

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

**Inserm U1113 : Interface de Recherche Fondamentale et Appliquée
en Cancérologie (IRFAC)**

THÈSE présentée par : **Aïssata Aimée GOÏTA**

soutenue le **24 Juin 2022**

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

Implication de l'axe CXCL12/CXCR4/CXCR7 dans la dissémination métastatique du cancer colique

THÈSE dirigée par

Madame GUENOT Dominique

DR CNRS, IRFAC, INSERM UMR_1113, Strasbourg

RAPPORTEURS

Madame FERRAND Audrey

DR Inserm, IRSD, INSERM UMR_1220, Toulouse

Monsieur DEDIEU Stéphane

PR CNRS, MEDyc, CNRS UMR_7369, Reims

EXAMINATEURS

Madame DONTENWILL Monique

DR CNRS, CNRS UMR_7021, Strasbourg

Monsieur BALABANIAN Karl

DR Inserm, IRSL, INSERM UMR_1160, Paris

À Daddy et Maman,

REMERCIEMENTS

Je remercie Mesdames Audrey FERRAND et Monique DONTENWILL et Messieurs Stéphane DEDIEU et Karl BALABANIAN pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer mon travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers ma directrice de thèse Dominique GUENOT, tout d'abord, de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer l'équipe depuis le master 2, de m'avoir fait découvert le domaine de l'oncologie, ensuite pour sa gentillesse, sa générosité, sa disponibilité sans égal. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez transmise aussi bien scientifiquement qu'humainement. Vous avez placé en moi toute votre confiance, plus particulièrement quand je n'y croyais plus. Avoir réalisé cette thèse sous votre tutelle fût une des plus belles expériences de ma vie. Merci pour tout Dominique.

J'aimerais adresser des remerciements à tous les chercheurs titulaires de l'unité U1113 pour leurs conseils, disponibilités et encouragements. Une mention particulière pour Claire DOMON-DELL, sans qui je n'aurais pas intégré l'unité.

Une autre mention spéciale pour Elisabeth et Cyril. Je ne saurais comment vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Cyril (*Cyrillounet*), toi que je venais voir au moindre petit problème. Merci de m'avoir supportée. Ma chère Elisabeth, tu n'hésites pas à apporter ton aide à tout le monde dans la vie de tous les jours et plus particulièrement pendant les jours fériés.

Merci pour votre gentillesse, votre patience et votre enthousiasme. Vous avez des cœurs en or et je ne vous oublierai jamais.

Des remerciements à l'égard de Damien, qui n'a pas hésité à m'apprendre les procédures de la méthode orthotopique, pour sa pédagogie et sa patience malgré qu'il ne fasse plus parti de l'équipe. Merci également pour toute l'aide apportée pendant ces périodes de grosses pressions et ce bout de temps partagé. Sans toi, je n'aurais pas pu m'en sortir toute seule avec les expériences *in vivo*.

À mes camarades, Amandine, Ava et Justine, avec qui j'ai débuté cette aventure depuis le master, mais également à Anaïs, Susanna, Yonca et Christelle. Merci les filles pour ces moments de partages (joie, stress, ...) et surtout pour les encouragements lorsque le moral n'était pas au rendez-vous. Ces années n'auraient pas été ce qu'elles sont sans vous les filles. Une mention plus spéciale pour Susanna, un merci ne saurait exprimer tout ce que je ressens, mais je te dis Merci du fond du cœur.

Je tiens également à exprimer mes sentiments les plus sincères aux autres personnes de l'équipe

(particulièrement Nathalie, Léonor, Véronique et (ancien membre) Cédric) d'avoir rendu agréable ces cinq années passées ensemble.

Je ne saurais terminée sans remercier toutes ces personnes merveilleuses que j'ai la chance d'avoir dans ma vie de tous les jours. Je ne pourrais vous nommer toutes et tous, mais un clin d'œil particulier à Mamoutou (*que j'ai initié dans mon monde sans qu'il ne soit biologiste*), Sadia (*que je fatigue mais tellement (même demain je t'appellerais Val)*), Amadou (*un petit frère qui ne respecte pas sa grande sœur*), ma Fatinouchette (*mon amie depuis l'école élémentaire*), Kady Traoré, Dra (*que je fatigue aussi, et pas qu'un peu*), Fatou, Maïmouna (*ma petite sœur (provisoire par moment)*), Adama. Et comment t'oublier Hameye. Pour toi, je n'ai pas besoin de « trop parler » comme on le dit chez nous.

Un grand merci à Taliby (*mon neveu choco*) et Jillys, encore pour tous ces encouragements pendant cette dernière étape. Vous n'avez pas cessé de prendre de mes nouvelles et de me remonter le moral chaque fois que le besoin s'imposait. J'ai énormément apprécié toutes ces attentions à ma personne pendant cette période si difficile de la rédaction.

Je n'oublie pas non plus mes deux lecteurs de choc de dernière minute, (*Madame*) Mariam et Moussa (*mon petit frère adoptif*). Merci d'avoir dégagé du temps pour moi comme vous le faites d'habitude. Je vous dis simplement merci pour tout. Mariam, avec ta joie de vivre, tu as été à l'écoute surtout quand j'avais besoin de m'aérer l'esprit, et nos appels à ne pas en finir furent pour moi, des moments de reconfort. Je pense que les opérateurs téléphoniques n'ont pas vraiment apprécié (*lol*). Ma jolie, je ne peux que te souhaiter le meilleur dans cette vie.

À Aïcha et sa famille adorable. On n'a pas besoin forcément d'avoir des liens de sang avec quelqu'un pour avoir des liens de fraternité. Tu as été, tu es et resteras ma grande sœur d'une autre mère. Je ne pourrais assez te remercier pour tout ce que tu as pu faire pour moi depuis qu'on se connaît, que ce soit à travers tes conseils d'ordre personnel et scientifique, qui m'ont été d'une grande utilité dans ma vie de tous les jours.

Mes remerciements vont également vers toutes celles et ceux qui me soutiennent malgré les kilomètres qui nous séparent. À Ami et Oumou, *mes gonies*, Oumar, Lamine, Paul. Merci de faire partie de mon cercle d'amis. Une mention particulière à mon Bbjo à moi. Je suis contente et heureuse que tu fasses partie de ma vie. Merci tout simplement d'être toi.

C'est avec une grande émotion que je termine avec de tendres pensées pour ma famille. Ma vie, ce sont également mes grands frères, Tonton, Bouba, Papus et Vieux. Merci d'être les grands frères que vous êtes malgré la distance, sans oublier mes grandes sœurs Rokia et Batoma et mes belles sœurs (*mes femmes*). Un clin d'œil spécial à mes femmes Oumou et Kady.

