytron (Kinematica Polytron PT 1300D) dans un tampon ATL (5ml, Qiagen, France). L'extraction est poursuivie

sur 900µl d'échantillon. La protéinase K est ajoutée ($1/10^{\text{ème}}$ du volume) puis incubée à 56°C sous agitation jusqu'à lyse complète du tissu. 500µl de phénol et 500µl de chloroforme sont ajoutés au lysat. Le mélange est centrifugé (800g pendant 10 minutes à 20°C) avant de récupérer la phase aqueuse à laquelle un mélange de chloroforme (500µl) et d'alcool isoamylique (21µl) est ajouté. Après une centrifugation de 10 minutes (800g, 20°C), le surnageant est récupéré. L'ADN est précipité à partir de 500µl de surnageant en ajoutant 67µl d'acétate d'ammonium (3M) et 1 ml d'éthanol 100°. Le mélange est placé à 20°C pendant une nuit puis centrifugé pendant 30 minutes (1000g, 4°C). Le culot d'ADN est lavé, séché puis remis en suspension dans de l'eau ultra pure. Pour la PCR quantitative des séquences Alu, 1ng d'ADN est utilisé.

3.8.2. PCR quantitative relative des séquences Alu

L'ADN extrait du foie et des poumons de chaque souris est analysé par qPCR. L'ADN génomique extrait des cellules SW480 est également analysé et est utilisé comme contrôle positif (ADN 100% humain). Deux contrôles négatifs correspondent à de l'eau en remplacement de l'ADN, et de l'ADN murin contrôle extrait des tissus de souris injectées avec du DMEM seul, sans cellules tumorales humaines.

Afin d'estimer la quantité d'ADN humain dans un mélange (ADN humain + murin), on inclut une gamme étalon réalisée à partir de quantités d'ADN humain allant de 1ng (quantité d'ADN maximale) à 0.00001ng. Chaque puits contient 10µl de SYBR Green, 1µl de chaque amorce (Alu) à 1µM, 6µl d'eau et 2 µl d'ADN (à 0,5 ng/µl). Le programme de qPCR est le même que celui utilisé précédemment (§1.2.3). Un nanogramme d'ADN génomique de chaque organe est analysé par PCR quantitative (SYBR Green). Le seuil de détection des séquences Alu (Ct) est déterminé pour chaque échantillon analysé. Chaque valeur de Ct est extrapolée dans la courbe étalon. Ainsi, la quantité d'ADN humain présente dans la quantité initiale d'ADN total (1ng) est déterminée.

RESULTATS

Partie I : Mécanismes à l'origine de la perte d'expression de CXCL12 (article 1)

1. Introduction

Le maintien de l'intégrité intestinale est géré par la maturation des entérocytes et leur migration directionnelle à partir de la zone proliférative à la base des cryptes, vers la surface de la muqueuse au sommet des cryptes. Il a été décrit que ce processus migratoire implique des chimiokines, notamment CXCL12 et son récepteur CXCR4 (Smith et al., 2005).

CXCL12 est une chimiokine de 7,8KDa exprimée par des tissus hématopoïétiques et non hématopoïétiques tels que l'intestin ou les vaisseaux sanguin. Cette chimiokine agit à travers ses deux récepteurs à sept segments transmembranaire CXCR4 et CXCR7 afin d'accomplir différents rôles (Shirozu et al., 1995). En effet, CXCL12 est impliquée dans la prolifération, la rétention et la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques, ainsi que dans la mobilisation des lymphocytes T matures à partir du thymus. De plus, CXCL12 est impliqué dans le développement et la différenciation des tissus embryonnaires intestinaux ainsi que dans la surveillance immunitaire de la muqueuse. De ce fait, la signalisation induite par CXCL12 joue un rôle très important dans la défense immunitaire innée (Smith et al., 2005).

Dans les cancers, CXCL12 a été décrit comme étant impliquée dans la mobilisation des cellules tumorales (bronchiques, mammaires, ovariennes et rénales) dans le cadre de la dissémination métastatique de ces cellules vers des sites exprimant CXCL12 (Müller et al., 2001).

Il a été rapporté que dans les cellules tumorales du CCR, la signalisation induite par CXCL12 est dérégulée. Ceci est dû à une perte d'expression de CXCL12 dans ces cellules tout en maintenant l'expression de CXCR4 et CXCR7. Selon l'étude de Wendt et coll. cette perte d'expression de CXCL12 est liée à la méthylation du promoteur comme ce qui a déjà été décrit dans le cas du cancer mammaire (Wendt et al., 2006). L'acquisition de ce phénotype n'exprimant pas CXCL12 confère aux cellules tumorales une résistance à l'anoïkis et une migration dans la circulation sanguine à travers un gradient de CXCL12 (Drury et al., 2010). Toutes ces données suggèrent que la perte d'expression de CXCL12 dans le CCR, pourrait avoir un rôle clés dans la formation des métastases. De ce fait, il est important d'identifier les facteurs responsables de cette perte d'expression, vu le taux de mortalité élevé chez les patients diagnostiqués au stade métastatique. La compréhension de ces mécanismes pourrait apporter des réponses à certaines questions concernant la dissémination métastatique dans le

CCR, qui reste un processus assez peu connu malgré les avancées considérables dans le domaine de la cancérologie en général.

A travers l'étude citée ci-dessous, nous avons d'abord voulu vérifier cette perte d'expression de CXCL12 dans une cohorte locale et nationale afin d'identifier, par la suite, et avec précision, les facteurs responsables de cette perte d'expression.

Publication

Romain B, Benbrika-Nehmar R*, Marisa L, Legrain M, , Lobstein V, Oravec A, Poidevin L, Bour C, Freund JN, Duluc I, Guenot D, Pencreach E. **Histone hypoacetylation contributes to CXCL12 downregulation in colon cancer: impact on tumor growth and cell migration. Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 24), pp: 38351-38366**

* participation équivalente des deux premiers auteurs

2. Publication

Histone hypoacetylation contributes to CXCL12 downregulation in colon cancer: impact on tumor growth and cell migration

Benoît Romain^{1,2}, Radhia Benbrika-Nehmar¹, Laetitia Marisa³, Michèle Legrain⁴, Viviane Lobstein¹, Attila Oravecz⁵, Laetitia Poidevin⁵, Cyril Bour¹, Jean-Noël Freund⁶, Isabelle Duluc⁶, Dominique Guenot¹, Erwan Pencreach^{1,4,7}

¹Université de Strasbourg, Progression Tumorale et Microenvironnement, Approches Translationnelles et Epidémiologie, Strasbourg, France

²Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Strasbourg, France

³Cartes d'Identité des Tumeurs Program, Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France

⁴Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Strasbourg, France

⁵Université de Strasbourg, CNRS, Department of Computer Science, ICube, Strasbourg, France

⁶Université de Strasbourg, INSERM Unit 1113, Strasbourg, France

⁷Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Centre de Ressources Biologiques, Département de Pathologie, Strasbourg, France

Correspondence to: Dominique Guenot, **email:** dominique.guenot@inserm.u-strasbg.fr

Keywords: chemokine, valproate, butyrate, PCAF, acetylation

Received: March 17, 2016

Accepted: February 27, 2017

Published: March 17, 2017

Copyright: Benoît Romain et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

CXCL12 has been shown to be involved in colon cancer metastasis, but its expression level and molecular mechanisms regulating its expression remain controversial. We thus evaluated CXCL12 expression in a large cohort of colon adenomas and carcinomas, investigated for an epigenetic mechanism controlling its expression and evaluated the impact of CXCL12 levels on cell migration and tumor growth. CXCL12 expression was measured in human colon adenomas and carcinomas with transcriptome array and RT-qPCR. The promoter methylation was analyzed with whole-genome DNA methylation chips and protein expression by immunohistochemistry. We confirm a reduced expression of CXCL12 in 75% of MSS carcinomas and show that the decrease is an early event as already present in adenomas. The methylome analysis shows that the CXCL12 promoter is methylated in only 30% of microsatellite-stable tumors. *In vitro*, treatments with HDAC inhibitors, butyrate and valproate restored CXCL12 expression in three colon cell lines, increased acetylation of histone H3 within the CXCL12 promoter and inhibited cell migration. *In vivo*, valproate diminished (65%) the number of intestinal tumors in APC mutant mice, slowed down xenograft tumor growth concomitant to restored CXCL12 expression. Finally we identified loss of PCAF expression in tumor samples and showed that forced expression of PCAF in colon cancer cell lines restored CXCL12 expression. Thus, reduced PCAF expression may participate to CXCL12 promoter hypoacetylation and its subsequent loss of expression. Our study is of potential clinical interest because agents that promote or maintain histone acetylation through HDAC inhibition and/or HAT stimulation, may help to lower colon adenoma/carcinoma incidence, especially in high-risk families, or could be included in therapeutic protocols to treat advanced colon cancer.

INTRODUCTION

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 or CXCL12) has been implicated in embryonic development, vasculogenesis, and hematopoietic stem cell engraftment,

lymphocyte trafficking and wound healing [1]. This cytokine and its cognate receptors, CXCR4 and CXCR7, are essential, as their knockout during embryogenesis or the perinatal period is lethal [2–4]. In the normal colon epithelium, CXCL12 is highly expressed at the top of

the crypt-cuff axis and regulates important physiological mechanisms, through facilitation of ion transport, epithelial cell migration, maintenance of intestinal barrier integrity and restoration [5, 6].

Chemotactic cytokines and their receptors are also involved in cancer and promote tumor initiation, progression and metastasis [7, 8]. Because the metastatic dissemination of malignant cells in target organs is a strong determinant of human mortality, much effort has been devoted to understanding how cytokines participate in this multistep process. Growing evidence of colon cancer *in vivo* indicates that a high expression level of CXCR4 receptor facilitates the non-random extravasation of tumor cells after they have left the primary tumor [9], especially in the liver, lungs or bone marrow, where CXCL12 is highly expressed. In line with this evidence, Wendt et al, recently suggested that DNA hypermethylation results in a loss of CXCL12 expression in tumor cells, which might promote the metastasis of colon and breast cancers by creating an enhanced chemotactic gradient between the CXCL12-poor microenvironment of the primary tumor and the CXCL12-rich target organs [10, 11]. However, the pattern and function of CXCL12 expression remain controversial, because other studies have reported that CXCL12 expression was increased in colon carcinomas or adenomas [12–14].

Considering the conflicting reports on CXCL12 expression in human colorectal cancers as well as the uncertainty that surrounds the mechanisms of dysregulation either DNA hypermethylation or/and histone deacetylation [10, 15], we analyzed CXCL12 in a large collection of human adenomas and carcinomas and the gene promoter methylation status from a whole-genome DNA methylation study. The level of CXCL12 expression was also evaluated in the six molecular subtypes (C1 to C6) that we previously identified from a discovery subset of 443 samples based on mRNA expression profile analyses [16]. These subtypes were associated with distinct clinic-pathological characteristics, molecular alterations, and specific enrichments of supervised gene expression signatures and deregulated signaling pathways.

Furthermore, we assessed the respective roles of DNA methylation and histone acetylation in colon cell lines and intestinal tumor-prone mice.

RESULTS

CXCL12 expression in human colon cancers based on transcriptome arrays

We analyzed a large cohort of tumor samples that was already used for molecular classification of colon carcinomas [16] as well as 2 series of adenomas. Both MSI and MSS tumors and adenomas expressed 4-fold less CXCL12 than unpaired normal tissues and this difference was significant ($p < 1e^{-16}$) (Figure 1A). Our previous work [16] identified six carcinoma subtypes of prognostic value

and we show here that CXCL12 expression is decreased in all subtypes, although to a lesser extent in the subtypes C4 and C6 ($p = 4.4e-03$ for C4 and $p = 1.1e-11$ for C6 vs. normal tissue - Figure 1A). The level of CXCL12 transcript was also significantly decreased in adenomas ($p = 2.2e^{-36}$), which indicated an early event in the pathological sequence. The unsupervised classification of CXCL12 expression values defined 2 groups of samples with the optimal model, which corresponded to a high CXCL12-expressing group ($n = 221$) that contained 100% of the non-tumor samples and a second group that expressed less CXCL12 ($n = 481$) (Figure 1B). Overall, CXCL12 expression was decreased in 94% (44/47) of the adenomas, 85% (64/75) of the MSI carcinomas and 75% (335/444) of the MSS tumors. As regards the CpG island methylation phenotype, although a slight decrease of expression level was observed for samples with CIMP-High status, no significant association was found between the level of CXCL12 expression groups and the CIMP status ($p = 0.34$).

Genomic status of CXCL12

The status of the CXCL12 gene locus at 10q11.1 was analyzed in carcinomas using CGH array data on a 4434 BAC-array with a median resolution of 0.6 Mb [16]. Allelic losses and gains were observed at the CXCL12 locus in 52/347 (15%) and 23/347 (7%) of the MSS tumors, respectively; no losses and only 5/69 gains (7%) were observed in the MSI tumors and as exemplified on Figure 4 for the methylation cohort, the level of CXCL12 expression was not significantly associated with the gene copy number ($p = 0.13$).

CXCL12 in human and murine colon cancers assessed by immunohistochemistry and RT-qPCR

CXCL12 expression was analyzed at the protein and mRNA levels in an independent cohort that included 30 colon adenomas and 46 sporadic MSS carcinomas (Table 1). In the normal intestinal mucosa, CXCL12 protein was weakly expressed at the crypt base, and this expression increased along the crypt-surface epithelial cuff axis and was maximized at the epithelium surface (Figure 2A–2B). Corroborating the transcriptomic array data from a national cohort, the CXCL12 expression was strongly decreased in a local cohort of 23/30 adenomas and in 45/46 carcinomas at both the protein (Figure 2C–2D) and mRNA levels (adenomas: mean relative ratio: 0.28; $p = 0.008$; carcinomas: mean relative ratio: 0.18; $p = 0.005$; Figure 2E–2F). The CXCL12 expression in adenomas did not significantly differ by distinct histological subtype or degree of dysplasia.

We attempted to demonstrate whether the loss of CXCL12 expression observed in human carcinomas would also be found in mouse models of intestinal tumors. As for human normal colon mucosa, the expression of

CXCL12 increased along the crypt-surface epithelial cuff axis in wild-type mice (Figure 3A). Moreover, in intestinal adenomas and adenocarcinomas that occurred in APC^{Δ14/+} (Figure 3B), APC^{Min/+} or azoxymethane-treated wild-type mice (data not shown), CXCL12 expression was strongly reduced.

These results demonstrate that the downregulation of CXCL12 expression is an early event during malignant colon epithelial cell transformation in both humans and mice.

CXCL12 promoter methylation status in human colon tumors

Aberrant gene silencing in tumor cells is often associated with gene promoter methylation, and CpG island methylation has been suggested to be a primary cause of the decay of CXCL12 expression in several cancers, including colon cancer [10]. Illumina methylome arrays of 87 colon carcinomas (40 MSS and 47 MSI

tumors) were used to investigate CXCL12 promoter methylation (Table 2). This cohort included 31 CIMP-High samples, 6 of which exhibited the MSS/CIMP-High phenotype. An unsupervised classification of the associated β -values delineated 2 groups with either a methylated or an unmethylated profile for 4 of the 9 CpG sites screened (cg 26718433, cg26267854, cg23407507, cg17267805) that all mapped near the transcription start site position (-185 to 0) of CXCL12 promoter. Across samples, (Figure 4, Table 3) 38/47 tumors (81%) of the MSI tumors and 14/38 (36%) of the MSS tumors were methylated at these sites, whereas these sites remained unmethylated in the remaining 19% of MSI and 64% of MSS tumors. Among the 87 samples, 2 CIMP+/MSS- MSI- samples were methylated at the 4 CpG sites.

Because 46 of the 87 tumors analyzed for the methylation status of the CXCL12 gene were included in the expression data set [16], we thus examined the association between methylation and expression

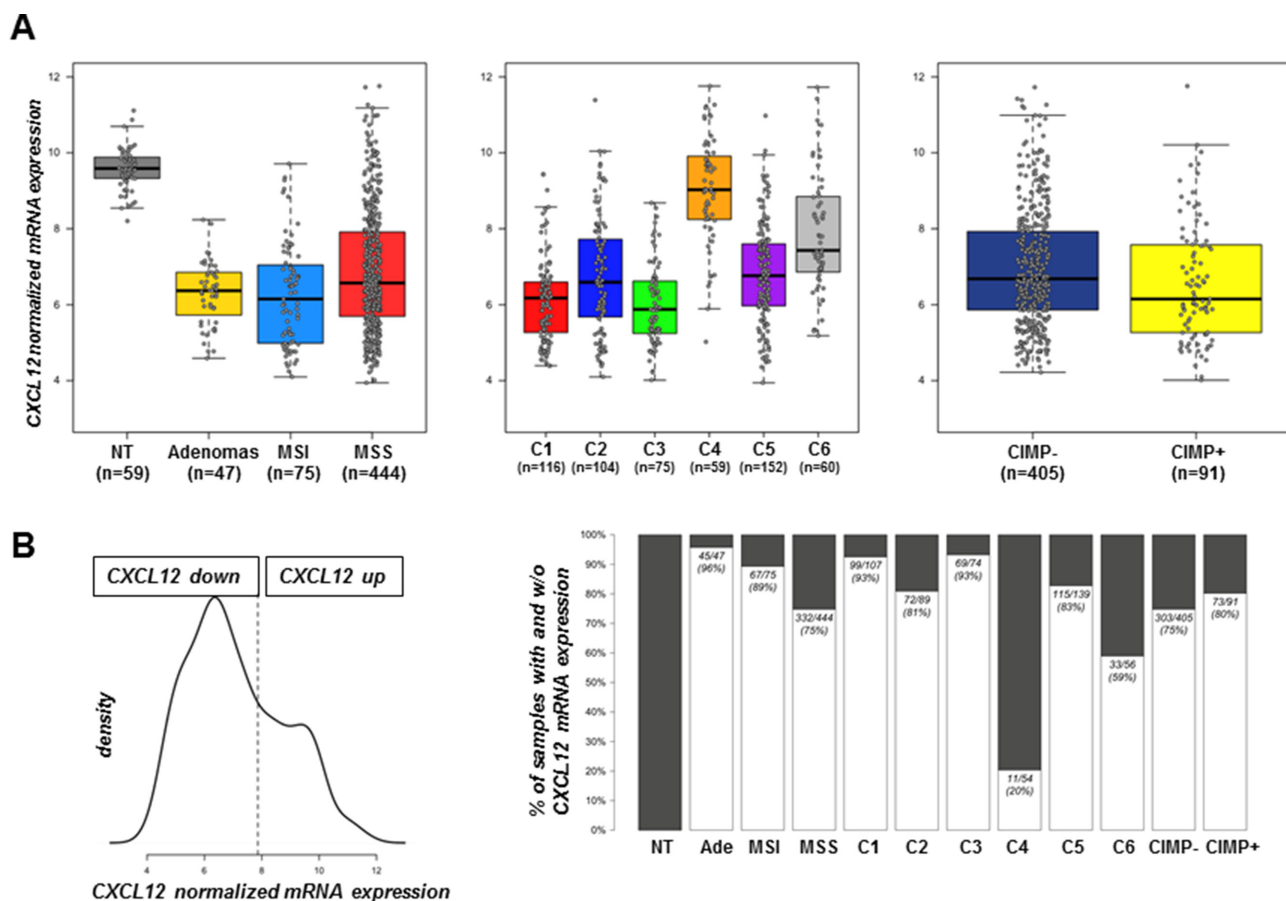


Figure 1: CXCL12 mRNA expression distribution. (A) Boxplot of intensity values according to sample types (left) (47 adenomas, 75 MSI carcinomas, 444 MSS carcinomas, and 59 non-tumor tissues), colon cancer subtype (middle) ($n = 566$ MSS and MSI carcinomas of the discovery set) and CIMP status (right) ($n = 496$). (B) Distribution and discretization of CXCL12 expression established from 702 samples, including the 566 samples (19), 30 carcinomas from the GSE4183 data set, the 59 non-tumor tissues and 47 carcinomas of undefined phenotype. (Left) Density estimation of CXCL12 expression value with mclust approach defining two distinct distributions that correspond to a cut-off value of 7.8. (Right) Proportion of the defined discretization of CXCL12 expression within sample type, colon cancer subtype and CIMP status groups. Black boxes indicate % of samples not expressing CXCL12 mRNA; white boxes indicate the % of samples expressing CXCL12 mRNA.

Table 1: Characteristics of the 30 adenomas and 46 carcinomas analyzed for CXCL12 mRNA

Adenomas		<i>n</i> = 30	Carcinomas		<i>n</i> = 46
<i>Mean age ± SD</i>		66,5 ± 10,2	<i>Mean age</i>		68,7 ± 12
<i>Men:Women</i>		19:11	<i>Men:Women</i>		33:13
<i>Localization</i>	Proximal colon	15	<i>Localization</i>	Proximal colon	21
	Distal colon	15		Distal colon Metastasis	24
<i>UICC classification</i>	Hyperplasia	0	<i>UICC classification</i>	In situ Tis	2
	Villous	1		I	8
	Tubulovillous	3		II	12
	Tubular	26		III	10
<i>Grade</i>	Low	23	IV	14	
	High	7			

Abbreviations: SD, standard deviation.

levels. Strikingly, these two variables did not correlate (correlation -0.22 , $p = 0.074$; Supplementary Figure 1). In addition, there is no correlation between the level of CXCL12 expression and the methylation status of each individual CpG island analyzed.

Together, these data establish that the decreased expression of CXCL12 is an early and frequent event in human colon tumors which does not result from allelic loss. As considering that the CXCL12 promoter region is methylated in only a minority of MSS tumors, the promoter hypermethylation does not fully explain the silencing of the CXCL12 gene.

Expression of CXCL12 in human colon cancer cells

Methylation status

As verified by MS-PCR, SW480, HCT116 and TC7 human colon cancer cells are characterized by different CpG island methylation profiles at the CXCL12 locus and at five additional genes, known to specify the methylator phenotype (Supplementary Table 1). Two of the three cell lines had a methylated promoter (HCT116 and TC7 cells). However, despite an unmethylated promoter, the SW480 cells did not express CXCL12.

Effect of histone deacetylase inhibitors

These observations suggest that the methylation of the promoter cannot by itself justify the loss of expression of CXCL12; thus we evaluated whether acetylation could participate to the loss of expression in the three colon cell lines.

Sodium butyrate (a short-chain fatty acid, SCFA) plays a major role in the modulation of gene expression via histone acetylation by inhibiting histone deacetylases (HDACs) [18]. Therefore, we tested the effects of butyrate and propionate, another SCFA, on CXCL12 expression in

the three cell lines. Interestingly, low concentrations of both molecules could induce CXCL12 expression after 24 h of exposure (Figure 5A). We then tested the effects of two pharmacological HDAC inhibitors: the pan-HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; 5 and 50 μ M) and the class I/II HDAC inhibitor valproic acid (VPA; 1 mM). Both inhibitors stimulated CXCL12 mRNA expression in the three cell lines (Figure 5B–5C).

The global acetylation of histone H3 (ACh3) was determined to investigate the status of histone acetylation after treatment with HDAC inhibitors, and the specific association of ACh3 with the CXCL12 promoter was examined using ChIP assays. As shown in Figure 6A–6B, butyrate, VPA and SAHA treatment increased the overall histone H3 acetylation in the three cell lines, butyrate and SAHA being the most potent compounds. In addition, the inhibitors increased the level of histone H3 N-terminal acetylation within the CXCL12 promoter (Figure 6C). Thus, HDAC inhibitors of different pharmacological classes restore and/or induce CXCL12 expression in human colon cancer cell lines.

Respective involvement of DNA methylation and histone acetylation in CXCL12 expression

To better define the respective roles of DNA methylation and histone acetylation on the expression of the CXCL12 gene, we quantified by RT-qPCR the ability of the different treatments (5-aza, SAHA, VPA and butyrate) to stimulate CXCL12 mRNA expression in the SW480 cell line the CXCL12 transcript was virtually undetectable in untreated cells ($Ct > 45$ cycles); our data show that prolonged and daily treatment with 5-aza had only minor effects (Relative Ratio RR = 0.0002), compared to SAHA (RR = 0.015), VPA (RR = 0.063) and butyrate, which reached a level similar to the one of normal human colon mucosa (RR = 0.13; Supplementary Figure 2). Similar results were observed for the two

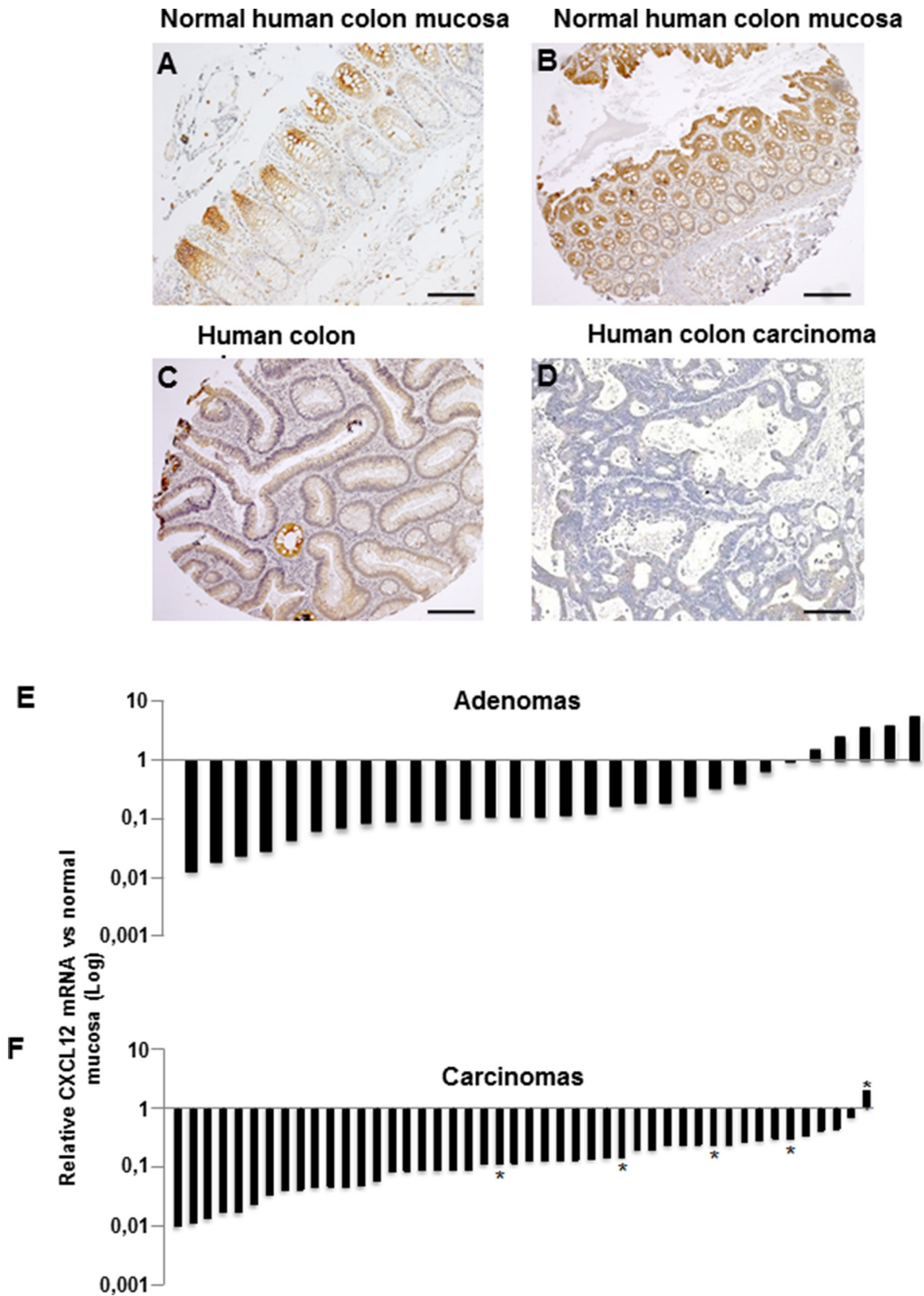


Figure 2: CXCL12 protein and mRNA expression. Immunohistochemical expression in (A–B) normal human colon mucosa, (C) an adenoma and a (D) carcinoma. (E–F) CXCL12 mRNA expression by RT-qPCR in human colon adenomas (E, $n = 30$) and carcinomas (F, $n = 46$). *Liver metastases. All quantifications were performed in duplicate in three independent experiments and normalized to the endogenous PDGF mRNA levels.

other colon cell lines (TC7 and HT29, data not shown). Combining 5-aza with any HDAC inhibitor did not further increase CXCL12 expression compared to the respective HDAC inhibitors alone (data not shown). Altogether, in our model of colon cancer cells, defect of histone acetylation would be a major epigenetic mechanism for CXCL12 downregulation, alone or in combination with promoter hypermethylation.

Involvement of PCAF loss in CXCL12 silencing

To further evaluate the histone H3 acetylation status in colon cancer, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments to compare the SW480 colon cancer cell line to HEK293, a human kidney embryo cell line that express CXCL12 at a high level. As shown in Figure 7A, we observed a significant higher proportion of acetylated H3 (ratio 20:1) in HEK293 as compared to SW480 cells.

Furthermore, since the treatment with HDAC inhibitors resulted only in partial CXCL12 re-expression and required a long-term exposure to the drugs, we hypothesized that an initial defect in histone acetylation could be, at least in part, responsible for the loss of CXCL12 expression, rather an increased deacetylation process. To confirm this hypothesis, we re-analyzed the most differentially expressed genes in our large transcriptomic data and focused on genes implicated in histone acetylation or deacetylation. Accordingly, we found a significant loss of the histone acetyltransferase (HAT) PCAF expression, in 72% of human colon cancer samples (Figure 7B, $p = 3.17 \times 10^{-54}$). In contrast, there was no significant modification of the expression of histone deacetylase genes. As observed for CXCL12, loss of PCAF was found in adenomas as well as in MSS and MSI tumors. These results were further confirmed by qRT-PCR in a validation cohort of 26 patients and 3 colon cancer cell lines (Figure 7C, Supplementary Table 2). The expression of CXCL12 and PCAF was significantly correlated both in patients tumors, in a human kidney embryonic cell line expressing CXCL12 (HEK293) and two colon cancer cell lines not expressing CXCL12 (SW480 and HT29) ($p < 0.001$).

Finally we evaluated the effect of PCAF-forced expression in SW480 cell line after a transient transfection with a plasmid encoding the human PCAF gene. PCAF expression plasmid restored CXCL12 mRNA *in vitro* (Figure 7D). We observed a highly significant increase (over 1000-fold) of CXCL12 gene expression in the transfected cells (Figure 7D). This result provides an argument in favor of PCAF implication in CXCL12 expression regulation.

Functional relevance of CXCL12 reexpression *in vitro*

Effect of CXCL12 reexpression on cell migration *in vitro*

The motility of SW480 cells was compared before and after treatment with 1 mM VPA, 10 mM butyrate or 10 mM SAHA in Boyden chambers. As illustrated in Figure 8, the addition of 50 nM CXCL12 to the bottom compartment stimulated the migration of the cells from the upper compartment. However, when the cells in the upper compartment were treated with 10 mM butyrate, 1mM VPA or 10 mM SAHA in order to reexpress CXCL12 (as measured by Elisa test, data not shown), the cells were no more attracted to the bottom compartment and therefore the migration was strongly compromised (about 65% inhibition; $p < 0.001$).

Effect of VPA treatment on tumor growth and CXCL12 re-expression in a xenografted human colon tumor

The impact of HDAC inhibition on tumor growth was evaluated *in vivo* in xenografted human colon tumors treated ($n = 5$) with 500 mg/kg VPA for 30 days. The control group ($n = 5$) only received vehicle. The VPA treatment resulted in a 50% decrease in tumor volume (Figure 9A) with extensive necrosis and few residual tumor cells (data not shown). As expected, CXCL12 expression was almost absent in the tumor cells of the untreated mice while we observed that CXCL12 expression was restored in the residual tumor cells after VPA treatment (Figure 9B–9C).

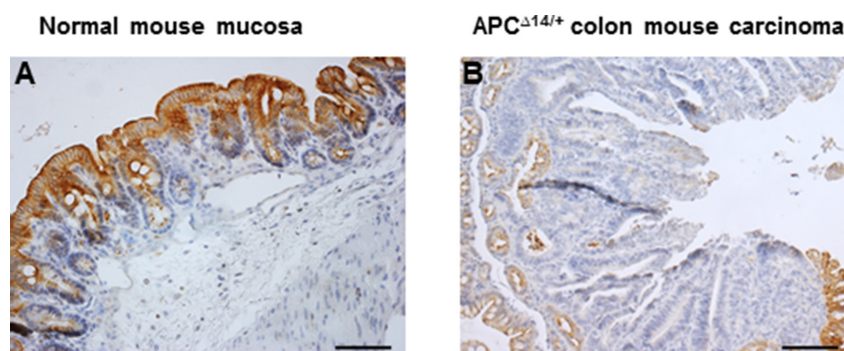


Figure 3: Immunohistochemical expression of CXCL12 in (A) normal mouse colon mucosa and (B) APC^{Δ14/+} mouse colon carcinoma.

Table 2: Characteristics of the 87 carcinomas analyzed for methylome

Carcinomas		<i>n</i> = 87
<i>Mean age ± S.D.</i>		68,28 ± 12,2
<i>Men:Women</i>		54:33
<i>Localization</i>	Proximal colon	49
	Distal colon	38
<i>UICC classification</i>	In situ Tis	3
	I	10
	II	32
	III	26
	IV	16
<i>MSS/MSI/CIMP</i>		38/47/31

SD: standard deviation.

Effect of VPA treatment on tumor formation and CXCL12 expression in APC mutated mice

Next, we evaluated the effect of HDAC inhibition and CXCL12 re-expression on tumor initiation/maintenance in the APC^{Δ14/+} mouse model. To this end, APC^{Δ14/+} mice were administered VPA (500 mg/kg) or PBS for 30 days. As shown in Figure 10A, a daily injection of VPA for 30 days significantly reduced the number of intestinal tumors by 65%, both in small intestine and colon (*p* < 0.001). A univariate negative binomial model indicated a sex effect (*p* = 0.012) and treatment effect (*p* = 0.014). Immunohistochemistry did not indicate CXCL12 expression in the tumor cell areas in the control group, whereas CXCL12 expression was patchy when re-expressed in the tumor cells of the VPA-treated group (Figure 10B–10D, arrows).

DISCUSSION

Our study presents data obtained from a large retrospective cohort of samples of human carcinomas and adenomas. The results clearly confirm previous work [10] showing that a loss of CXCL12 expression is a hallmark of colon cancer and in addition, we demonstrate for the first time, that the loss occurs early in the colon pathogenesis process as it is already present in the adenomas. Moreover, two mouse models of chemically-induced and spontaneous intestinal cancer recapitulate the observations made in humans, which reinforces the aforementioned observations. However, although we confirm that in this large cohort, the CXCL12 gene promoter is a target for methylation [10] particularly in CIMP+ samples, our functional *in vitro* and *in vivo* studies clearly demonstrate that a defect of

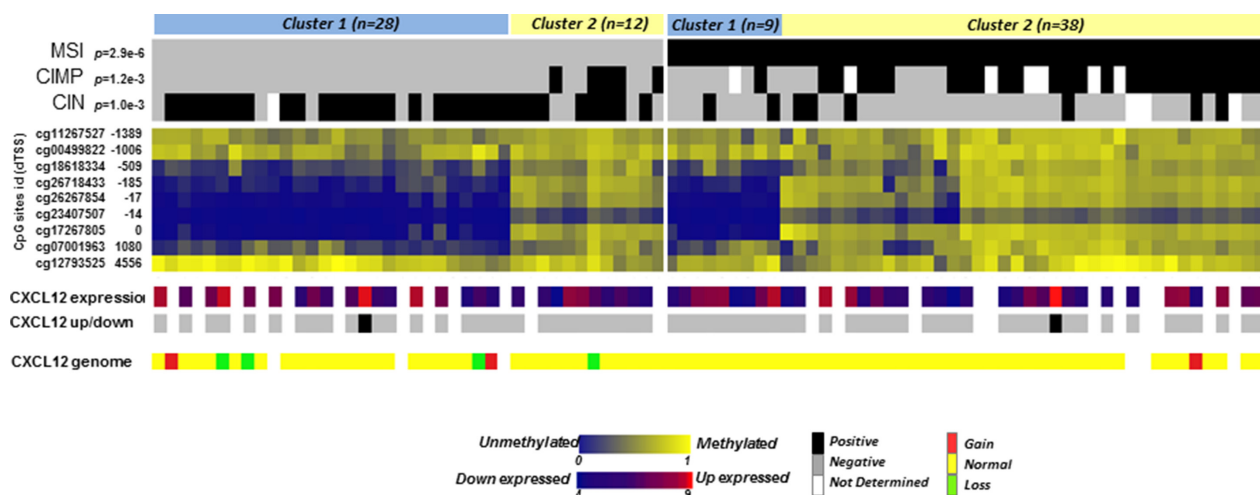


Figure 4: Heatmap of methylation levels of CpG sites in the CXCL12 CpG island region. β -values of the 9 CpG sites in the CpG island associated with CXCL12 are represented in blue (low level of methylation) to yellow (high level of methylation). The values are ordered based on clusters separately defined by unsupervised hierarchical clustering in MSS and MSI tumors and by CpG site location distances from the transcription start site (from -1389 to 4556). The molecular annotations of the samples and their *p*-value of association with the cluster defined by Fisher’s exact test are given at the top. At the bottom, the expression levels of CXCL12, the recorded up- or downregulated expression group as defined above and the genomic loss/gain of CXCL12 are displayed.