À mes parents qui m'ont tout offert dans cette vie, sans qui je n'aurais pas été la personne que je suis. Vous avez tout fait pour nous mettre dans les conditions, plus que meilleures, à mes frères et moi et je suis tellement fière de faire partie de cette famille. Maman, merci d'être toujours présente et de m'épauler en toutes circonstances même si tu n'es pas forcément d'accord avec mes choix. Daddy, comme j'aurais aimé que tu sois là aujourd'hui. Les années qui passent ne rempliront jamais le vide que tu as laissé. Merci d'avoir été le plus merveilleux des papas et j'espère que de là où tu es, tu es fier de ta « *petite tantie* ». Je vous aime tout simplement.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	
LISTE DES TABLEAUX.....	
ABRÉVIATIONS.....	
INTRODUCTION.....	- 1 -
1. Le côlon	- 3 -
1.1. Caractéristiques anatomiques du côlon	- 3 -
1.2. Caractéristiques histologiques et cellulaires.....	- 3 -
1.3. Fonctions du côlon	- 5 -
2. Le cancer colorectal	- 5 -
2.1. Epidémiologie	- 7 -
2.2. Facteurs de risque.....	- 9 -
2.3. Formes héréditaires du cancer colorectal	- 9 -
2.4. Dépistage du cancer	- 10 -
2.5. Anatomopathologie	- 12 -
2.6. Classification du cancer colorectal.....	- 14 -
2.7. Phénotypes du cancer colorectal	- 16 -
3. Traitements thérapeutiques	- 19 -
4. Pronostic et survie	- 21 -
5. Voies de signalisation critiques dans la carcinogénèse colorectale	- 25 -
5.1. La voie Wnt/ β -caténine	- 25 -
5.2. La voie TGF- β /SMAD	- 27 -
5.3. La voie Ras/Raf/MAPK	- 29 -
5.4. La voie PI3K/Akt	- 32 -
5.5. La voie p53.....	- 34 -
6. Dissémination métastatique.....	- 36 -
7. Les chimiokines et les récepteurs de chimiokines.....	- 36 -
7.1. Les chimiokines.....	- 36 -
7.2. Les récepteurs de chimiokines	- 39 -

7.3.	Rôles des chimiokines et récepteurs dans la physiologie et les pathologies ...	- 41 -
8.	La chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7.....	- 43 -
8.1.	Rôles dans les pathologies.....	- 43 -
8.2.	Rôles physiologiques et pathologiques dans le cancer colorectal.....	- 45 -
OBJECTIFS.....		- 83 -
PARTIE I.....		- 85 -
Établissement d'un modèle de cellules invalidées pour les récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7		- 86 -
1. Préambule		- 86 -
2. Matériels et méthodes		- 86 -
2.1.	Invalidation des récepteurs par la technique CRISPR-Cas9	- 86 -
2.2.	Lignée et culture cellulaire	- 90 -
2.3.	Caryotypage	- 92 -
2.4.	Validation de l'excision du gène des récepteurs	- 92 -
2.5.	Validation de la perte d'expression transcriptionnelle des récepteurs par RT-qPCR	- 93 -
2.6.	Validation de la perte d'expression protéique des récepteurs	- 95 -
2.7.	Analyses statistiques	- 100 -
3. Résultats		- 100 -
3.1.	Caractérisation génomique des clones invalidés pour les gènes codant pour CXCR4 et/ou CXCR7	- 100 -
3.2.	Caractérisation transcriptionnelle de l'expression des récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7	- 104 -
3.3.	Caractérisation protéique de l'expression des récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7...-	104 -
4. Discussion		- 106 -
5. Conclusion et perspectives.....		- 108 -
PARTIE II.....		- 111 -

**Détermination des conséquences fonctionnelles de la perte d'expression des récepteurs
in vitro - 112 -**

1. Préambule - 112 -

2. Matériels et méthodes - 112 -

2.1. Lignées et culture cellulaire - 112 -

2.2. Transfection cellulaire - 112 -

2.3. Expression transcriptionnelle par RT-qPCR - 113 -

2.4. Expression protéique par western blot - 113 -

2.5. Mesure de l'activation de la Rac1 - 113 -

2.6. Expression et localisation des protéines par immunofluorescence - 114 -

2.7. Test de prolifération - 114 -

2.8. Tests de migration et d'invasion - 115 -

2.9. Test de migration trans-endothéliale - 116 -

2.10. Analyses statistiques - 116 -

3. Résultats - 116 -

3.1. Étude de la prolifération cellulaire - 119 -

3.2. Étude de la migration cellulaire - 119 -

3.3. Étude de l'invasion cellulaire - 125 -

3.4. Étude de la migration trans-endothéliale - 127 -

3.5. Étude des mécanismes impliqués dans les étapes du processus métastatique- 129 -

4. Discussion - 139 -

5. Conclusion et perspectives - 144 -

PARTIE III - 146 -

**Détermination du rôle respectif de CXCR4 et de CXCR7 dans la dissémination
métastatique du cancer colique *in vivo* - 147 -**

1. Préambule - 147 -

2. Matériels et méthodes - 147 -

2.1. Xénogreffes des cellules tumorales dans des souris immunodéficientes - 147 -

2.2. Analyse des séquences Alu - 150 -

2.3. Histologie et immunohistochimie - 151 -

2.4. Analyses statistiques	- 153 -
3. Résultats	- 153 -
3.1. Quantification de tumeurs caecales, de métastases pulmonaires et hépatiques par analyse des séquences Alu	- 153 -
3.2. Détection des tumeurs caecales, de métastases pulmonaires et hépatiques par histologie et immunohistochimie	- 158 -
4. Discussion	- 160 -
5. Conclusion et perspectives	- 163 -
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	- 164 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 167 -
SITES WEB CONSULTÉS	- 187 -
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	- 188 -
1. Publications	- 188 -
2. Communications orales	- 188 -
3. Posters	- 188 -

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Anatomie du côlon.....	- 2 -
Figure 2. Représentation schématique de la structure histologique du côlon.	- 2 -
Figure 3. Représentation schématique de l'épithélium du côlon.	- 4 -
Figure 4. Traits caractéristiques des cellules cancéreuses.	- 6 -
Figure 5. Répartition des cas de cancers coliques survenant dans divers contextes familiaux.....	- 8 -
Figure 6. Séquence polype-adénome-carcinome dans la carcinogénèse colorectale. ...	- 11 -
Figure 7. Aspects histologiques des adénomes conventionnels.....	- 13 -
Figure 8. Pourcentage des cas de CCR et survie relative à 5 ans des patients atteints de cancer colorectal selon le stade.....	- 20 -
Figure 9. Classification moltaire consensus (CMS) des CCR et valeur pronostique associée.	- 22 -
Figure 10. Voie WNT/ β -caténine.	- 24 -
Figure 11. Voie TGF β /SMAD.	- 26 -
Figure 12. Voie Ras/Raf/MAPK.	- 28 -
Figure 13. Voie PI3K/Akt.....	- 31 -
Figure 14. Voie p53.....	- 33 -
Figure 15. Représentation schématique des étapes de la dissémination métastatique.-	- 35 -
Figure 16. Structure des différentes classes de chimiokines.....	- 37 -
Figure 17. Famille des chimiokines et leurs récepteurs apparentés.	- 40 -
Figure 18. Représentation schématique du recrutement des leucocytes sur un site inflammatoire.....	- 40 -
Figure 19. Mécanisme d'action de l'immunité adaptative bactérienne par le système CRISPR-Cas9.	- 87 -
Figure 20. Composition du système CRISPR-Cas9.	- 87 -
Figure 21. Mécanismes de réparation double-brin dans le système CRISPR-Cas9. ...	- 89 -
Figure 22. Schémas représentatifs des gènes de CXCR4 et CXCR7 et localisation des ARNg 1 et 2 et des couples d'amorces utilisés pour la PCR génomique.	- 98 -
Figure 23. Recherche de l'excision de l'exon 2 codant pour CXCR4 et CXCR7.	- 99 -

Figure 24. Graphes de la détection de l'excision effectuée par CRISPR-Cas9 lors du séquençage par capture du gène de CXCR4 et de CXCR7.	- 101 -
Figure 25. Expression transcriptionnelle de CXCR4 et CXCR7 par RT-qPCR.	- 103 -
Figure 26. Expression protéique de CXCR4 et CXCR7 par cytométrie en flux.	- 103 -
Figure 27. Expression protéique de CXCR4 et CXCR7 par western blot.	- 105 -
Figure 28. Expression protéique et localisation des récepteurs CXCR4 et CXCR7 par immunofluorescence.....	- 107 -
Figure 29. Co-localisation des récepteurs CXCR4 et CXCR7 par immunofluorescence. ...	107 -
Figure 30 : Caryotypes dans les cellules de la lignée colique humaine SW480.	- 109 -
Figure 31. Prolifération des cellules marquées au CFSE par cytométrie en flux.....	- 117 -
Figure 32. Migration cellulaire dans les chambres de Boyden.....	- 118 -
Figure 33. Efficacité des transfections pour la validation de l'implication de CXCR4 dans la migration cellulaire.	- 120 -
Figure 34. Validation de l'implication de CXCR4 dans la migration cellulaire.	- 121 -
Figure 35. Effets d'inhibiteurs de CXCR4, CXCR7 et CXCL12 sur la migration cellulaire.	- 123 -
Figure 36. Invasion cellulaire dans les chambres de Boyden.	- 124 -
Figure 37. Validation de l'implication de CXCR4 dans l'invasion cellulaire.	- 124 -
Figure 38. Effets d'inhibiteurs de CXCR4, CXCR7 et CXCL12 sur l'invasion cellulaire. -	126 -
Figure 39. Migration trans-endothéliale dans les chambres de Boyden.....	- 128 -
Figure 40. Validation de l'implication de CXCR4 dans la migration trans-endothéliale dans les chambres de Boyden.	- 128 -
Figure 41. Expression transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'EMT par RT-qPCR.	- 130 -
Figure 42. Localisation des protéines d'adhérence par immunofluorescence.	- 131 -
Figure 43. Expression transcriptionnelle de métalloprotéases et d'inhibiteur de métalloprotéases par RT-qPCR.....	- 133 -
Figure 44. Expression transcriptionnelle et protéique des intégrines.	- 134 -
Figure 45. Expression de Rac1 active par western blot.	- 136 -

Figure 46. Activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2 par western blot....	- 138 -
Figure 47. Courbe étalon pour la quantification des séquences Alu.....	- 149 -
Figure 48. Détection d'ADN tumoral humain dans les xénogreffes orthopiques chez la souris.....	- 154 -
Figure 49. Détection d'ADN tumoral humain dans les xénogreffes intraveineuses chez des souris.....	- 156 -
Figure 50. Histologie du caecum, poumon et foie par coloration hématoxyline-éosine (H&E).....	- 157 -
Figure 51. Expression protéique de CXCL12, β-caténine, CDX2, CXCR4 et CXCR7 par immunohistochimie.	- 159 -

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification du cancer colorectal.....	- 15 -
Tableau 2. Séquences des deux ARN guides.....	- 89 -
Tableau 3. Séquences des amorces en PCR génomique.	- 91 -
Tableau 4. Amorces (sens et antisens) utilisées pour analyser l'expression des gènes par RT-qPCR.	- 94 -
Tableau 5. Liste des anticorps utilisés en western blot.....	- 96 -
Tableau 6. Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.	- 96 -
Tableau 7. Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.....	- 98 -
Tableau 8. Séquences des amorces des séquences Alu.....	- 149 -
Tableau 9. Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie.....	- 152 -

ABRÉVIATIONS

ACKR : Atypical Chemokine Receptor	FGF/R : Fibroblast Growth Factor/Receptor
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	GAG : GlycosAminoGlycanes
Akt : Protéine kinase B	GDP/GTP : Guanine Di/Triphosphate
APC : Adenomatous Polyposis Coli	HDR : Homology Directed Repair
ARN : Acide RiboNucléique	HIF : Hypoxia-Inducible Factor
CAF : Cancer Associated Fibroblast	HNPCC : Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer
Cas 9 : CRISPR Associated protein 9	HSC : Hepatic Stellate Cells
CCR : Cancer ColoRectal	ICI : Immune Checkpoint Inhibitor
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A	IGFR : Insulin-like growth factor receptor
CIMP : CpG Island Methylation Phenotype	KO : Knock-out
CIN : Chromosome INstability	LOH : Loss Of Heterozygosity
CpG : Cytosine-phosphate-Guanine	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	MEC : Matrice ExtraCellulaire
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4	MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
CXCL12 : Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12	MIN : Microsatellite instability
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4	MMP : Matrix MetalloProteinase
CXCR7 : C-X-C chemokine receptor type 7	MMR : Mismatch Repair Mismatch Repair
EGF/R : Epidermal Growth Factor/Receptor	MSS : MicroSatellite Stable
EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition	MSI : MicroSatellite Instable
Erk : Extracellular signal-regulated kinases	mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin
FAP : Familial Adenomatous Polyposis	NHEJ : Non-Homologous End Joining
	PD-1/-L1 : Programmed Cell Death Protein 1/Protein Ligand 1
	PDGFR : Platelet Derived Growth Factor