Table 3: CXCL12 methylation proportion according to MSI, MSS and CIMP status for each CpG sites in CXCL12 nearest and within the start of CXCL12 gene

CpG site Target ID	Position	dTSS	CpG Island according to UCSC	% methylated in Normal Tissues	% methylated in MSI tumors	% methylated in MSS tumors	p-value (diff % MSI vs %MSS)	% methylated in CIMP+ tumors	% methylated in CIMP- tumors	p-value (diff % CIMP+ vs %CIMP-)	% methylated in MSI CIMP- tumors	% methylated in MSI CIMP+ tumors	% methylated in MSS CIMP- tumors	% methylated in MSS CIMP+ tumors	p-value (diff % MSI x CIMP)
cg11267527	44881934	-1389	Island	nd	100%	100%	-	100%	100%	-	100%	100%	100%	100%	-
cg00499822	44881551	-1006	Island	100%	91%	83%	0.37	94%	82%	0.26	92%	86%	80%	100%	0.55
cg18618334	44881054	-509	Island	4%	72%	33%	5.3E-04	90%	24%	2.1E-08	92%	21%	26%	80%	5.8E-08
cg26718433	44880730	-185	Island	nd	77%	30%	6.4E-05	94%	27%	7.0E-09	92%	43%	20%	100%	1.2E-08
cg26267854	44880562	-17	Island	nd	81%	43%	6.0E-04	97%	39%	1.2E-07	96%	50%	34%	100%	7.1E-07
cg23407507	44880559	-14	Island	nd	77%	33%	1.1E-04	94%	29%	2.1E-08	92%	43%	23%	100%	4.6E-08
cg17267805	44880545	0	Island	nd	81%	33%	4.3E-05	97%	31%	5.8E-09	96%	50%	23%	100%	8.6E-09
cg07001963	44879465	1080	N_Shore	nd	74%	33%	2.4E-04	97%	22%	2.0E-10	96%	21%	23%	100%	1.0E-09
cg12793525	44875989	4556	N_Shelf	nd	100%	100%	-	100%	100%	-	100%	100%	100%	100%	-

CpGisland (UCSC, chr10:44879714-44882391).

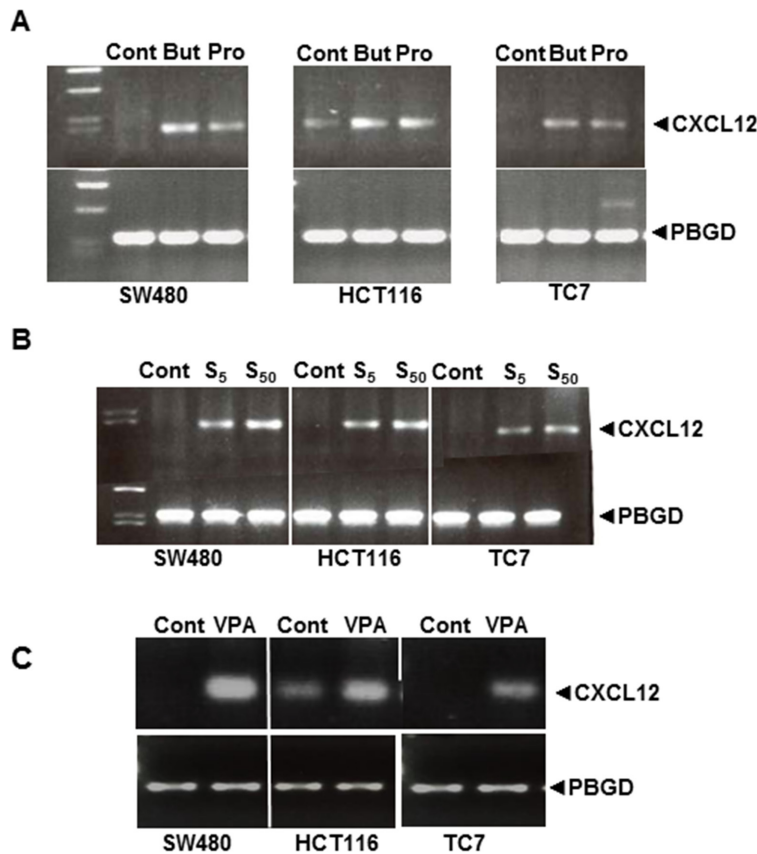


Figure 5: Strategies to re-express CXCL12 mRNA in SW480, HCT116 and TC7 cell lines after treatment for 24 h with (A) the natural short-chain fatty acid (SCFA) HDAC inhibitors Butyrate (10 mM) and propionate (15 mM) and (B) pharmacological HDAC inhibitors SAHA (S, 5 and 50 μM) and (C) VPA (1 mM). Results represent experiments run in triplicate with 4 wells per experiment.

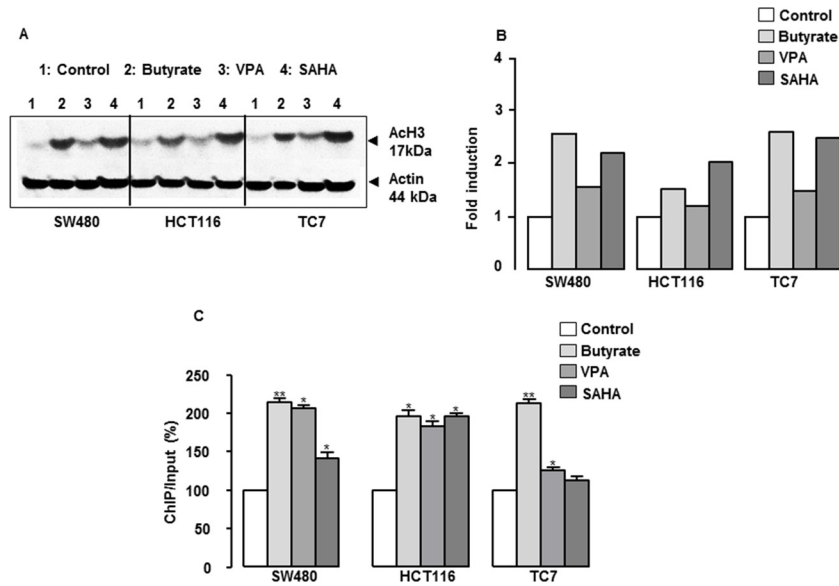


Figure 6: Role of histone acetylation in the regulation of CXCL12 gene expression and functional study. (A) Representative experiment of butyrate- and VPA-induced histone H3 acetylation as quantified by western blotting in SW480, HCT116 and TC7 cell lines. (B) ChIP assays were performed on colon cells treated with but (10 mM) or VPA (1 mM) for 24 h, and the levels of the CXCL12 promoter in the immunoprecipitates were measured by RT-qPCR in SW480, HCT116 and TC7 cell lines.

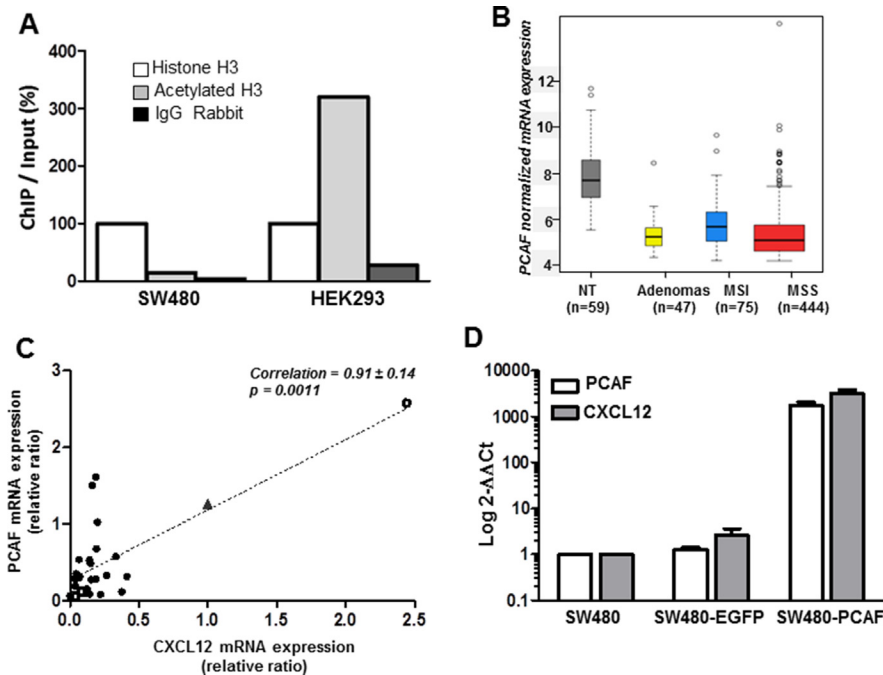


Figure 7: Histone H3 acetylation and PCAF expression. (A) ChIP assays were performed on SW480 and HEK293 cell lines and the levels of the CXCL12 promoter in the immunoprecipitates were measured by RT-QPCR. (B) PCAF mRNA expression distribution. Boxplot of intensity values according to sample types (59 non-tumor tissues, 47 adenomas, 75 MSI carcinomas, 444 MSS carcinomas). (C) Correlation at the mRNA level (RT-qPCR) between CXCL12 and PCAF expression in 26 colon tumor samples (black circles), a carcinoma expressing CXCL12 as in normal mucosa (open circle), two colon cancer cell lines (SW480 and HT29, open squares) and the human kidney embryonic cell line expressing CXCL12 (HEK293, black triangle). (D) Effect of PCAF forced-expression on CXCL12 in SW480 cells. PCAF and CXCL12 mRNA expression were evaluated 24 h after transfection with 3 μ g of a control plasmid (SW480-EGFP) and a PCAF-expressing plasmid (SW480-PCAF). The mean Ct for CXCL12 and PCAF was normalized with PBGD and SW480 as controls and the results were expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Experiments have been repeated in triplicate and results are representative of three sets of independent samples per group.

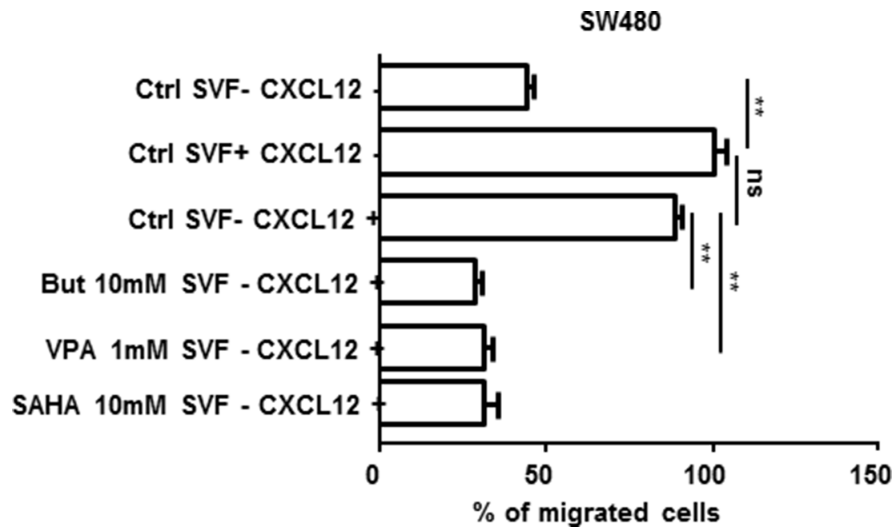


Figure 8: SW480 cell migration in Boyden chamber assays. Cells remaining in the upper chamber were mechanically removed after 24 h of incubation w/o or with 10% fetal calf serum, 50 nM CXCL12 and/or 10 mM but or 1 mM VPA. The cells that had migrated to the lower chamber were counted after staining with the fluorescent dye DAPI (or 4',6-diamidino-2-phenylindole). Quantification was performed by counting five random fields for each chamber under a microscope (Mann-Whitney parametric test, $**p < 0.001$; ns: non-significant).

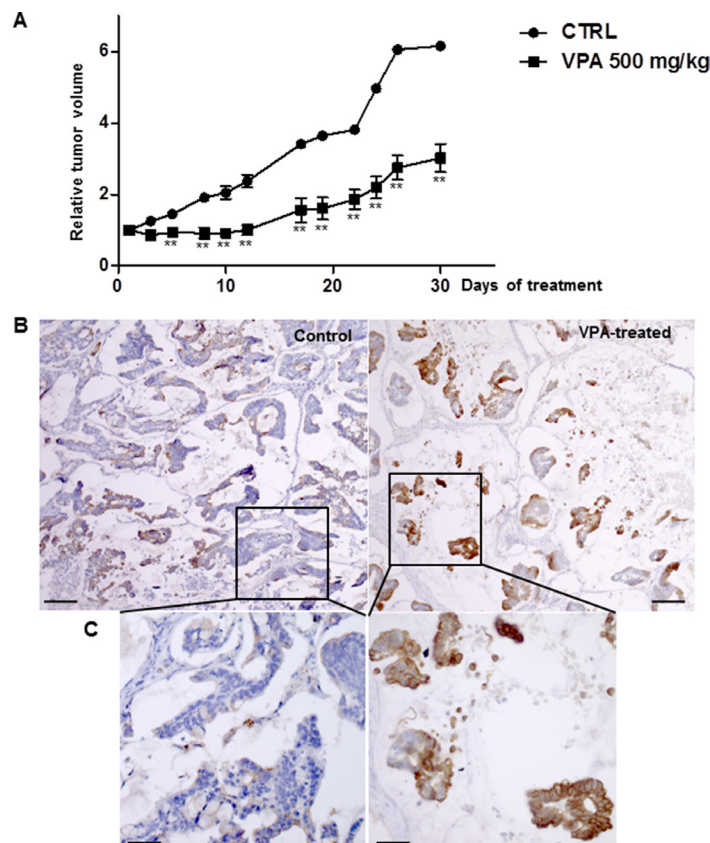


Figure 9: VPA treatment in a subcutaneous human colon tumor xenograft. (A) Tumor growth was measured daily before and throughout the intraperitoneal administration of VPA (500 mg/kg) for 30 days. Data represent the relative tumor volume plotted as a function of time. Five mice, each bearing two individual tumors, were included in each group. Mann-Whitney parametric test, $**p < 0.02$. (B) Immunohistochemical CXCL12 expression in human colon cancer xenografts treated with 500 mg/kg VPA for 30 days and control (untreated) xenografts. (C) Enlargement of a part of the pictures shown in B. The results represent five mice per group.

CXCL12 promoter histone acetylation may represent an additional process participating in CXCL12 expression extinction. Interestingly, the two carcinomas subtypes C4 and C6 which have higher CXCL12 expression levels than the four other subtypes – but still lower than in the normal mucosa - and that are associated with a worse prognosis for patients, aggregate downregulated genes of proliferation pathways and upregulated genes of migration/epithelial-mesenchymal transition pathways [16]. We might thus hypothesize that the reduction of CXCL12 expression might participate to the colon mucosa transformation early in the colon carcinogenesis process, and thereafter, according to the remaining level of CXCL12, the dissemination process would be facilitated.

How does CXCL12 gene silencing impact tumor initiation and/or progression?

Colonic epithelial homeostasis based on bottom-up cell migration from the crypt base depends on multiple

regulatory pathways, including E-cadherin/Beta-catenin interactions. Furthermore, the migration of enterocytes is reduced in several transgenic mouse models that display altered adherens junction protein expression, which may lead to adenoma formation [19]. The CXCL12 gradient along the crypt axis participates in the regulation of the continuous renewal of the colon epithelium and maintains the epithelial barrier integrity. Promoter acetylation, which could be sustained by the action of HDAC inhibitors such as butyrate, may be one of the processes that maintain a proper level of CXCL12 expression. Interestingly, a butyrate proximal-to-distal luminal gradient has been described in the normal colon epithelium and was also observed for CXCL12 expression in the present study [20, 21]. We showed that epigenetic modifications, including defects in promoter histone acetylation in MSS carcinomas and DNA methylation in MSI samples, decreased CXCL12 expression in tumor tissue.

For the first time, we identified PCAF, a lysine acetyl transferase enzyme that is related to apoptotic

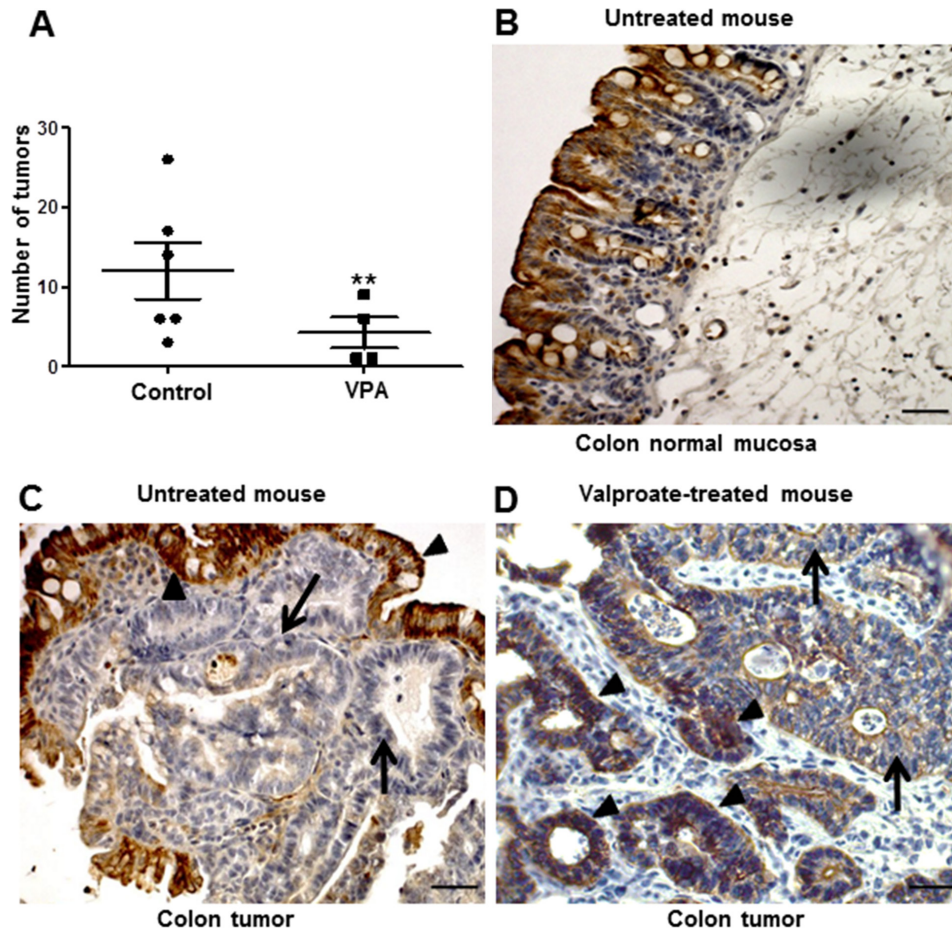


Figure 10: Intestinal CXCL12 expression and carcinoma development in control and VPA-treated $APC^{\Delta14/+}$ mice. (A) Quantitative evaluation of the number of carcinomas in the entire intestinal tract of control and VPA-treated $APC^{\Delta14/+}$ mice. The $APC^{\Delta14/+}$ mice were intraperitoneally injected with PBS ($n = 6$) or VPA ($n = 5$; 500 mg/kg/day) for 30 days. Mann-Whitney parametric test, $**p < 0.001$. (B–D) Immuno-histochemical CXCL12 expression in the normal colon mucosa of control $APC^{\Delta14/+}$ mice (PBS treated, (B) in a VPA-untreated tumor of an $APC^{\Delta14/+}$ mouse (C) and in the colon of $APC^{\Delta14/+}$ mice treated with 500 mg/kg VPA for 30 days (D).

cell processes [22], as a master regulator of CXCL12 expression *in vitro*. We also demonstrated that loss of PCAF expression is an early event in colon cancer initiation, observed at the adenoma stage and maintained in carcinomas that correlates with CXCL12 silencing in human tumors. Loss of PCAF has already been described in pancreatic cancer, endometrial tumors or head and neck carcinomas, and has been implicated in different molecular processes regulating tumor initiation and/or progression [23–25]. Here we also show that forced-expression of PCAF in SW480 non-CXCL12 expressing cells, is a powerful inducer of CXCL12, providing further evidence that in addition to methylation, level of promoter acetylation may participate to regulate CXCL12 expression in colon cancer cells.

A recent paper indicated that in cervical cancer cells, epigenetic reactivation of CXCL12 was observed when cells are treated with both methylation-inhibiting and acetylating agents, suggesting that in cervical cancer also, methylation and histone acetylation may participate to control the CXCL12 expression level [26].

CXCL12 as a molecular target in colon cancer

Our results suggest that epigenetic-based therapeutic intervention, especially HDAC inhibition might be a powerful strategy. Clinically, it is easier to consider treatments that inhibit enzymatic activity rather than activating it. In cancer, the modulation of histone acetylation has been extensively studied, and many pan-HDAC inhibitors have recently been developed [27]. In our study, treatment with the natural SCFA butyrate *in vitro* most strongly restored CXCL12 expression compared with two pharmacological HDAC inhibitors, SAHA and VPA. Nevertheless, VPA could reduce ectopic tumor growth *in vivo* as well as the number of intestinal tumors in APC mutant mice, and this effect was concomitant to the re-expression of CXCL12. Colon cancer cells forced to endogenously express CXCL12 undergo anoikis [28], whereas non-producing cells exogenously exposed to CXCL12 survived and migrated [29]. Although CXCL12 is the main effector of the changes seen *in vitro* in cell migration, or in the animal models, HDAC inhibition will bring about broad-ranging alterations in gene expression of which the increased expression of CXCL12. Nonetheless, these findings suggest that CXCL12 maintenance or re-expression by colon epithelial cells could have a preventive and/or therapeutic interest.

Numerous epidemiological and experimental studies have identified a correlation between a high-fiber diet and a decreased incidence of colon cancer [30]. Thus, these protective effects could be provided by butyrate, which is produced from the fermentation of non-digestible substrates by the enteric microbiota. Butyrate has been shown to inhibit the growth of colon carcinoma cells in several *in vivo* [31–32] and *in vitro* models [33], and this butyrate-induced cell growth inhibition and differentiation

was partially due to the capacity of this SCFA to induce histone hyperacetylation via HDAC inhibition [34]. A recent report confirms a molecular mechanism by which butyrate functions as an HDAC inhibitor in cancer colonocytes [35]. Because several HDACs are overexpressed in early colon field carcinomas [36] and patients with colorectal carcinomas exhibit a significant reduction of butyrate-producing bacteria in the gut microbiota [37], cancer risk may correlate with changes in the colonic milieu, such as a depletion of butyrate producers and an increase in opportunistic pathogens with oncogenic potential.

In conclusion, besides confirming a major decrease of CXCL12 expression in carcinomas as already shown in colon cancer, we demonstrate that the decrease is a precocious event occurring already in adenomas. Regarding the CXCL12 loss, it results from a promoter acetylation defect for the large majority of carcinomas and treating APC mutant mice with a HDAC inhibitor importantly reduces the intestinal tumor development. Although the mechanistic link between CXCL12 silencing, the default promoter histone acetylation and colon cancer formation and progression require further investigation, the results of our study are of potential clinical interest.

Agents that promote or maintain histone acetylation through HDAC inhibition and/or HAT stimulation may help to lower colon adenoma/carcinoma incidence, especially in high-risk families, or could be included in therapeutic protocols to treat advanced colon cancer.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tumor samples

The CXCL12 and PCAF gene status were evaluated based on an Array-Based Comparative Genomic Hybridization Analysis established from 7 national cohorts [16] that comprise 566 samples, which included 444 microsatellite-stable (MSS), 75 microsatellite-unstable (MSI) and 47 adenomas. For the relative quantitative CXCL12 expression (RT-qPCR) and immune-histochemical labelling, 46 MSS carcinomas, which also belonged to the 444 MSS cohort, and 30 MSS adenomas were collected at the Biological Resources Center at the Strasbourg University Hospital (local cohort, Table 1) using protocols approved by the CRB institutional review. All patients provided written informed consent and were recruited into the study after it had undergone institutional review by the French Ethics Committee of Strasbourg. MSI or MSS phenotypes were characterized using a panel of five different microsatellite loci from the Bethesda reference panel. Tumors were characterized as MSI if two or more of the five markers showed microsatellite instability and MSS if none of the five markers showed instability. CIN was defined from CGH profiles and samples with at least

20% gain or loss of whole chromosomes or fractions of chromosomes [16].

The correlation between CXCL12 and PCAF expression at the mRNA level (RT-qPCR) was analyzed in an independent validation cohort of 26 MSS carcinomas (Supplementary Table 2).

Transcriptome analysis

CXCL12 mRNA expression was evaluated in a gene expression data set of 519 MSS and MSI colon carcinomas [16], 47 adenomas (32 from GSE8671, 15 from GSE4183) and 59 non-tumor tissue samples (19 from GSE33582, 32 from GSE8671 and 8 from GSE4183). Thirty additional carcinomas from the GSE4183 data set were also integrated. The three data sets were normalized together by RMA normalization (R package affy). An unsupervised Gaussian mixture model clustering approach [38] (R package mclust) was used to define the best number of sample groups for CXCL12 expression data. Associations with annotations were assessed by an ANOVA, *t*-test or Fisher's exact test depending on the type of variable tested (R package stats).

Methylome analysis

Whole-genome DNA methylation was analyzed in a subset of 87 tumors (Table 2) using the Illumina Infinium HumanMethylation450 Beadchips. Hybridizations were performed at Integragen (www.integragen.com) according to the manufacturer's specifications (Illumina). The chips were scanned using the Illumina HiScan SQ scanner, and the raw image data were imported into the GenomeStudio (v2011.1) methylation module (v1.9.2.). Only CXCL12 CpG sites within CpG islands were considered, as reported in Illumina annotations; sites with probes that contained a SNP were removed. Unsupervised hierarchical clustering, Ward linkage and Euclidian distance were performed to identify samples with different methylation profiles for these sites. For each site, β -values were assigned to the methylated/unmethylated status using an unsupervised mixture modeled fits approach (R package mclust). When no group was found, the site was considered methylated for all samples if the median of the β -values was below 0.3; otherwise, the site was considered unmethylated. The association of the methylation status with annotations was assessed with Fisher's exact test.

Cell culture and treatments

Human colon carcinoma HCT116, SW480 (obtained in 2013 from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; experiments started at P15 and P70 for HCT116 and SW480 respectively) and TC7 (kindly provided by M. Rousset), [39] cells were maintained at 37°C in standard culture conditions. The mutational

status of BRAF, PI3K and KRAS has been validated as previously shown [40]. Cells were treated during exponential growth 30% confluence with 5-azacytidine at 2.5 μ M Vidaza®, 25 mg/ml (Celgene) every day for up to 10 days; with sodium butyrate at 10 mM 110.09 g/mol (Sigma), sodium propionate at 15 mM 96.06 g/mol (Sigma), SAHA Vorinostat at 5 and 50 μ M 264.32 g/mol (Sigma) or Valproic Acid at 1 mM during 24 hours 166.19 g/mol (Sigma). Experiments were run in triplicate with $n = 4$ wells in each experiment.

PCAF-Expressing SW480 cells

Cells (500.10⁶) were transfected with 3 μ g of the pMSCVpuro-PCAF plasmid (Addgene, #63705) encoding the human PCAF gene with JetPEI (Polyplus Transfection), according to manufacturer's instructions. The DNA mix was incubated with the JetPEI for 20 min at room temperature. After incubation, the complex was added to the culture medium. As control, we transfected the cells with the control vector pEGFP-C1 (Addgene, #U55763). The transfection efficiency was confirmed after 24 h by quantitative RT-PCR.

Cell migration assay

Single cell migration assay was performed in Boyden Chambers BD (Biosciences) with the upper and lower compartments filled without and with 50 nM CXCL12 cell culture medium respectively, with or without HDAC inhibitors (1 mM valproic Acid or 10 mM butyrate, 24 h treatment before migration assay). After 12 h of migration in the chamber, the cells were fixed with 4% PFA, stained with DAPI and counted under the microscope.

Methylation specific PCR

Methylation patterns in the CpG islands of CXCL12 and of 5 methylation markers (RUNX3, SOCS1, NEUROG1, CACNA1G, IGF2) were determined by methylation specific PCR, and the CIMP+ phenotype was defined by CpG island promoter methylation of at least 3 out of these 5 markers [41]. Multiplex PCR allowed amplification of methylated and unmethylated fragments in the same PCR reaction and were analysed by capillary electrophoresis on a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). *In vitro* methylated DNA (CpGGenome™ Universal Methylated DNA, MP Biomedicals, Irvine, USA) was used as a positive control for the methylated alleles, and unmethylated DNA was used as a negative control. Moreover, a control of the sensitivity of detection of methylated DNA (5% methylated DNA + 95% unmethylated DNA) was also included in each experiment.

PCR amplifications were performed in a final volume of 50 μ l consisting of 0.2 μ M of each primer (except for IGF2 0.1 μ M and CXCL12 0.75 μ M), 2.5 mM MgCl₂, 1M Betaine, 70 μ M of each dNTP, Taq Gold Buffer 1 \times , 5 units Taq Gold and \sim 10ng of bisulfite converted DNA. After an initial denaturation step at 95°C for 10 min, 33 cycles were performed at 94°C for 45 sec, 60°C for 90 sec and 65°C for 25 sec, followed by a final elongation step at 65°C for 30 min. The primers for the MS-PCR are listed in (Supplementary Table 3).

Relative quantitative RT-PCR

mRNA expression of the human CXCL12, PCAF and control HMBS genes was evaluated by relative quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis using the LightCycler system (Roche Molecular Biochemicals) and FastStart DNA Master Mix SYBR Green I (Roche Diagnostics) as previously described [42].

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP assay)

The ChIP protocol was adapted from MilliporeChIP Assay Kit (17-295) with minor modifications, as previously described [43]. In brief, trypsinized cells were washed 2 \times in PBS and 1.2 \times 10⁷ cells were cross-linked at 37°C for 10 min in 5 ml PBS/0.5%BSA/1% ultra-pure formaldehyde (Electron Microscopy Sciences). Quenching with 125 mM glycine and a cold PBS wash (containing 1x protease inhibitor cocktail (PIC); Roche) was followed by cell lysis in 5 ml of 1% Triton X-100, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 7.1), 11% sucrose, 1 \times PIC for 10 min on ice. Nuclei were pelleted at 2,000 rpm for 10 min at 4°C and were lysed in 500 μ l of 1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 \times PIC. Chromatin was sonicated to 800–300 bp using Bioruptor 200 (Diagenode), cleared by centrifugation and sonication efficiency was verified. Sonicated chromatin diluted 4 \times with 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM TRIS-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl, 1 \times PIC was pre-cleared by rotating for 1 h at 4°C with 50 μ l Magna ChIP Protein A Magnetic Beads (Millipore 16-661) previously blocked with 0.5% BSA for 1h at 4°C. 3 \times 10⁶ cell equivalents were further diluted 2.5 \times in the same buffer, and incubated overnight with 5 μ g anti-AcH3 (N-Term specific, Millipore 06-599), 5 μ g anti-H3 (Millipore 06-755) and 5 μ g rabbit IgG (Millipore 12-370). Protein-DNA complexes were bound to 30 μ l Protein A Magnetic Beads for 5–6 h at 4°C and washed 1 \times each with low-salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.1, 150 mMNaCl, 2 mM EDTA, 1%Triton X100, 0.1% SDS), high-salt buffer (20 mMTris-HCl, pH8.1, 500 mMNaCl, 2 mM EDTA, 1%Triton X100, 0.1% SDS), LiCl buffer (10 mMTris-HCl, pH8.1, 1 mM EDTA, 1% deoxycholate, 1% NP40, 0.25 M LiCl), and TE. Samples were further processed using iPure Kit

(Diagenode) according to the manufacturer's instructions. DNA recovered after ChIP was used for PCR detection of CXCL12 promoter and a nonrelated region in the CXCL12 exon 2 as a control (see the primer sequences in Supplementary Table 4). ChIP-qPCR data were analysed relative to total histone H3 1% input adjusted to 100%, fold enrichment was calculated according to the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method and PCR efficiency was calculated after serial dilutions of standard sample (slope: -3.25; Efficiency : 103%).

Western blot analysis

Whole cell extracts prepared from HCT116, SW480 and TC7 colon cancer cell lines were separated on a 12% SDS-PAGE gel and subjected to immunoblot analysis. Primary antibody for Western Blot analysis was AcH3 (5 μ g/ml Millipore) and anti-actin (1/15000, Millipore®). Protein expression was detected by using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (Amersham) with ECL reagent (Amersham) following the manufacturer's instructions.

Human tumor xenografts, mice models and treatments

Six- to eight-week-old female athymic nude mice (NMRI-Foxn1nu/Fox1nu, Janvier®) were used, and the procedures were approved by the French Ethical Committee (Cremeas, N°AL/85/92/02/13). Human tumor tissue fragments were obtained in accordance with the ethical standards of the institutional committee. Cancer tissues were injected in the flanks of the mice [17]. The mean RTV was calculated for each group.

Wild type, APC Min⁺, APC ^{Δ 14/+} mice (C57BL/6 (B6) background) were housed according to the guidelines of the Ethic Committee of the University of Strasbourg.

Wild-type mice were treated with 10 mg/kg azoxymethane as previously described [44]. For valproate treatment (VPA), 16- to 18-week-old heterozygous APC ^{Δ 14/+} mice [45] were intraperitoneally injected with PBS ($n = 6$) or VPA ($n = 5$; 500 mg/kg/day) for 30 days. At the end of the treatment, the intestinal tracts were fixed in 4% PFA in PBS for immunohistochemistry, and the frozen samples were kept at -80°C for molecular analyses.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry used standard procedures with tumors fixed zinc fixative and embedded in paraffin. Tissue sections were incubated with the primary antibodies against CXCR4 (1:200; eBiosciences) and CXCR7 (1:75; ThermoScientific) after antigen retrieval and immunostaining was developed with a liquid DAB substrate kit (Roche).

Statistical analysis

The data were analyzed with the Mann-Whitney parametric test, and the significance level was set to 5%. To evaluate the effect of VPA on APC $\Delta 14/+$ mice, the macroscopically detected tumors were counted in the control and treated animals. A negative binomial model was fitted, and a p -value < 0.05 was considered significant. The model was run under R 3.0.2. with the MASS package “glm.nb” function.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge Mrs Véronique Kussaibi and Isabelle Keller for their excellent technical assistance. We are grateful to Dr Monique Dontenwill (UMR CNRS 7213) for her critical reading of this manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare they have no competing interest.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by the Université de Strasbourg (IDEX Attractivité program), Ligue Contre le cancer, a non-governmental charity organization, through the Cartes d'Identité des tumeurs program (CIT) and the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

REFERENCES

1. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. 2006; 20:1915–1924.
2. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida H, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996; 382:635–638.
3. Sierro F, Biben C, Martínez-Muñoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl H, Leung J, Groom M, Batten RP, Harvey C, Martínez-A C, Mackay CR, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:14759–14764.
4. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura K, Matsushima N, Yoshida S, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 1998; 393:591–594.
5. Dwinell MB, Ogawa H, Barrett KE, Kagnoff MF. SDF-1/CXCL12 regulates cAMP production and ion transport in intestinal epithelial cells via CXCR4. *Am J Physiol*. 2004; 286:G844–450.
6. Smith JM, Johanesen PA, Wendt MK, Binion DG, Dwinell MB. CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of intestinal barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 288:G316–326.
7. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*. 2004; 14:171–179.
8. Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW Jr. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab Invest*. 2004; 84:1666–1676.
9. Gassmann P, Haier J, Schlüter K, Domikowsky B, Wendel C, Wiesner U, Kubitzka R, Engers R, Schneider SW, Homey B, Müller A. CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells *in vivo*. *Neoplasia*. 2009; 11:651–661.
10. Wendt MK, Johanesen PA, Kang-Decker N, Binion DG, Shah V, Dwinell MB. Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene*. 2006; 25:4986–4997.
11. Wendt MK, Cooper AN, Dwinell MB. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene*. 2008; 27:1461–1471.
12. Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. *Am Clin Pathol*. 2009; 132:202–210.
13. Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S. Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008; 98:1682–1689.
14. Greijer AE, Delis-van Diemen PM, Fijneman RJ, Giles RH, Voest EE, van Hinsbergh VW, Meijer GA. Presence of HIF-1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2008; 452:535–544.
15. Seo J, Kim OY, Jo I. Differential expression of stromal cell-derived factor 1 in human brain microvascular endothelial cells and pericytes involves histone modifications. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 382:519–524.
16. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, Etienne-Grimaldi MC, Schiappa R, Guenot D, Ayadi M, Kirzin S, Chazal M, Fléjou JF, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*. 2013; 10:e1001453.
17. Guenot D, Guérin E, Aguillon-Romain S, Pencreach E, Schneider A, Neuville A, Chenard MP, Duluc I, Du Manoir S, Brigand C, Oudet P, Kedinger M, Gaub MP. Primary tumor genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability. *J Pathol*. 2006; 208:643–652.
18. Della Ragione F, Criniti V, Della Pietra V, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T, Zappia V. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *Febs Lett*. 2001; 499:199–204.