Receptor

PI3K : PhosphatidyInositol 3-Kinase

PIP2/3 : PhosphatidyInositol-
di/triphosphate

RTK : Récepteur à Tyrosine Kinase

SDF-1 : Stromal Cell-Derived Factor 1

Taq Polymérase : Thermus aquaticus
Polymérase

TGF : Transforming growth factor

TGFBR : TGF- β Receptor type

TIMP : Tissue Inhibitor of
MetalloProteinases

TNM : Tumor, Node, Metastasis

VEGF/R : Vascular Endothelial Growth
Factor/Receptor

VIH : Virus de l'Immunodéficience
Humaine

WHIM : Warts,
Hypogammaglobulinaemia, Infections and
Myelokathexis

Wnt : Wingless

ZEB : Zinc finger E-box- Binding
homeobox 1/2CC

ZO : Zonula Occludens

INTRODUCTION

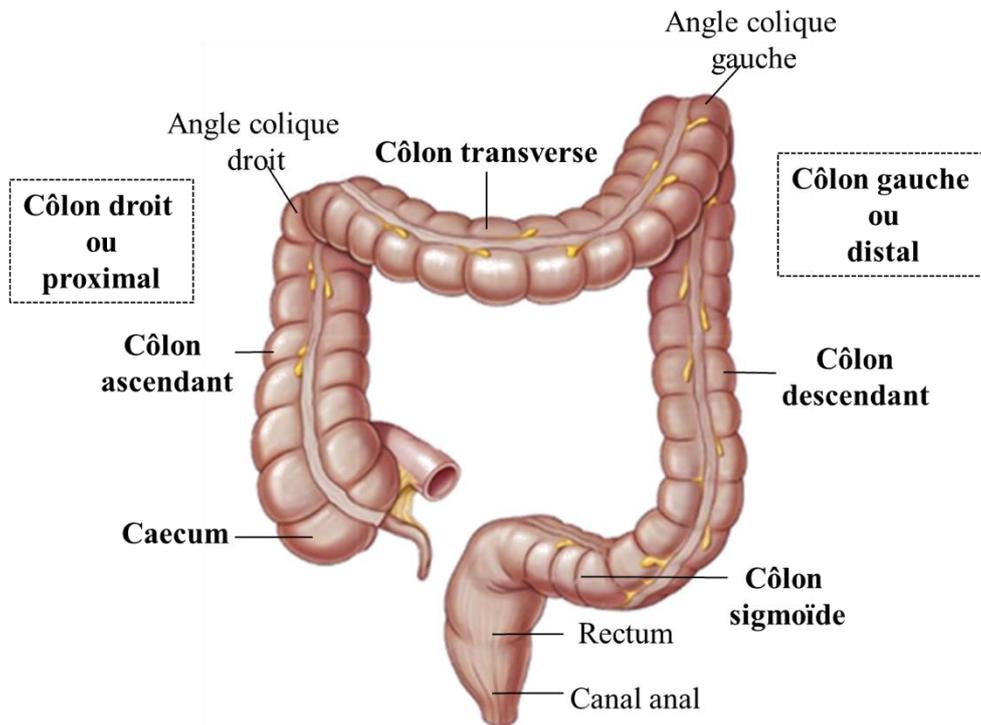


Figure 1. Anatomie du côlon.

Le côlon droit comprend le caecum, le côlon ascendant et 2/3 du côlon transverse et le côlon gauche comprend 1/3 du côlon transverse, le côlon descendant et le sigmoïde.

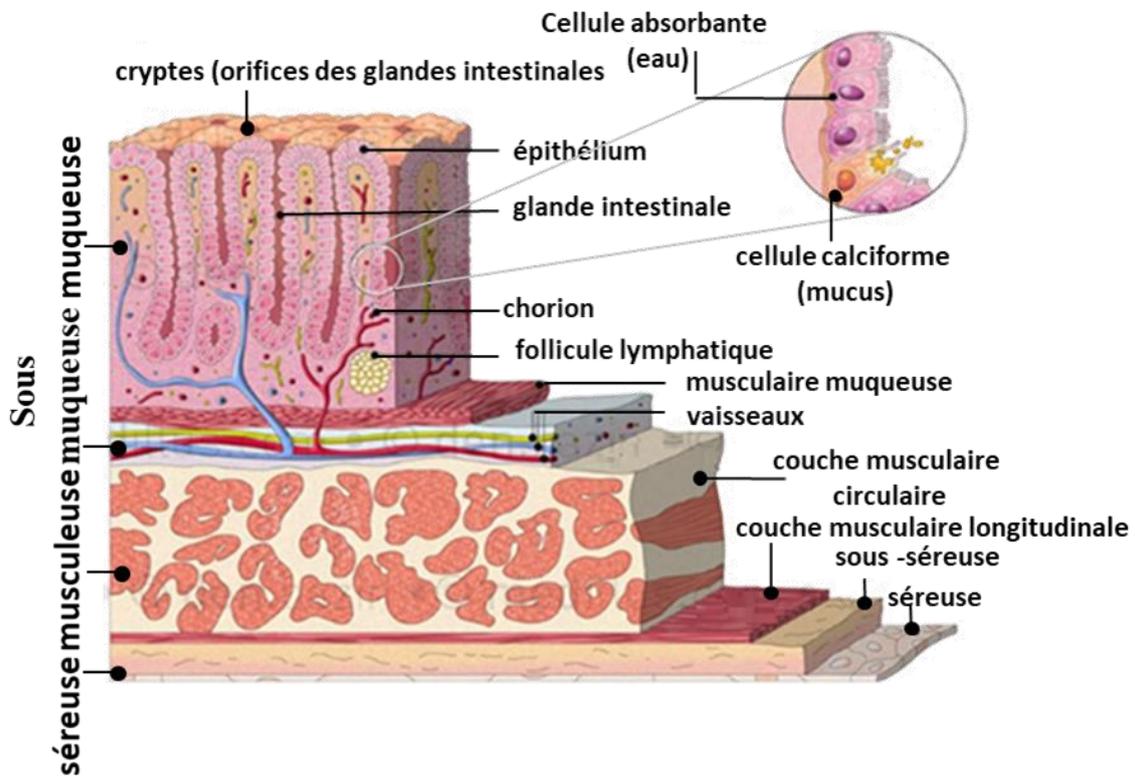


Figure 2. Représentation schématique de la structure histologique du côlon.

En partant de la lumière vers la périphérie, on distingue 4 couches : la muqueuse (glandes, chorion et musculaire muqueuse), la sous-muqueuse, la musculaire et la séreuse.

1. Le côlon

1.1. Caractéristiques anatomiques du côlon

Le côlon est un organe du tractus gastro-intestinal localisé dans la cavité abdominale. Il est la continuité de l'intestin grêle et constitue avec le rectum, le gros intestin qui se termine par la cavité anale. Ainsi, le côlon représente la partie la plus large de l'intestin avec une longueur de 150 cm et un diamètre de 7,5 cm au niveau du caecum et 2,5 cm pour le côlon sigmoïde.

Morphologiquement, le côlon est subdivisé en cinq parties (**Figure 1**). Le caecum représente le premier segment (6-8 cm de longueur) et est localisé à droite de l'abdomen. Il relie l'intestin grêle au côlon par la valvule iléo-caecale. Le caecum continue vers le côlon ascendant (12-20 cm) jusqu'à l'angle colique droit ou angle hépatique, ce dernier étant directement joint au côlon transverse (40-50 cm). Ce segment du côlon constitue sa partie la plus longue et la plus motile au bout duquel on retrouve l'angle colique gauche ou angle splénique. Alors débute le côlon descendant (30 cm) qui se prolonge vers le bas de la cavité péritonéale jusqu'au côlon sigmoïde. Le sigmoïde constitue la dernière partie la plus étroite du côlon de longueur variable. Cette dernière partie est liée au rectum (10-12 cm), lequel se prolonge vers le canal anal.

Plus simplement, on retrouve le côlon droit avec le caecum et le côlon ascendant, également appelé côlon proximal, le côlon transverse puis le côlon gauche avec le côlon descendant et sigmoïde, encore appelé côlon distal (**Figure 1**). Sur le plan embryologique, le côlon droit avec 2/3 du côlon transverse, dérive de l'intestin primitif moyen et est vascularisé par l'artère mésentérique supérieure alors que le côlon gauche avec 1/3 du côlon transverse, est issu de l'intestin primitif postérieur et une vascularisation par l'artère mésentérique inférieure (Kwak and Ju, 2019; de Santa Barbara et al., 2003).

1.2. Caractéristiques histologiques et cellulaires

Une coupe histologique du côlon indique quatre couches (**Figure 2**) : de la lumière vers la périphérie, on trouve la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse.

- **La muqueuse** : elle constitue la couche la plus interne du côlon. Elle est formée d'un épithélium, d'un chorion et de la musculaire muqueuse.

L'épithélium est une couche de cellules épithéliales glandulaires formant la structure cylindrique des cryptes de Lieberkühn et qui reposent sur une membrane basale. Cet épithélium est constitué de cinq types cellulaires et possède une capacité de renouvellement rapide qui se produit tous les 3 à 5 jours grâce aux cellules souches localisées à la base des cryptes.

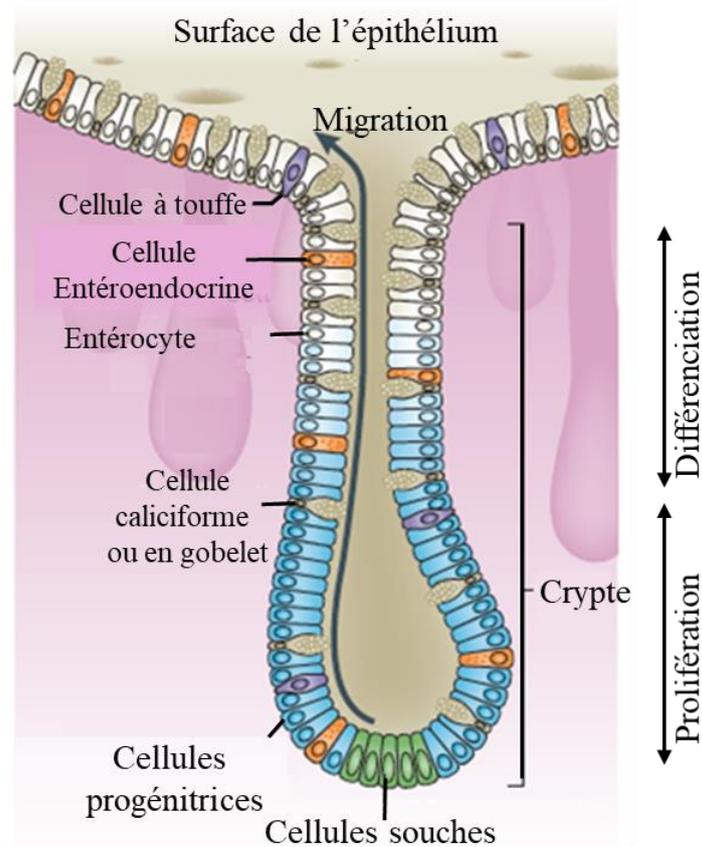


Figure 3. Représentation schématique de l'épithélium du côlon.

On retrouve du fond de la crypte vers la surface, les cinq types cellulaires : les cellules souches, les cellules progénitrices (zone de prolifération), les cellules caliciformes (gobelet), les entérocytes, les entéro-endocrines et les cellules à touffes ou cellules *Tuft* (zone de différenciation). D'après *Barker et al., 2014*.

Ces cellules souches maintiennent un stock de cellules souches par auto-renouvellement mais génèrent des cellules progénitrices à forte activité proliférative (**Figure 3**). Dans la moitié inférieure de la crypte, ces progéniteurs se différencient pour donner des entérocytes du lignage absorbeur, des cellules en gobelet ou cellules à mucus ou caliciformes, les cellules à touffes ou « *Tuft* », les cellules entéro-endocrines du lignage sécréteur. Ces cellules migrent jusqu'à la surface de la crypte pour être éliminées dans la lumière durant le renouvellement de l'épithélium.

Les cellules épithéliales sont juxtaposées au chorion ou *lamina propria*, tissu conjonctif qui comporte des protéines de structure et de soutien, comme les fibres de collagène mais également des leucocytes. La musculaire muqueuse (*muscularis mucosæ*) est formée de cellules musculaires lisses et se trouve à la limite de la muqueuse et de la sous-muqueuse.

- **La sous-muqueuse** : c'est le tissu conjonctif fibreux qui contient des fibroblastes, des cellules immunitaires (lymphocytes), des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses ou plexus de Meissner.
- **La musculature ou *muscularis propria*** : représente le tissu musculaire et est formée de deux couches de muscles lisses, une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe, les deux disposées de manière hélicoïdale. Entre ces deux couches, se trouvent le plexus nerveux myentérique d'Auerbach et des cellules de Cajal, cellules « *pacemaker* » qui contrôlent le rythme du péristaltisme.
- **La séreuse ou adventice** : il s'agit de la couche la plus externe du tissu conjonctif souvent riche en adipocytes.

1.3. Fonctions du côlon

La fonction principale du côlon est d'absorber les nutriments et l'eau des aliments qui n'ont pas été absorbés par l'intestin grêle et de synthétiser certaines vitamines. La déshydratation des résidus alimentaires conduit à la formation de matières fécales semi-solides qui sont acheminées jusqu'au canal anal. La lumière colique abrite également la grande majorité du microbiote intestinal. Grâce aux différentes enzymes produites par ce microbiote, le côlon peut digérer les glucides résiduels non digérés par fermentation et métabolisation.

2. Le cancer colorectal

Notre organisme produit chaque jour des milliards de cellules mortes pour faire place à des milliards de cellules naissantes qui seront soumises à une régulation stricte lors de processus de différenciation et de croissance, d'interactions cellulaires et environnementales et d'apoptose.

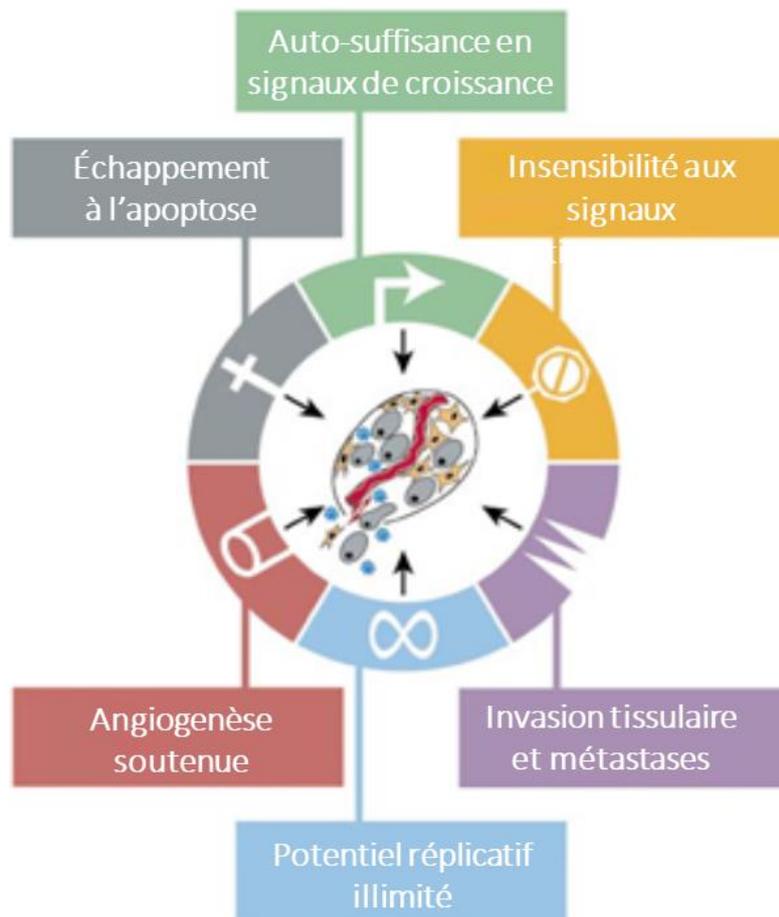


Figure 4. Traits caractéristiques des cellules cancéreuses.
D'après Hanahan et Weinberg, 2000.