19. Carothers AM, Melstrom KA Jr, Mueller JD, Weyant MJ, Bertagnolli M. Progressive changes in adherens junction structure during intestinal adenoma formation in Apc mutant mice. *J Biol Chem.* 2001; 276:39094–102.
20. Sengupta S, Muir JG, Gibson PR. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepato.* 2006; 21:209–218.
21. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell.* 2012; 48:612–626.
22. Gai X, Tu K, Li C, Lu Z, Roberts LR, Zheng X. Histone acetyltransferase PCAF accelerates apoptosis by repressing a GLI1/BCL2/BAX axis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2015; 6:e17122015.
23. Giannini R, Cavallini A. Expression analysis of a subset of coregulators and three nuclear receptors in human colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2005;25:4287–92
24. Wan J, Zhan J, Li S, Ma J, Xu W, Liu C, Xue X, Xie Y, Fang W, Chin YE, Zhang H. PCAF-primed EZH2 acetylation regulates its stability and promotes lung adenocarcinoma progression. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:3591–3604.
25. Ying MZ, Wang JJ, Li DW, Yu G, Wang X, Pan J, Chen Y, He MX. The p300/CBP associated factor is frequently downregulated in intestinal-type gastric carcinoma and constitutes a biomarker for clinical outcome. *Cancer Biol Ther.* 2010; 9:312–320.
26. Yadav SS, Prasad SB, Prasad CB, Pandey LK, Singh S, Narayan G. CXCL12 is a key regulator in tumor microenvironment of cervical cancer: an *in vitro* study. *Clin Exp Metastasis.* 2016;33:431–439.
27. Giannini G, Cabri W, Fattorusso C, Rodriguez M. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. *Future Med Chem.* 2012; 4:1439–1460.
28. Drury LJ, Wendt MK, Dwinell MB. CXCL12 chemokine expression and secretion regulates colorectal carcinoma cell anoikis through Bim-mediated intrinsic apoptosis. *PLoS One.* 2010; 59:e12895
29. Wendt MK, Drury LJ, Vongsa RA, Dwinell MB. Constitutive CXCL12 expression induces anoikis in colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology.* 2007; 135:508–517.
30. Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82:650–661.
31. McIntyre A, Gibson PR, Young GP. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut.* 1993; 34:386–391.
32. Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K, Menanteau J. Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut.* 2001; 48:53–61.
33. Barnard JA, Warwick G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ.* 1993; 4:495–501.
34. Sealy L, Chalkley, R. The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell.* 1978; 14:115–121.
35. Donohoe DR, Holley D, Collins LB, Montgomery SA, Whitmore AC, Hillhouse A, Curry KP, Renner SW, Greenwalt A, Ryan EP, Godfrey V, Heise MT, Threadgill DS et al. A Gnotobiotic Mouse Model Demonstrates That Dietary Fiber Protects against Colorectal Tumorigenesis in a Microbiota- and Butyrate-Dependent Manner. *Cancer Discov.* 2014; 4:1387–1397.
36. Stypula-Cyrus Y, Damania D, Kunte DP, Cruz MD, Subramanian H, Roy HK, Backman V. HDAC up-regulation in early colon field carcinogenesis is involved in cell tumorigenicity through regulation of chromatin structure. *PLoS One.* 2013; 8:e64600.
37. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME Journal.* 2012; 6:320–329.
38. Fraley C, Raftery AE. MCLUST Version 3 for R: Normal Mixture Modeling and Model-based Clustering. Technical Report No. 504. Department of Statistics, University of Washington revised, 2009. 2006.
39. Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line TC7: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci.* 1994; 107:213–225.
40. Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R, Mariadason JM. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res.* 2008; 15;68:1953–1961.
41. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006; 38:787–793.
42. Romain B, Hachet-Haas M, Rohr S, Brigand C, Galzi JL, Gaub MP, Pencreach E, Guenot D. Hypoxia differentially regulated CXCR4 and CXCR7 signaling in colon cancer. *Molecular Cancer.* 2014; 13:58–69.
43. Sellars M, San-Martin B, Kastner P, Chan S. Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med.* 2009; 206:1073–1087.
44. Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard MP, Kedinger M, Beck F, Freund JN, Domon-Dell C. The Cdx2 homeobox gene has a tumor suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut.* 2003; 52:1465–1471.
45. Colnot S, Niwa-Kawakita M, Hamard G, Godard C, Le Plenier S, Houbron C, Romagnolo B, Berrebi D, Giovannini M, Perret C. Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest.* 2004; 84:1619–1630.

Conclusion

Cette étude a montré que l'expression de CXCL12 est perdue dans les cellules tumorales de CCR et que cet évènement n'est pas lié à la progression puisque la perte est déjà observée dans les adénomes. Cette perte d'expression est induite par une dérégulation épigénétique. En effet, la perte résulte, en partie, d'une méthylation du promoteur de CXCL12, mais surtout d'un défaut d'acétylation du promoteur empêchant la transcription du gène *CXCL12*. Cette hypoacétylation résulterait d'une diminution d'expression de l'histone acétyl transférase KAT2B (PCAF) dans les cellules tumorales. D'autre part, il est intéressant de noter que dans un modèle murin développant spontanément des CCR, l'expression de CXCL12 est perdue dans les cellules tumorales et le traitement des souris par des inhibiteurs d'histones déacétylases, permet de restaurer cette expression tout en diminuant le nombre de tumeurs formées dans l'intestin.

Malgré l'identification du mécanisme principal responsable de la perte d'expression de CXCL12, nous avons constaté que d'autres enzymes régulant les mécanismes épigénétiques pouvaient également intervenir dans cette perte d'expression. C'est pour cette raison que nous avons continué l'exploration en ce sens. Les résultats sont présentés dans la partie II.

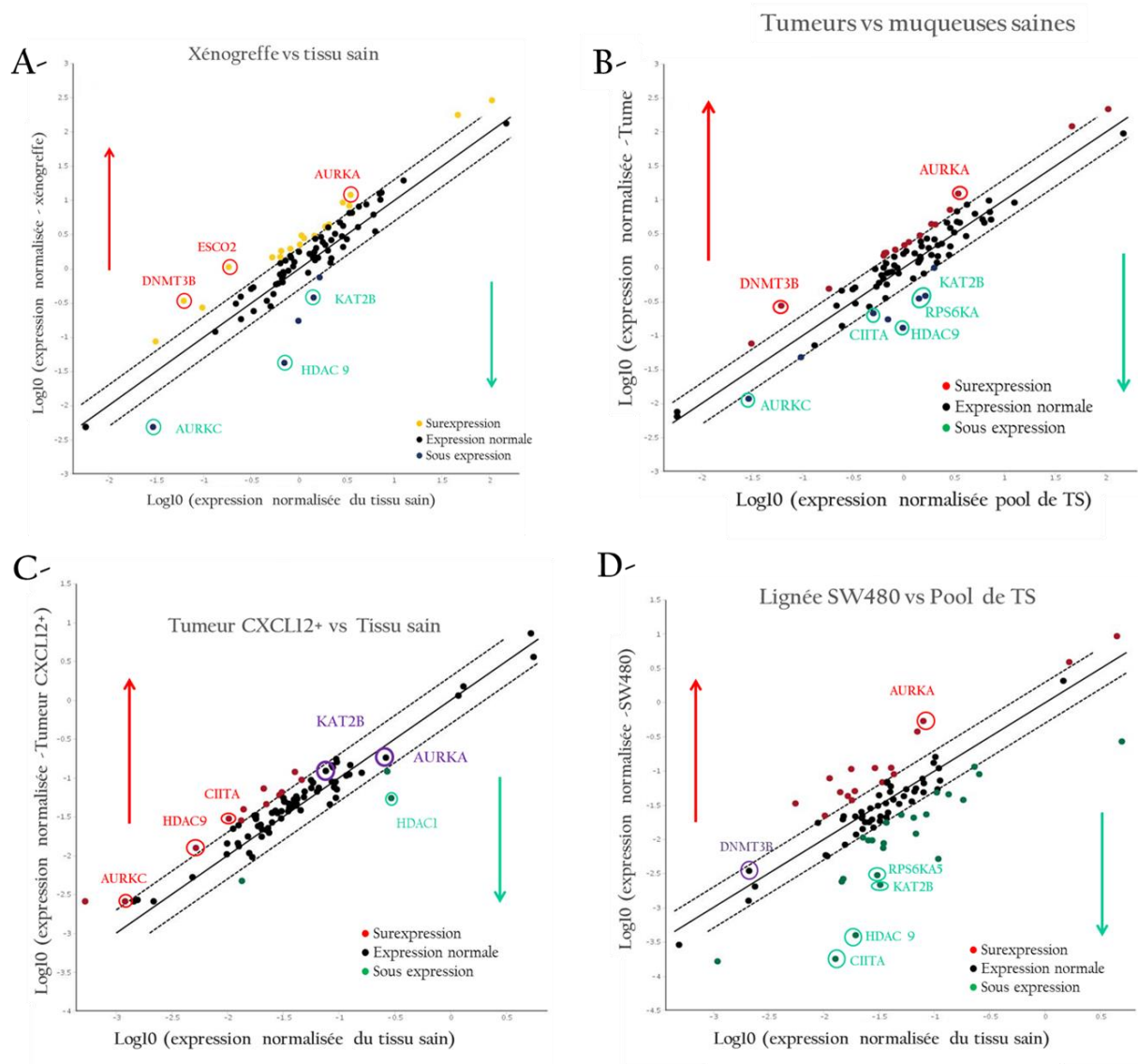


Figure 52 : Scatter plots présentant les gènes surexprimés et sous exprimés. A) Pour les tumeurs. B) Pour une xénogreffe et la muqueuses saine associée (TS) à la tumeur primaire. C) Pour une tumeur exprimant CXCL12 (CXCL12⁺). D) Pour la lignée SW480 et le pool des muqueuses saines (pool TS).

Partie II : Identification des gènes régulateurs des processus épigénétiques

1. Expression évaluée par PCR Array

Afin d'identifier d'autres gènes dont la dérégulation d'expression pourrait conduire à la perte d'expression de CXCL12 dans les tumeurs coliques, une PCR array, ciblant 84 gènes régulant les processus épigénétiques, a été réalisée pour 30 échantillons tumoraux et l'expression de chaque gène est comparée à celle du tissu sain correspondant (analyse grâce au Data analysis center de Qiagen).

Les contrôles sont validés puis l'expression de chaque gène est normalisée par rapport à l'expression dans la muqueuse saine et par rapport à 5 gènes de référence (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, RPLP0). Pour chaque patient, les résultats sont présentés sous forme de « scatter plot » qui sépare les gènes dont l'expression est augmentée de celle des gènes dont l'expression est diminuée. Cette approche a sélectionnée 31 gènes dont l'expression est significativement dérégulée dans les cellules tumorales comparée à l'expression dans la muqueuse saine (**Tableau 12 ; Figure 52A**).

Gène	Valeur de p	% tumeurs
AURKA	0.0002177 p < 0.001 ***	76.66%
KAT2B	0.0002579 p < 0.001 ***	76.66%
PAK1	0.0002801 p < 0.001 ***	40%
RPS6KA5	0.0003351 p < 0.001 ***	70%
PRMT3	0.0006344 p < 0.001 ***	56.66%
USP16	0.0006344 p < 0.001 ***	33.33%
DNMT3B	0.0007429 p < 0.001 ***	86.66%
HDAC9	0.0008035 p < 0.001 ***	63.33%
PRMT1	0.0009023 p < 0.001 ***	53.33%
HDAC1	0.0009026 p < 0.001 ***	56.66%
KMT2E	0.001094 p < 0.01 **	36.66%
KAT5	0.001373 p < 0.01 **	40%
KDM6B	0.001847 p < 0.01 **	50%
KDM4A	0.001916 p < 0.01 **	50%
AURKB	0.002297 p < 0.01 **	63.33%

Gène	Valeur de p	% tumeurs
UBE2A	0.002468 p < 0.01 **	36.66%
MBD2	0.002468 p < 0.01 **	50%
NCOA1	0.002468 p < 0.01 **	50%
SUV39H1	0.00265 p < 0.01 **	53.33%
KAT2A	0.00351 p < 0.01 **	66.6%
CIITA	0.004314 p < 0.01 **	56.66%
HAT1	0.004314 p < 0.01 **	33.33%
AURKC	0.005281 p < 0.01 **	43.33%
DNMT1	0.006874 p < 0.01 **	53.33%
PRMT5	0.008339 p < 0.01 **	40%
KAT6B	0.01041 p < 0.05 *	50%
SETD1A	0.02068 p < 0.05 *	36.66%
ESCO2	0.02452 p < 0.05 *	53.33%
HDAC2	0.02593 p < 0.05 *	43.33%
MYSM1	0.03791 p < 0.05 *	30%
HDAC7	0.04209 p < 0.05 *	46.66%

Tableau 12 : Gènes dérégulés dans les tumeurs par rapport à la muqueuse saine associée dans 30 tumeurs coliques humaines (en rouge, gènes surexprimés ; en vert, gènes sous exprimés). La troisième colonne correspond aux pourcentages de tumeurs présentant la dérégulation pour chaque gène. **, *** : p < 0.01, 0.001 évalué par un t-test.

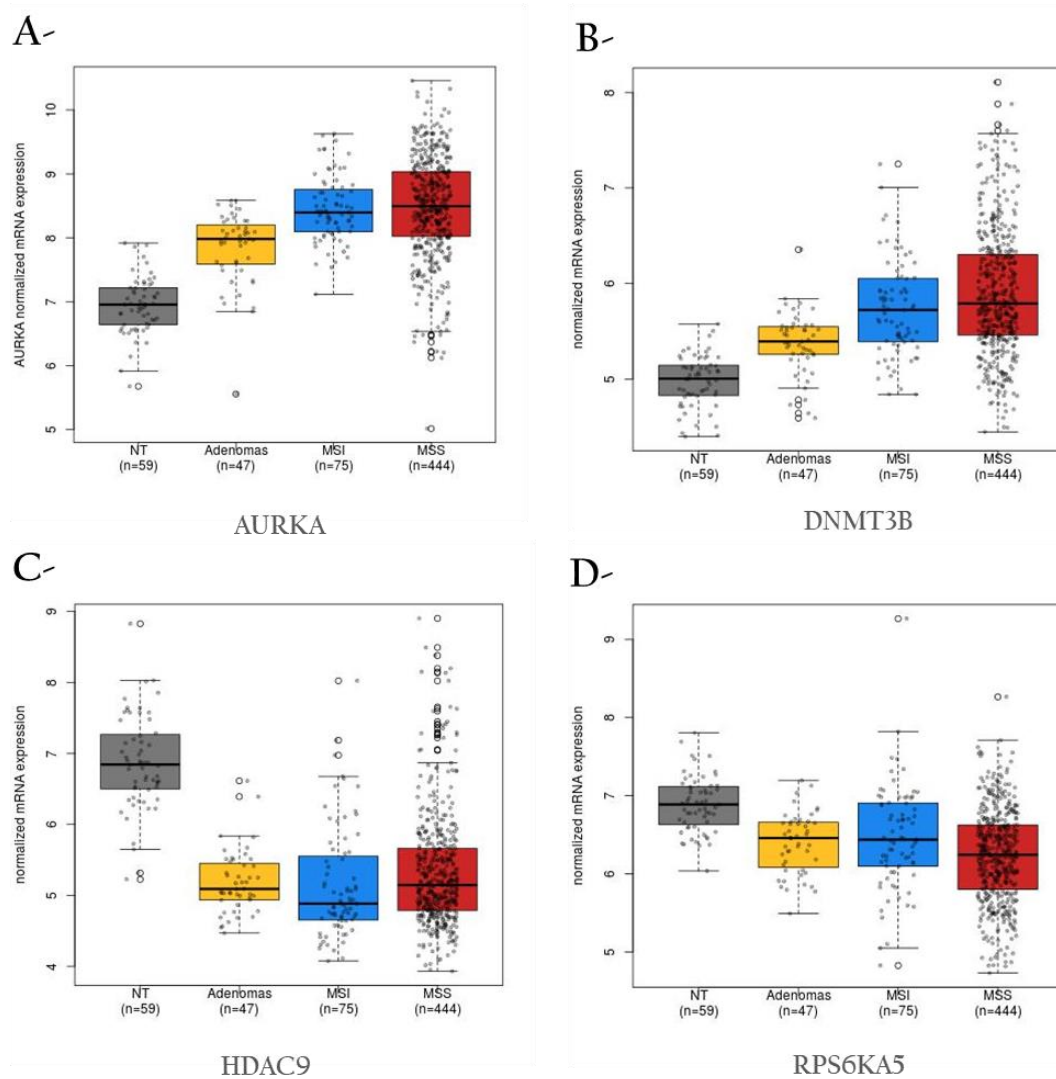


Figure 53 : Résultats du transcriptome du CIT. Analyse de l'expression de l'ARNm de A) AURKA, B) DNMT3B, C) HDAC9, D) RPS6KA5 dans les muqueuses coliques saines (n=59), les adénomes (n=47), les tumeurs MSI (n=75) et les tumeurs MSS (n=444).

Les tumeurs sélectionnées ont été choisies pour avoir au moins 50% de cellules tumorales. En effet, les tumeurs humaines sont constituées de cellules tumorales, de cellules stromales et de cellules immunitaires/inflammatoires. Afin de savoir si les profils d'expression des gènes de la PCR array étaient spécifiques aux cellules tumorales, nous avons comparé l'expression de ces gènes dans une tumeur primaire et dans la xéno greffe issue de cette tumeur primaire. En effet, la xéno greffe entraîne la mort des cellules non tumorales dès le 1^{er} passage chez la souris immunodéficente. Les résultats montrent que le profil de dérégulation dans la xéno greffe est proche de celui obtenu avec la tumeur primaire lorsqu'il est comparé au profil de la muqueuse saine (**Figure 52B**).

Nous cherchons à identifier des gènes dont la dérégulation serait à l'origine de la perte d'expression de CXCL12. Afin de valider ces données, nous avons comparé le profil d'expression dans une tumeur de la cohorte qui exprime CXCL12. Les résultats montrent que cette dernière présente un profil totalement différent du profil des tumeurs sans CXCL12, puisque plusieurs gènes présentent des profils d'expression inversés, comme pour CIITA, AURK1, HDAC10 ou AURKB (**Figure 52C**).

Nous avons montré que l'expression de CXCL12 est également perdue dans plusieurs lignées cellulaires coliques humaines, dont SW480, SW620 et HT29 alors que dans une lignée non colique, la lignée de cellules rénales HEK293, CXCL12 est fortement exprimée (cette lignée sera considérée comme contrôle positif dans les études *in vitro*).

Les cellules SW480 ont été analysées et comparés par rapport au pool des tissus sains des patients. Les résultats montrent un profil très proche de celui des tumeurs puisque ce sont les mêmes gènes qui sont dérégulés (**Figure 52D**).

Enfin, l'analyse des résultats de PCR array prenant en compte les stades cliniques (I et II) et les stades tardifs (III et IV) n'a pas montré de différence d'expression (résultats non montrés). La dérégulation de l'expression des gènes sélectionnés a été également validée par qPCR en utilisant des amorces différentes spécifiques à chaque gène (résultats non montrés).

2. Validation de la dérégulation des gènes sélectionnés par PCR Array dans la cohorte du CIT (Figure 53)

La PCR Array a permis d'identifier des gènes dont l'expression est dérégulée dans les tumeurs par rapport aux muqueuses saines dans une cohorte locale de Strasbourg. Nous avons choisi, par la suite, de valider ces résultats sur une cohorte plus large et plus hétérogène (du point de vu de la localisation géographique). Pour cela, nous avons analysé les résultats du transcriptome réalisé par « La ligue contre le cancer » dans le cadre du programme CIT qui

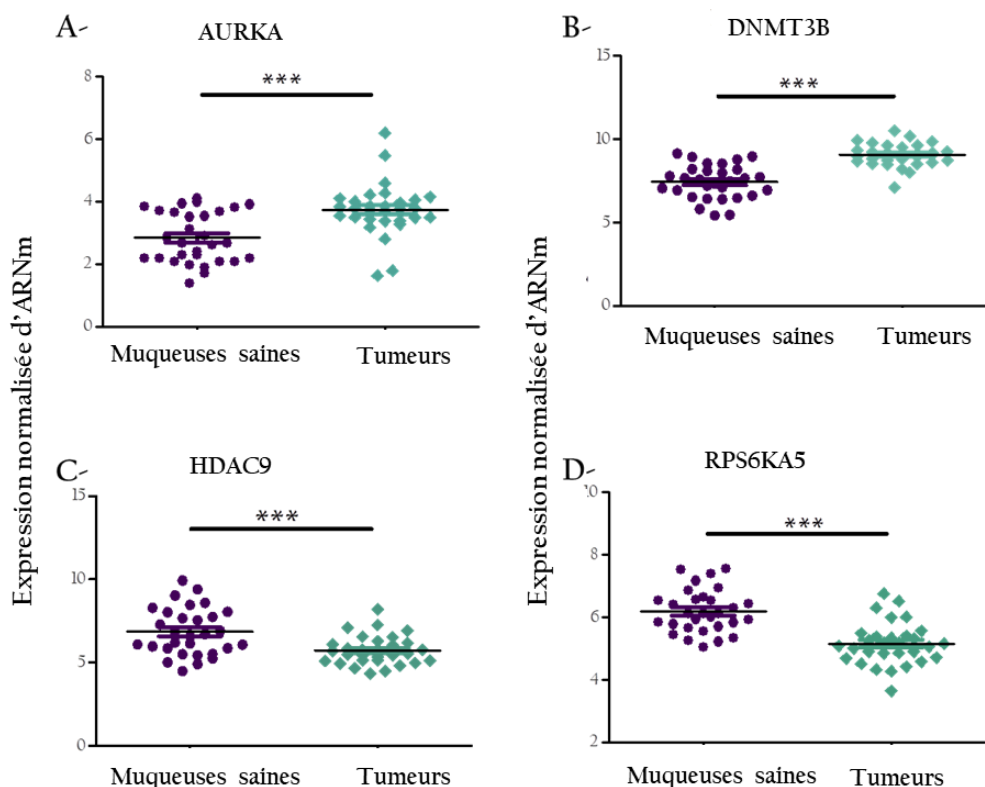


Figure 54 : Analyse de l'expression des ARNm de **A) AURKA**, **B) DNMT3B**, **C) HDAC9** et **D) RPS6KA5** dans les tumeurs et les muqueuses saines d'une cohorte locale de tumeurs CCR (n=30). (Analyse par t-test two tailed).

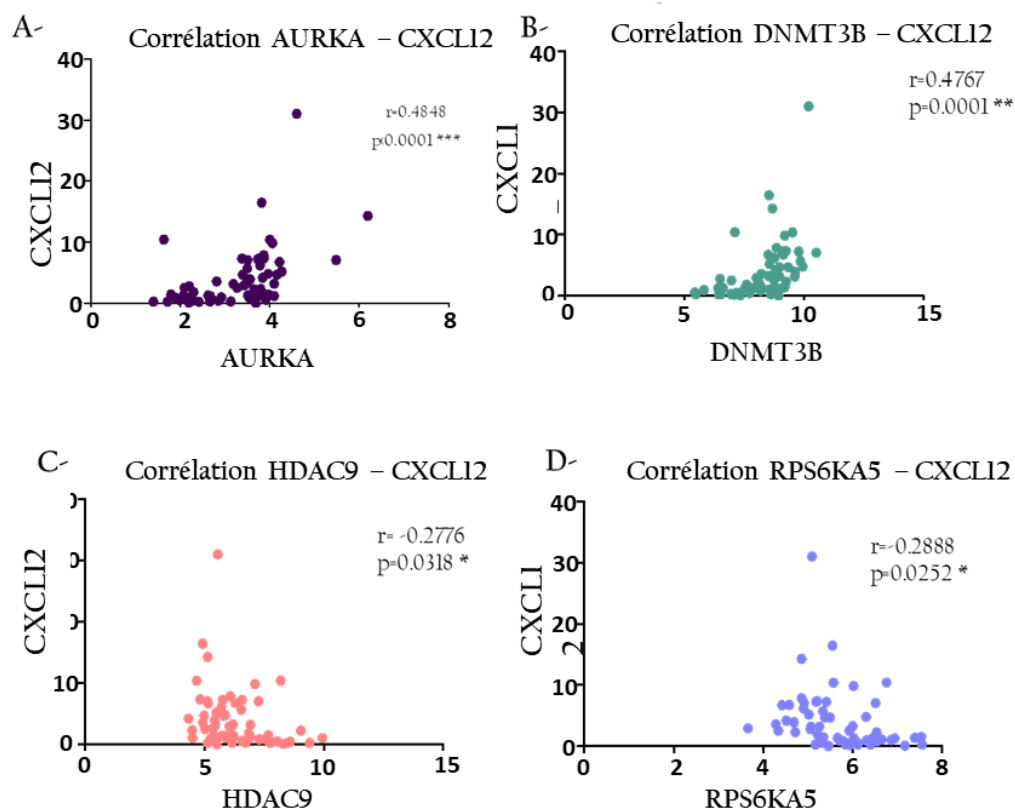


Figure 55 : Corrélations entre l'expression de CXCL12 et : **A) AURKA**, **B) DNMT3B**, **C) HDAC9** et **D) RPS6KA5**.

rassemble 7 centres de recrutement (Marisa et al., 2013). Nous avons séparé les muqueuses saines (n=59) des adénomes (n=47), et les échantillons correspondant au statut moléculaire MSI (n=75) des MSS (n=444). Puis nous avons analysé l'expression des gènes préalablement sélectionnés (par PCR Array) dans ces différents échantillons. L'expression d'AURKA et de DNMT3B augmente entre les muqueuses saines et les adénomes puis entre les adénomes et les tumeurs, alors que l'expression de HDAC9 et RPS6KA diminue entre les muqueuses saines et les adénomes et dans les tumeurs, l'expression est similaire à celle des adénomes (**Figure 53**). Dans la cohorte locale de 30 échantillons, les modifications d'expression sont similaires à celles de la cohorte nationale, avec une augmentation d'expression d'AURKA et de DNMT3B et une baisse d'expression de HDAC9 et RPS6KA (**Figure 54**).

3. Etude de corrélation entre l'expression de CXCL12 et les gènes sélectionnés

Après le criblage réalisé par PCR Array, et la validation dans la cohorte du CIT, des gènes potentiellement impliqués dans la perte d'expression de CXCL12 ont été sélectionnés. La sélection s'est faite à partir de la liste des gènes mentionnés dans le **Tableau 12**. Les gènes retenus sont ceux qui sont dérégulés dans plus de 60% des tumeurs et de façon identique dans les cellules SW480. Il s'agit de DNMT3B, HDAC9, AURKA et RPS6KA5. Des tests de corrélation entre l'expression de ces gènes et l'expression de CXCL12 ont été réalisés afin de démontrer une éventuelle relation entre la dérégulation de ces gènes et la perte d'expression de CXCL12. Pour ces quatre gènes, les résultats indiquent une corrélation positive entre l'expression d'AURKA et DNMT3B et la perte de CXCL12, avec des coefficients de corrélation de 0.4848 et 0.4767 respectivement (**Figure 55A-B**). Ces corrélations sont moins fortes que celle obtenue pour KAT2B (voir article 1). En revanche, les corrélations entre l'expression de CXCL12 et celle de HDAC9 et RPS6KA5 sont négatives ($r = -0.2776$ et 0.2888 respectivement; **Figure 55C-D**).

Conclusion partie II

En conclusion, la perte d'expression de CXCL12 est un processus largement observé dans les tumeurs CCR, et validée dans deux cohortes indépendantes. Pour comprendre l'origine de cette perte, nous avons identifié des gènes dont les modifications d'expression pourraient être corrélées à cette perte d'expression de CXCL12. Après avoir identifié une histone acétyl transférase, KAT2B (ou PCAF ; voir article 1), dont la perte d'expression est corrélée à celle de CXCL12, j'ai identifié d'autres gènes pouvant participer à cette perte d'expression, il s'agit de AURKA, DNMT3B, HDAC9 et RPS6KA5. En effet, le niveau d'expression des ARNm

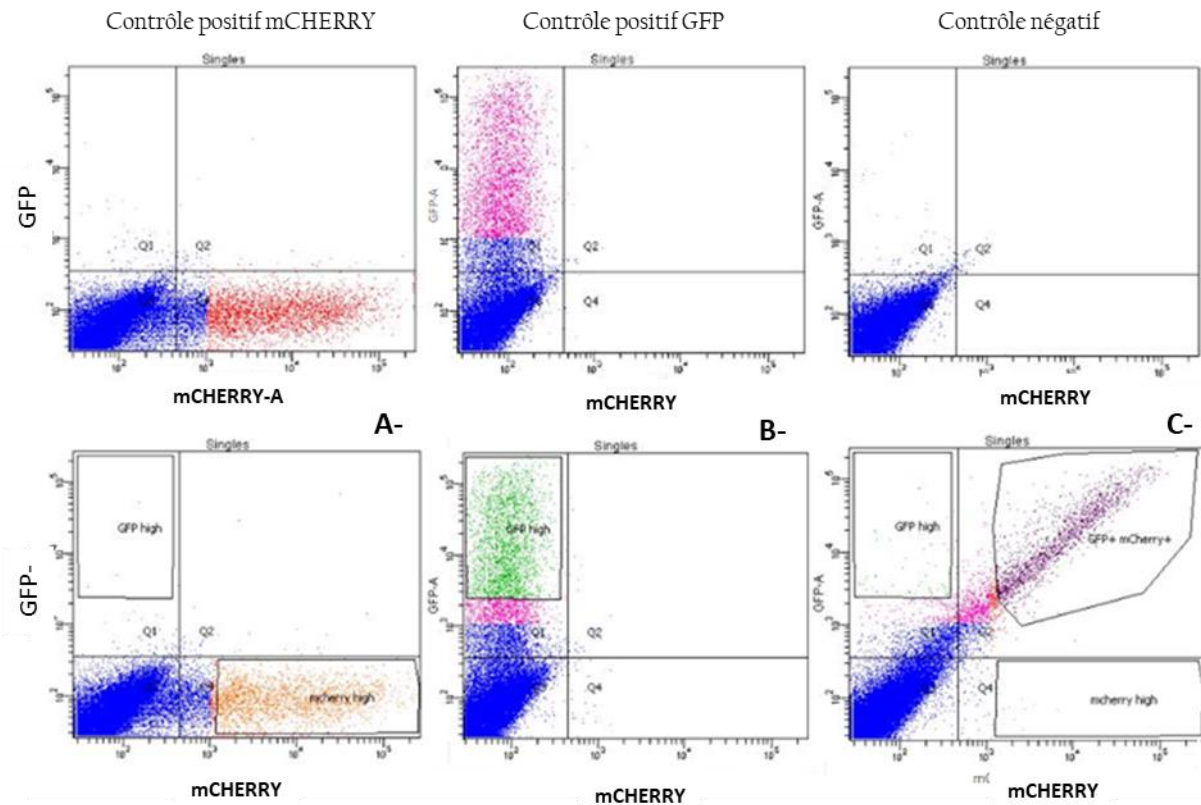


Figure 56 : Tri des cellules SW480 transfectées par pX234 et/ou pX235 selon l'expression de la GFP et/ou mCHERRY.

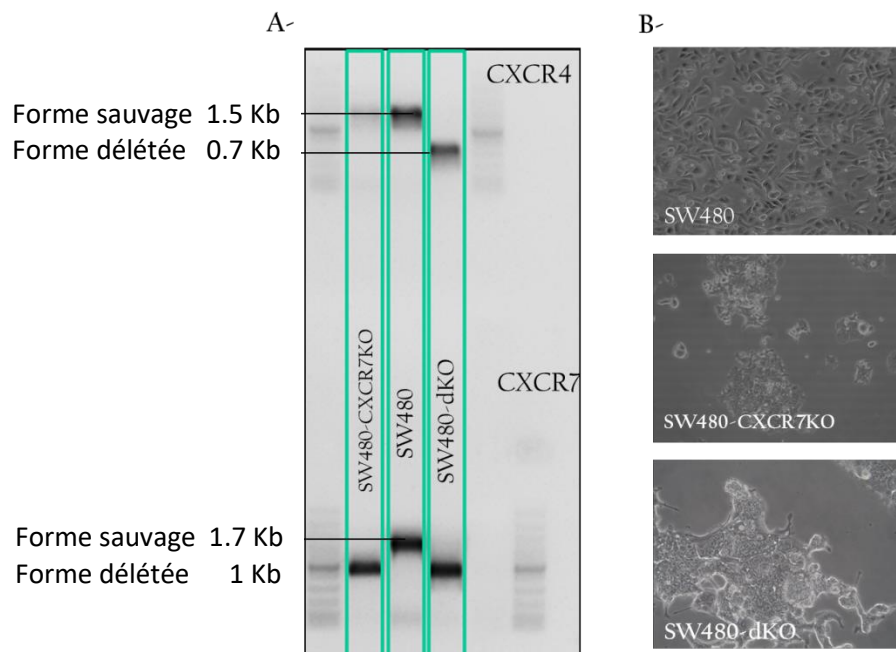


Figure 57 : **A)** Exemple de validation d'un clone délété pour l'exon 2 du gène codant CXCR7 (SW480-CXCR7KO) et d'un clone délété pour l'exon 2 des gènes CXCR4 et CXCR7 (SW480-dKO) par PCR sur gel d'agarose. **B)** Morphologie des cellules invalidées pour les récepteurs de chimiokines CXCR7 et CXCR7/CXCR4 observée en contraste de phase (X25).

de ces gènes est significativement corrélé au niveau d'expression de l'ARNm de CXCL12.

Partie III : Rôle des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans la dissémination métastatique

1. Invalidation de l'exon 2 des gènes codant CXCR4 et CXCR7

Afin de définir les rôles respectifs de CXCR4 et de CXCR7 et l'implication de la signalisation induite par CXCL12 dans la dissémination métastatique, nous avons procédé à l'invalidation des récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7 dans les cellules coliques SW480. Pour cela, nous avons utilisé la technologie CRISPR-Cas9 afin d'introduire la délétion génomique d'une large portion de l'exon 2 des gènes CXCR4 et CXCR7, conduisant à la perte d'expression des récepteurs. La première étape a été de cloner les plasmides pX234 et pX235 permettant l'expression des ARNg et de la Cas9. Après validation du clonage par PCR génomique, et séquençage Sanger (données non montrées), les plasmides ont été transfectés dans les cellules SW480. Chaque plasmide est transfecté seul afin de générer des cellules invalidées pour un des récepteurs (pX234 pour CXCR4 KO et pX235 pour les CXCR7 KO), puis une double transfection est réalisée afin de créer des cellules doublement KO. La transfection transitoire de ces plasmides dans les cellules SW480 permet l'expression des éléments nécessaires à l'invalidation génomique des récepteurs, à savoir, les ARNs guides et la Cas9. En plus de cela, les protéines fluorescentes GFP et mCherry sont également exprimées pour trier les cellules transfectées. En effet, les cellules transfectées par pX234 ou pX235 sont sélectionnées grâce à l'expression de l'eGFP ou la mcherry respectivement. Celles qui ont été doublement transfectées sont sélectionnées par rapport à l'expression des deux protéines (eGFP et mCherry) (**Figure 56**).

1.1. Validation des KO par PCR génomique

Des dilutions limites sont réalisées sur les cellules issues du tri pour être remises en culture dans l'attente d'une expansion clonale. Après 2 à 3 semaines d'ensemencement, plusieurs clones se sont formés (35 clones pour les cellules transfectées par pX235 et 44 clones pour les cellules doublement transfectées). Des PCR sont réalisées à partir de l'ADN génomique des cellules issues de ces clones. Le premier criblage a sélectionné les clones ayant intégré les modifications attendues, à savoir la perte d'une séquence localisée dans l'exon 2 de chaque gène.

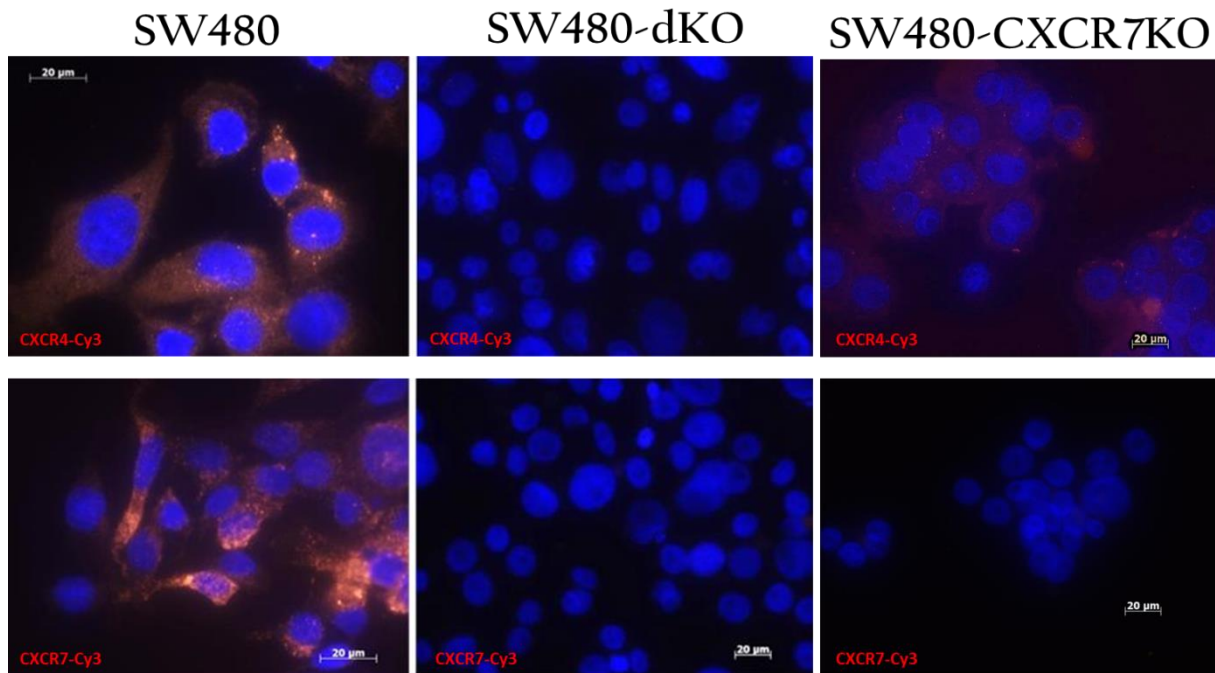


Figure 58 : Marquage des récepteurs CXCR4 et CXCR7 par immunofluorescence dans les cellules SW480, SW480-dKO et SW480-CXCR7KO.