Cependant, des perturbations dans ces processus peuvent générer de nombreuses pathologies dont le cancer.

D'un point de vue moléculaire, un cancer survient à la suite d'altérations génétiques et épigénétiques successives dans les cellules saines conduisant à leur transformation tumorale et qui confèrent à la cellule cancéreuse un avantage sélectif par rapport aux cellules saines environnantes. Les gènes touchés interviennent spécialement dans la régulation de l'apoptose et la prolifération cellulaire, ce qui permet aux cellules tumorales d'acquérir des compétences de résistance aux signaux de mort cellulaire, d'accélération du cycle cellulaire et même l'induction d'un pouvoir métastatique (**Figure 4**).

Le cancer colorectal (CCR) est une tumeur qui se développe dans les cellules de la muqueuse colique et rectale avec environ 40% des cancers qui touchent le rectum et 60% localisés dans le côlon (Infocancer France, 2021). Bien que les deux maladies soient regroupées sous le nom de cancer colorectal, elles sont complètement distinctes tant d'un point de vue moléculaire que structurale et implique une prise en charge complètement différente.

2.1. Épidémiologie

Dans le monde, le CCR est un problème de santé publique avec une prévalence particulière dans les pays développés et la population vieillissante. En 2020, il a été classé comme le 3^{ème} cancer le plus fréquent, avec une estimation annuelle de 1.148.515 nouveaux cas affectant aussi bien les hommes que les femmes (Sung et al., 2021). Parce que la majorité des patients sont diagnostiqués aux stades métastatiques de la maladie (O'Connell et al., 2004), il est le 2^{ème} cancer causant une forte mortalité avec près de 576.858 décès par an dans le monde (Sung et al., 2021).

L'incidence de cette maladie était en augmentation constante depuis 20 ans, mais elle s'est stabilisée depuis 2015. Cependant, en France, près de 44.000 nouveaux cas ont été recensés en 2018. Même si on constate une amélioration du taux de survie grâce au développement des techniques de dépistage, cette maladie est tout de même responsable de plus de 17.000 décès en 2018 (Institut National du Cancer. Édition 2021). Par ailleurs, l'incidence du CCR va augmenter dans le monde de 60% avec plus de deux millions de nouveaux cas et plus d'un million de morts en 2030 selon les prévisions (Arnold et al., 2017).

Dans le côlon, l'incidence varie avec la localisation du cancer. Ainsi, l'apparition d'une tumeur est plus fréquente dans le côlon gauche que dans le côlon droit (Schrag et al., 2016).

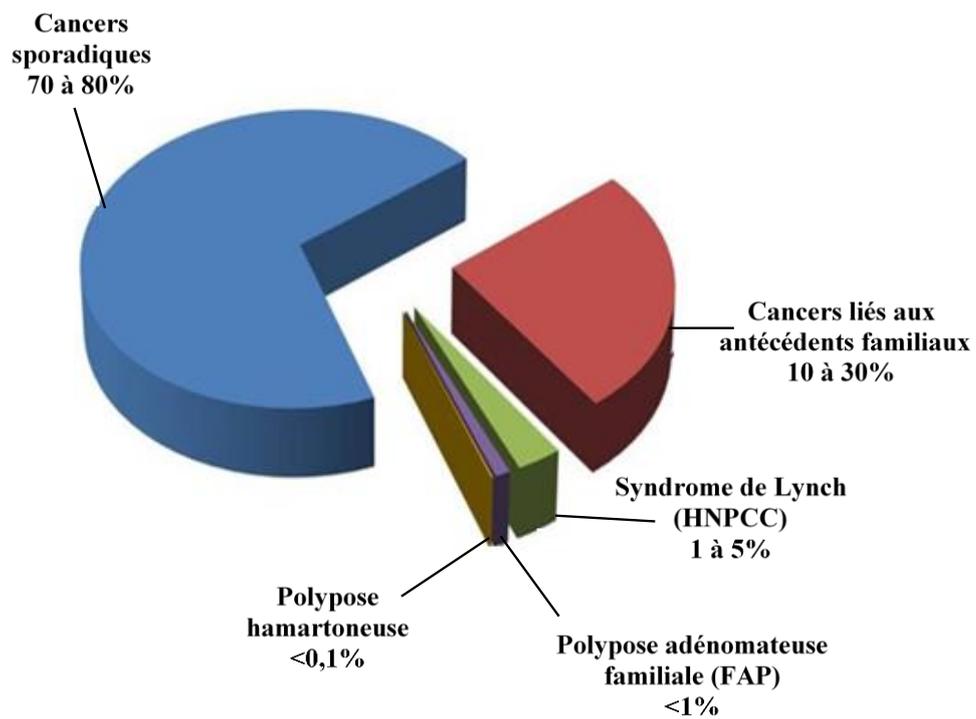


Figure 5. Répartition des cas de cancers coliques survenant dans divers contextes familiaux.
D'après National Institute of Cancer. Avril 2022.

2.2. Facteurs de risque

Si les causes du développement d'un CCR ne sont pas clairement identifiées comme pour beaucoup de cancers, il survient de manière sporadique pour la majorité des cas (70 à 80%), tandis que moins de 10% sont héréditaires (Lynch et al., 1992; Souglakos, 2007).

L'étiologie de ce cancer fait intervenir divers facteurs dont l'âge et la prédisposition à des formes familiales (Lynch et al., 1992; Mármol et al., 2017). De ce fait, un risque moyen est attribué aux hommes et femmes de plus de 50 ans. Cependant, dans les CCR sporadiques, des facteurs liés au mode de vie, au déséquilibre alimentaire avec une alimentation riche en matières grasses et pauvre en fibres, à une vie sédentaire avec une activité physique insuffisante, à une consommation abusive d'alcool et de tabac, l'obésité, constituent des facteurs de risque (Ahmed, 2004; Keum and Giovannucci, 2019). D'autre part, une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) de type rectocolite hémorragique ou maladie de Crohn, influence fortement la survenue d'un CCR (Lukas, 2010; Nuako et al., 1998). Ainsi, le risque augmente avec la durée de la maladie, la sévérité et l'étendue de l'inflammation (Itzkowitz and Harpaz, 2004). Ce risque est de 2 à 5 fois supérieur au risque moyen de développer un CCR à partir d'un polype, ou d'un parent du 1^{er} degré ayant développé des polypes ou un CCR (Lukas, 2010; Nuako et al., 1998).