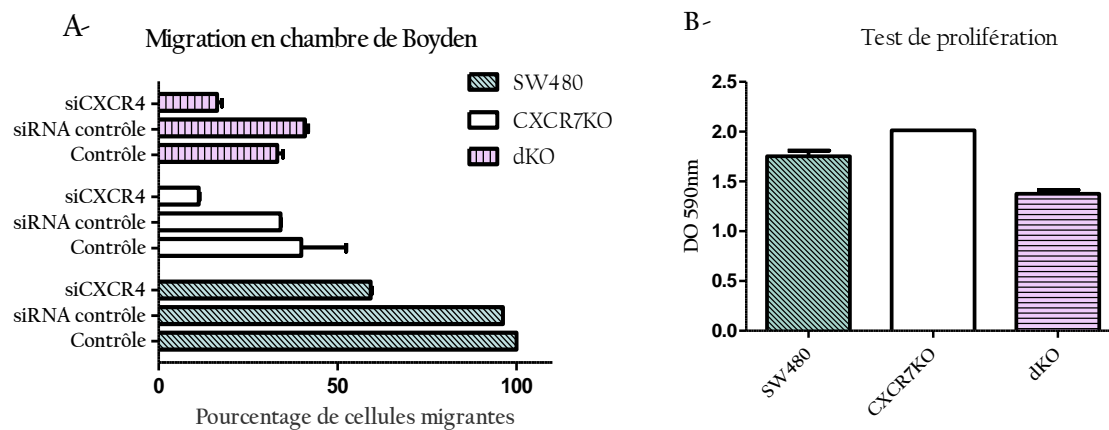


Figure 59 : A) Migration des cellules SW480 sauvages, SW480-CXCR7KO et SW480-dKO en chambre de Boyden. Pourcentage des cellules ayant migré par rapport à la migration des cellules SW480 sauvages (n=3). B) Mesure de la prolifération des cellules SW480, SW480-CXCR7KO et SW480-Dko (n=3).

Au fil des passages, j'ai obtenu 14 clones au total. L'analyse des données de PCR génomique de ces clones (**Figure 57A**) a permis d'identifier des clones délétés de l'exon 2 du gène *CXCR7* et d'autres délétés pour l'exon 2 des deux gènes *CXCR4* et *CXCR7*. En revanche, aucun clone présentant une délétion au niveau du gène *CXCR4* seul n'a été obtenu. Les cellules invalidées pour *CXCR7* seront nommées SW480-CXCR7KO (*CXCR7* Knock Out) et celles doublement invalidées, SW480-dKO (pour double KO).

Lors de l'amplification des clones sélectionnés, nous avons constaté que les cellules transformées ont une morphologie différente des cellules SW480 sauvages. En effet, les cellules invalidées pour *CXCR7* et/ou *CXCR4* prolifèrent en amas cellulaires bien délimités et ne forment pas de tapis cellulaire comme les lignées sauvages (**Figure 57B**).

1.2. Validation des KO par la mesure de l'expression des transcrits

Les ARNm des cellules SW480-CXCR7KO et SW80-dKO ont été analysés par qPCR afin de valider l'efficacité des KO et montrer la perte d'expression des transcrits de *CXCR4* et *CXCR7*. Les résultats confirment la délétion de l'exon 2 puisqu'il n'y a plus d'expression de l'ARNm de *CXCR7* dans les cellules SW480-CXCR7KO et SW80-dKO. En revanche, une expression résiduelle de *CXCR4* est observée dans les cellules SW480-dKO (données non montrées).

1.3. Validation des KO par immunofluorescence

Afin de valider la perte d'expression des récepteurs *CXCR4* et *CXCR7* dans les clones sélectionnés, un marquage des récepteurs a été réalisé par immunofluorescence. Les cellules sauvages SW480 expriment les deux récepteurs alors que pour les cellules KO, les marquages confirment les résultats obtenus par PCR génomique. En effet, aucun marquage de *CXCR4* ni de *CXCR7* n'est observé dans les cellules SW480-dKO et seul un marquage de *CXCR4* a été observé dans les SW480-CXCR7KO (**Figure 58**).

2. Etude fonctionnelle des cellules invalidées pour *CXCR7* ou *CXCR4/CXCR7*

2.1. Migration *in vitro* en chambre de Boyden

Dans le but de déterminer l'impact de l'invalidation des récepteurs *CXCR4* et *CXCR7* sur la migration des cellules tumorales coliques, nous avons réalisé des tests de migration *in vitro* en chambre de Boyden. Les résultats montrent que la perte d'expression de *CXCR7* diminue la migration de 60% ($p=0.04$) et que la migration des cellules invalidées pour l'expression des deux récepteurs est diminuée de 67% ($p=0.006$; **Figure 59-A**). En revanche, la différence de

migration entre les SW480-CXCR7KO et les SW480-dKO n'est pas significative malgré une légère baisse pour les cellules double KO.

La transfection des cellules SW480 sauvages avec un siRNA dirigé contre CXCR4 entraîne une diminution de 40% de la migration (**Figure 59A**). Lorsque les cellules CXCR7KO et dKO dont la migration est déjà diminuée de 60-67% respectivement, sont transfectées avec le siRNA, seules 10 et 15% des cellules CXCR7KO et dKO ont migré par rapport aux cellules SW480 sauvages (**Figure 59-A**).

2.2.Effet sur la prolifération cellulaire

L'impact de l'inactivation de CXCR4 et/ou CXCR7 a été évalué sur la prolifération cellulaire. Les résultats montrent que l'inactivation des récepteurs (CXCR4 et/ou CXCR7) n'a aucun impact sur la prolifération cellulaire puisqu'elle est comparable à celle de la lignée sauvage SW480. Cependant, pour les cellules dKO, la prolifération est faiblement diminuée mais de façon non significative (**Figure 59-B**).

2.3. Effet sur la dissémination métastatique *in vivo*

Le pouvoir métastatique des cellules tumorales invalidées pour les récepteurs CXCR4 et CXCR7 a été évalué *in vivo*.

2.3.1. Mise au point du modèle de développement de métastases *in vivo*

Ce travail a fait l'objet d'un article dont je suis co-auteur et qui est soumis pour publication (Annexe).

La mise au point du modèle de développement de métastases *in vivo* a été réalisée avec les trois lignées coliques humaines SW480, SW620 et HT29. Aucune de ces lignées n'exprime CXCL12 mais expriment les récepteurs CXCR4 et CXCR7.

Afin de valider un modèle reproductible et permettant d'obtenir des métastases, plusieurs combinaisons d'éléments ont été testés: 2 souches de souris immunodéficientes (Nudes et NSG) et deux types d'injections des cellules tumorales (intrasplénique et orthotopique).

Les souris injectées avec les cellules SW480 ont développé des tumeurs orthotopiques plus rapidement que les deux autres lignées. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser les cellules SW480 pour la suite des expériences.

Quel que soit le mode d'injection des cellules, l'utilisation des souris NSG plutôt que les souris nudes, a permis une meilleure prise de greffe avec la formation d'une tumeur et la dissémination des cellules tumorales dans les organes à distance dans un temps plus court.









	Souris Nude		Souris NSG	
Lieu d'injection des cellules tumorales (5.10 ⁶ cellules/100µl)	 Paroi du caecum	 Rate	 Paroi du caecum	 Rate
Prélèvement après	-50 jours	-30 jours	-50 jours	-30 jours
Présence de tumeur primitive	Rare- petite		 Oui	
Présence de métastases	Très rare 		Foie, poumons et ganglions lymphatiques 	
Inconvénients	Prise de greffe très faible + Durée de l'expérience	Carcinose péritonéale	Durée de l'expérience	Carcinose péritonéale 

Figure 60 : Mise au point du modèle de développement de métastases. Deux paramètres sont considérés : la souche de souris (nudes ou NSG) et le site d'injection des cellules tumorales (intrasplénique ou orthotopique).

Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser les souris NSG pour la suite des expériences. Puis nous avons testé deux modes d'injection des cellules tumorales : l'injection intrasplénique et l'injection orthotopique. Dans le premier cas, les cellules tumorales injectées dans la rate, passent dans la circulation sanguine et s'implantent dans divers organes pour former des métastases. Dans le second cas, les cellules sont injectées dans l'organe d'origine de la tumeur. Nous avons ciblé le caecum, plus accessible que la muqueuse du côlon chez la souris. Si le modèle d'injection intrasplénique favorise le développement de métastases hépatiques plus rapidement (~30 jours), il présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, les métastases ne sont pas issues d'une tumeur primitive colique. De plus, une tumeur se développe au site de la splénectomie ainsi qu'une carcinose péritonéale chez une grande majorité des souris, probablement dû à une fuite des cellules tumorales lors de l'injection ou la splénectomie. Le développement de carcinose péritonéale empêche le suivi des souris jusqu'au 30^{ème} de l'expérience (**Figure 60**).

Contrairement au modèle d'injection intrasplénique, le développement de métastases dans le modèle orthotopiques est plus long (~50 jours). Néanmoins, le processus est plus proche de la pathologie humaine puisque les métastases se développent à partir d'une tumeur primitive dans la paroi du caecum et les métastases se forment essentiellement dans le foie, les poumons et les ganglions lymphatiques, sites de dissémination classiquement décrits chez les patients développant un CCR (**Figure 60**).

2.3.2. Détection des tumeurs et des métastases

Pour pouvoir détecter la présence de métastases ou ne pas sacrifier les souris alors qu'aucune métastase ne s'était développée, nous avons envisagé d'utiliser l'imagerie du petit animal. Pour cela, nous avons utilisé la TEP en injectant du FDG-F¹⁸, qui permet de détecter les foyers de cellules métaboliquement actives, dont les cellules tumorales et les métastases. Cependant, cette technique d'imagerie a été abandonnée en raison d'un bruit de fond trop important au niveau de l'abdomen, empêchant de détecter un vrai signal, spécifique d'une masse tumorale.

L'approche de bioluminescence a alors été testée. Pour cela, les cellules SW480 ont été transfectées pour exprimer d'une manière stable le gène exprimant la Firefly luciférase (SW480-Luc). Cette transfection n'a eu aucun impact sur le potentiel métastatique des cellules (résultats non montrés). Ce type d'imagerie donne un signal de bioluminescence après injection du substrat de la luciférase. En revanche, l'intensité du signal n'est pas du tout représentative de la taille de la tumeur. En effet, le signal est influencé par la profondeur de la

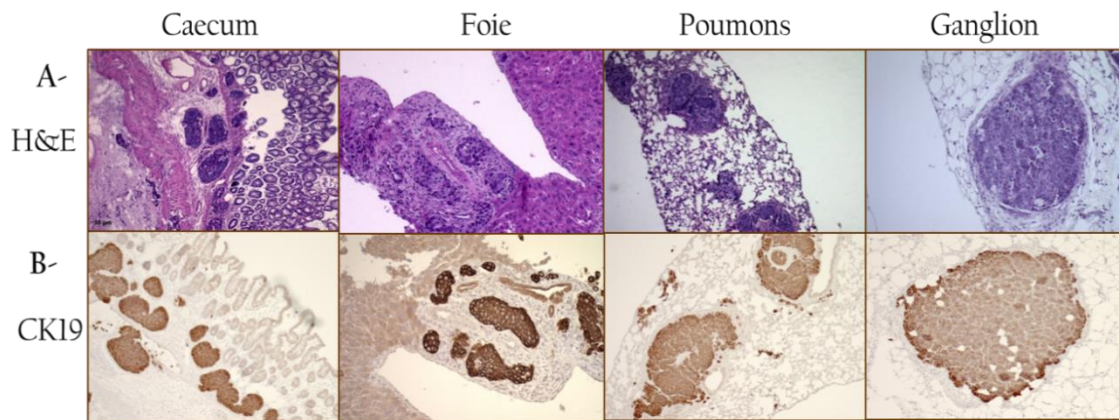


Figure 61 : Détection de cellules tumorales dans le caecum, le foie, les poumons et les ganglions lymphatiques. A) Coloration H&E, B) Marquage IHC de la CK19 (X20).

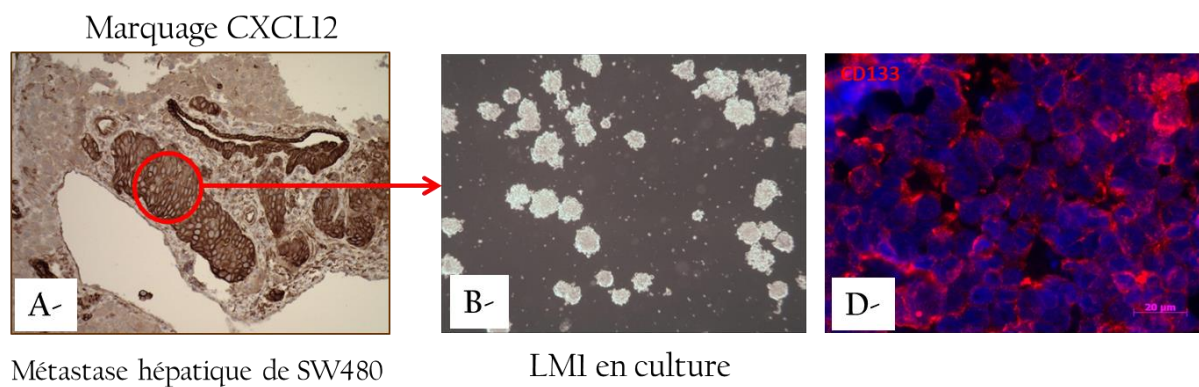


Figure 62 : Métastases hépatiques de SW480. A- Expression évaluée par IHC de CXCL12, dans des cellules SW480 sauvages ayant métastasé dans le foie murin. **B-** Dissociation et mise en culture de cellules SW480 ayant métastasé dans le foie (LM1 pour Liver Metastasis 1). **C-** Marquage de CD133 en immunofluorescence des Cryo-coupes de LM1 (x63).

tumeur et la densité de l'organe contenant les cellules tumorales. Par conséquent, il était probable que nous ne détecterions aucun foyer métastatique alors qu'il pouvait déjà s'être développé et nous avons décidé d'abandonner cette approche d'imagerie. Cependant, les cellules SW480 exprimant la luciférase (SW480-Luc+) ont été gardées pour toutes les expériences réalisées *in vivo* et *in vitro*.

Notre alternative a été de se baser sur des observations physiques (palpation de l'abdomen pour sentir une tumeur caecale), suivi du poids de la souris. Lorsque la taille de tumeur caecale à la palpation a atteint 1cm, nous avons commencé à sacrifier les animaux, prélever le foie, les poumons, les ganglions lymphatiques, les reins, la rate afin de trouver le délai le plus favorable à la formation de métastases, dans le foie et les poumons en priorité.

Il s'avère que le délai minimal pour développer une tumeur primaire caecale qui n'entraîne pas d'occlusion intestinale, et la formation de métastases hépatiques et pulmonaires est en moyenne de 25 jours. Cependant, il est possible de garder les souris jusqu'à 50 jours sans atteindre les points limites (**Figure 60**).

Une coloration H&E des tissus permet de détecter des cellules dont la morphologie et celle du noyau est révélatrice de cellules tumorales (**Figure 61A**). De plus, le marquage de la CK19 humaine, exprimée exclusivement par les cellules épithéliales coliques humaines, confirme l'origine colique épithéliale des cellules métastatiques (**Figure 61B**).

2.3.3. Caractérisation des métastases

Après avoir prélevé les organes présentant des métastases, l'expression de CXCL12 a été évaluée dans les cellules tumorales détectées dans le foie et les poumons. L'expression est restaurée dans les cellules ayant métastasé (**Figure 62-A**). Dans le but de caractériser sur le plan moléculaire, ces cellules ayant métastasé et exprimant CXCL12, les foies ont été prélevés, les cellules dissociées puis mis en culture. Nous avons observé que ces cellules, nommées LM1 pour Liver metastasis 1, prolifèrent spontanément en sphères en culture (**Figure 62-B**). Un marquage de la glycoprotéine CD133, marqueur membranaire de cellules souches tumorales, a été réalisé par immunofluorescence, sur les coupes des sphères. Les cellules expriment le marqueur CD133 au niveau de la membrane (**Figure 62-C**). D'autre part, le maintien de ces cellules dans un milieu complété en sérum (DMEM à 10% de SVF) entraîne la dissociation des sphères et un étalement des cellules, suggérant une différenciation en cellules épithéliales adhérentes (donnée non montrée).

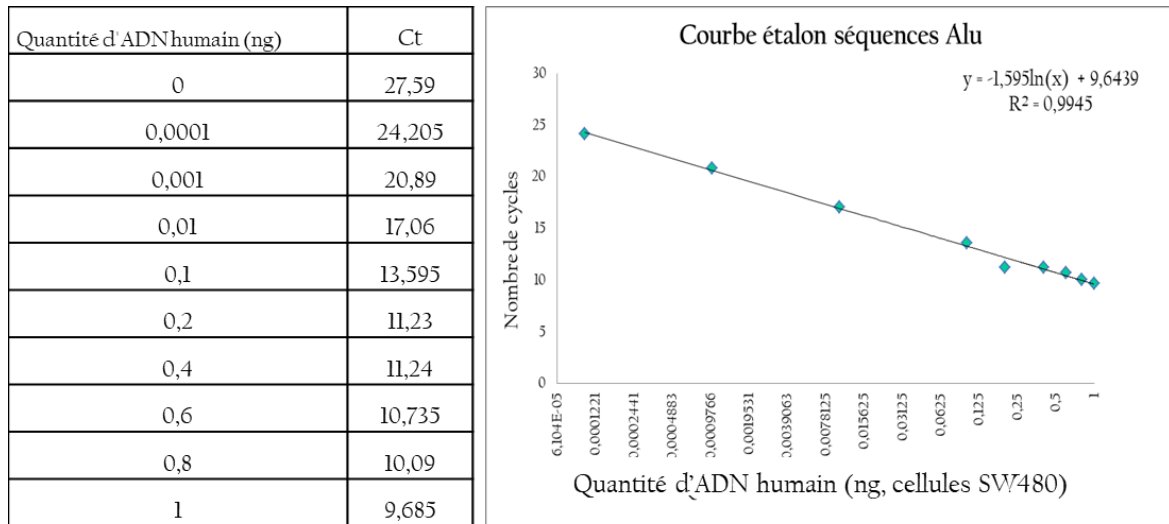


Figure 63 : Courbe étalon pour la quantification des séquences Alu.

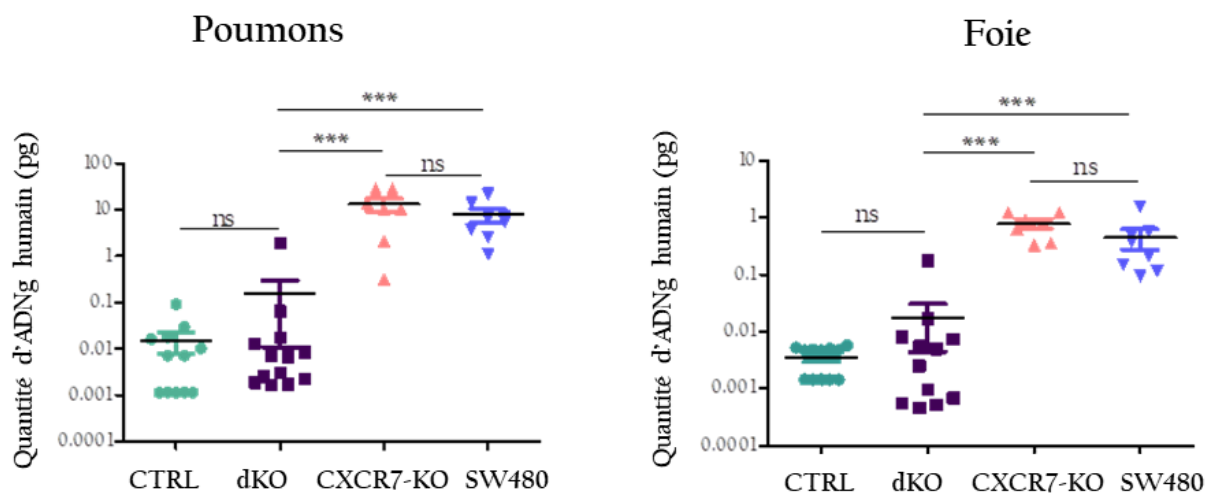


Figure 64 : Présence de métastases coliques humaines dans le foie et les poumons des souris injectées avec les cellules contrôle (milieu DMEM sans cellules) (n=12), SW480-dKO (n=13), SW480-CXCR7KO (n=7) et SW480 (n=8). (t test, Mann-Whiney-two tailed pour les poumons et one tailed pour les foies)

2.3.4. Quantification des métastases par recherche des séquences Alu

Afin de déterminer la quantité d'ADN humain présente dans l'ADN génomique total extrait des organes murins, les séquences Alu ont été amplifiées par PCR quantitative. La quantité d'ADN total dans chaque puits est de 1 ng. En parallèle, une courbe étalon est réalisée en amplifiant la séquence Alu à partir de quantités croissantes d'ADN (de 0,00001ng à 1ng) (**Figure 63**).

2.3.4.1. Mise au point de la quantification

Pour pouvoir évaluer l'impact d'un traitement ou de cellules génétiquement modifiées sur la formation de métastases, il est nécessaire de connaître la quantité de cellules tumorales humaines dans les organes murins. Pour cela, j'ai mis au point au laboratoire, avec un autre doctorant de l'équipe, la quantification de séquences « Alu » spécifiques du génome humain. Dans un premier temps, nous avons montré que le seuil de détection d'une quantité donnée d'ADN humain n'est pas influencé par la quantité d'ADN murin présente dans le mélange. L'ADN murin est détecté comme l'eau, après ~27,6 cycles d'amplification (contrôle négatif) et 1ng d'ADN humain est la quantité maximale choisie pour la gamme de calibration (détection après ~9,6 cycles d'amplification).

2.3.4.2. Quantification des métastases

Les souris NSG injectées dans la paroi du caecum avec les cellules SW480, SW480-CXCR7KO ou SW480-dKO sont mises à mort 50 jours après l'injection. La présence d'une tumeur primaire caecale et de métastases hépatiques et/ou pulmonaires est constatée pendant le prélèvement des organes à l'échelle macroscopique.

Le résultat de quantification par recherche des séquences Alu pour chaque type cellulaire injecté est présenté dans la (**Figure 64**). La quantification des séquences Alu indique la présence de métastases présentes en quantité identique chez les souris injectées avec les cellules SW480 sauvages et avec les cellules invalidées pour CXCR7 (en moyenne ~10pg/ng d'ADNg total dans les poumons et 1pg dans le foie). Cette observation est valable quel que soit l'organe. D'une manière intéressante, chez les souris injectées avec les cellules invalidées pour les deux récepteurs (dKO), la prise tumorale est très faible puisqu'1/13 souris seulement, a développé une tumeur caecale de taille très réduite (taille d'une tête d'épingle). De ce fait, les données de ce groupe sont plutôt comparables à celles du groupe de souris contrôle n'ayant reçu aucune injection et n'ayant développé aucune métastase.

Conclusion partie III

En conclusion, des cellules tumorales coliques invalidées pour CXCR7 et invalidées pour CXCR7 et CXCR4 ont été obtenues. En revanche, il n'a pas été possible d'obtenir des cellules invalidées pour CXCR4. Les cellules invalidées ont une capacité migratoire réduite et un changement de leur morphologie puisqu'elles prolifèrent sous forme d'amas cellulaire bien délimité et non sous forme de tapis. Cet aspect est plus caractéristique de cellules non migrantes.

J'ai également validé un modèle *in vivo* permettant le développement d'une tumeur primitive caecale et des métastases hépatiques et pulmonaires chez des souris immunodéprimées. Le suivi du développement tumoral et métastatique par imagerie n'ayant pas été satisfaisant, nous avons privilégié une observation macroscopique et histologique des organes, et la quantification des métastases par la quantification des séquences Alu. Grâce à cette quantification, j'ai montré que les cellules invalidées pour CXCR7 gardent le même potentiel métastatique que les cellules sauvages alors que les cellules invalidées pour CXCR4 et CXCR7 ne développent pas de tumeur caecale et aucune métastase à distance.

DISCUSSION

Discussion et perspectives

Partie I et II

Bien que les patients ayant un CCR bénéficient d'une résection de la tumeur primaire, les patients ayant été diagnostiqués pour une tumeur métastasée ont une survie réduite et leur décès est dû à la progression/résistance de ces métastases.

Une tumeur CCR se forme à partir de l'accumulation de mutations touchant des gènes tels qu'*APC*, *KRAS* et *p53* ainsi que des modifications épigénétiques inhibant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs. A l'heure actuelle, deux hypothèses expliqueraient la formation des métastases : soit certaines cellules tumorales possèdent d'emblée des propriétés invasives, soit elles les acquièrent avec la progression tumorale. Quelle que soit l'hypothèse, il est nécessaire de comprendre les mécanismes qui confèrent aux cellules, la capacité de devenir invasives, pour pouvoir proposer des thérapies adaptées aux stades métastatiques. Parmi les facteurs influençant la formation de métastases, les chimiokines jouent un rôle clés dans plusieurs types de cancers. Un tropisme particulier entre les cellules tumorales et le site de métastases est influencé, entre autres, par les interactions entre les récepteurs de chimiokines exprimés par les cellules tumorales et leurs ligands disponibles dans les sites cibles de métastases. Le récepteur CXCR4 est le premier récepteur de chimiokines décrit comme étant impliqué dans la formation de métastases dans de nombreux cancers, dont le cancer mammaire (Müller et al., 2001), le mélanome (Robledo et al., 2001) ou le cancer bronchique (Cavallaro, 2013) vers des organes qui expriment le ligand CXCL12 à des taux élevés.

L'expression de CXCL12 dans les tumeurs coliques est controversée avec des travaux indiquant soit une augmentation (Greijer et al., 2008) soit une diminution (Wendt et al., 2006, 2008) de son expression. Une autre étude décrit les deux types d'expression dans des CCR, une forte expression étant associée à une survie plus courte et une faible expression à une survie plus longue (Akishima-Fukasawa et al., 2009). De même, l'expression de CXCR4 est inversement corrélée à celle de son ligand CXCL12 dans le CCR avec une surexpression de CXCR4 quand l'expression de CXCL12 est diminuée ou absente, et inversement (Brand et al., 2005). Chez la souris, lorsque des cellules myéloïdes issues de la moelle osseuse (Bone Marrow Derived Cells, BMDC), recrutées au site d'une tumeur primaire prostatique ou mammaire, sont invalidées pour l'expression de CXCR4, le développement de micro- et macro-métastases est ralenti (Hiratsuka et al., 2011). Les cellules cancéreuses mammaires

exprimant CXCR4 métastasent dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie, et la moelle osseuse où le ligand CXCL12 est exprimé à des taux élevés. Quant aux cellules cancéreuses coliques exprimant CXCR4, elles métastasent principalement dans le foie où CXCL12 est exprimé par les cellules endothéliales, les cellules de Küpffer (macrophages hépatiques) et quelques myofibroblastes (Gassmann et al., 2009; Matsusue et al., 2009). De plus, un traitement par un anticorps anti-CXCL12 réduit significativement la formation de métastases dans un modèle murin de xénogreffes orthotopiques de cancer mammaire (Zhong et al., 2013).

Une perte d'expression de CXCL12 dans les cellules tumorales coliques a été décrite par Wendt et coll., (2006) qui démontrent également que cette perte est liée à une méthylation du promoteur de CXCL12. Nos travaux ont montré que dans une cohorte locale et une cohorte nationale, l'expression de CXCL12 est effectivement, fortement diminuée dans les tumeurs coliques et à une fréquence élevée (Romain et al., 2017). De plus, cette perte d'expression est observée au stade précoce d'adénome (Romain et al., 2017). Si cette perte d'expression est liée à une méthylation du promoteur de CXCL12 (Wendt et al., 2006), nous avons montré qu'elle est majoritairement due à un défaut d'acétylation (Romain et al., 2017). Grâce aux travaux réalisés durant ma thèse, j'ai montré que l'acétylation peut être régulée, entre autres, par l'histone acétyl transférase KAT2B dont l'expression est diminuée dans les CCR alors que son expression forcée dans des lignées coliques, permet la réexpression de CXCL12 (Romain et al., 2017).

Cependant, nous avons également identifié d'autres gènes dérégulés dans les tumeurs pouvant être en relation avec la perte d'expression de CXCL12. Les dérégulations observées concernant aussi bien les tumeurs de notre cohorte locale que celle du CIT, que nous avons considérée comme une cohorte de validation.

Par exemple, j'ai montré que le gène codant la DNA méthyltransférase DNMT3B, qui est une méthyl transférase impliquée dans la méthylation de novo (Bestor, 2000), est surexprimée dans les tumeurs coliques et son expression est inversement corrélée à celle de CXCL12. La surexpression protéique de DNMT3B a déjà été décrite comme étant associée à la perte d'expression de CXCL12 dans des lignées coliques (Wendt et al., 2006). En plus du CCR, DNMT3B est également surexprimée dans d'autres cancers comme celui du rein et de la vessie (Robertson et al., 1999), où elle est associée à l'hyperméthylation des îlots CpG dans les régions codantes, notamment des gènes suppresseurs de tumeurs. De plus, sa surexpression dans les cellules épithéliales coliques saines est associée à un risque plus élevé

de formation d'adénomes colorectaux (Ho et al., 2015). La fréquence élevée de méthylation de promoteurs de nombreux gènes dans les cancers humains, fait des inhibiteurs de DNMTs (comme le 5-azacytidine et 2'-deoxy-5-azacytidine) des outils très efficaces dans le traitement des cancers, seuls ou en association avec de la chimiothérapie, de la thérapie ciblée ou de l'immunothérapie (Ahuja et al., 2014).

Parmi les autres gènes dont l'expression est dérégulée dans les tumeurs coliques, j'ai identifié le gène codant pour l'histone deacétylase HDAC9, sous exprimée dans 63% des tumeurs. Cette sous-expression est corrélée à celle de CXCL12, suggérant que HDAC9 ne contrôle pas directement la déacétylation du promoteur de CXCL12. En effet, plusieurs études montrent que HDAC9 est impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales et la croissance des vaisseaux sanguins en réprimant l'expression du miR-17-92 décrit comme un facteur anti-angiogénique (Kaluza et al., 2013). De même, dans des biopsies mammaires, l'expression de HDAC9 était significativement augmentée dans les tumeurs du sous-type basal, en corrélation avec l'expression de SOX9 et est associée à un mauvais pronostic (Lapierre et al., 2016). Une autre étude met également en évidence que HDAC9 est un médiateur de l'invasion cellulaire et de l'angiogenèse dans les cellules cancéreuses mammaires triple négatives en modulant l'expression de miR-206 (Salgado et al., 2018). Par conséquent, dans ces études, HDAC9 a un rôle pro-tumoral et la perte de son expression serait plutôt en faveur d'une diminution du potentiel tumoral des cellules. Dans notre cas, la perte d'expression d'HDAC9 lèverait l'inhibition de facteurs agissant en faveur de la perte d'expression de CXCL12.

Dans notre étude, nous avons également observé une augmentation de l'expression d'AURKA dans 76% des tumeurs analysées. Cette protéine fait partie de la famille des serine/thréonine kinases. A l'état physiologique, elle est exprimée de manière ubiquitaire et contrôle la mitose et la méiose et son activité culmine pendant la transition de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire. La surexpression d'AURKA est démontrée dans plusieurs cancers où elle agit comme un oncogène (Borum-Auensen et al., 2007). Dans les tumeurs solides, y compris dans le CCR, il a été montré qu'elle favorise la progression du cycle cellulaire, active la survie et les signalisations anti-apoptotiques, et contribue également à l'EMT (Yan et al., 2016). De plus, la dérégulation de la balance entre AURKA et les protéines de la famille p53 induit une défaillance des points de contrôle du cycle cellulaire, favorisant l'instabilité chromosomique, la croissance cellulaire et la résistance aux traitements (Yan et al., 2016). Dans le CCR, la surexpression d'AURKA a été associée à la progression des adénomes colorectaux vers des carcinomes, en particulier dans les CCR de phénotype

CIN (Yan et al., 2016). De plus, la surexpression d'AURKA est significativement corrélée à la taille des adénomes (Kasap et al., 2016). Ces observations sont en accord avec nos résultats puisque la surexpression d'AURKA est déjà présente au stade adénome.

Plusieurs études ont démontré que l'expression d'AURKA stabilise la β -caténine et une baisse d'expression entraîne une inhibition de la voie Wnt (Dutta-Simmons et al., 2009). L'implication de cette kinase dans la tumorigenèse et l'invasion tumorale en fait une cible potentielle de thérapie anti-cancéreuse. En revanche, le rôle d'AURKA dans la régulation de la transcription est très peu étudié. Quelques études démontrent que AURKA phosphoryle H3S10 et active la transcription de plusieurs gènes dont des cyclines (Kim et al., 2016). Dans notre étude, AURKA ne pourrait pas agir directement sur l'expression de CXCL12 puisque son expression est inversement corrélée à celle de CXCL12. D'autres expériences complémentaires sont nécessaires pour valider l'implication d'AURKA dans l'expression de CXCL12. D'après le rôle de cette enzyme dans l'initiation du développement tumorale ainsi que son rôle potentiel dans la perte d'expression de CXCL12 dans le même mécanisme, il est probable que ces deux événements surviennent d'une manière indépendante.

L'expression du gène *RPS5KA5* (Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5), codant pour l'enzyme MSK1 (Mitogen and Stress-activated protein Kinase 1) est également dérégulée dans les tumeurs analysées. En effet, 70% des tumeurs sous expriment le gène *RPS6KA5*. Cette enzyme se lie à des effecteurs de la voie MAPK tels que p38 et ERK1 et induit leur translocation dans le noyau (Deak et al., 1998). MSK1 est également capable d'activer des facteurs de transcription et des protéines nucléaires tels que p65 (sous-unité de NF-KB), CREB, ATF1. Parmi les protéines cibles nucléaires, les histones H3 sont phosphorylées par MSK1 pour recruter des facteurs nécessaires à la transcription (Adewumi et al., 2018). Dans les noyaux, MSK1 est inclus dans un complexe protéique avec d'autres facteurs comme PCAF, également sous exprimé dans les tumeurs coliques. En réponse à divers stimuli (facteurs de croissance par exemple), le complexe de MSK1 est recruté au niveau des promoteurs des gènes cibles par des facteurs de transcription tels que Elk-1, induisant la phosphorylation de H3, le remodelage de la chromatine et l'induction de la transcription génique. MSK1 joue un rôle important dans l'induction de l'expression des gènes précoces impliqués dans l'oncogenèse tels que les gènes de la famille AP-1, FOS et JUN.

Une surexpression de MSK1 a été décrite dans les CCR et elle est associée à une survie globale plus courte (Fu et al., 2017). Ces mêmes auteurs ont montré que l'inactivation de MSK1 dans des lignées de CCR diminue la prolifération, la migration, l'invasion et augmente la sensibilité au 5-FU (Fu et al., 2017). En revanche, dans les tumeurs mammaires, la surexpression de MSK1 a été associée à une survie globale plus longue (Pu et al., 2018).

Les résultats décrivant une surexpression de MSK1 dans le CCR ne sont pas concordants avec nos résultats, puisque nous avons observé une sous expression dans les tumeurs coliques. Cette différence pourrait être expliquée par la nature des échantillons analysés. En effet, dans l'étude de Fu et coll, (2017), plus que la moitié des tumeurs étaient des tumeurs rectales et le phénotype des tumeurs n'a pas été précisé. Or, dans notre étude, seules des tumeurs issues du côlon et de phénotype CIN ont été analysées. Cependant, la relation entre la sous expression de MSK1 et la perte d'expression de CXCL12 doit être explorée.

Toutes les enzymes sélectionnées lors de cette étude, sont potentiellement impliquées dans la perte d'expression de CXCL12. Mais le rôle de chacune de ces enzymes dans ce mécanisme en particulier, doit être validé par des études fonctionnelles de perte ou gain de fonction (siRNA, shRNA, ou plasmide d'expression). Il serait intéressant d'évaluer le rôle de ces enzymes sur la méthylation, l'acétylation ou la phosphorylation du promoteur de CXCL12, notamment pour PCAF. En effet, nous avons montré que la surexpression de cette enzyme dans les cellules SW480 rétablit l'expression de CXCL12. Mais son effet sur la réacétylation du promoteur de ce gène reste à confirmer.

Partie III

Des études ont montré que la surexpression de CXCR4 est corrélée à un taux de métastases élevé et une survie réduite. Les travaux réalisés sur des CCR dans notre laboratoire ont montré que CXCR4 et CXCR7 sont surexprimés par les cellules tumorales coliques humaines dans les stades avancés (III et IV) par rapport aux stades précoces (I et II) (Romain et al., 2014). Cette surexpression est régulée par l'hypoxie et par le facteur HIF1- α (Romain et al., 2014).

La surexpression de CXCR4 associée à la perte d'expression de CXCL12 a été associée à une survie sans progression plus courte (Stanisavljević et al., 2016). Selon les travaux de la littérature, l'augmentation de l'expression des récepteurs aux stades tardifs pourrait faciliter soit l'invasion, soit le développement de métastases ou les deux processus (Sun et al., 2010; Zeelenberg et al., 2003). Par conséquent, suite aux travaux de l'équipe et pour comprendre le rôle respectif de CXCR4 et CXCR7 dans le processus de dissémination tumorale et/ou le développement de métastases au site d'implantation, nous avons utilisé la technologie Crispr-Cas9 pour générer des cellules invalidées pour l'un ou pour les deux récepteurs en réalisant une délétion quasi-totale de l'exon 2 codant pour les deux récepteurs. Cette approche a permis de produire des cellules KO pour CXCR7 et CXCR4/CXCR7 (SW480-dKO). Cependant, les résultats de validation génomique par qPCR indiquent qu'il y a une expression résiduelle de CXCR4 dans tous les clones dKO (CXCR4 et CXCR7). De façon surprenante, il n'a pas été possible d'obtenir des clones invalidés pour CXCR4. Ceci suggère que l'invalidation de CXCR4 pourrait être létale et que la survie des clones SW480-dKO s'expliquerait par la présence résiduelle d'une forme normale de CXCR4. Ceci est en accord avec une étude dans laquelle un KO de CXCR4 a été réalisé dans des cellules Jurkat et pour lesquelles, seulement 45% des cellules ont été invalidées pour CXCR4, malgré l'utilisation de 10 ARN guides différents (Hou et al., 2015). Par conséquent, une expression résiduelle de CXCR4 serait suffisante pour préserver la survie cellulaire.

Suite à mon travail, un séquençage des régions ciblées par les ARN guides a été réalisé et a confirmé l'existence d'une forme sauvage résiduelle de CXCR4 dans le génome des cellules SW480-dKO. La Cas9 n'a pas été capable de faire une délétion de tous les allèles. En effet, le caryotype des cellules SW480 indique que le chromosome 2 est triploïde, voire plus, puisqu'un travail montre que la lignée SW480 est au moins bi-clonale avec un type cellulaire de morphologie épithéliale et dont le chromosome 2 est triploïde et l'autre, de morphologie

ronde, qui est hexaploïde (Tomita et al., 1992). Nous avons confirmé ces observations avec notre lignée pour laquelle l'analyse du caryotype indique l'existence d'au moins deux clones avec un chromosome 2 triploïde.

En perspective, des expériences d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) utilisant des sondes spécifiques du gène codant CXCR4 et CXCR7 sur le chromosome 2 permettront de savoir s'il persiste effectivement un/des allèle(s) sauvage(s) dans les cellules. Si tel est le cas, Il est possible d'envisager de refaire une délétion par Crispr-Cas9 ou d'utiliser des shRNA ciblant CXCR4 dans les cellules partiellement invalidées.

Cependant, il est également envisageable de poursuivre les expériences avec ces clones puisque j'ai montré que la perte d'expression de CXCR7 dans les cellules KO CXCR7 ou dKO, altère les capacités migratoires des cellules *in vitro*. De plus, si les cellules simples KO CXCR7 et les dKO ayant une forme résiduelle de CXCR4, sont transfectées avec un siRNA ciblant CXCR4, la diminution de la migration est augmentée et est similaire dans les deux types de clones. Par conséquent, même une délétion incomplète du gène codant CXCR4 entraîne des altérations fonctionnelles dans les cellules.

Lorsque la capacité de ces cellules à former des métastases est évaluée *in vivo*, j'ai constaté que la perte d'expression de CXCR7 n'a pas d'effet sur la quantité de métastases hépatiques et pulmonaires puisque des quantités similaires d'ADN humain identifié via les séquences *Alu*, est identique après injection des cellules SW480 sauvages ou SW480-CXCR7KO. Ceci suggère que la seule perte d'expression de CXCR7 n'est pas suffisante pour bloquer la dissémination, l'implantation et/ou le développement des métastases *in vivo*.

Avec les cellules invalidées pour les deux récepteurs, la dissémination métastatique n'a pas pu être évaluée puisque la prise de greffe dans le caecum a été quasi nulle (1 souris sur 13) même 50 jours après l'injection des cellules. Cette absence de prise de greffe n'est pas due à un taux de prolifération réduit dans les cellules. En effet, des tests de prolifération ont montré que l'invalidation des récepteurs n'impacte pas la capacité proliférative de ces cellules. De plus, lorsque ces cellules (SW480-dKO) sont injectées en greffe ectopique, elles prolifèrent et forment rapidement une tumeur. Par conséquent, il semblerait que dans l'environnement colique, l'expression de CXCR4 soit nécessaire pour permettre l'adhésion des cellules à la muqueuse colique, condition non nécessaire en greffe ectopique.

Une observation intéressante est la capacité de cellules issues d'une métastase hépatique à former spontanément des sphères après mise en culture. Parmi les caractéristiques des cellules souches cancéreuses est leur capacité à proliférer en culture sous forme de sphères flottantes

(Rybak et al., 2011), mais également d'exprimer des marqueurs de cellules souches cancéreuses tels que le CD133 (Jing et al., 2015) ou le CD44, ALDH1 (Tirino et al., 2013). Dans nos cultures, ces cellules expriment le marqueur CD133 et expriment toujours la luciférase, elles sont donc bien issues de la tumeur primaire développée à partir des cellules SW480 (SW480-luc) injectées dans la paroi du caecum.

Comme perspective, il serait intéressant de réaliser des dilutions limites à partir des cellules LM1 dissociées et de suivre la formation de sphères à partir de chaque cellule unique. La question sera de savoir si chaque cellule a la capacité de proliférer en sphères ou si parmi toutes les cellules dissociées, seules certaines ont des caractéristiques de cellules souches cancéreuses.

Une autre particularité de ces cellules est la ré-expression de CXCL12 aussi bien dans la métastase hépatique (expression protéique) que dans les sphères en culture (expression de l'ARNm). Par conséquent, l'analyse du profil d'expression des gènes de régulation épigénétique par PCR array, permettra de comparer le profil d'expression de ces gènes dans la lignée sauvage (n'exprimant pas CXCL12) et dans les cellules issues des sphères (exprimant CXCL12). La comparaison pourra indiquer quels sont les gènes potentiellement impliqués dans la ré-expression de CXCL12.

Les interactions intercellulaires définissent la polarité des cellules épithéliales et servent à la communication intercellulaire. Une perte d'expression des protéines impliquées dans ces interactions conduit à une perte de polarité des cellules, facilitant leur mobilité (Wei and Huang, 2013). Dans des études préliminaires utilisant l'immunofluorescence pour localiser des protéines d'interactions cellulaires comme la paxilline (adhésions focales), la E-cadhérine (jonctions adhérentes) et la claudine-1 (jonctions serrées), j'ai observé une délocalisation du cytoplasme vers la membrane de ces protéines dans les cellules CXCR7KO et dKO. De plus, un marquage qui était ponctiforme devenait continu. Ces profils d'expression sont caractéristiques d'une diminution de la capacité migratoire des cellules (Horwitz and Parsons, 1999; Jockusch et al., 1995).

En perspective, les capacités d'invasion des cellules CXCR7KO et dKO seront analysées dans des chambres de Boyden, avec les cellules cultivées sur un tapis de matrigel (MEC artificielle). Les deux récepteurs ont été décrits comme régulateurs de l'extra- et l'intravasation, processus indispensables à la dissémination et à l'implantation dans les organes à distance (Gassmann et al., 2009; Zabel et al., 2011). La capacité des cellules SW480 sauvages, CXCR7KO et dKO à traverser la paroi des cellules endothéliales sera

évaluée en tapissant des chambres de Boyden avec des cellules endothéliales, comme les cellules HUVEC.

D'autre part, l'étude des protéines d'interactions cellulaires sera complétée par l'analyse de l'expression d'autres protéines telles que la β -caténine, la Focal Adhesion Kinase (FAK), la cortactine spécifiquement exprimée dans les invadopodes afin de définir si les cellules expriment un phénotype migratoire et/ou invasif.

Il est connu que la réorganisation du cytosquelette est nécessaire à la formation des structures cytoplasmiques impliquées dans la migration cellulaire, et la famille Rho de petites GTPases constitue un facteur clé de ce processus (Burridge, 2017). Les lamellipodes fournissent la force qui propulse la cellule vers l'avant pendant la migration et l'activité de Rac 1 est nécessaire à la formation des lamellipodes via la polymérisation et l'extension de l'actine (Nobes and Hall, 1995). Il a été démontré que l'épuisement de Rac1 supprime la formation d'adhérences focales dans des cellules de carcinome (Guo et al., 2006). Par conséquent, l'activité des membres de la famille Rho, dont Rac1/2/3, pourra être mesurée dans les différents clones cellulaires et une diminution de cette activité dans les cellules KO sera en faveur d'une diminution des capacités migratoires et invasives.

CONCLUSION

Conclusion générale

Ces travaux ont permis d'identifier des processus épigénétiques à l'origine de la perte de CXCL12 dans les CCR. En effet, j'ai montré que cette perte d'expression est due, en partie, à une méthylation du promoteur du gène *CXCL12*. Cette méthylation est présente dans seulement 36% des tumeurs de la cohorte locale et la cohorte plus large, de validation. Mais le phénomène majeur impliqué dans la perte d'expression est un défaut d'acétylation des histones du promoteur du gène *CXCL12*. J'ai également identifié un des facteurs de régulation de l'acétylation des histones, l'histone acétyl transférase PCAF, dont l'expression est fortement diminuée dans les CCR. La réexpression forcée de cette enzyme rétablit l'expression de CXCL12 dans la lignée colique SW480. D'autres facteurs régulant potentiellement l'expression de CXCL12 ont également été identifiés (AURKA, RPS6KA5, HDAC9 et DNMT3B).

Pour pouvoir mieux définir les rôles respectifs du récepteur CXCR4 et CXCR7 dans la dissémination tumorale, j'ai utilisé la technologie Crispr cas9 pour générer des clones invalidés pour l'expression de CXCR4, CXCR7 ou les deux dans la lignée colique humaine SW480. J'ai obtenu des clones invalidés pour l'expression de CXCR7 et pour l'expression de CXCR4 et CXCR7. En revanche, je n'ai pas réussi à obtenir de cellules invalidées pour CXCR4. Après avoir sélectionné un clone de chaque condition, j'ai montré que la capacité migratoire des cellules est diminuée lorsque l'expression de CXCR4 est diminuée, alors que l'absence de CXCR7 est sans effet.

Ce travail a également permis de valider un modèle de greffe orthotopique permettant le développement de métastases hépatiques et pulmonaires à partir d'une tumeur primaire caecale chez la souris. Pour quantifier ces métastases, j'ai développé une méthode de quantification sur la base de la présence de séquences *Alu*, spécifiques du génome humain. Chez ces souris, contrairement à ce qui a été observé *in vitro*, l'invalidation du récepteur CXCR7 n'a pas modifié le potentiel métastatique des cellules. Par contre, les cellules invalidées pour les deux récepteurs perdent leur capacité à adhérer à la muqueuse colique et ne forment pas de tumeur primaire.

Les pistes ouvertes grâce à ces résultats nécessiteront certes d'être approfondies mais elles ouvrent cependant le champ au développement d'approches thérapeutiques qui viseraient à bloquer l'interaction des récepteurs CXCR4/CXCR7 avec leur ligand.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Adewumi, I., López, C., and Davie, J.R. (2018). Mitogen and stress- activated protein kinase regulated gene expression in cancer cells. *Adv. Biol. Regul.*

Ahuja, N., Easwaran, H., and Baylin, S.B. (2014). Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors. *J. Clin. Invest.* *124*, 56–63.

Akeus, P., Langenes, V., von Mentzer, A., Yrlid, U., Sjöling, Å., Saksena, P., Raghavan, S., and Quiding-Järbrink, M. (2014). Altered chemokine production and accumulation of regulatory T cells in intestinal adenomas of APC(Min/+) mice. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII 63*, 807–819.

Akishima-Fukasawa, Y., Nakanishi, Y., Ino, Y., Moriya, Y., Kanai, Y., and Hirohashi, S. (2009). Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* *132*, 202–210; quiz 307.

Allis, C.D., and Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* *17*, 487–500.

Ansel, K.M., Ngo, V.N., Hyman, P.L., Luther, S.A., Förster, R., Sedgwick, J.D., Browning, J.L., Lipp, M., and Cyster, J.G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* *406*, 309–314.

Aoki, K., Tamai, Y., Horiike, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2003). Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in *Apc⁺/Delta716 Cdx2^{+/-}* compound mutant mice. *Nat. Genet.* *35*, 323–330.

Azzouz, L.L., and Sharma, S. (2018). Physiology, Large Intestine. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Babu, M., Durga Devi, T., Mäkinen, P., Kaikkonen, M., Lesch, H.P., Junttila, S., Laiho, A., Ghimire, B., Gyenesei, A., and Ylä-Herttuala, S. (2015). Differential Promoter Methylation of Macrophage Genes Is Associated With Impaired Vascular Growth in Ischemic Muscles of Hyperlipidemic and Type 2 Diabetic Mice: Genome-Wide Promoter Methylation Study. *Circ. Res.* *117*, 289–299.

Bachelierie, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A.M., Combadiere, C., Farber, J.M., Graham, G.J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A.H., Locati, M., Luster, A.D., et al. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* *66*, 1–79.

Bachelierie, F., Graham, G.J., Locati, M., Mantovani, A., Murphy, P.M., Nibbs, R., Rot, A., Sozzani, S., and Thelen, M. (2015). An atypical addition to the chemokine receptor nomenclature: IUPHAR Review 15. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 3945–3949.

Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., and Schettini, G. (2002). Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J. Neurochem.* *82*, 1311–1329.

- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y.C., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 35760–35766.
- Balch, C., Ramapuram, J.B., and Tiwari, A.K. (2017). The Epigenomics of Embryonic Pathway Signaling in Colorectal Cancer. *Front. Pharmacol.* 8, 267.
- Baretti, M., and Azad, N.S. (2018). The role of epigenetic therapies in colorectal cancer. *Curr. Probl. Cancer.*
- Barker, C.E., Thompson, S., O’Boyle, G., Lortat-Jacob, H., Sheerin, N.S., Ali, S., and Kirby, J.A. (2017). CCL2 nitration is a negative regulator of chemokine-mediated inflammation. *Sci. Rep.* 7, 44384.
- Bensaad, K., and Vousden, K.H. (2007). p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.* 17, 286–291.
- Benson, L.J., Phillips, J.A., Gu, Y., Parthun, M.R., Hoffman, C.S., and Annunziato, A.T. (2007). Properties of the type B histone acetyltransferase Hat1: H4 tail interaction, site preference, and involvement in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 282, 836–842.
- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2395–2402.
- Bernard and Christopher, *World Cancer Rreport* (2014)
- Biswas, S., and Rao, C.M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.* 837, 8–24.
- Bjerling, P., Silverstein, R.A., Thon, G., Caudy, A., Grewal, S., and Ekwall, K. (2002). Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2170–2181.
- Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723–1729.
- Bogani, C., Ponziani, V., Guglielmelli, P., Desterke, C., Rosti, V., Bosi, A., Le Bousse-Kerdilès, M.-C., Barosi, G., Vannucchi, A.M., and Myeloproliferative Disorders Research Consortium (2008). Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1920–1930.
- Boivin, G.P., Washington, K., Yang, K., Ward, J.M., Pretlow, T.P., Russell, R., Besselsen, D.G., Godfrey, V.L., Doetschman, T., Dove, W.F., et al. (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124, 762–777.
- Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132, 463–473.
- Bonavita, O., Mollica Poeta, V., Massara, M., Mantovani, A., and Bonecchi, R. (2018). Regulation of hematopoiesis by the chemokine system. *Cytokine* 109, 76–80.

- Brand, S., Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Diebold, J., Otte, J.-M., Göke, B., and Eichhorst, S.T. (2005). CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp. Cell Res.* *310*, 117–130.
- Brevik, A., Joshi, A.D., Corral, R., Onland-Moret, N.C., Siegmund, K.D., Marchand, L.L., Baron, J.A., Martinez, M.E., Haile, R.W., Ahnen, D.J., et al. (2010). Polymorphisms in Base Excision Repair Genes as Colorectal Cancer Risk Factors and Modifiers of the Effect of Diets High in Red Meat. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* *19*, 3167–3173.
- Budinska, E., Popovici, V., Tejpar, S., D’Ario, G., Lapique, N., Sikora, K.O., Di Narzo, A.F., Yan, P., Hodgson, J.G., Weinrich, S., et al. (2013). Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J. Pathol.* *231*, 63–76.
- Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E.T., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., et al. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.* *203*, 2201–2213.
- Burrige, K. (2017). Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J.* *284*, 3355–3361.
- Burt, R. (2007). Inheritance of Colorectal Cancer. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* *4*, 293–300.
- Burum-Auensen, E., De Angelis, P.M., Schjølberg, A.R., Kravik, K.L., Aure, M., and Clausen, O.P.F. (2007). Subcellular localization of the spindle proteins Aurora A, Mad2, and BUBR1 assessed by immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *55*, 477–486.
- Busillo, J.M., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of CXCR4 Signaling. *Biochim. Biophys. Acta* *1768*, 952–963.
- BW, S., and CP, W. World Cancer Report 2014.
- Campanella, G.S.V., Colvin, R.A., and Luster, A.D. (2010). CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3. *PloS One* *5*, e12700.
- Cao, B., Yang, Y., Pan, Y., Jia, Y., Brock, M.V., Herman, J.G., and Guo, M. (2013). Epigenetic silencing of CXCL14 induced colorectal cancer migration and invasion. *Discov. Med.* *16*, 137–147.
- Cardona, A.E., Sasse, M.E., Liu, L., Cardona, S.M., Mizutani, M., Savarin, C., Hu, T., and Ransohoff, R.M. (2008). Scavenging roles of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased levels of ligand in circulation and tissues. *Blood* *112*, 256–263.
- Cavallaro, S. (2013). CXCR4/CXCL12 in non-small-cell lung cancer metastasis to the brain. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 1713–1727.
- Ceradini, D.J., and Gurtner, G.C. (2005). Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc. Med.* *15*, 57–63.

- Cheng, X.-S., Li, Y.-F., Tan, J., Sun, B., Xiao, Y.-C., Fang, X.-B., Zhang, X.-F., Li, Q., Dong, J.-H., Li, M., et al. (2014). CCL20 and CXCL8 synergize to promote progression and poor survival outcome in patients with colorectal cancer by collaborative induction of the epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* *348*, 77–87.
- Cheung, K.J., Padmanaban, V., Silvestri, V., Schipper, K., Cohen, J.D., Fairchild, A.N., Gorin, M.A., Verdone, J.E., Pienta, K.J., Bader, J.S., et al. (2016). Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E854-863.
- Choe, H., Moore, M.J., Owens, C.M., Wright, P.L., Vasilieva, N., Li, W., Singh, A.P., Shakri, R., Chitnis, C.E., and Farzan, M. (2005). Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and Plasmodium vivax Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). *Mol. Microbiol.* *55*, 1413–1422.
- Chow, M.T., and Luster, A.D. (2014). Chemokines in cancer. *Cancer Immunol. Res.* *2*, 1125–1131.
- Clocchiatti, A., Florean, C., and Brancolini, C. (2011). Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumourigenesis. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 1833–1846.
- Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., and Wolberger, C. (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 1037–1043.
- Craig, A., Mai, J., Cai, S., and Jeyaseelan, S. (2009). Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* *77*, 568–575.
- 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.
- Décaillot, F.M., Kazmi, M.A., Lin, Y., Ray-Saha, S., Sakmar, T.P., and Sachdev, P. (2011). CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J. Biol. Chem.* *286*, 32188–32197.
- Dent, G., Loweth, S.C., Hasan, A.M., and Leslie, F.M. (2014). Synergic production of neutrophil chemotactic activity by colonic epithelial cells and eosinophils. *Immunobiology* *219*, 793–797.
- Ding, L., Lan, Z., Xiong, X., Ao, H., Feng, Y., Gu, H., Yu, M., and Cui, Q. (2018). The Dual Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., et al. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* *355*, 1041–1047.
- Douillard, J.-Y., Rong, A., and Sidhu, R. (2013). RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *369*, 2159–2160.

- Druliner, B.R., Ruan, X., Sicotte, H., O'Brien, D., Liu, H., Kocher, J.-P.A., and Boardman, L. (2018). Early genetic aberrations in patients with sporadic colorectal cancer. *Mol. Carcinog.* *57*, 114–124.
- Drury, L.J., Wendt, M.K., and Dwinell, M.B. (2010). CXCL12 chemokine expression and secretion regulates colorectal carcinoma cell anoikis through Bim-mediated intrinsic apoptosis. *PLoS One* *5*, e12895.
- Duquenne, C., Psomas, C., Gimenez, S., Guigues, A., Carles, M.-J., Barbuat, C., Lavigne, J.-P., Sotto, A., Reynes, J., Guglielmi, P., et al. (2014). The two human CXCR4 isoforms display different HIV receptor activities: consequences for the emergence of X4 strains. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 4188–4194.
- Dutta-Simmons, J., Zhang, Y., Gorgun, G., Gatt, M., Mani, M., Hideshima, T., Takada, K., Carlson, N.E., Carrasco, D.E., Tai, Y.-T., et al. (2009). Aurora kinase A is a target of Wnt/beta-catenin involved in multiple myeloma disease progression. *Blood* *114*, 2699–2708.
- Duval, A., and Hamelin, R. (2002). Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* *62*, 2447–2454.
- Edelmann, W., Yang, K., Kuraguchi, M., Heyer, J., Lia, M., Kneitz, B., Fan, K., Brown, A.M., Lipkin, M., and Kucherlapati, R. (1999). Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer Res.* *59*, 1301–1307.
- Evans, J.P., Sutton, P.A., Winiarski, B.K., Fenwick, S.W., Malik, H.Z., Vimalachandran, D., Tweedle, E.M., Costello, E., Palmer, D.H., Park, B.K., et al. (2016). From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *98*, 94–105.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *6*, 479–507.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767.
- 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.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* *75*, 1027–1038.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatischev, S.F., and Wang, H.L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* *3*, 153–173.
- Fu, X., Fan, X., Hu, J., Zou, H., Chen, Z., Liu, Q., Ni, B., Tan, X., Su, Q., Wang, J., et al. (2017). Overexpression of MSK1 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in colorectal cancer. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* *49*, 683–691.

- Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M., and Joung, J.K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 32, 279–284.
- Fukuma, N., Akimitsu, N., Hamamoto, H., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., and Sekimizu, K. (2003). A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 137–139.
- Galés, C. (2012). [G-protein-coupled receptors plasticity and signalling]. *Med. Sci. MS* 28, 883–885.
- Gallois, C., Laurent-Puig, P., and Taieb, J. (2016). Methylator phenotype in colorectal cancer: A prognostic factor or not? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 99, 74–80.
- Ganai, S.A., Bandy, S., Farooq, Z., and Altaf, M. (2016). Modulating epigenetic HAT activity for reinstating acetylation homeostasis: A promising therapeutic strategy for neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* 166, 106–122.
- Garkavtsev, I., Kozin, S.V., Chernova, O., Xu, L., Winkler, F., Brown, E., Barnett, G.H., and Jain, R.K. (2004). The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* 428, 328–332.
- Gassmann, P., Haier, J., Schlüter, K., Domikowsky, B., Wendel, C., Wiesner, U., Kubitz, R., Engers, R., Schneider, S.W., Homey, B., et al. (2009). CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. *Neoplasia N. Y. N* 11, 651–661.
- Geigl, J.B., Obenaus, A.C., Schwarzbraun, T., and Speicher, M.R. (2008). Defining “chromosomal instability.” *Trends Genet. TIG* 24, 64–69.
- Gerrits, H., van Ingen Schenau, D.S., Bakker, N.E.C., van Disseldorp, A.J.M., Strik, A., Hermens, L.S., Koenen, T.B., Krajnc-Franken, M.A.M., and Gossen, J.A. (2008). Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genes. N. Y. N* 2000 46, 235–245.
- Giantonio, B.J. (2006). Bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) in second- and third-line settings. *Semin. Oncol.* 33, S15-18.
- Goel, A., Nagasaka, T., Arnold, C.N., Inoue, T., Hamilton, C., Niedzwiecki, D., Compton, C., Mayer, R.J., Goldberg, R., Bertagnolli, M.M., et al. (2007). The CpG Island Methylator Phenotype and Chromosomal Instability Are Inversely Correlated in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 132, 127–138.
- González-Martín, A., Gómez, L., Lustgarten, J., Mira, E., and Mañes, S. (2011). Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4(+) and CD8(+) T cells. *Cancer Res.* 71, 5455–5466.
- Goodenberger, M., and Lindor, N.M. (2011). Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy. *J. Clin. Gastroenterol.* 45, 488–500.
- Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., and Jeltsch, A. (2005). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J. Biol. Chem.* 280, 13341–13348.

- Grady, W.M., Myeroff, L.L., Swinler, S.E., Rajput, A., Thiagalingam, S., Lutterbaugh, J.D., Neumann, A., Brattain, M.G., Chang, J., Kim, S.J., et al. (1999). Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* *59*, 320–324.
- de Gramont, A., Vignoud, J., Tournigand, C., Louvet, C., André, T., Varette, C., Raymond, E., Moreau, S., Le Bail, N., and Krulik, M. (1997). Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *33*, 214–219.
- de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., et al. (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *18*, 2938–2947.
- Gregorette, I.V., Lee, Y.-M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* *338*, 17–31.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* *129*, 626–638.
- Greijer, A.E., Delis-van Diemen, P.M., Fijneman, R.J.A., Giles, R.H., Voest, E.E., van Hinsbergh, V.W.M., and Meijer, G.A. (2008). Presence of HIF-1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *452*, 535–544.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 659–702.
- de Guillebon, E., Roussille, P., Frouin, E., and Tougeron, D. (2015). Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers. *World J. Gastrointest. Oncol.* *7*, 95–101.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* *21*, 1350–1356.
- Gundry, J., Glenn, R., Alagesan, P., and Rajagopal, S. (2017). A Practical Guide to Approaching Biased Agonism at G Protein Coupled Receptors. *Front. Neurosci.* *11*, 17.
- Guo, F., Debidia, M., Yang, L., Williams, D.A., and Zheng, Y. (2006). Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J. Biol. Chem.* *281*, 18652–18659.
- 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. Baltim. Md* *1950* *163*, 2368–2372.
- Gupta, P.B., Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2009). Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat. Med.* *15*, 1010–1012.

- Hamelin, R., Chalastanis, A., Colas, C., El Bchiri, J., Mercier, D., Schreurs, A.-S., Simon, V., Svrcek, M., Zaanani, A., Borie, C., et al. (2008). [Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]. *Bull. Cancer (Paris)* 95, 121–132.
- Hattermann, K., and Mentlein, R. (2013). An infernal trio: the chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in tumor biology. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* 195, 103–110.
- Heesen, M., Berman, M.A., Höpken, U.E., Gerard, N.P., and Dorf, M.E. (1997). Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms. *J. Immunol. Baltim. Md* 158, 3561–3564.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.
- Hernandez, L., Magalhaes, M.A., Coniglio, S.J., Condeelis, J.S., and Segall, J.E. (2011). Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 13, R128.
- Hewit, K.D., Fraser, A., Nibbs, R.J.B., and Graham, G.J. (2014). The N-terminal region of the atypical chemokine receptor ACKR2 is a key determinant of ligand binding. *J. Biol. Chem.* 289, 12330–12342.
- Hiratsuka, S., Duda, D.G., Huang, Y., Goel, S., Sugiyama, T., Nagasawa, T., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 302–307.
- Ho, V., Ashbury, J.E., Taylor, S., Vanner, S., and King, W.D. (2015). Gene-specific DNA methylation of DNMT3B and MTHFR and colorectal adenoma risk. *Mutat. Res.* 782, 1–6.
- Höpken, U.E., Wengner, A.M., Loddenkemper, C., Stein, H., Heimesaat, M.M., Rehm, A., and Lipp, M. (2007). CCR7 deficiency causes ectopic lymphoid neogenesis and disturbed mucosal tissue integrity. *Blood* 109, 886–895.
- Horwitz, A.R., and Parsons, J.T. (1999). Cell migration--movin' on. *Science* 286, 1102–1103.
- Hou, P., Chen, S., Wang, S., Yu, X., Chen, Y., Jiang, M., Zhuang, K., Ho, W., Hou, W., Huang, J., et al. (2015). Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci. Rep.* 5, 15577.
- Huang, X., Guo, B., Liu, S., Wan, J., and Broxmeyer, H.E. (2018). Neutralizing negative epigenetic regulation by HDAC5 enhances human haematopoietic stem cell homing and engraftment. *Nat. Commun.* 9, 2741.
- Hughes, C.E., and Nibbs, R.J.B. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 0.
- Hurwitz, H. (2004). Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 4 Suppl 2, S62-68.

- Hüsemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G., et al. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* *13*, 58–68.
- Issa, J.-P.J., Shen, L., and Toyota, M. (2005). CIMP, at last. *Gastroenterology* *129*, 1121–1124.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* *333*, 1300–1303.
- Janssens, R., Struyf, S., and Proost, P. (2017). The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell. Mol. Immunol.*
- Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2044–2058.
- Jeltsch, A., and Jurkowska, R.Z. (2014). New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 310–318.
- Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, H.B., Ferrari, P., Duijnhoven, F.J.B. van, Norat, T., Pischon, T., Jansen, E.H.J.M., Slimani, N., Byrnes, G., Rinaldi, S., et al. (2010). Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *BMJ* *340*, b5500.
- Jin, S., Tong, T., Fan, W., Fan, F., Antinore, M.J., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K.L., Rajasekaran, B., et al. (2002). GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene* *21*, 8696–8704.
- Jing, F., Kim, H.J., Kim, C.H., Kim, Y.J., Lee, J.H., and Kim, H.R. (2015). Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *Int. J. Oncol.* *46*, 1582–1588.
- Jockusch, B.M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rüdiger, M., Schlüter, K., Stanke, G., and Winkler, J. (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 379–416.
- Jones, S., Chen, W.-D., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerenwinkel, N., Antal, T., Traulsen, A., Nowak, M.A., Siegel, C., Velculescu, V.E., et al. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 4283–4288.
- Kaiser, S., Jurkowski, T.P., Kellner, S., Schneider, D., Jeltsch, A., and Helm, M. (2017). The RNA methyltransferase Dnmt2 methylates DNA in the structural context of a tRNA. *RNA Biol.* *14*, 1241–1251.
- 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.
- Kaluza, D., Kroll, J., Gesierich, S., Manavski, Y., Boeckel, J.-N., Doebele, C., Zelent, A., Rössig, L., Zeiher, A.M., Augustin, H.G., et al. (2013). Histone deacetylase 9 promotes

angiogenesis by targeting the antiangiogenic microRNA-17-92 cluster in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 533–543.

Kanai, Y., Ushijima, S., Nakanishi, Y., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. (2003). Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers. *Cancer Lett.* *192*, 75–82.

Karouzakis, E., Rengel, Y., Jünger, A., Kolling, C., Gay, R.E., Michel, B.A., Tak, P.P., Gay, S., Neidhart, M., and Ospelt, C. (2011). DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Genes Immun.* *12*, 643–652.

Karpf, A.R., and Matsui, S. (2005). Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 8635–8639.

Kasap, E., Gerceker, E., Boyacıoğlu, S.Ö., Yuceyar, H., Yıldırım, H., Ayhan, S., and Korkmaz, M. (2016). The potential role of the NEK6, AURKA, AURKB, and PAK1 genes in adenomatous colorectal polyps and colorectal adenocarcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *37*, 3071–3080.

Kawashima, D., Oshitani, N., Jinno, Y., Watanabe, K., Nakamura, S., Higuchi, K., and Arakawa, T. (2005). Augmented expression of secondary lymphoid tissue chemokine and EB11 ligand chemokine in Crohn's disease. *J. Clin. Pathol.* *58*, 1057–1063.

Kelly, H., and Goldberg, R.M. (2005). Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 4553–4560.

Kierszenbaum, A.L. (2002). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology* (Mosby).

Kikuchi, S., Yamada, D., Fukami, T., Maruyama, T., Ito, A., Asamura, H., Matsuno, Y., Onizuka, M., and Murakami, Y. (2006). Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* *106*, 1751–1758.

Kim, S.-R., Kim, K.-B., Chae, Y.-C., Park, J.W., and Seo, S.-B. (2016). H3S10 phosphorylation-mediated transcriptional regulation by Aurora kinase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *469*, 22–28.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 89–97.

Kobaek-Larsen, M., Thorup, I., Diederichsen, A., Fenger, C., and Hoitinga, M.R. (2000). Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comp. Med.* *50*, 16–26.

Kopetz, S., Hoff, P.M., Morris, J.S., Wolff, R.A., Eng, C., Glover, K.Y., Adinin, R., Overman, M.J., Valero, V., Wen, S., et al. (2010). Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 453–459.

- Kuipers, E.J., Grady, W.M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., van de Velde, C.J.H., and Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 15065.
- Kuraguchi, M., Yang, K., Wong, E., Avdievich, E., Fan, K., Kolodner, R.D., Lipkin, M., Brown, A.M., Kucherlapati, R., and Edelmann, W. (2001). The distinct spectra of tumor-associated Apc mutations in mismatch repair-deficient Apc1638N mice define the roles of MSH3 and MSH6 in DNA repair and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 61, 7934–7942.
- Kurrey, N.K., Jalgaonkar, S.P., Joglekar, A.V., Ghanate, A.D., Chaskar, P.D., Doiphode, R.Y., and Bapat, S.A. (2009). Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2059–2068.
- Lai, C.-S., Tsai, M.-L., Cheng, A.-C., Li, S., Lo, C.-Y., Wang, Y., Xiao, H., Ho, C.-T., Wang, Y.-J., and Pan, M.-H. (2011). Chemoprevention of colonic tumorigenesis by dietary hydroxylated polymethoxyflavones in azoxymethane-treated mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 278–290.
- Laird, P.W., Jackson-Grusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S.L., Jung, W.E., Li, E., Weinberg, R.A., and Jaenisch, R. (1995). Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81, 197–205.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 168, 670–691.
- Lao, V.V., and Grady, W.M. (2011). Epigenetics and Colorectal Cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 686–700.
- Lapierre, M., Linares, A., Dalvai, M., Duraffourd, C., Bonnet, S., Boulahtouf, A., Rodriguez, C., Jalaguier, S., Assou, S., Orsetti, B., et al. (2016). Histone deacetylase 9 regulates breast cancer cell proliferation and the response to histone deacetylase inhibitors. *Oncotarget* 7, 19693–19708.
- Laurent-Puig, P., Agostini, J., and Maley, K. (2010). [Colorectal oncogenesis]. *Bull. Cancer (Paris)* 97, 1311–1321.
- Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Lubner, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 372, 2509–2520.
- Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P., and Wang, J.M. (2004). Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease. *Mol. Immunol.* 1, 10.
- Le Voyer, T.E., Sigurdson, E.R., Hanlon, A.L., Mayer, R.J., Macdonald, J.S., Catalano, P.J., and Haller, D.G. (2003). Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21, 2912–2919.
- Lee, J.S., Frevert, C.W., Wurfel, M.M., Peiper, S.C., Wong, V.A., Ballman, K.K., Ruzinski, J.T., Rhim, J.S., Martin, T.R., and Goodman, R.B. (2003). Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 5244–5251.

- Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 18677–18680.
- Leggett, B., and Whitehall, V. (2010). Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 138, 2088–2100.
- Legler, D.F., and Thelen, M. (2016). Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function. *Chimia* 70, 856–859.
- Legler, D.F., and Thelen, M. (2018). New insights in chemokine signaling. *F1000Research* 7, 95.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- 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, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., and Singh, R.K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 3369–3376.
- Li, B., Wang, Z., Wu, H., Xue, M., Lin, P., Wang, S., Lin, N., Huang, X., Pan, W., Liu, M., et al. (2018a). Epigenetic Regulation of CXCL12 Plays a Critical Role in Mediating Tumor Progression and the Immune Response In Osteosarcoma. *Cancer Res.* 78, 3938–3953.
- Li, F., Xue, Z.-Y., Yuan, Y., Huang, S.-S., Fan, Y.-H., Zhu, X., and Wei, L. (2018b). Upregulation of CXCR4 through promoter demethylation contributes to inflammatory hyperalgesia in rats. *CNS Neurosci. Ther.* 24, 947–956.
- Liang, J.J., Bissett, I., Kalady, M., Bennet, A., and Church, J.M. (2013). Importance of serrated polyps in colorectal carcinogenesis. *ANZ J. Surg.* 83, 325–330.
- Lièvre, A., and Laurent-Puig, P. (2008). [Predictive factors of response to anti-EGFR treatments in colorectal cancer]. *Bull. Cancer (Paris)* 95, 133–140.
- Lin, K., Zou, R., Lin, F., Zheng, S., Shen, X., and Xue, X. (2014). Expression and effect of CXCL14 in colorectal carcinoma. *Mol. Med. Rep.* 10, 1561–1568.
- Liu, B., Parsons, R., Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Lynch, H.T., Watson, P., Jass, J.R., Dunlop, M., Wyllie, A., Peltomäki, P., et al. (1996). Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat. Med.* 2, 169–174.
- Loeb, L.A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 61, 3230–3239.
- Loeb, L.A. (2016). Human Cancers Express a Mutator Phenotype: Hypothesis, Origin, and Consequences. *Cancer Res.* 76, 2057–2059.
- Loos, T., Mortier, A., Gouwy, M., Ronsse, I., Put, W., Lenaerts, J.-P., Van Damme, J., and Proost, P. (2008). Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation. *Blood* 112, 2648–2656.