2.3. Formes héréditaires du cancer colorectal

Dans les formes héréditaires on trouve la polypose adénomateuse familiale (PAF), le syndrome de Lynch ou HNPCC (*Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*) qui est un syndrome héréditaire sans polypose et moins fréquemment, la polypose hamartomateuse (syndrome de Peutz-Jeghers, PJS), ou la polypose juvénile (JPS) (Byrne and Tsikitis, 2018; Chung, 2010; Fearnhead et al., 2002) (Figure 5).

2.3.1. La polypose adénomateuse familiale ou polypose colique familiale

La polypose adénomateuse familiale (PAF) ou *Familial Adenomatous Polyposis (FAP)* est une affection héréditaire à transmission autosomique dominante rare et contribue pour moins de 1% des cas de CCR (Brenner et al., 2014). Elle est causée par la mutation du gène *APC (Adenomatous Polyposis Coli)* (Cottrell et al., 1992; Groden et al., 1991) et caractérisée par la présence de centaines/milliers de polypes dans la paroi interne du côlon ou du rectum qui apparaissent à l'adolescence (10 à 12 ans). Après détection, la résection de ces lésions voire l'ablation du côlon est nécessaire pour prévenir la survenue d'un CCR. Par ailleurs, le risque

de développer un CCR demeure et s'élève à 100% avant l'âge de 40 ans si les polypes ne sont pas réséqués (Galiatsatos and Foulkes, 2006).

2.3.2. Le syndrome de Lynch ou syndrome du cancer colorectal sans polypose

Le syndrome de Lynch ou HNPCC est la forme de prédisposition la plus fréquente et représente 1 à 5% des CCR. C'est une affection sans polypose préalable, de transmission autosomique dominante survenant chez des personnes âgées de moins de 50 ans. Son diagnostic est difficile en l'absence de polypes et peut être souvent confondu avec un cancer sporadique. L'affection de HNPCC est liée à la mutation d'un des gènes impliqués dans le système de réparation de mésappariements de bases ou MMR (*MisMatch Repair*) lors de la réplication de l'ADN : les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2* dont *MLH1* et *MSH2* sont les plus touchés (Chung, 2010; Lynch and Smyrk, 1996).

Le syndrome de Lynch serait responsable de l'apparition d'un CCR très précocement (Chung, 2010), en général avant 40 ans où il sera préférentiellement localisé dans le côlon droit. De plus, les personnes porteuses du HNPCC sont plus aptes à développer des cancers dans d'autres organes comme l'utérus, l'estomac, l'ovaire, l'endomètre et le pancréas (Chung, 2010).

2.4. Dépistage du cancer

Un dépistage du CCR permet de détecter des formes précoces et de prévenir le développement de cancers avancés, plus difficiles à traiter. Grâce au dépistage, environ 35% des cas sont diagnostiqués au stade localisé, 38% au stade régional et près de 20% au stade métastatique (Burt, 2000; Tauriello et al., 2017). Chez ces patients, les métastases se forment préférentiellement dans le foie dans 75% des cas contre 15% dans les poumons.

Le premier test de dépistage développé consistait à rechercher du sang dans les selles ou test Hemocult II ; mais il était peu sensible puisque la majorité des tumeurs ne saignent pas au départ.

Par la suite, un test immunologique a été proposé depuis quelques années et consiste à rechercher la présence d'hémoglobine humaine dans les selles grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. Ce test détecte 8 cancers sur 10 à un stade le plus souvent curable. En cas de détection positive, une colonoscopie est proposée. La colonoscopie permet d'examiner le rectum et le côlon jusqu'à la jonction iléo-colique. Elle est également préconisée dans les cas d'antécédents de FAP. Aux États Unis, cette méthode de dépistage a permis de réduire les taux d'incidence et de mortalité du CCR distal d'environ 60 à 80% (Cunningham et al., 2010).

Une autre méthode utilisée est le colo-scanner. Ce dernier se présente comme une radiographie

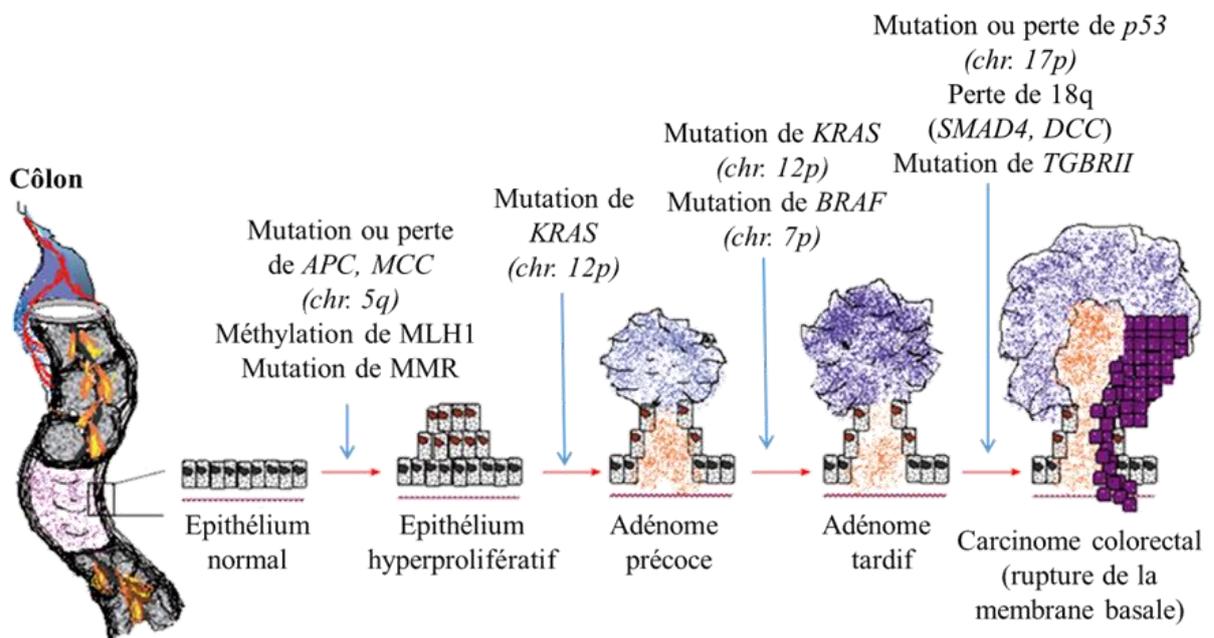


Figure 6. Séquence polype-adénome-carcinome dans la carcinogénèse colorectale.

Les mutations et/ou anomalies chromosomiques observées dans le CCR favorisent la transformation d'un polype à un adénome qui peut évoluer en carcinome. *D'après Paschos et al., 2014.*

apparentée à la colonoscopie mais ne permet pas la détection de polypes de moins de 1 cm.