- Lucchesi, W., Brady, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Russ, R., and Farrell, P.J. (2008). Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2. *J. Virol.* 82, 7456–7466.
- Luker, K.E., and Luker, G.D. (2006). Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett.* 238, 30–41.
- Luker, K.E., Gupta, M., and Luker, G.D. (2008). Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation. *FASEB J.* 23, 823–834.
- Luster, A.D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436–445.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., and Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9448–9453.
- Ma, X., Shang, F., Zhu, W., and Lin, Q. (2017). CXCR4 expression varies significantly among different subtypes of glioblastoma multiforme (GBM) and its low expression or hypermethylation might predict favorable overall survival. *Expert Rev. Neurother.* 17, 941–946.
- Manfredi, S., Lepage, C., Hatem, C., Coatmeur, O., Faivre, J., and Bouvier, A.-M. (2006). Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann. Surg.* 244, 254–259.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Schioppa, T., Saccani, A., Allavena, P., and Sica, A. (2004). Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Novartis Found. Symp.* 256, 137–145; discussion 146-148, 259–269.
- Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.-C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., et al. (2013a). Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* 10, e1001453.
- Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.-C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., et al. (2013b). Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* 10, e1001453.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., and Rodriguez Yoldi, M.J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Matsusue, R., Kubo, H., Hisamori, S., Okoshi, K., Takagi, H., Hida, K., Nakano, K., Itami, A., Kawada, K., Nagayama, S., et al. (2009). Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. *Ann. Surg. Oncol.* 16, 2645–2653.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the

- Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1263–1284.
- Mendelson, A., and Frenette, P.S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* *20*, 833–846.
- Meng, W., Xue, S., and Chen, Y. (2018). The role of CXCL12 in tumor microenvironment. *Gene* *641*, 105–110.
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* *111*, 485–491.
- Metzemaekers, M., Van Damme, J., Mortier, A., and Proost, P. (2016). Regulation of Chemokine Activity - A Focus on the Role of Dipeptidyl Peptidase IV/CD26. *Front. Immunol.* *7*, 483.
- Miao, Z., Luker, K.E., Summers, B.C., Berahovich, R., Bhojani, M.S., Rehemtulla, A., Kleer, C.G., Essner, J.J., Nasevicius, A., Luker, G.D., et al. (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15735–15740.
- Mighell, A.J., Markham, A.F., and Robinson, P.A. (1997). Alu sequences. *FEBS Lett.* *417*, 1–5.
- Mishra, P., Banerjee, D., and Ben-Baruch, A. (2011). Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *J. Leukoc. Biol.* *89*, 31–39.
- Molon, B., Ugel, S., Del Pozzo, F., Soldani, C., Zilio, S., Avella, D., De Palma, A., Mauri, P., Monegal, A., Rescigno, M., et al. (2011). Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* *208*, 1949–1962.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* *247*, 322–324.
- Moyret-Lalle, C., Pommier, R., Bouard, C., Nouri, E., Richard, G., and Puisieux, A. (2016). [Cancer cell plasticity and metastatic dissemination]. *Med. Sci. MS* *32*, 725–731.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001a). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50–56.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001b). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50–56.
- Nagasawa, T. (2000). A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* *72*, 408–411.
- Nagasawa, T. (2014). CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *92*, 433–439.
- 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.
- Neuville, A., Nicolet, C., Meyer, N., Schneider, A., Legrain, M., Brigand, C., Duclos, B., Bachellier, P., Oudet, P., Bellocq, J.-P., et al. (2011). Histologic characteristics of non-microsatellite-unstable colon adenomas correlate with distinct molecular patterns. *Hum. Pathol.* 42, 244–253.
- Nibbs, R.J.B., and Graham, G.J. (2013). Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 815–829.
- Nishimura, M., Kuboi, Y., Muramoto, K., Kawano, T., and Imai, T. (2009). Chemokines as novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173, 350–356.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Nojadedh, J.N., Behrouz Sharif, S., and Sakhinia, E. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J.* 17, 159–168.
- Nör, J.E., Christensen, J., Liu, J., Peters, M., Mooney, D.J., Strieter, R.M., and Polverini, P.J. (2001). Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer Res.* 61, 2183–2188.
- Nosho, K., Shima, K., Irahara, N., Kure, S., Baba, Y., Kirkner, G.J., Chen, L., Gokhale, S., Hazra, A., Spiegelman, D., et al. (2009). DNMT3B expression might contribute to CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 3663–3671.
- O’Connell, J.B., Maggard, M.A., and Ko, C.Y. (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1420–1425.
- Ogino, S., Kawasaki, T., Kirkner, G.J., Kraft, P., Loda, M., and Fuchs, C.S. (2007). Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J. Mol. Diagn. JMD* 9, 305–314.
- O’Hayre, M., Salanga, C.L., Handel, T.M., and Allen, S.J. (2008). Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem. J.* 409, 635–649.
- Okugawa, Y., Grady, W.M., and Goel, A. (2015). Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology* 149, 1204-1225.e12.
- Olkhanud, P.B., Baatar, D., Bodogai, M., Hakim, F., Gress, R., Anderson, R.L., Deng, J., Xu, M., Briest, S., and Biragyn, A. (2009). Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res.* 69, 5996–6004.
- Papadakis, K.A. (2004). Chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 4, 83–89.

- Papadakis, K.A., and Targan, S.R. (2000). The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 6, 303–313.
- Parsons, D.W., Wang, T.-L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J.M., DeLong, L., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J.K.V., et al. (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 436, 792.
- Pavkova Goldbergova, M., Lipkova, J., Pavek, N., Gatterova, J., Vasku, A., Soucek, M., and Nemeč, P. (2012). RANTES, MCP-1 chemokines and factors describing rheumatoid arthritis. *Mol. Immunol.* 52, 273–278.
- Pawig, L., Klasen, C., Weber, C., Bernhagen, J., and Noels, H. (2015). Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives. *Front. Immunol.* 6, 429.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2059–2072.
- Pöld, M., Zhu, L.X., Sharma, S., Burdick, M.D., Lin, Y., Lee, P.P.N., Pöld, A., Luo, J., Krysan, K., Dohadwala, M., et al. (2004). Cyclooxygenase-2-dependent expression of angiogenic CXC chemokines ENA-78/CXC Ligand (CXCL) 5 and interleukin-8/CXCL8 in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 64, 1853–1860.
- Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 609–618.
- Pozzobon, T., Goldoni, G., Viola, A., and Molon, B. (2016). CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol. Lett.* 177, 6–15.
- Proost, P., Loos, T., Mortier, A., Schutyser, E., Gouwy, M., Noppen, S., Dillen, C., Ronsse, I., Conings, R., Struyf, S., et al. (2008). Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. *J. Exp. Med.* 205, 2085–2097.
- Proost, P., Struyf, S., Van Damme, J., Fiten, P., Ugarte-Berzal, E., and Opdenakker, G. (2017). Chemokine isoforms and processing in inflammation and immunity. *J. Autoimmun.* 85, 45–57.
- Pu, X., Storr, S.J., Ahmad, N.S., Rakha, E.A., Green, A.R., Ellis, I.O., and Martin, S.G. (2018). High nuclear MSK1 is associated with longer survival in breast cancer patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 144, 509–517.
- Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C.M., Gerard, N.P., Gerard, C., and Lefkowitz, R.J. (2010). β -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 628–632.
- Raman, D., Baugher, P.J., Thu, Y.M., and Richmond, A. (2007). Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett.* 256, 137–165.

- Ramos, E.A.S., Grochoski, M., Braun-Prado, K., Seniski, G.G., Cavalli, I.J., Ribeiro, E.M.S.F., Camargo, A.A., Costa, F.F., and Klassen, G. (2011). Epigenetic changes of CXCR4 and its ligand CXCL12 as prognostic factors for sporadic breast cancer. *PloS One* 6, e29461.
- Rao, C.V., Hirose, Y., Indranie, C., and Reddy, B.S. (2001). Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res.* 61, 1927–1933.
- Razin, A., and Riggs, A.D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604–610.
- Recio-Boiles, A., and Cagir, B. (2018). Cancer, Colon. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., and Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 179–197.
- Rezaeeyan, H., Shirzad, R., McKee, T.D., and Saki, N. (2018). Role of chemokines in metastatic niche: new insights along with a diagnostic and prognostic approach. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 126, 359–370.
- Rezasoltani, S., Asadzadeh-Aghdaei, H., Nazemalhosseini-Mojarad, E., Dabiri, H., Ghanbari, R., and Zali, M.R. (2017). Gut microbiota, epigenetic modification and colorectal cancer. *Iran. J. Microbiol.* 9, 55–63.
- Rhee, Y.-Y., Kim, K.-J., and Kang, G.H. (2017). CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut Liver* 11, 38–46.
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349–361.
- Richmond, A. (2002). Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 664–674.
- Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A., and Jones, P.A. (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 27, 2291–2298.
- Robledo, M.M., Bartolome, R.A., Longo, N., Rodríguez-Frade, J.M., Mellado, M., Longo, I., van Muijen, G.N., Sánchez-Mateos, P., and Teixidó, J. (2001). Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 276, 45098–45105.
- Roepman, P., Schlicker, A., Tabernero, J., Majewski, I., Tian, S., Moreno, V., Snel, M.H., Chresta, C.M., Rosenberg, R., Nitsche, U., et al. (2014). Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer* 134, 552–562.

- Romain, B., Hachet-Haas, M., Rohr, S., Brigand, C., Galzi, J.-L., Gaub, M.-P., Pencreach, E., and Guenot, D. (2014). Hypoxia differentially regulated CXCR4 and CXCR7 signaling in colon cancer. *Mol. Cancer* *13*, 58.
- Romain, B., Benbrika-Nehmar, R., Marisa, L., Legrain, M., Lobstein, V., Oravec, A., Poidevin, L., Bour, C., Freund, J.-N., Duluc, I., et al. (2017). Histone hypoacetylation contributes to CXCL12 downregulation in colon cancer: impact on tumor growth and cell migration. *Oncotarget* *8*, 38351–38366.
- Rothbart, S.B., and Strahl, B.D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 627–643.
- Rubie, C., Kauffels, A., Kölsch, K., Glanemann, M., and Justinger, C. (2016). CXCL12/CXCR4 display an inverse mRNA expression profile in gastric carcinoma that correlates with tumor progression. *Oncol. Lett.* *11*, 360–364.
- Ruers, T., and Bleichrodt, R.P. (2002). Treatment of liver metastases, an update on the possibilities and results. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *38*, 1023–1033.
- Rybak, A.P., He, L., Kapoor, A., Cutz, J.-C., and Tang, D. (2011). Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 683–694.
- Salgado, E., Bian, X., Feng, A., Shim, H., and Liang, Z. (2018). HDAC9 overexpression confers invasive and angiogenic potential to triple negative breast cancer cells via modulating microRNA-206. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *503*, 1087–1091.
- Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirodda, N., et al. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N. Engl. J. Med.* *343*, 905–914.
- Samowitz, W.S., Albertsen, H., Herrick, J., Levin, T.R., Sweeney, C., Murtaugh, M.A., Wolff, R.K., and Slattery, M.L. (2005). Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* *129*, 837–845.
- Sánchez-Alcañiz, J.A., Haeger, S., Mueller, W., Pla, R., Mackay, F., Schulz, S., López-Bendito, G., Stumm, R., and Marín, O. (2011). Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron* *69*, 77–90.
- Sánchez-Martín, L., Estechea, A., Samaniego, R., Sánchez-Ramón, S., Vega, M.Á., and Sánchez-Mateos, P. (2011). The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood* *117*, 88–97.
- Sánchez-Martín, L., Sánchez-Mateos, P., and Cabañas, C. (2013). CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol. Med.* *19*, 12–22.
- Sato, N., Matsubayashi, H., Fukushima, N., and Goggins, M. (2005). The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* *4*, 70–76.
- Schlicker, A., Beran, G., Chresta, C.M., McWalter, G., Pritchard, A., Weston, S., Runswick, S., Davenport, S., Heathcote, K., Castro, D.A., et al. (2012). Subtypes of primary colorectal

tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med. Genomics* 5, 66.

Schneider, T., Osl, F., Friess, T., Stockinger, H., and Scheuer, W.V. (2002). Quantification of human Alu sequences by real-time PCR--an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin. Exp. Metastasis* 19, 571–582.

Schönemeier, B., Kolodziej, A., Schulz, S., Jacobs, S., Hoell, V., and Stumm, R. (2008). Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 510, 207–220.

Schuebel, K.E., Chen, W., Cope, L., Glöckner, S.C., Suzuki, H., Yi, J.-M., Chan, T.A., Van Neste, L., Van Criekinge, W., van den Bosch, S., et al. (2007). Comparing the DNA hypermethylation with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet.* 3, 1709–1723.

Sebag-Montefiore, D., Stephens, R.J., Steele, R., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S., Quirke, P., Couture, J., de Metz, C., Myint, A.S., et al. (2009). Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* 373, 811–820.

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495–500.

Sierro, F., Biben, C., Martínez-Muñoz, 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.

Smith, J.M., Johanesen, P.A., Wendt, M.K., Binion, D.G., and Dwinell, M.B. (2005). CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of intestinal barrier integrity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G316-326.

Smith, M.C.P., Luker, K.E., Garbow, J.R., Prior, J.L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., and Luker, G.D. (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 64, 8604–8612.

Snover, D.C. (2011). Sessile serrated adenoma/polyp of the large intestine: a potentially aggressive lesion in need of a new screening strategy. *Dis. Colon Rectum* 54, 1205–1206.

Sorich, M.J., Wiese, M.D., Rowland, A., Kichenadasse, G., McKinnon, R.A., and Karapetis, C.S. (2015). Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 13–21.

Sowińska, A., and Jagodzinski, P.P. (2007). RNA interference-mediated knockdown of DNMT1 and DNMT3B induces CXCL12 expression in MCF-7 breast cancer and AsPC1 pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 255, 153–159.

- Stangl, R., Altendorf-Hofmann, A., Charnley, R.M., and Scheele, J. (1994). Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet Lond. Engl.* *343*, 1405–1410.
- Stanisavljević, L., Abmus, J., Storli, K.E., Leh, S.M., Dahl, O., and Myklebust, M.P. (2016). CXCR4, CXCL12 and the relative CXCL12-CXCR4 expression as prognostic factors in colon cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *37*, 7441–7452.
- Stone, M.J., Hayward, J.A., Huang, C., E Huma, Z., and Sanchez, J. (2017). Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41–45.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., and Marriott, D. (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* *270*, 27348–27357.
- Strieter, R.M., Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A., and Keane, M.P. (2005). CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 593–609.
- Struyf, S., Noppen, S., Loos, T., Mortier, A., Gouwy, M., Verbeke, H., Huskens, D., Luangsay, S., Parmentier, M., Geboes, K., et al. (2009). Citrullination of CXCL12 differentially reduces CXCR4 and CXCR7 binding with loss of inflammatory and anti-HIV-1 activity via CXCR4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 666–674.
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R.S., Pienta, K.J., and Wang, J. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* *29*, 709–722.
- Suzuki, M., Mohamed, S., Nakajima, T., Kubo, R., Tian, L., Fujiwara, T., Suzuki, H., Nagato, K., Chiyo, M., Motohashi, S., et al. (2008). Aberrant methylation of CXCL12 in non-small cell lung cancer is associated with an unfavorable prognosis. *Int. J. Oncol.* *33*, 113–119.
- Szabo, V., Bugyik, E., Dezso, K., Ecker, N., Nagy, P., Timar, J., Tovari, J., Laszlo, V., Bridgeman, V.L., Wan, E., et al. (2015). Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases. *J. Pathol.* *235*, 384–396.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* *393*, 591–594.
- Taipale, M., Rea, S., Richter, K., Vilar, A., Lichter, P., Imhof, A., and Akhtar, A. (2005). hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6798–6810.
- Terabayashi, T., and Hanada, K. (2018). Genome instability syndromes caused by impaired DNA repair and aberrant DNA damage responses. *Cell Biol. Toxicol.* *34*, 337–350.
- Thanabalasuriar, A., Neupane, A.S., Wang, J., Krummel, M.F., and Kubes, P. (2016). iNKT Cell Emigration out of the Lung Vasculature Requires Neutrophils and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Inflammation. *Cell Rep.* *16*, 3260–3272.

- Thelen, M. (2001). Dancing to the tune of chemokines. *Nat. Immunol.* 2, 129–134.
- Thelen, M., and Thelen, S. (2008). CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J. Neuroimmunol.* 198, 9–13.
- Thun, M.J., Jacobs, E.J., and Patrono, C. (2012). The role of aspirin in cancer prevention. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 259–267.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., Laino, L., De Francesco, F., and Papaccio, G. (2013). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 13–24.
- Tomita, N., Jiang, W., Hibshoosh, H., Warburton, D., Kahn, S.M., and Weinstein, I.B. (1992). Isolation and characterization of a highly malignant variant of the SW480 human colon cancer cell line. *Cancer Res.* 52, 6840–6847.
- Tremblay, J.P. (2015). [The CRISPR system can correct or modify the expression of genes responsible for hereditary diseases]. *Med. Sci. MS* 31, 1014–1022.
- Treps, L., and Gavard, J. (2015). [Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad]. *Med. Sci. MS* 31, 989–995.
- Tse, C., and Capeau, J. (2003). [Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 61, 279–293.
- Turker, M.S. (2002). Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene* 21, 5388–5393.
- Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., Koike, M., Inadera, H., and Matsushima, K. (2000). Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 3282–3289.
- Van Cutsem, E., Rivera, F., Berry, S., Kretzschmar, A., Michael, M., DiBartolomeo, M., Mazier, M.-A., Canon, J.-L., Georgoulas, V., Peeters, M., et al. (2009). Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 20, 1842–1847.
- Van Lint, P., and Libert, C. (2007). Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1375–1381.
- Vermeulen, M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G., et al. (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* 142, 967–980.
- Vilar, E., and Gruber, S.B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 153–162.

- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.
- Walther, A., Houlston, R., and Tomlinson, I. (2008). Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 57, 941–950.
- Wang, D., Dubois, R.N., and Richmond, A. (2009). The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 688–696.
- Wei, Q., and Huang, H. (2013). Insights into the role of cell-cell junctions in physiology and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 306, 187–221.
- Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 38, 787–793.
- Wendt, M.K., Johanesen, P.A., Kang-Decker, N., Binion, D.G., Shah, V., and Dwinell, M.B. (2006). Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene* 25, 4986–4997.
- Wendt, M.K., Cooper, A.N., and Dwinell, M.B. (2008a). Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene* 27, 1461–1471.
- Wendt, M.K., Drury, L.J., Vongsa, R.A., and Dwinell, M.B. (2008b). Constitutive CXCL12 expression induces anoikis in colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology* 135, 508–517.
- Xiao, K., Sun, J., Kim, J., Rajagopal, S., Zhai, B., Villén, J., Haas, W., Kovacs, J.J., Shukla, A.K., Hara, M.R., et al. (2010). Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15299–15304.
- Xie, S., Zeng, W., Fan, G., Huang, J., Kang, G., Geng, Q., Cheng, B., Wang, W., and Dong, P. (2014). Effect of CXCL12/CXCR4 on increasing the metastatic potential of non-small cell lung cancer in vitro is inhibited through the downregulation of CXCR4 chemokine receptor expression. *Oncol. Lett.* 7, 941–947.
- Yamamoto, H., and Imai, K. (2015). Microsatellite instability: an update. *Arch. Toxicol.* 89, 899–921.
- Yan, M., Wang, C., He, B., Yang, M., Tong, M., Long, Z., Liu, B., Peng, F., Xu, L., Zhang, Y., et al. (2016). Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy. *Med. Res. Rev.* 36, 1036–1079.
- Yasmin, R., Siraj, S., Hassan, A., Khan, A.R., Abbasi, R., and Ahmad, N. (2015). Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokines and Associated Genes in Human Malignancies. *Mediators Inflamm.* 2015.
- Yoneda, J., Kuniyasu, H., Crispens, M.A., Price, J.E., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (1998). Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 447–454.

- York, B., and O'Malley, B.W. (2010). Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology. *J. Biol. Chem.* 285, 38743–38750.
- Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., and Kuwano, M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4015–4023.
- Yothers, G., Sargent, D.J., Wolmark, N., Goldberg, R.M., O'Connell, M.J., Benedetti, J.K., Saltz, L.B., Dignam, J.J., Blackstock, A.W., and ACCENT Collaborative Group (2011). Outcomes among black patients with stage II and III colon cancer receiving chemotherapy: an analysis of ACCENT adjuvant trials. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1498–1506.
- 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.
- Yu, S., Crawford, D., Tsuchihashi, T., Behrens, T.W., and Srivastava, D. (2011). The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 240, 384–393.
- Zabel, B.A., Wang, Y., Lewén, S., Berahovich, R.D., Penfold, M.E.T., Zhang, P., Powers, J., Summers, B.C., Miao, Z., Zhao, B., et al. (2009). Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3204–3211.
- Zabel, B.A., Lewén, S., Berahovich, R.D., Jaén, J.C., and Schall, T.J. (2011a). The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Mol. Cancer* 10, 73.
- Zabel, B.A., Lewén, S., Berahovich, R.D., Jaén, J.C., and Schall, T.J. (2011b). The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Mol. Cancer* 10, 73.
- Zaniboni, A., Labianca, R., Marsoni, S., Torri, V., Mosconi, P., Grilli, R., Apolone, G., Cifani, S., and Tinazzi, A. (1998). GIVIO-SITAC 01: A randomized trial of adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid administered to patients with colon carcinoma--long term results and evaluation of the indicators of health-related quality of life. Gruppo Italiano Valutazione Interventi in Oncologia. Studio Italiano Terapia Adjuvante Colon. *Cancer* 82, 2135–2144.
- Zeelenberg, I.S., Ruuls-Van Stalle, L., and Roos, E. (2003). The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 63, 3833–3839.
- Zeineldin, M., and Neufeld, K.L. (2013a). More than two decades of Apc modeling in rodents. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 80–89.
- Zeineldin, M., and Neufeld, K.L. (2013b). More than two decades of Apc modeling in rodents. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 80–89.
- Zhang, W., and Xu, J. (2017). DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomark. Res.* 5, 1.

- Zhao, H., Guo, L., Zhao, H., Zhao, J., Weng, H., and Zhao, B. (2015). CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* 6, 5022–5040.
- Zheng, J., Wang, J., Sun, X., Hao, M., Ding, T., Xiong, D., Wang, X., Zhu, Y., Xiao, G., Cheng, G., et al. (2013). HIC1 modulates prostate cancer progression by epigenetic modification. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 1400–1410.
- Zhi, Y., Chen, J., Zhang, S., Chang, X., Ma, J., and Dai, D. (2012). Down-regulation of CXCL12 by DNA hypermethylation and its involvement in gastric cancer metastatic progression. *Dig. Dis. Sci.* 57, 650–659.
- Zhong, C., Wang, J., Li, B., Xiang, H., Ultsch, M., Coons, M., Wong, T., Chiang, N.Y., Clark, S., Clark, R., et al. (2013). Development and preclinical characterization of a humanized antibody targeting CXCL12. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 4433–4445.
- Zhou, X., and Ma, H. (2008). Evolutionary history of histone demethylase families: distinct evolutionary patterns suggest functional divergence. *BMC Evol. Biol.* 8, 294.
- Ziarek, J.J., Kleist, A.B., London, N., Raveh, B., Montpas, N., Bonnetterre, J., St-Onge, G., DiCosmo-Ponticello, C.J., Koplinski, C.A., Roy, I., et al. (2017). Structural basis for chemokine recognition by a G protein-coupled receptor and implications for receptor activation. *Sci. Signal.* 10.
- Zimmerman, N.P., Vongsa, R.A., Wendt, M.K., and Dwinell, M.B. (2008). Chemokines and chemokine receptors in mucosal homeostasis at the intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1000, 1000–1011.
- Zlotnik, A. (2006). Chemokines and cancer. *Int. J. Cancer* 119, 2026–2029.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121–127.
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., and Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 597–606.
- 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.

ANNEXE

Synergistic anti-tumor effect of mTOR inhibitors with irinotecan on colon cancer cells

Reita Damien^{1,2,4}, Bour Cyril¹, Radhia Benbrika¹, Groh Audrey¹, Pencreach Erwan^{1,2,3}, Guérin Eric^{1,2} and Guenot Dominique¹.

¹ Université de Strasbourg, Progression Tumorale et Microenvironnement, Approches Translationnelles et Epidémiologie, Strasbourg, France

² Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Strasbourg, France

Université de Strasbourg, INSERM Unit 1113, Strasbourg, France

³ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Centre de Ressources Biologiques, Département de Pathologie, Strasbourg, France

⁴ UMR 7021 CNRS/Unistra, LBP - Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France

Corresponding author: Damien Reita

Email: damien.reita@gmail.com

Telephone number: +33 88 27 53 62

Keywords: Irinotecan, AZD2014, colon cancer, ectopic, orthotopic xenograft, metastasis,

1. Introduction

Colorectal cancer remains the third most common cause of cancer-related deaths worldwide. Despite the growing arsenal of chemotherapeutic and targeted agents, overall 5-year survival rate is less than 10% at metastatic stage of the disease [1].

Activation of PI3K/Akt and Ras/Raf/MEK/MAPK pathways is commonly involved in sporadic colon cancer pathogenesis. Downstream of these two pathways, mammalian target of rapamycin (mTOR), a Ser/Thr protein kinase involved in the regulation of cell growth, proliferation and survival, is directly activated by the PI3K/Akt pathway, or directly and indirectly by Ras/MAPK pathway [2]. mTOR exists in two distinct functional complexes: mTORC1 and mTORC2 which control protein synthesis and survival respectively [3–5]. Since the discovery of the bacterially derived drug rapamycin, found in a Easter Island's soil sample in 1975, more has been learned about the involvement of the mTOR pathway in cell proliferation and ultimately tumorigenesis [6]. Over the last 15 years, there has been a great interest for mTOR inhibition using rapamycin and its chemical analogues everolimus and temsirolimus which target the only mTORC1 complex, and more than 400 clinical trials testing these mTOR inhibitors have been registered as antitumor therapeutics (clinicaltrials.gov). However, mTOR inhibition in cancer, especially as monotherapy, has limited benefits, increasing survival by just few months and several studies demonstrated the occurrence of drug-resistance [7–10]. As example, colon and breast tumor samples taken from patients after 4 weeks of treatment with everolimus showed higher levels of activated AKT compared to untreated samples which potentially explained limited response or resistance [11]. Renewed interest in targeting the mTOR pathway has evolved through the discovery that mTORC2 directly phosphorylates the Ser⁴⁷³ residue of the survival AKT kinase in diseases as lymphoid and solid cancers [12], making mTORC2 a new therapeutic target. The positive regulation of AKT by mTORC2 implicates mTOR in acting both upstream and downstream of AKT [3,13]. Whereas rapamycin and analogues are allosteric mTOR inhibitors, new generation mTOR catalytic inhibitors are ATP analogues which inhibit both mTORC1 and mTORC2 kinase activities [11,14,15] by competing with ATP for binding to the mTOR kinase domain. Due to the dual inhibition of rapamycin-insensitive mTORC2 and rapamycin-sensitive mTORC1, the anticancer efficacy of ATP-competitive inhibitors are expected to be more potent in clinical use [14]. Since then, many preclinical data have shown that dual inhibition of mTORC1 and mTORC2 may overcome rapamycin resistance [16].

In addition to this oncogenic pathway activation, colorectal cancers like many other solid tumors, are characterized by a hypoxic microenvironment [17]. Tumor hypoxia appears to be

strongly associated with tumor propagation, malignant progression, and resistance to therapy [17]. Multiple mechanisms could be involved in the hypoxia-induced resistance to chemotherapeutic agents, including an activation of cell proliferation, a loss of apoptotic potential, a decreased cytotoxicity of some agents, and tissue acidosis due to a high glycolytic rate [17]. At a molecular level, the tumor cell adaption to hypoxia is regulated in part by the PI3K / AKT / mTOR pathway and by the transcription factors HIF-1 α and HIF-2 α , whose protein expression and transcriptional activity are also partly regulated by mTOR [18].

Several drug combinations associate irinotecan as a first line treatment of metastatic CRC and the irinotecan antitumor activity results from double-stranded DNA damages by stabilization of the TOP1-DNA complex [19]. Nevertheless, our team has previously shown that irinotecan administered at low doses has a cytotoxic or cytostatic effect without induction of genotoxic lesions, but by targeting the hypoxic tumor microenvironment and inhibiting the accumulation of HIF-1 α and abolishing tumor vascularization [20]. In clinics, the reduction of irinotecan doses is of particular interest in view of the severe toxicity induced by irinotecan-based chemotherapy protocols, i.e. diarrhea (grade 3 or 4 for 40 % of patients) and neutropenia (grade 3 or 4 for 30% of patients) [21].

Based on these observations, our working hypothesis is that the vertical and complete inhibition of the PI3K / AKT / mTOR axis with mTOR catalytic inhibitors and low doses of irinotecan may have a significant effect in reducing cancer cell viability, migration, as well as risk of recurrence of metastases at the advanced stages of the disease.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

The cell lines HCT116 and SW480 derive from a human colon carcinoma and were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) in 2013. HT29 and Caco2 colon cell lines were kindly provided by Dr. M. Rousset [22]. The mutational status of BRAF, PI3K and KRAS, and 23 other genes has been validated by NGS sequencing (Tumor Hotspot MASTR Plus assay). All cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 1g/L glucose and supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FCS) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Human colon tumour samples

Human colon tumor fragments were obtained in accordance with the ethical standards of the institutional committee and provided by the Centre de Ressources Biologiques (CRB) of Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. The clinical and molecular characteristics of the human colon tumors are indicated in **Supplementary Table 1**.

2.2. Compounds

Irinotecan (Hospira, ONCOTAIN, 20mg/ml), Fluorouracil (Accord, 50mg/ml), oxaliplatin (Hospira, ONCOTAIN, 5mg / ml) and calcium folinate (Sandoz, 10mg /ml) are provided by the Pharmacy department of the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Rapamycin was purchased from LC laboratories (R-5000), LY294002 from Calbiochem (440202) and AZD8055 from Selleckchem (S1555). AZD2014, the AZD8055's congener [22] was provided from AstraZeneca thanks to a Materials Transfer Agreement (MTA) obtained in July 2015.

2.3. Molecular profiling of patient-derived xenografts and cell lines by Next Generation Sequencing (NGS)

DNA was extracted from cultured cells and from snap frozen tissue of patient-derived xenografts (PDX) using phenol/chloroform extraction protocol. Mutation screening was performed by Next Generation Sequencing on a MiSeq Illumina platform using Tumor Hotspot MASTR Plus assay (Multiplicom-Agilent) which targets frequently occurring mutations (hotspots) in a panel of 26 genes including PIK3CA and RAS gene (see **Supplemental data S1** for a complete list of genes and exons covered). Sequencing data were aligned to human genome hg19 using BWA-MEM algorithm (Burrows-Wheeler Aligner-Maximal Exact Matches). Variants were called using three different variant callers: VarScan, GATK HaplotypeCaller and GATK UnifiedGenotyper. The minimum coverage per base (DP depth) and the minimum variant allelic frequency (VAF) were fixed at 500-fold and 5% respectively. Data were visualized using Integrative Genomics Viewer.

2.4. Cell viability assay

Cells were seeded in a 96-well plate overnight and treated with increasing concentrations of rapamycin, AZD8055 or AZD2014 (0.01 nM to 0.5 μ M) for 72 hours. Cell viability was determined by using Crystal violet colorimetric assay. Calculation of the IG₅₀ (concentration causing 50% of maximal viability inhibition) is performed with the GraphPad Prism5 software. The combination index were calculated according to Chou and Talalay [23,24].

2.5. Migration and invasion assays

Cell migration and invasion assays are performed with ThinCert™ 24 Well Cell Culture Inserts for Multiwell Plates (8 µm pore, Greiner Bio-one). For invasion assay, the upper chamber of each multiwell insert (transwell) is precoated with Matrigel (250µg/ml, Corning Matrigel Matrix). The cells are pre-treated for 24 hours with irinotecan, AZD2014 and irinotecan + AZD2014. Four hours before seeding in the Boyden chamber, the cells are maintained in serum-free DMEM. Then the cells were loaded into the upper chamber of the transwell (40000 cells/well in 300µl aliquot). After 24h incubation, the cells that had migrated to the lower chamber (containing 10% FCS) were fixed and stained by crystal violet. All experiments were performed in quadruplicate. The images are acquired using Zeiss microscope and total number of cells that have migrated is quantified using Fiji software. The procedure for the migration assay was similar to that for the invasion assay without the matrigel coating.

2.6. Western blot

After treatment, cells are lysed on ice in Laemmli buffer with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma France). Nitrocellulose membranes were blocked in a 0.1% PBS-Tween with 4% nonfat dry milk and incubated overnight at 4°C with primary antibodies specific for: pS6RP^{Ser235/236} (1:1000, CST #2211), S6RP (1:1000, CST #2217), pAKT^{Ser473} (1:1000, CST #4060), AKT (1: 1000, CST #4685), pERK^{Thr202/Tyr204} (1: 1000, CST #4370), ERK (1:1000, CST #4695), p4EBP1 (1:1000, CST #2855) from Cell Signaling (MA, USA) and actin (1:15000, MAB1501) from Millipore (CA, USA). The membranes are next incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5000 NXA931, NA934V, GE Healthcare) followed by detection with the enhanced chemiluminescence kit (ECL Amersham, France). The signal intensity is qualified by Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.7. *In vivo* PDX experiments

All animal studies were conducted in accordance with the principles and procedure outlined in the French Ethical (Approval No. E67-482-21, Cremeas, NAL/85/92/02/13).

Ectopic model

Athymic nu/nu nude mice (Janvier Labs, France), 6-8 weeks old were maintained under specific pathogen-free conditions. Tumor tissues were transferred to DMEM supplemented with 200 UI/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin, 5 µg/ml fungizone (Gibco Invitrogen,

France) and minced on ice. The homogenate obtained is injected subcutaneously into the right and left flanks of nude mice as previously described [25]. Mice were monitored twice a week and treatment starts when the tumors reached an average volume of 150-200mm³. Before treatment was initiated, the mice are randomized according to the tumor size into homogeneous groups of 7 mice. Irinotecan and rapamycin are given intraperitoneally at 10 mg/kg/day, q5d and 3 mg/kg/day, q5d, respectively. AZD2014 is given orally at 20mg/kg, BID, 2 days/5) [26]. FOLFOX protocol is as follow: 5FU: 50mg / kg - q7d - IP, LV: 90mg / kg - q7d - IP, Oxaliplatin: 6mg / kg - q7d - IP and FOLFIRI protocol: 5FU: 50mg/kg - q7d - IP, LV: 90mg/kg - q7d - IP, irinotecan 10mg/kg - q5d-IP)[27–29]. The mean tumor volume (MTV) and tumor growth inhibition [TGI = 100 - (RTV_{treated} / RTV_{control}) * 100] are calculated for each condition and compared between day 0 (before the initiation of the treatment) and the end of the treatment [20].

Orthotopic model

NOD SCID γ (NSG) mice (Charles River Laboratories, France), aged 6-9 weeks, were used. Abdominal access by laparotomy was through a 1 cm hypogastric midline skin and peritoneal wall incision. The caecum was exteriorized and placed on a sterile compress. A 100 μ l SW480 cell suspension (5×10^6 cells) is injected into the caecal wall using a 30G needle. The mucosa is pre-injured by a slight friction of the needle against the wall to facilitate implantation. This step is crucial to prevent leakage of tumour cells into the caecal lumen or peritoneal cavity. The caecum is returned to the peritoneal cavity, and peritoneum and skin closed by running sutures. Seven days after implantation, the mice are divided into 4 treatment groups (7 mice per group) and one validation group (2 mice). The mice of the validation group are sacrificed at the initiation of the treatments, 7 days after injection of the cell suspension and serve as a control for the presence of a caecal tumor, and liver and pulmonary micro-metastases. Treatment groups include control (untreated mice), irinotecan (irinotecan, 10mg / kg, q5d, IP), AZD2014 (20mg / kg, 2ON / 5off BID, PO) and irinotecan + AZD 2014 treated-mice. After 25 days of implantation, control and treated mice are sacrificed and the caecum, liver and lungs are collected. The organs of 2 mice are fixed in 4% paraformaldehyde for 4 h for histological analysis with H&E coloration. The organs of the remaining 5 mice are removed and snap frozen in liquid nitrogen for subsequent molecular analyzes.

2.8. Histology and immunohistochemistry

Resected fixed tissues are embedded in paraffin and processed for histology by H&E coloration. For immunohistochemistry, 6µm tissue sections are incubated with CK19 antibody (1:100, clone E16-L, DN103-05, Biotech DB, Slovakia) and then with horseradish peroxidase–conjugated Fab fragments (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). Counterstaining with hematoxylin is then performed and the images are acquired using a Zeiss microscope. For immunofluorescence tests, fixed sections are incubated with the primary Phosphohistone H3^{Ser10} antibody (1:1000, 06-570, Millipore France) overnight at 4 ° C. Secondary antibodies used were Alexa488 conjugated goat anti-rabbit (1:1000, A-11034 Molecular Probes, USA). The images are acquired using a Zeiss Z2 inverted fluorescence microscope. Quantification of the number of pH3^{Ser10} labeled cells and total cell number is performed for two independent tumors per group (2 sections / tumor, 3 fields / section - objective 20x) using Fiji software.

2.9. *Alu* sequence quantification by relative PCR

For *Alu* sequence quantification, liver and lungs of orthotopic xenografted mice are removed and snapfrozen in liquid nitrogen and stored at -80 ° C. Whole frozen organs are transferred into ATL buffer (Qiagen, France), mechanically dissociated (Kinematica Polytron PT 1300D) and part of the homogenate (1000µL for the liver, 500µL for the lungs) is incubated with proteinase K (1.87mg/ml) overnight at 57°C. Genomic DNA is extracted by the phenol/chloroform method. Relative PCR is performed on a LightCycler 480 (Roche) with the QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix® Kit (Qiagen). The primer used to detect *Alu* sequence are: Forward sequence: CACCTGTAATCCCAGCACTTT; Reverse sequence: CCCAGGCTGGAGTGCAGT. The PCR reaction is carried out on 1ng of genomic DNA in a final volume of 20µl SYBR Green I Master mix (1X final) combined with Hotstart Taq DNA polymerase, dNTPs and 1mmol/L MgCl₂. The PCR program consists of: denaturation at 95°C for 15 min followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 63°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The melting curve is carried out directly after the PCR, starts at 60°C for 15 seconds with a temperature increase of 0.1°C/s. Each experiment includes a negative control (gDNA extract from liver or lung of mouse without PDX). The amount of human DNA present in the murine tissue is determined using a standard curve (0.01 µg to 1 µg of genomic DNA extracted from the human colonic cells SW480). The presence of hepatic or pulmonary metastases corresponds to the detection of at least 0.1 µg of human DNA (0.01% of the total DNA). Invasiveness is calculated by plotting the amount of estimated human DNA to the total amount of DNA used for the PCR reaction (1ng).

2.10. Statistical analyzes

All quantitative data are represented as mean \pm SEM (standard error of mean). All statistical analyses are performed with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The multi-group comparisons are made by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunns test. Comparisons of two groups are made by a Mann-Whitney test. One-sided decreasing Mann-Whitney tests were used to compare tumor volumes (efficacy) and log-rank tests are used to compare survival distributions (survival prolongation). The *p* values for the tumor volume and survival assessment are adjusted for multiple comparisons according to Bonferroni-Holm. For all analysis, *p* values under 0.05 represent a statistically significant effect.

3. Results

3.1 Effects of mTORC1 and mTORC2 inhibition on colon cancer cell viability

Many cancer cells demonstrate variable sensitivity to rapamycin treatment and the effects of mTOR inhibition on CRC growth are not clear [3]. Therefore, we evaluated the impact of the allosteric (rapamycin) and 2 catalytic mTOR inhibitors (AZD8055, AZD2014) on the survival of 4 colon cancer cell lines characterized by specific mutations leading to activated Ras/MAPK and PI3K signaling pathway (**Supplementary Table S2**). Cells were treated with increasing doses of rapamycin, AZD8055 or AZD2014 (0 to 5000nM) for 72h and cell viability quantified. The three compounds induce a dose dependent growth inhibition of the 4 cell lines. Interestingly, two patterns of inhibition were found depending on which mTOR inhibitor is tested (Table 1). A first pattern of inhibition (Pattern A) induced by rapamycin is characterized by a differential sensitivity for each cell line (IG₅₀ ranging from 0.06 for HT29 to 24.7 nM for HCT116) and a moderate growth inhibition with a maximal inhibition of 60% for the Caco2 cell line and 40% for the three other cell lines (**Figure 1**). In addition, increasing the rapamycin concentration above 50nM did not further inhibit growth. The second pattern of inhibition (Pattern B) was observed with the two catalytic inhibitors (AZD8055 and AZD2014) which display a sensitivity range similar for all cell lines (**Figure 1**). The IG₅₀ concentration was <150nM with AZD8055 (IG₅₀ ranging from 45.8 to 133 nM) and <500nM with AZD2014 (IG₅₀ ranging from 131 to 495 nM) for all cell lines. At 1000nM, AZD8055 and AZD2014 growth inhibition was > 80%.

3.2 Effects of mTORC1 and mTORC2 inhibitors on mTOR targets

The impact of drugs in blocking the mTOR signaling was investigated after 24h of treatment with increasing concentrations of rapamycin, AZD2085 and 2014 (from 50 to 500nM) by measuring the expression of Ser235/236 S6RP (mTORC1 effector) by western blot. The results show that the concentration of 50nM for rapamycin, 50nM for AZD8055 and 200nM for AZD2014 almost completely abolish the S6RP phosphorylation in each cell line; increasing the concentrations doesn't bring any benefit (**Figure 2**). The concentration of 50nM for rapamycin and AZD2085 and 200nM for AZD2014 will therefore be used for further *in vitro* experiments. We next evaluated the effects of the mTOR inhibitors on the PI3K/Akt/mTOR pathway. Treatment of cells with AZD8055 and AZD2014 for 24 hours at 50nM and 200nM respectively, abolishes the phosphorylation of Ser235/236 S6RP and significantly inhibits phosphorylation (35% for HT29 to 63% for SW480) of 4EBP1 (mTORC1 effectors, **Figure 3A**). In contrast, rapamycin (50nM) completely inhibits phosphorylation of Ser235/236 S6RP without any effect on 4EBP1 phosphorylation. Interestingly, mTOR catalytic inhibitors dramatically suppress phosphorylation of Ser473AKT (mTORC2 effector) whereas in contrast, rapamycin induced phosphorylation of Ser473 AKT (from 2.5 to 4.41-fold increase depending on cell line; **Figure 3B**). Rapamycin and mTOR catalytic inhibitors have no significantly effect on ERK phosphorylation (**Figure 3B**).

Interestingly in SW480, addition of a PI3K inhibitor (LY294002, 20 μ M) to rapamycin (50nM) prevents rapamycin induced AKT phosphorylation (3.5-fold increase) (**Figure 3B**). This suggests that rapamycin-induced phosphorylation of AKT is dependent on PI3K.

In summary, the AZD8055 and AZD2014 catalytic inhibitors are more effective than rapamycin in inhibiting the viability of colon cancer cells and their efficacy is not correlated to the tumor cell mutational profile. In addition, rapamycin only partially inhibits the mTORC1 pathway and leads to reactivation of the PI3K/AKT pathway secondary to mTORC1 inhibition.

3.4 Combination of mTOR inhibitors and irinotecan has synergistic effect on colon cancer cells *in vitro*

Previous *in vitro* results have shown the better efficacy of catalytic inhibitors over rapamycin to inhibit the viability of colon tumor cell line. Thus, we next evaluated the effect of combining irinotecan with AZD8055 or AZD2014 on cell viability. The protocol to establish the drug combinations was designed according to the method reported by Chou and Talalay in

order to quantify the dose-effect relationships through calculation of a combination index [23,30]. The combination index values indicate synergism for irinotecan + AZD8055 and irinotecan + AZD2014 to inhibit cell viability in Caco2 and HCT116 cells (CI <1) and a slight additivity for the HT29 cells (CI ~ 1, for an efficacy of 40 to 60%; **Figure 4**). In SW480 cells, irinotecan + AZD8055 combination does not bring benefit to inhibit the cell viability as the CI is close to 1 whereas irinotecan + AZD2014 combination is additive (CI =1,58, **Figure 4**).

3.5 *In vivo* effects of AZD2014 in combination with irinotecan

Based on these results, we next determined the benefit of the mTOR inhibitor AZD2014 alone or in combination with irinotecan on tumor growth *in vivo*. The patient-derived xenograft PDX36M1 comes from a synchronous liver metastasis of colon tumor stage IV, and PDX40 from a stage III colon tumor which present two activating mutations (see Supplementary Tables 1 and 2). *In vivo*, we only evaluated the effect of the AZD8055 inhibitor, as AZD8055 has a strong hepatic turnover and will no longer be used in clinic. In addition, only AZD2014 (vistusertib®) is currently under phase 2 clinical trials.

3.5.1 Effects of treatments on PDX growth

For the 36M1 PDX, AZD2014 alone leads to a slight reduction of the tumor growth (RTV A2014 = 5.73; TGI=39.2%; p = 0.03) while the combination of irinotecan+AZD2014 induces a regression of the tumor volume (RTV CPT11+A2014 = 0.71; TGI: 92.5%; p < 0.0005) (**Figure 5A**). We next investigated whether this combination would have a better effect compared to the reference treatments for advanced colon cancer. Interestingly, the human colon tumor whose PDX36M1 is derived, has progressed under treatment with FOLFOX with a progression of disease 6 months after surgery (**Supplementary Table 2**). In nude mice, after 21 days of treatment, FOLFOX only slightly inhibits the tumor growth (RTV FOLFOX= 6.32, TGI = 32.9%, p=0.06) whereas the combination of irinotecan + AZD2014 induces a cytotoxic effect with a TGI of 92.5 (**Figure 5A, Table**). At the end of the treatment, histology reveals an important necrosis and very few cells (< 5%) express the epithelial colon cell marker, cytokeratin 19 (CK19) (**Figure 5B**). This confirms the benefit of the combination as compared to others therapeutic strategies.

The combination has been tested on another PDX (PDX40) which was amplified from a stage III colon tumor (**Supplementary Table 2**) which escapes to FOLFOX treatment 6 months after surgery, leading to the death of patient. This primary tumor and the associated PDX have PIK3CA E545K and ERBB2 L755S mutations (**Supplementary Table 1**) and we previously

showed that this tumor is resistant to irinotecan alone [20]. The present results show that the irinotecan + AZD2014 combination induces a cytostatic effect up to day 12 of treatment (RTV CPT11+A2014 = 1.05) and then by day 14, the tumor escapes with a recovery of the tumor growth (**Figure 6A**). Nevertheless, the TGI is higher when irinotecan is combined to AZD2014 (TGI CPT11 + AZD2014 = 81.6%, $p < 0.0001$) as compared to the drugs alone (TGI CPT11 = 69.5%, $p = 0.0007$ and TGI AZD2014 = 69.7%, $p = 0.0003$) and greater than that induced by FOLFIRI (TGI FOLFIRI = 73.6%, $p = 0.0002$, **Figure 6A**).

Interestingly, tissue immunostaining with the proliferation marker, phospho-Histone H3Ser10 performed at day 10, shows that irinotecan + AZD2014 significantly decreases the percentage of proliferating cells as compared to control ($p < 0.0005$) or FOLFIRI ($p < 0.05$) (**Figure 6B**).

When considering the mouse survival which corresponds to the time at which mice are sacrificed when tumor volume reaches 1500mm^3 , the irinotecan + AZD2014 group has significantly longer survival than mice treated with irinotecan alone (HR = 2.991; [1.176-7.606]; $p = 0.02$) or AZD2014 alone (HR = 16.01, [4.399- 58.27], $p < 0.0001$) (**Figure 6C**), and importantly, mice from FOLFIRI group have lower survival compared to mice treated with irinotecan + AZD2014 (HR = 2.474, [0.921-6.643], $p = 0.07$) (**Figure 6C**).

Taken together, our data confirm that combining irinotecan to AZD2014 is effective in inhibiting tumor growth of two PDX whatever their mutational profile. In addition, this combination is more effective than the two reference treatments FOLFIRI and FOLFOX for the two PDX.

3.5. Effects of treatments on metastatic process

Because most of the patients with CRC die from metastases, we investigate the inhibitory effects of irinotecan+AZD2014 treatment on the metastatic process.

3.5.1 *In vitro* effects on cell migration and invasion

We first evaluated the *in vitro* effect of the drug combination on the colon cancer cell migration and invasion. Impact of the treatment has been evaluated on SW480 cells only, as the other cell lines did not sufficiently migrate in the Boyden chamber assay. As shown in **Figure 7**, irinotecan does not significantly inhibit the cell migration whereas AZD2014 decreases migration by 40% as compared to untreated cells ($p < 0.0005$). The inhibition increases to 70% when AZD2014 is combined to irinotecan (irinotecan+AZD2014 vs AZD2014: $p < 0.05$, **Figure 7**). The cell invasion capacity evaluated after coating the Boyden

chambers with matrigel, is not significantly decreased by AZD2014 (40% decrease) or irinotecan alone (4% decrease) but irinotecan + AZD2014 induces a significant inhibition of cell invasion (70% inhibition, $p < 0.05$; **Figure 7**). Taken together, these results demonstrate that AZD2014 alone inhibits the migratory and invasive capacity of SW480 cells and combining AZD2014 with irinotecan accentuated this effect.

3.5.2 *In vivo* effects on metastasis formation

To confirm that irinotecan combined to AZ2014 can shut down the invasion and metastasis formation *in vivo*, we developed orthotopic xenografts from SW480 cells (**Figure 8A**). To validate our model, we used a validation group with 2 mice. These mice were sacrificed at the initiation of the treatments, 7 days after injection of the cell suspension and their organs are collected. Detection of *Alu* sequences with quantitative PCR allow us to confirm the presence of a caecal tumor, and liver and pulmonary micro-metastases before the initiation of treatment in the other groups.

3.5.2.1. Impact of treatments on primary caecal tumors

At the time of sacrifice (day 25), all the mice of the control group have developed a primary caecal tumor (**Figure 8B**). Concerning the treated mice, at the end of treatment (day 25), all the mice treated with AZD2014 have developed a caecal tumor whereas only 60% and 40% of the mice have a palpable tumor mass in the caecal wall for the irinotecan and irinotecan + AZD2014-treated group respectively. Moreover, the size of the tumor is decreased for mice treated with irinotecan, AZD2014 and with the combination, as compared to the control group (**Figure 8B**).

3.5.2.2. Impact of treatments on hepatic and lung metastases

At sacrifice (day 25), macroscopic hepatic and pulmonary metastases are observed (**Figure 8B**) as spots of tissue necrosis (data not shown). Macroscopically, the mice treated with the irinotecan + AZD2014 combination did not develop macroscopic metastasis (**Figure 8B**).

In order to evidence and confirm microscopic and macroscopic metastases respectively in the liver and lungs, we search for human *Alu* sequences with quantitative PCR at day of sacrifice (day 25). The use of a standard range of human DNA allows establishing a correlation between the Cycle Threshold (Ct) value for detection of the *Alu* sequences and the amount of human DNA in the tissue. In the control group, 80% (4/5) of mice developed hepatic and pulmonary metastases (**Figure 8C**). The average *Alu* sequences content is 14% and 0.2% for

the liver and lungs respectively (**Figure 8C**). The mice treated with AZD2014 or irinotecan express less *Alu* sequences as compared to the control group with a respective rate of 4.4% and 0.01% in the liver and 0.16% and 0.03% in the lungs. When treated with the irinotecan +AZD2014 combination, no amplifiable *Alu* sequence could be detected suggesting very few or even no colon tumor cells in the liver and lungs (threshold at 0.03pg or 0.003% invasiveness) (**Figure 8C**).

4. Discussion

The present study aim to demonstrate that vertical and complete inhibition of the PI3K/AKT/mTOR axis with mTOR catalytic inhibitors and low doses of irinotecan significantly reduces cell viability, migration as well as dissemination capacity. The mTOR protein kinase is a key player in the progression of CRC. The presence of activating mutations at the level of the PI3K/AKT and Ras/MAPK pathways upstream of mTOR respectively concerns 30% and 50% of the CRC cases [31]. An immunohistochemical study conducted on 154 patients, showed that colon tumor tissue overexpresses p-mTORSer2448 and p-p70S6KThr389 compared to adjacent healthy mucosa [32]. Similarly, overexpression of mTOR mRNA is associated with decreased overall survival of patients with stage III CRC (AlQurashi et al., 2013). These data highlight the importance of targeting the mTOR axis in CCR. At the present time, first and second generation of mTOR inhibitors are available. The first-generation inhibitors which derived from rapamycin, are allosteric inhibitors of mTOR. They inhibit the formation of the mTORC1 complex by binding to the FRB domain. At the preclinical level, the use of these rapalogs shows limited efficacy in models of breast cancer and glioblastoma [33]. In particular, a biochemical approach has shown a reactivation of the PI3K/AKT pathway secondary to the inhibition of mTORC1 by rapalogs [34].

Similarly, clinical studies using everolimus in CRC have shown modest clinical activity and combining everolimus and bevacizumab has a limited efficacy with an important toxicity [35,36]. These observations led to the development of second-generation inhibitors such as AZD8055 and its congener AZD2014. These inhibitors are catalytic inhibitors inhibiting the kinase activity of both mTORC1 and the mTORC2 complex [26,37,38]. mTORC2 is one of the main activators of the PI3K/AKT pathway by phosphorylation of AKT on Ser473 [13]. In the present study, our results show that the catalytic mTOR inhibitors more effectively inhibit the viability of colon cancer cell than the allosteric inhibitor rapamycin. This result is explained in particular by the fact that rapamycin only leads to partial inhibition of the mTORC1 complex as evidenced by the weak inhibition of 4EBP phosphorylation. In addition,

we demonstrate that rapamycin causes phosphorylation of AKT^{Ser473} which results from PI3K activation, secondary to mTORC1 inhibition. Conversely, the use of second-generation mTOR inhibitors completely inhibits the activity of the mTORC1 complex as shown for S6RP and 4EBP1 proteins that remain unphosphorylated and for Ser473AKT phosphorylation of which is almost completely abolished. These data are in full agreement with other studies [37,39]. Then, in the CCR, unlike first-generation inhibitors, mTOR catalytic inhibitors are able to completely block the mTOR axis.

The rational use of therapeutic combinations is today the standard of care for patients, as monotherapy is synonymous with poor efficacy and rapid resistance. However, use of drug combinations is useful only in cases where the benefit they bring is greater than that of existing therapies. In our study, *in vitro* combination index has highlighted the benefit of such a combination on inhibiting the proliferation of colon tumor cells. When using human colon tumors, characterized at the molecular level and for their response to FOLFIRI or FOLFOX treatment, we further demonstrate the benefit of the irinotecan + mTOR inhibitor combination, since it allows a drastic inhibition of ectopic PDX primary tumor growth but also of the formation of liver and lung metastases in orthotopic tumors derived from a human colon cell line.

Importantly, combination efficacy varies according to the PDX as irinotecan + AZD2014 has cytotoxic effect on PDX36M1 while it only leads to a cytostatic effect on PDX40. Our previous results showed that low-dose irinotecan results in a lack of tumor vascularization and inhibition of HIF-1 α protein accumulation leading to impaired adaptation of tumor cells to their environment [20]. We hypothesize that the efficacy of combinatorial synergism of the drugs relies on effects on tumor microenvironment such as vascularization, as well as on oncogenic pathways. Interestingly, Vétillard et al. have demonstrated *in vitro* and *in vivo* that SN38, the active metabolite of irinotecan, leads to a secondary activation of AKT, a kinase involved in cell proliferation, in two colon cancer lines [40]. Thus, the inhibition of PI3K/Akt/mTOR with mTOR inhibitor could abolish this mechanism of resistance when using irinotecan alone.

Development of targeted therapies requires the identification of biomarkers to predict tumor sensitivity, and there is currently no consensus on biomarker(s) predicting response to mTOR inhibitors alone or in combination. The use of PDX with different mutational profiles show the effectiveness of the combination on a stage IV colon tumor (PDX36M1), but also for a tumor mutated on the PIK3CA and ERBB2 genes (PDX40). These results therefore suggest a potential benefit of the low dose irinotecan combined to mTOR catalytic inhibitors, for

tumors whose current therapeutic arsenal is limited. Indeed, tumors with KRAS or ERBB2 mutations have been shown to be resistant to anti-EGFR antibodies [41] whereas other studies have shown that tumors with mutations in the PI3K pathway or loss of PTEN are more sensitive to mTOR inhibitors [42]. However, we cannot conclude on the impact of PI3K/AKT and Ras/MAPK pathway mutations on treatment response as the overall genetic context of the PDX is not perfectly defined and other markers could contribute to the response to drugs. Indeed, we now know that the sensitivity of cells to irinotecan depends on the status of p53 [43] as cells with a mutated p53 protein have decreased sensitivity to irinotecan. In other hand, non-small cell lung tumor cells bearing a copy number gain of the RICTOR gene have increased sensitivity to AZD8055, AZD2014, and INK128 [44], while mutations in FBXW7 would contribute to resistance to mTOR inhibitors [45].

Our study also shows the benefit of the irinotecan+AZD2014 combination on migration and invasion processes *in vitro* and metastasis development *in vivo*. This can partly be explained by the different factors targeted by irinotecan and AZD2014. Indeed, inhibition of mTOR suppresses the invasive potential of glioblastoma cells by inhibition of PKC α activity and NF κ B expression [46]. In addition, Gulhati et al. have shown that the use of shRNA directed against Raptor or Rictor leads to an increase in vimentin and a decrease in E-cadherin *in vitro* in the SW480 cells [47]. Inhibition of mTOR would therefore prevent epithelial-mesenchymal transition and therefore inhibit tumor cell dissemination. The use of mTOR inhibitors is potentially a hope in the colon cancer treatment and the rational for association with other chemotherapeutic agents like irinotecan seems to be useful but the identification of subgroup of patient that are most likely to respond remains as a major challenge.

Acknowledgements

We thank Elisabeth Martin for excellent technical assistance.

References

- [1] A.-M. Bouvier, *Epidémiologie descriptive du cancer colorectal en France*, BEH Thématique. (2009) 2–3.
- [2] J.A. McCubrey, L.S. Steelman, S.L. Abrams, J.T. Lee, F. Chang, F.E. Bertrand, P.M. Navolanic, D.M. Terrian, R.A. Franklin, A.B. D’Assoro, J.L. Salisbury, M.C. Mazzarino, F. Stivala, M. Libra, *Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance*, *Adv. Enzyme Regul.* 46 (2006) 249–279. doi:10.1016/j.advenzreg.2006.01.004.
- [3] D.A. Guertin, D.M. Sabatini, *Defining the Role of mTOR in Cancer*, *Cancer Cell.* 12 (2007) 9–22. doi:10.1016/j.ccr.2007.05.008.
- [4] E. Jacinto, R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M.A. Rüegg, A. Hall, M.N. Hall, *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*, *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 1122–1128. doi:10.1038/ncb1183.
- [5] X.M. Ma, J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 307–318. doi:10.1038/nrm2672.
- [6] M. Guba, P. von Breitenbuch, M. Steinbauer, G. Koehl, S. Flegel, M. Hornung, C.J. Bruns, C. Zuelke, S. Farkas, M. Anthuber, K.-W. Jauch, E.K. Geissler, *Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor*, *Nat. Med.* 8 (2002) 128–135. doi:10.1038/nm0202-128.
- [7] C.L. Sawyers, *Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs?*, *Cancer Cell.* 4 (2003) 343–348. doi:10.1016/S1535-6108(03)00275-7.
- [8] G. Hudes, M. Carducci, P. Tomczak, J. Dutcher, R. Figlin, A. Kapoor, E. Staroslawska, J. Sosman, D. McDermott, I. Bodrogi, *Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma*, *N. Engl. J. Med.* 356 (2007) 2271–2281.
- [9] R.J. Motzer, B. Escudier, S. Oudard, T.E. Hutson, C. Porta, S. Bracarda, V. Grünwald, J.A. Thompson, R.A. Figlin, N. Hollaender, G. Urbanowitz, W.J. Berg, A. Kay, D. Lebwohl, A. Ravaud, *Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial*, *The Lancet.* 372 (2008) 449–456. doi:10.1016/S0140-6736(08)61039-9.
- [10] J. Rodon, J. Tabernero, *Improving the Armamentarium of PI3K Inhibitors with Isoform-Selective Agents: A New Light in the Darkness*, *Cancer Discov.* 7 (2017) 666–669. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0500.
- [11] D. Benjamin, M. Colombi, C. Moroni, M.N. Hall, *Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors*, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 868–880. doi:10.1038/nrd3531.
- [12] K. Yu, C. Shi, L. Toral-Barza, J. Lucas, B. Shor, J.E. Kim, W.-G. Zhang, R. Mahoney, C. Gaydos, L. Tardio, S.K. Kim, R. Conant, K. Curran, J. Kaplan, J. Verheijen, S. Ayrál-Kaloustian, T.S. Mansour, R.T. Abraham, A. Zask, J.J. Gibbons, *Beyond rapalog therapy: preclinical pharmacology and antitumor activity of WYE-125132, an ATP-competitive and specific inhibitor of mTORC1 and mTORC2*, *Cancer Res.* 70 (2010) 621–631. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2340.
- [13] D.D. Sarbassov, D.A. Guertin, S.M. Ali, D.M. Sabatini, *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*, *Science.* 307 (2005) 1098–1101. doi:10.1126/science.1106148.
- [14] C.A. Sparks, D.A. Guertin, *Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy*, *Oncogene.* 29 (2010) 3733–3744. doi:10.1038/onc.2010.139.

- [15] M. Laplante, D.M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth Control and Disease, *Cell*. 149 (2012) 274–293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- [16] T.A. Eyre, G.P. Collins, A.H. Goldstone, K. Cwynarski, Time now to TORC the TORC? New developments in mTOR pathway inhibition in lymphoid malignancies, *Br. J. Haematol.* (2014) n/a-n/a. doi:10.1111/bjh.12945.
- [17] M. Höckel, P. Vaupel, Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects, *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (2001) 266–276. doi:10.1093/jnci/93.4.266.
- [18] B.G. Wouters, M. Koritzinsky, Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 8 (2008) 851–864. doi:10.1038/nrc2501.
- [19] L.F. Liu, S.D. Desai, T.K. Li, Y. Mao, M. Sun, S.P. Sim, Mechanism of action of camptothecin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 922 (2000) 1–10.
- [20] E. Guérin, W. Raffelsberger, E. Pencreach, A. Maier, A. Neuville, A. Schneider, P. Bachellier, S. Rohr, A. Petitprez, O. Poch, In Vivo Topoisomerase I Inhibition Attenuates the Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Target Genes and Decreases Tumor Angiogenesis, *Mol. Med.* 18 (2012) 83.
- [21] J.Y. Douillard, D. Cunningham, A.D. Roth, M. Navarro, R.D. James, P. Karasek, P. Jandik, T. Iveson, J. Carmichael, M. Alakl, G. Gruia, L. Awad, P. Rougier, Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial, *Lancet Lond. Engl.* 355 (2000) 1041–1047.
- [22] K.G. Pike, K. Malagu, M.G. Hummersone, K.A. Menear, H.M.E. Duggan, S. Gomez, N.M.B. Martin, L. Ruston, S.L. Pass, M. Pass, Optimization of potent and selective dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors: The discovery of AZD8055 and AZD2014, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 1212–1216. doi:10.1016/j.bmcl.2013.01.019.
- [23] T.-C. Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 621–681. doi:10.1124/pr.58.3.10.
- [24] T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27–55.
- [25] D. Guenot, E. Guérin, S. Aguilon-Romain, E. Pencreach, A. Schneider, A. Neuville, M.-P. Chenard, I. Duluc, S. Du Manoir, C. Brigand, P. Oudet, M. Kedingier, M.-P. Gaub, Primary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability, *J. Pathol.* 208 (2006) 643–652. doi:10.1002/path.1936.
- [26] C.M. Chresta, B.R. Davies, I. Hickson, T. Harding, S. Cosulich, S.E. Critchlow, J.P. Vincent, R. Ellston, D. Jones, P. Sini, D. James, Z. Howard, P. Dudley, G. Hughes, L. Smith, S. Maguire, M. Hummersone, K. Malagu, K. Menear, R. Jenkins, M. Jacobsen, G.C.M. Smith, S. Guichard, M. Pass, AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with In vitro and In vivo Antitumor Activity, *Cancer Res.* 70 (2010) 288–298. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1751.
- [27] N.A. Boughattas, F. Lévi, C. Fournier, G. Lemaigre, A. Roulon, B. Hecquet, G. Mathé, A. Reinberg, Circadian rhythm in toxicities and tissue uptake of 1,2-diamminocyclohexane(trans-1)oxalatoplatinum(II) in mice, *Cancer Res.* 49 (1989) 3362–3368.

- [28] S. Cao, C. Frank, Y.M. Rustum, Role of Fluoropyrimidine Schedule and (6R, S)Leucovorin Dose in a Preclinical Animal Model of Colorectal Carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 430–436. doi:10.1093/jnci/88.7.430.
- [29] S.M. Robinson, D.A. Mann, D.M. Manas, F. Oakley, J. Mann, S.A. White, The potential contribution of tumour-related factors to the development of FOLFOX-induced sinusoidal obstruction syndrome, *Br. J. Cancer.* 109 (2013) 2396–2403. doi:10.1038/bjc.2013.604.
- [30] T.-C. Chou, Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method, *Cancer Res.* 70 (2010) 440–446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
- [31] Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer, *Nature.* 487 (2012) 330–337. doi:10.1038/nature11252.
- [32] S.M. Johnson, P. Gulhati, B.A. Rampy, Y. Han, P.G. Rychahou, H.Q. Doan, H.L. Weiss, B.M. Evers, Novel Expression Patterns of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway Components in Colorectal Cancer, *J. Am. Coll. Surg.* 210 (2010) 767–776. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2009.12.008.
- [33] T.F. Cloughesy, K. Yoshimoto, P. Nghiemphu, K. Brown, J. Dang, S. Zhu, T. Hsueh, Y. Chen, W. Wang, D. Youngkin, Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma, *PLoS Med.* 5 (2008) e8.
- [34] A. Carracedo, L. Ma, J. Teruya-Feldstein, F. Rojo, L. Salmena, A. Alimonti, A. Egia, A.T. Sasaki, G. Thomas, S.C. Kozma, A. Papa, C. Nardella, L.C. Cantley, J. Baselga, P.P. Pandolfi, Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer, *J. Clin. Invest.* (2008). doi:10.1172/JCI34739.
- [35] I. Altomare, H. Hurwitz, Everolimus in colorectal cancer, *Expert Opin. Pharmacother.* 14 (2013) 505–513. doi:10.1517/14656566.2013.770473.
- [36] K. Ng, J. Tabernero, J. Hwang, E. Bajetta, S. Sharma, S.A. Del Prete, E.R. Arrowsmith, D.P. Ryan, M. Sedova, J. Jin, K. Malek, C.S. Fuchs, Phase II Study of Everolimus in Patients With Metastatic Colorectal Adenocarcinoma Previously Treated With Bevacizumab-, Fluoropyrimidine-, Oxaliplatin-, and Irinotecan-Based Regimens, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19 (2013) 3987–3995. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0027.
- [37] M.E. Feldman, B. Apffel, A. Uotila, R. Loewith, Z.A. Knight, D. Ruggero, K.M. Shokat, Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2, *PLoS Biol.* 7 (2009). doi:10.1371/journal.pbio.1000038.
- [38] J.M. García-Martínez, J. Moran, R.G. Clarke, A. Gray, S.C. Cosulich, C.M. Chresta, D.R. Alessi, Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR), *Biochem. J.* 421 (2009) 29–42. doi:10.1042/BJ20090489.
- [39] K.E. O'Reilly, F. Rojo, Q.-B. She, D. Solit, G.B. Mills, D. Smith, H. Lane, F. Hofmann, D.J. Hicklin, D.L. Ludwig, mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt, *Cancer Res.* 66 (2006) 1500–1508.
- [40] A. Vétillard, B. Jonchère, M. Moreau, B. Toutain, C. Henry, S. Fontanel, A.-C. Bernard, M. Campone, C. Guette, O. Coqueret, Akt inhibition improves irinotecan treatment and prevents cell emergence by switching the senescence response to apoptosis, *Oncotarget.* 6 (2015) 43342–43362.
- [41] S.M. Kavuri, N. Jain, F. Galimi, F. Cottino, S.M. Leto, G. Migliardi, A.C. Searleman, W. Shen, J. Monsey, L. Trusolino, S.A. Jacobs, A. Bertotti, R. Bose, HER2 activating

- mutations are targets for colorectal cancer treatment, *Cancer Discov.* 5 (2015) 832–841. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1211.
- [42] F. Janku, J.J. Lee, A.M. Tsimberidou, D.S. Hong, A. Naing, G.S. Falchook, S. Fu, R. Luthra, I. Garrido-Laguna, R. Kurzrock, PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers, *PloS One.* 6 (2011) e22769. doi:10.1371/journal.pone.0022769.
- [43] R.A. Bras-Gonçalves, C. Rosty, P. Laurent-Puig, P. Soulié, B. Dutrillaux, M.F. Poupon, Sensitivity to CPT-11 of xenografted human colorectal cancers as a function of microsatellite instability and p53 status, *Br. J. Cancer.* 82 (2000) 913–923. doi:10.1054/bjoc.1999.1019.
- [44] N. Sakre, G. Wildey, M. Behtaj, A. Kresak, M. Yang, P. Fu, A. Dowlati, RICTOR amplification identifies a subgroup in small cell lung cancer and predicts response to drugs targeting mTOR, *Oncotarget.* 8 (2017) 5992–6002. doi:10.18632/oncotarget.13362.
- [45] D.L. Jardim, J.J. Wheler, K. Hess, A.M. Tsimberidou, R. Zinner, F. Janku, V. Subbiah, A. Naing, S.A. Piha-Paul, S.N. Westin, S. Roy-Chowdhuri, F. Meric-Bernstam, D.S. Hong, FBXW7 Mutations in Patients with Advanced Cancers: Clinical and Molecular Characteristics and Outcomes with mTOR Inhibitors, *PLoS ONE.* 9 (2014) e89388. doi:10.1371/journal.pone.0089388.
- [46] G. Chandrika, K. Natesh, D. Ranade, A. Chugh, P. Shastry, Suppression of the invasive potential of Glioblastoma cells by mTOR inhibitors involves modulation of NFκB and PKC-α signaling, *Sci. Rep.* 6 (2016). doi:10.1038/srep22455.
- [47] P. Gulhati, K.A. Bowen, J. Liu, P.D. Stevens, P.G. Rychahou, M. Chen, E.Y. Lee, H.L. Weiss, K.L. O'Connor, T. Gao, B.M. Evers, mTORC1 and mTORC2 Regulate EMT, Motility, and Metastasis of Colorectal Cancer via RhoA and Rac1 Signaling Pathways, *Cancer Res.* 71 (2011) 3246–3256. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4058.

Legends to the figures

Figure 1. Effects of rapamycin, AZD8055 and AZD2014 on colon cancer cell viability. Viability analysis of colon cancer cells was obtained by Crystal violet assay after 72 hours of treatment. The four cell lines were treated with increasing concentrations of rapamycin, AZD8055 or AZD2014 (range of concentrations from 0.01nM to 5000nM). Each point corresponds to the mean \pm SEM of three independent experiments, each carried out in quintuplicate. The tables below graph summarize quantification of IG50, affected fraction (F_a) for an IG50 and concentration for an affected fraction at 80% where sensibility is specified from + (weak sensibility) to +++ (strong sensibility).

Figure 2. Effects of rapamycin, AZD8055 and AZD2014 on mTOR pathway. Western blot analysis (WB) of S6RP protein phosphorylation after 24h exposure at different concentrations of rapamycin, AZD8055 and AZD2014. WB are representative of 3 independent experiments.

Figure 3. Benefits of AZD8055 and AZD2014 on the inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. A) Effects on phosphorylation of ERK, mTORC1 (S6RP and 4EBP1), mTORC2 (AKT) main effectors and after 24h treatment. WB are representative of 3 independent experiments. Ctrl: untreated cells, R50: rapamycin at 50nM; A50: AZD8055 at 50nM; A200: AZD2014 at 200nM. **B)** Analysis of ERK and AKT phosphorylation after 24h treatment with rapamycin (50nM), LY294002 PI3K inhibitor (20 μ M) or combination of both drugs in SW480 cells.

Figure 4. Synergism between irinotecan (Irinotecan) and AZD8055 and between irinotecan (Irinotecan) and AZD2014 on colon cancer cell viability. Combination index (CI) showing the synergistic effect of irinotecan and AZD8055 or AZD2014 on colon cancer cells. CI was determined from Chou and Talalay method, according to a constant ratio model. For a given efficiency, the combination index (CI) allows to define if the association is synergistic CI <1, additive CI = 1 or antagonist CI > 1.

Figure 5. In vivo effect of irinotecan (Irinotecan) and AZD2014 combination on tumor growth of 36M1 PDX. A) Relative tumor volume (mean RTV \pm standard deviation) as a function of time for the PDX36M1 xenograft. Each group consists of 7 subcutaneous xenografted mice. The table summarizes the Δ MTV, RTV and TGI for each group between the start and the end of treatment. Δ MTV (%): variation of the average tumor volume between the day 1 and the end of the treatments. RTV: Relative tumor volume. SEM: Standard error of mean. TGI (%): Tumor Growth Inhibition. **B)** Immunostaining for CK19 of 36M1 xenograft tissue sections at the end of treatments. The images are representative of different tumors from each group.

The treatment schedules are as follows: irinotecan (Irinotecan) (IP, 10mg / kg / day q5d); AZD2014 (PO, 20mg / kg BID 2days / 5); FOLFFOX (5FU: 50mg / kg - q7d - IP, LV: 90mg / kg - q7d - IP, Oxaliplatin: 6mg / kg - q7d - IP). ** p <0.005, *** p <0.0005.

Figure 6. In vivo effect of irinotecan (Irinotecan) and AZD2014 combination on tumor growth of PDX40 xenograft. A) Relative tumor volume (mean RTV \pm standard deviation) as a function of time for the PDX40 xenograft. The table summarizes the Δ MTV, RTV and TGI for each group between the start and the end of treatment. Δ MTV (%): variation of the average tumor volume between the day 1 and the end of the treatments. RTV: Relative tumor volume. SEM: Standard error of mean. TGI (%): Tumor Growth Inhibition. **B)** Quantification of cells positive for phosphohistone H3 in PDX 40 tumor cells, 10 days after initiation of treatment. The data are expressed in relative ratio to the control group. **C)** Kaplan-Meier analysis of mouse survival for PDX40 in each group of treatments. An event

corresponds to the sacrifice of the mouse due to a tumor volume above 1500mm³ or because of tumor ulceration. The treatment schedules are as follows: irinotecan (Irino) (IP, 10mg / kg / day q5d); AZD2014 (PO, 20mg / kg BID 2days / 5); FOLFIRI (5FU: 50mg / kg - q7d - IP, LV: 90mg / kg - q7d - IP, irinotecan 10mg / kg - q5d-IP). Control mice receive no treatment. * p <0.05, *** p <0.0005.

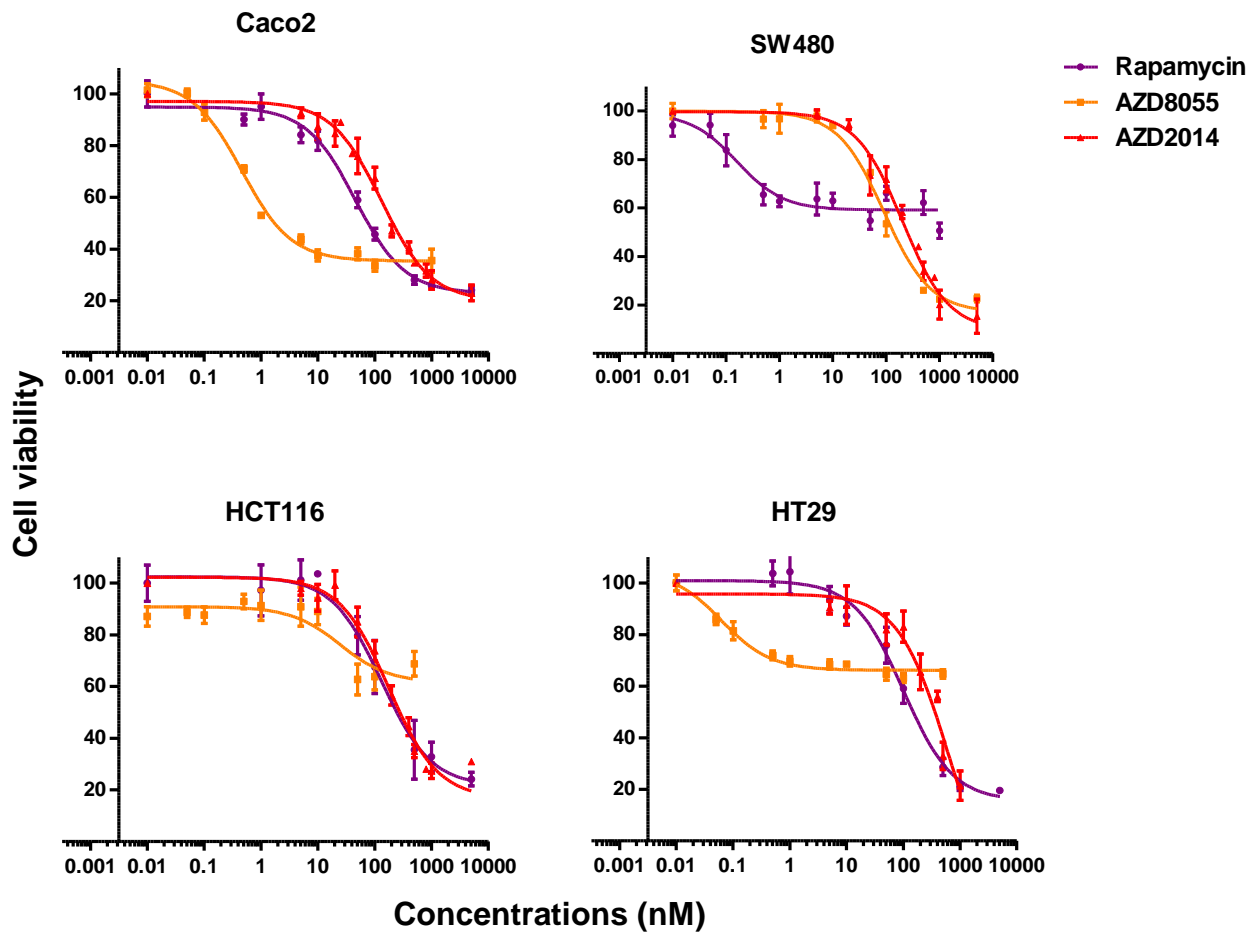
Figure 7. Effect of irinotecan and AZD2014 on SW480 cell migration and invasion. Migration **(A)** and invasion **(B)** assays of SW480 cells cultured in Boyden chambers for 24 hours. The graph represents the ratio of migrated cells in each condition compared to the control cells. For the invasion test, Boyden chambers are coated with matrigel (150µg/ml). Control: untreated cells; irinotecan: 1µM; AZD2014: 200nM

Figure 8: Effect of irinotecan and AZD2014 on in vivo formation of metastases. **A)** Scheme of the procedure of orthotopic injection of SW480 cells (5.10⁶ cells/100µl) to detect metastases disseminating from a primary caecal tumor. **B)** Organs have been removed 25 days after the SW480 cell injection. H&E staining and CK19 expression in the caecum, liver and lungs of the orthotopically xenografted mice 25 days after the cell injection. White and black arrows: colon tumor cells, red arrow: normal caecal mucosa, green arrow: tumor that developed into the caecum wall. Scale: 10X. **C).** Mean primary caecal tumor volume (MTV) and macroscopic evaluation of metastases in the liver and lungs 25 days after the cell injection (spots of necrosis). +++: numerous spots, ++: moderate spots, +: few spots, - no spot. **D)** Human DNA expression (%) in the liver and lungs of orthotopically xenografted mice at the end of treatment (day 25 after SW480 cell injection). The amount of human DNA in the organs is determined by quantification by q-PCR of the Alu sequences. CTRL (-): mice without intracaecal SW480 cell injection. CTRL: untreated mice, irinotecan (10mg/kg, q5d, IP), AZD2014 (20mg/kg, bid 2on/5off, PO), irinotecan (10mg/kg, q5d, IP) + AZD2014 (20mg/kg, bid 2on/5off, PO).

Supplementary Data S1. List of genes and exons covered by Tumor Hotspot MASTR Plus assay (Multiplicom) for NGS sequencing

Supplementary Table 1. Molecular characteristics of CRC cell lines and PDX

Supplementary Table 2. Clinical and pathological data of patient-derived xenografts



Pattern A Rapamycin	IG50 (nM)	Fa (IG50) (%)	Fa=80% (nM)	Sensibility
Caco2	0,5	30	x	++
SW480	0,16	23	x	+
HCT116	24,7	12	x	+
HT29	0,06	15	x	+

Pattern B AZD8055 / AZD2014	IG50 (nM)	Fa (IG50) (%)	Fa=80% (nM)	Sensibility
Caco2	45,8/131	40	1000	+++
SW480	91/200	50	1000	+++
HCT116	133/177	45	1000	+++
HT29	100,6/595	45	1000	+++

Figure 1

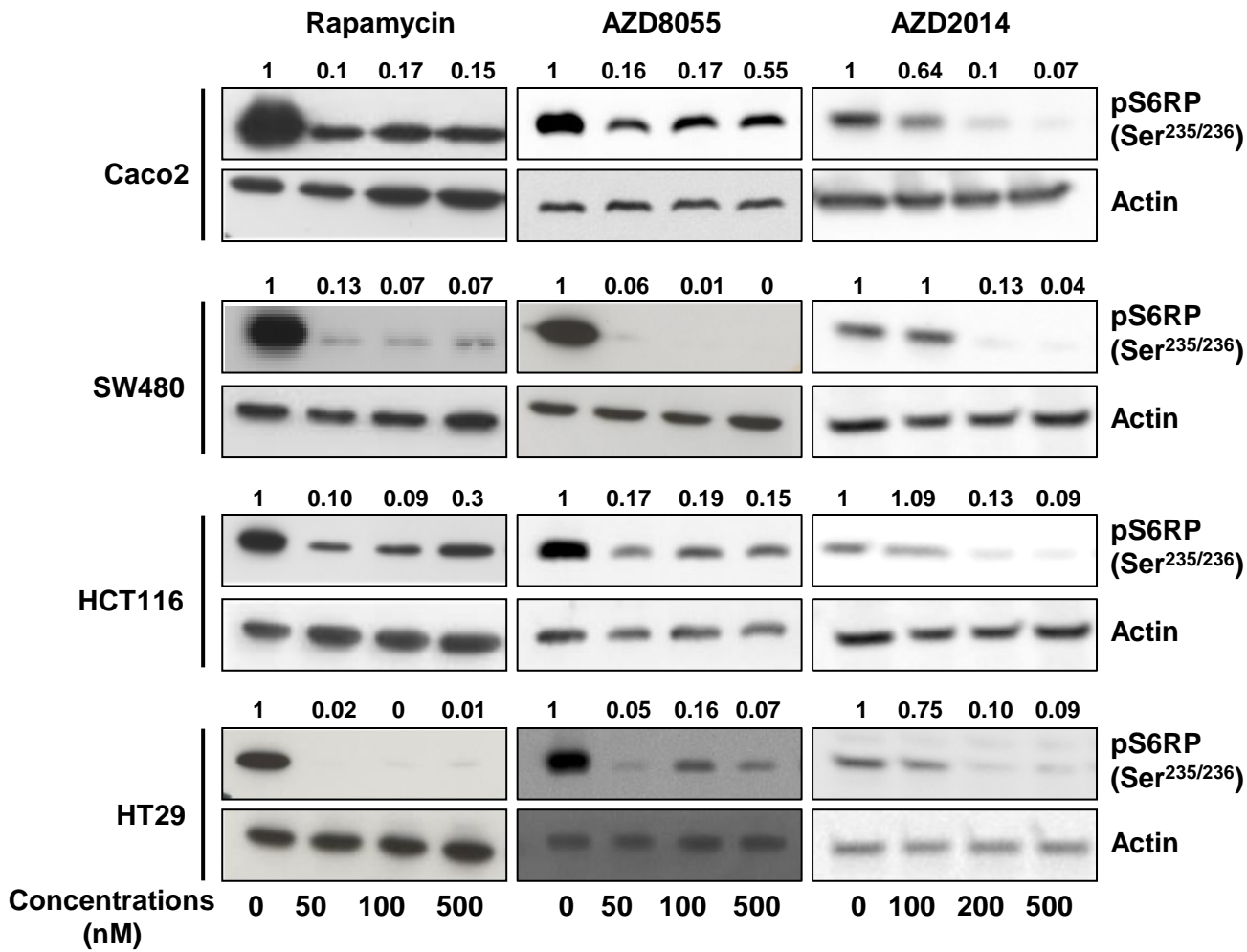


Figure 2

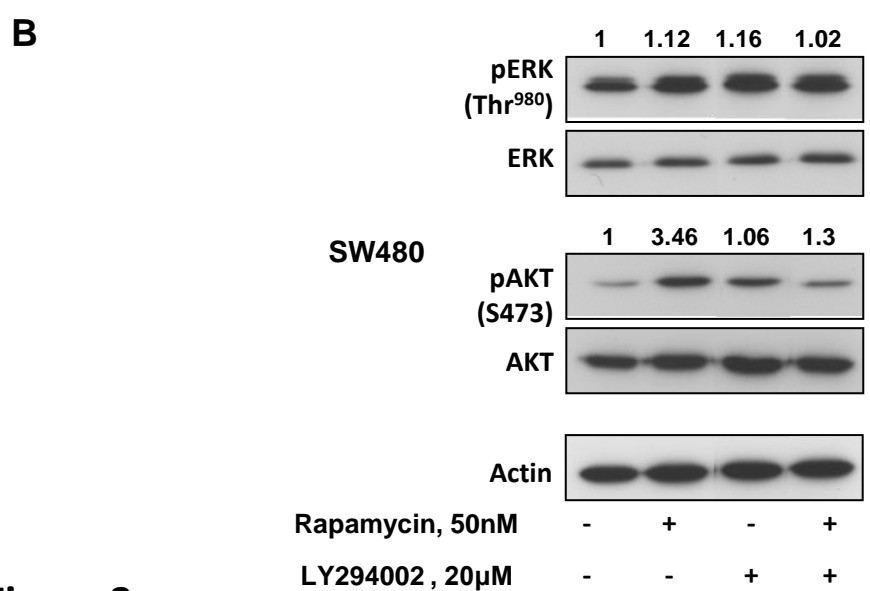
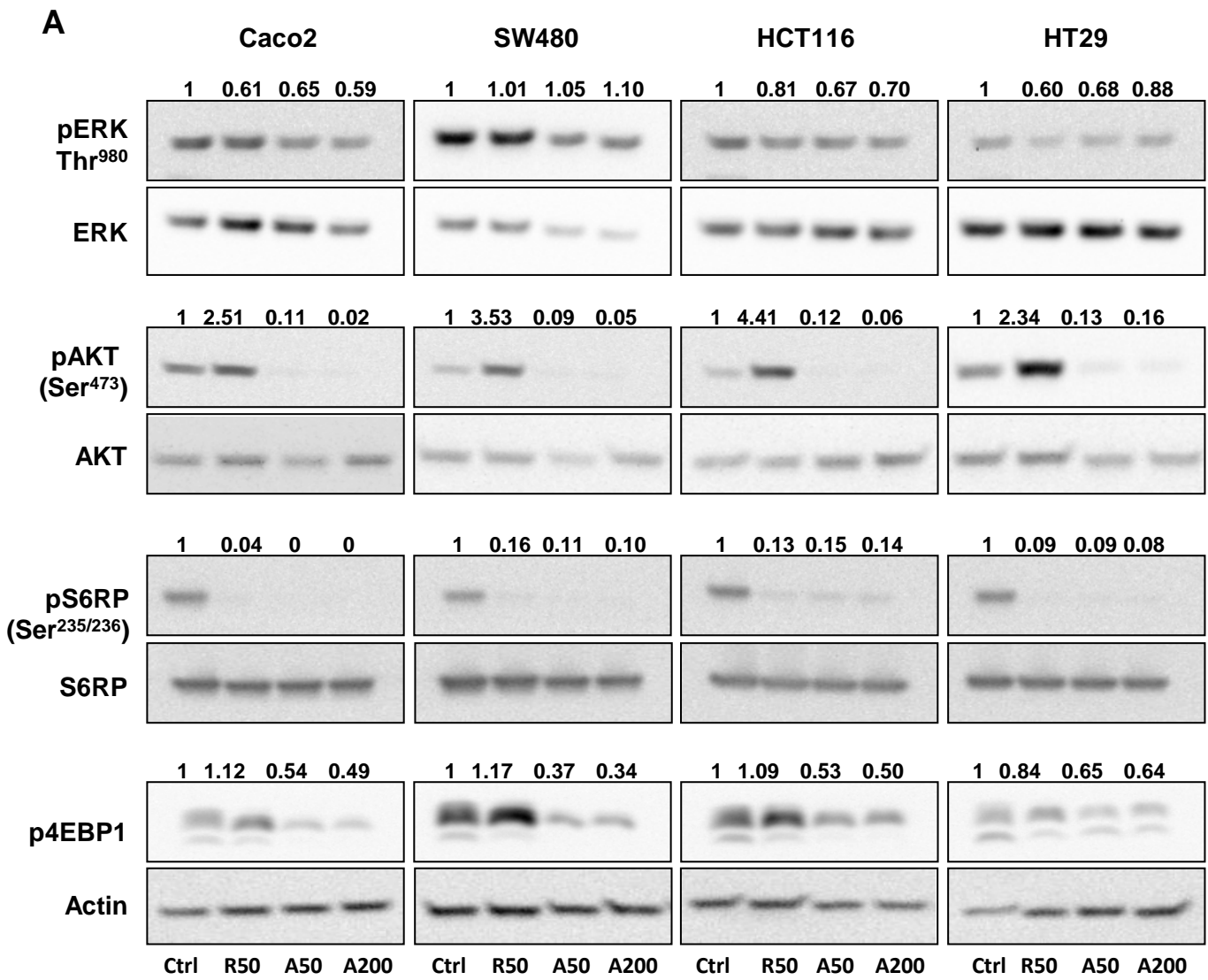


Figure 3

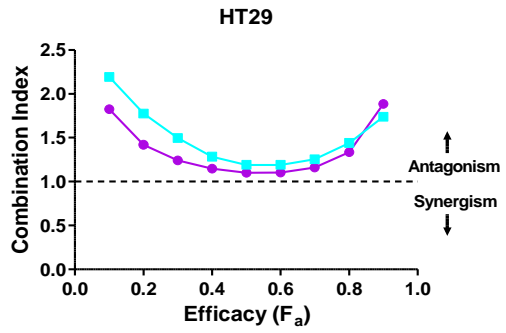
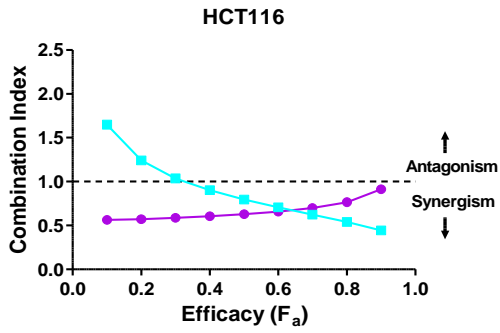
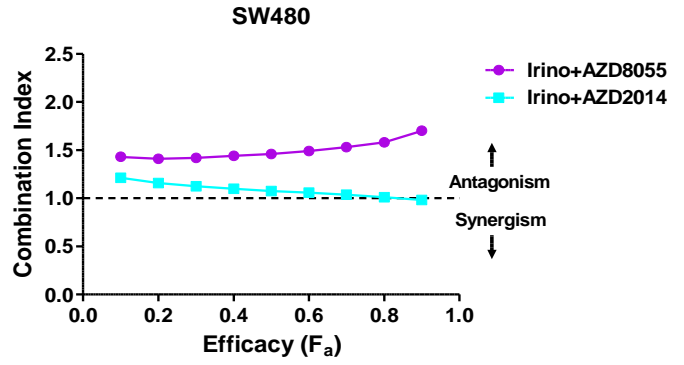
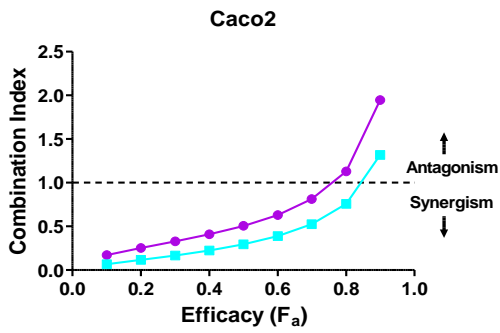
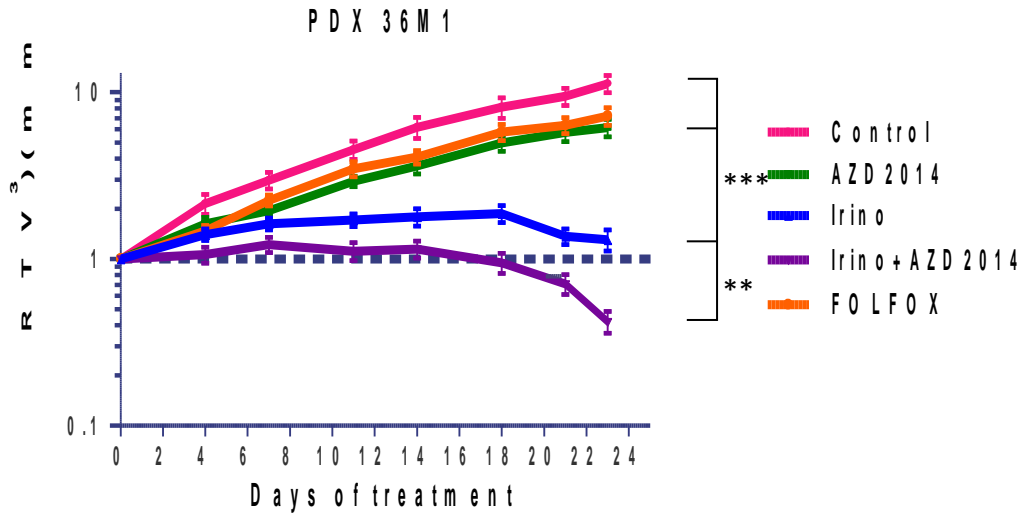


Figure 4

A



PDX 36M1

	Control	Irino	AZD2014	Irino + AZD2014	Folfox
Δ MTV	+ 375%	+42%	+290%	-23%	+455%
RTV	9,42	1,36	5,73	0,71	6,32
SEM	1,1	0,15	0,69	0,09	0,7
TGI	-	85,6	39,2	92,5	32,9

B

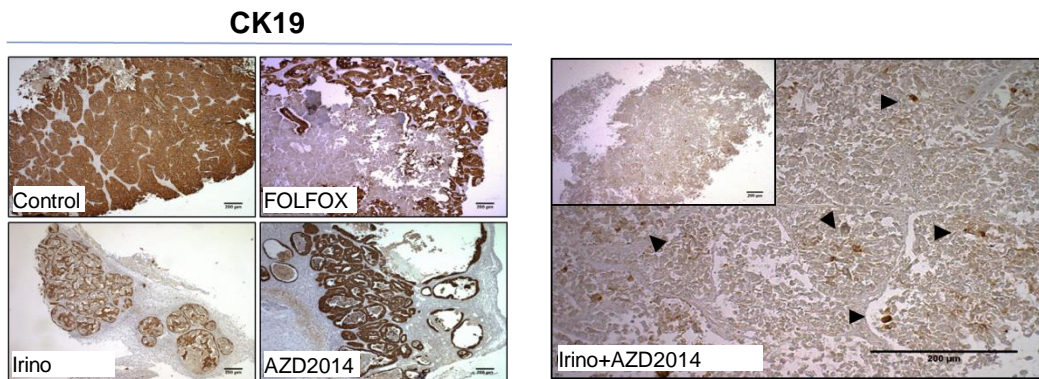
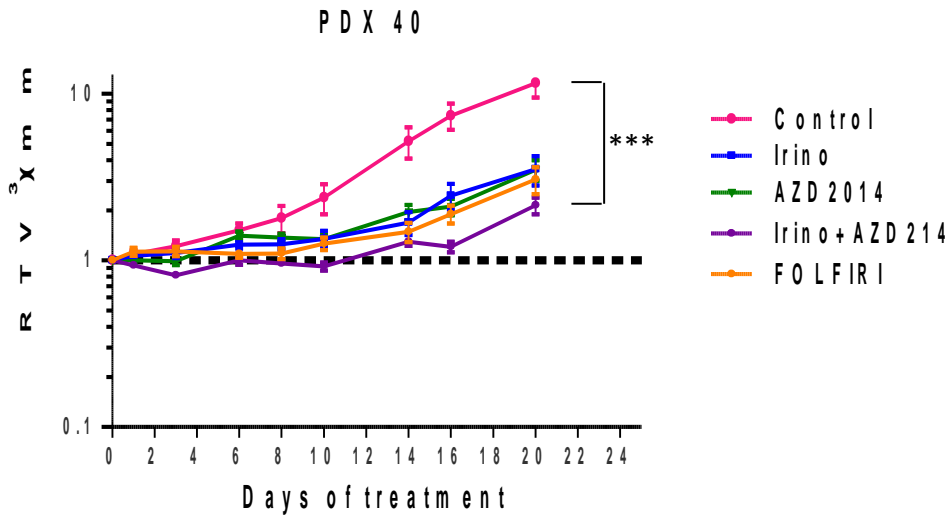
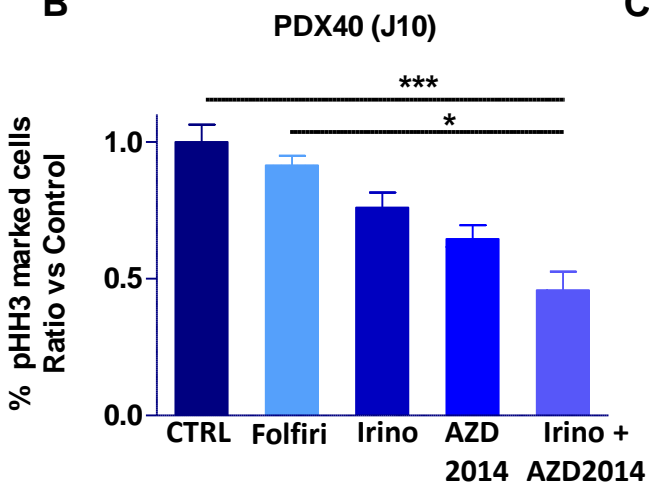
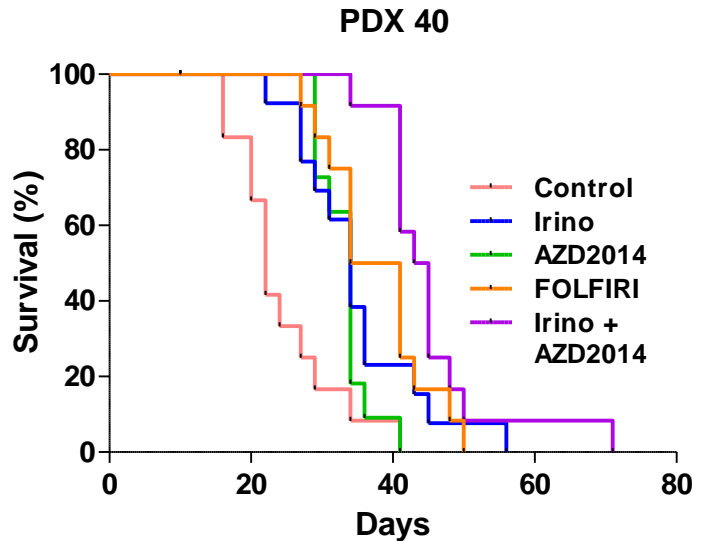


Figure 5

A

	PDX40				
	Control	Irino	AZD2014	Irino + AZD	FOLFIRI
Δ MTV	+1040 %	+135%	+240%	+116%	+140%
RTV	11,55	3,52	3,5	2,13	3,05
SEM	2,06	0,7	0,5	0,25	0,56
TGI	-	69,5	69,7	81,6	73,6

B**C****Figure 6**

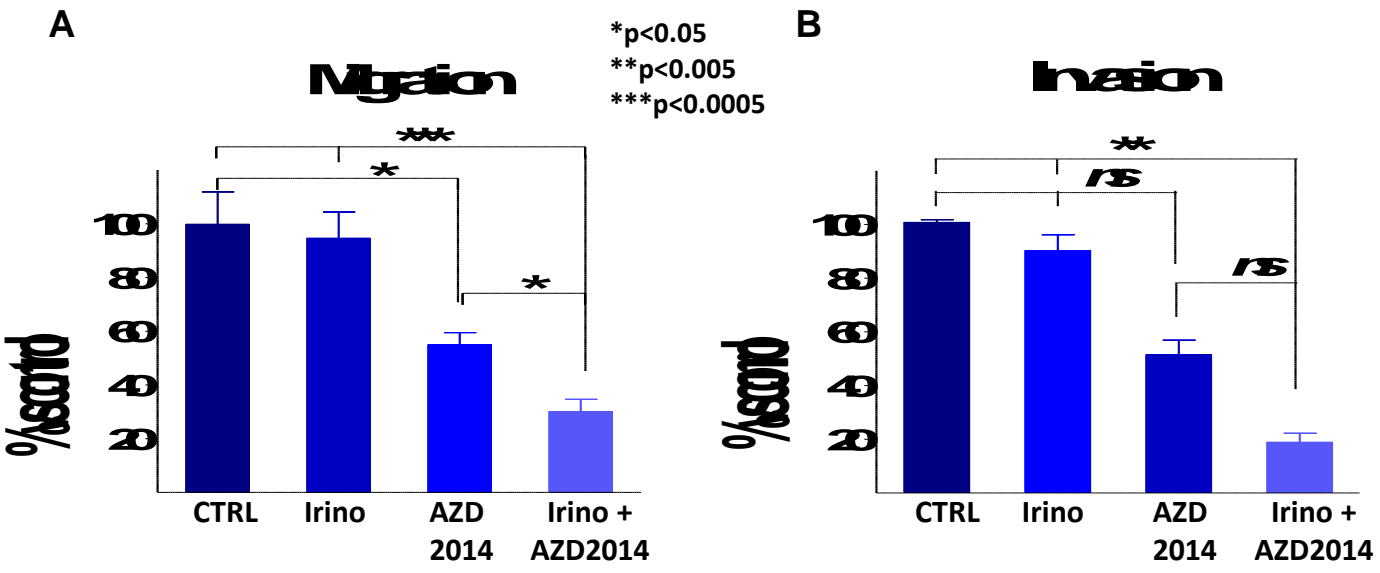
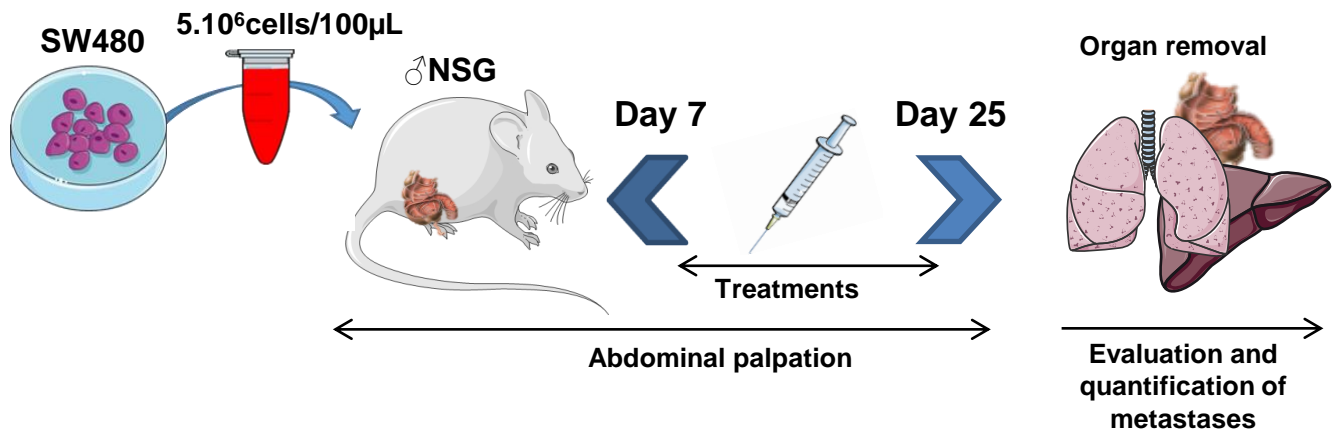
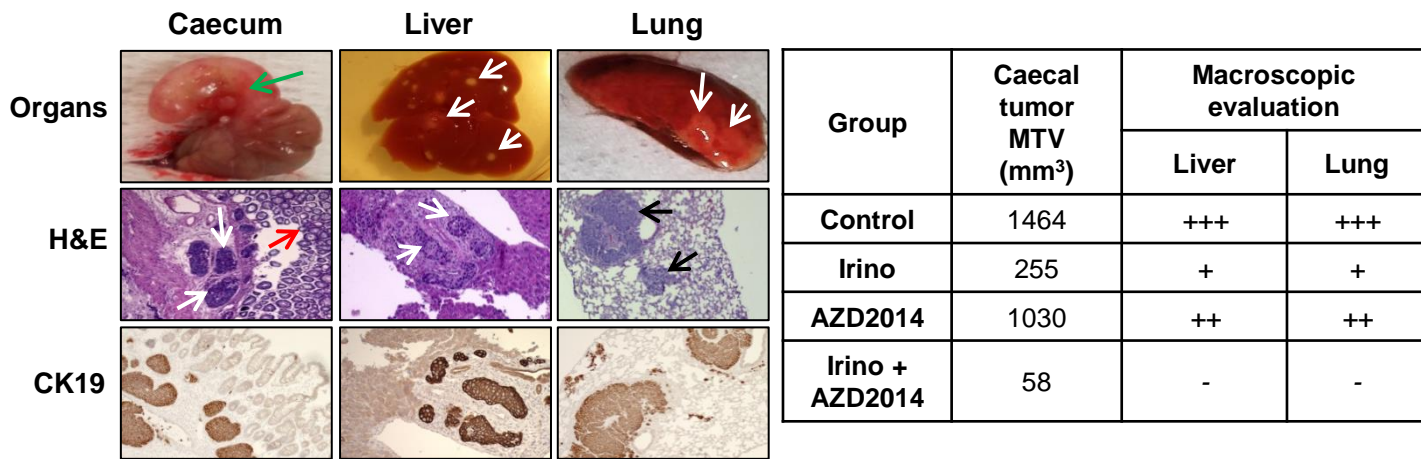
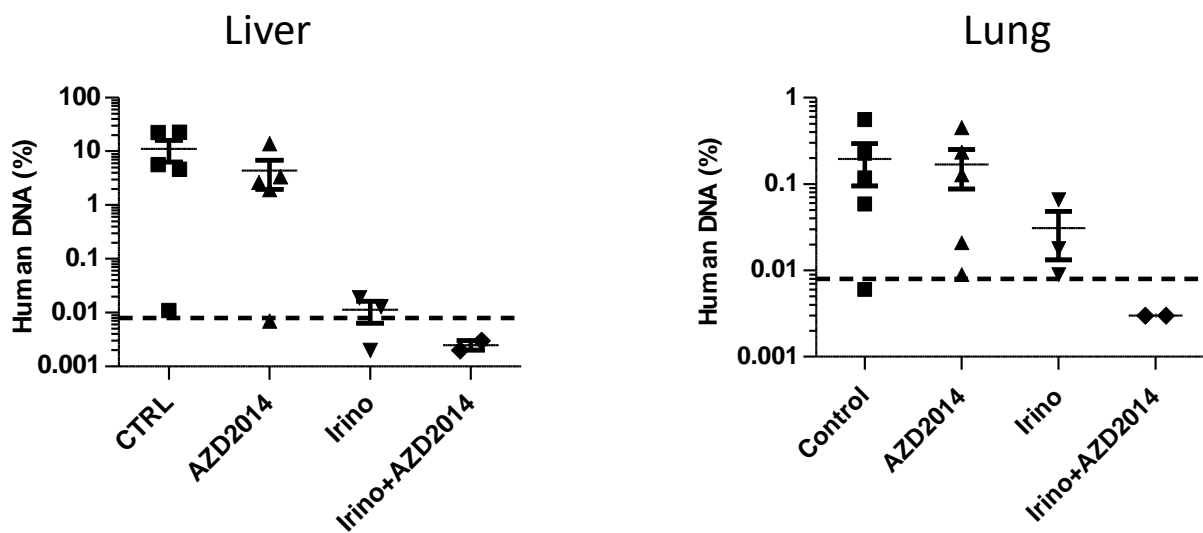


Figure 7

A**B****C****Figure 8**

Supplementary data S1: List of genes and exons covered by Tumor Hotspot MASTR Plus assay (Multiplicom) for NGS sequencing

AKT1: NM_005163.2, exon 3
ALK: NM_004304.4, exons 20 to 29
BRAF: NM_004333.4, exons 11 and 15
CDKN2A: NM_000077.4 (p16/INK4a) and NM_058195.3 (p14/ARF), whole coding sequence (3 exons)
CTNNB1: NM_001904.3, exon 3
DDR2: NM_006182.2, whole coding sequence (16 exons)
EGFR: NM_005228.3, exons 18 to 21
ERBB2/HER2: NM_004448.3, exons 19, 20 and 21
ERBB4/HER4: NM_005235.2, exons 10 and 12
FGFR2: NM_000141.4, exons 7, 12 and 14
FGFR3: NM_000142.4, exons 7, 9, 14 and 16
H3F3A: NM_002107.4, exon 2
HIST1H3B: NM_003537.3, exon 1
HRAS: NM_005343.3, exons 2, 3 and 4
IDH1: NM_005896.3, exon 4
IDH2: NM_002168.3, exon 4
KIT: NM_000222.2, exons 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17 and 18
KRAS: NM_033360.3, exons 2, 3 and 4
MAP2K1/MEK1: NM_002755.3, exons 2 and 3
MET: NM_001127500.1, exons 2, 10, 14 to 20
NRAS: NM_002524.4, exons 2, 3 and 4
PDGFRA: NM_006206.4, exons 12, 14 and 18
PIK3CA: NM_006218.2, exons 2, 3, 10, 11 and 21
PIK3R1: NM_181523.2, exons 11, 12 and 13
PTEN: NM_000314.6, whole coding sequence (9 exons)
STK11/LBK1: NM_000455.4, whole coding sequence (9 exons)

Supplementary Table 1: Clinical parameters of human colon tumors used for patient-derived xenografts (PDX).

	PDX 36M1	PDX 40
TNM	pT3N2M1	pT4N1M1
Stage	IV	IV
Tumor location	Hepatic metastase	Right colon
Metastasis localization	Liver and lung	Liver
Sex	M	F
Age (years)	74	77
Treatment after surgery	FOLFOX	FOLFOX/FOLFIRI
Evolution	Disease progression after 6 months. Death related to cancer 2 years after surgery	Disease progression at hepatic level. Death related to cancer 6 months after surgery

Supplementary Table 2: Molecular characteristics of CRC cells and PDX

<i>Samples</i>	<i>MSI/MSS</i>	<i>KRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>Others</i>
Caco2	MSS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
SW480	MSS	c.35G>T p.G12V	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HCT116	MSI	c.38G>A p.G13D	WT	WT	WT	c.3140A>G p.H1047R	WT	WT
HT29	MSS	WT	WT	WT	c.1799T>A p.V600E	c.1345C>A p.P449T	WT	WT
PDX-36M1	MSS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
PDX-40	MSS	WT	WT	WT	WT	c.1633G>A p.E545K	WT	ERBB2 c.2264T>C pL755S

Etude des Mécanismes Impliqués dans le Processus Métastatique dans le Cancer Colique Humain: Implication de l'Axe CXCL12/CXCR4/CXCR7

Résumé

Malgré les diagnostics précoces et les avancées thérapeutiques, le taux de mortalité chez les patients diagnostiqués d'un CCR au stade métastatique reste très élevé. L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de la chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans processus métastatique.

J'ai comparé l'expression de la chimiokine CXCL12 dans des tumeurs coliques humaines avec les tissus sains associés puis je me suis intéressée aux mécanismes de régulation de cette expression et plus particulièrement la régulation épigénétique. J'ai montré que le promoteur de CXCL12 est méthylé dans 35% des CCR et qu'un défaut d'acétylation des histones du promoteur entraîne la perte d'expression de CXCL12. Des enzymes impliquées dans la régulation des mécanismes épigénétiques, potentiellement liées à ce défaut d'acétylation ont été identifiées par l'analyse des tumeurs par PCR Array et parmi ces facteurs, j'ai identifié l'histone acétyltransférase PCAF dont l'expression est diminuée dans les tumeurs.

Enfin, pour comprendre le rôle respectif de CXCR4 et de CXCR7 dans la dissémination métastatique, j'ai invalidé l'expression du gène des récepteurs dans la lignée colique humaine SW480 par Crispr-Cas9, puis j'ai comparé la capacité migratoire des cellules *in vitro* et leur potentiel métastatique *in vivo*.

L'induction d'une perte d'expression du récepteur CXCR7 n'a pas eu d'impact sur le développement des métastases pulmonaire et hépatique *in vivo*, mais a entraîné une baisse de la migration *in vitro*.

Mots-clés : CXCL12, épigénétique, CXCR4, CXCR7, métastases, CCR, CRISPR-Cas9

Summary

Despite early cancer detection and therapeutic advances, the mortality rate in patients diagnosed with CRC at the metastatic stage remains very high. The aim of this work was to study the role of the chemokine CXCL12 and its two receptors CXCR4 and CXCR7 in the metastatic process. I compared the expression of the chemokine CXCL12 in human colon tumors with the associated healthy tissues, then I focused on the mechanisms regulating this expression and more particularly the epigenetic regulation. I have shown that the CXCL12 promoter is methylated in 35% of the CCR and that a lack of histone acetylation of the CXCL12 promoter causes the loss of its expression. Enzymes involved in the regulation of epigenetic mechanisms, potentially related to this acetylation defect, were identified by Array PCR on tumors and among these factors, the histone acetyl transferase PCAF, whose expression is decreased in tumors, was identified.

Finally, to understand the respective role of CXCR4 and CXCR7 in metastatic spread, I invalidated the expression of both receptor genes in the human colonic line SW480 by Crispr-Cas9, and then compared the migratory capacity of the cells *in vitro* and their metastatic potential *in vivo*.

Inducing a loss of expression of CXCR7 receptor did not have an impact on the development of pulmonary and hepatic metastases *in vivo*, but resulted in a decrease in *in vitro* migration.

Key words: CXCL12, epigenetic, CXCR4, CXCR7, metastasis, CRC, CRISPR-Cas9