2.5. Anatomopathologie

Un modèle de carcinogenèse du CCR a été proposé par Fearon et Vogelstein en 1990 selon un modèle d'évolution de la séquence adénome-carcinome appelé également Vogelgramme (Fearon and Vogelstein, 1990) (**Figure 6**). Ainsi, cette séquence résulterait d'une accumulation successive d'évènements génétiques d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et d'activation des oncogènes, qui favorisent le passage progressif d'un épithélium normal vers un épithélium tumoral.

Dans la pathologie CCR, on distingue des lésions précurseurs avec les polypes non adénomateux et les polypes adénomateux ou adénomes qui peuvent évoluer vers un cancer. Dans 95% des cas, le cancer sera de type adénocarcinome (Sameer, 2013). Par définition, les polypes sont des excroissances macroscopiques de cellules épithéliales qui font saillies dans la lumière du côlon et du rectum. Sur l'ensemble des polypes, seulement 70 à 75% deviennent des adénomes et sont de véritables lésions précancéreuses, cependant, seuls 15 à 20% d'entre eux évolueront vers un adénocarcinome sur une durée moyenne de 10 à 20 ans.

2.5.1. Sous-types de polypes

Traditionnellement, les polypes CCR ont été divisés en deux grands sous-types : hyperplasiques et adénomateux. Il a été longtemps pensé que ces deux sous-types étaient différents et avaient des issues distinctes, les adénomes étant potentiellement précancéreux, mais pas les polypes hyperplasiques (HP) (Liang et al., 2013). Par ailleurs, plusieurs évidences ont montré que les HP pouvaient être des précurseurs d'un certain nombre de tumeurs sporadiques, ce qui a permis d'identifier un nouveau type de lésion, le polype festonné ou dentelé ou « *serrated* » en anglais (Jass, 2007a). Ainsi, les tumeurs dérivées de ces polypes évoluent suivant une voie alternative à la carcinogénèse colorectale classique, une transition polype dentelé-adénome-carcinome. Ces polypes présentent des caractéristiques morphologiques et moléculaires différentes des adénomes classiques et se caractérisent par une forte instabilité microsatellitaire, une forte méthylation des îlots CpG et la mutation du gène *BRAF*. De plus, il semblerait que la progression tumorale de la voie des adénomes festonnés survienne plus rapidement que celle de la voie adénome-carcinome classique (Oono et al., 2009).

L'hyperplasie se définit comme la multiplication anormale des cellules épithéliales et qui résulte en une augmentation du nombre de cellules et du volume du tissu épithélial.

Dans les tissus dysplasiques, les cellules ont acquis des caractéristiques propres de cellules en

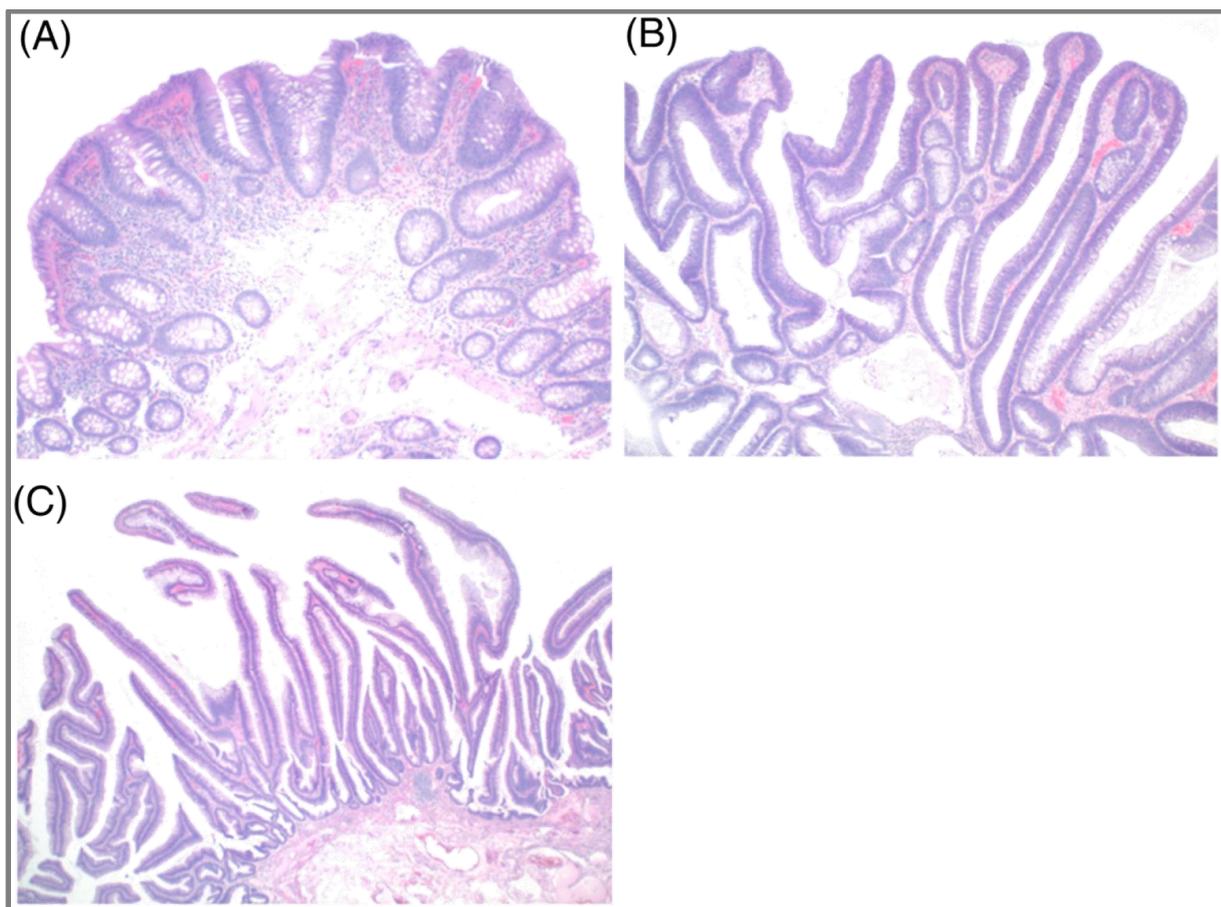


Figure 7. Aspects histologiques des adénomes conventionnels.

Adénomes tubuleux (A). Adénomes tubulo-villeux (B). Adénomes vilieux (C). *D'après Gibson et Robert, 2016.*

transformation avec une prolifération plus importante. Elles présentent des caractéristiques architecturales et cytologiques différentes des cellules normales définies par un rapport noyau/cytoplasme élevé, un pléomorphisme et une perte de polarité.

2.5.2. Classification morphologique des polypes

Les polypes ont été catégorisés en trois sous-types selon leur aspect morphologique (sessile, pédiculé et plan). Cependant, le polype plan, de par sa petite taille (diamètre <1 cm), présente le plus grand risque de cancérisation car sa détection est difficile lors d'une endoscopie.

2.5.3. Classification histologique des polypes

Selon leur architecture microscopique, les adénomes sont également divisés en différents types. Les adénomes conventionnels ont été classés en adénome tubuleux, tubulo-villeux et vilieux (**Figure 7**). Ces adénomes sont caractérisés par la présence de dysplasie intra-épithéliale et sont les précurseurs de presque tous les CCR sporadiques.

- L'adénome tubuleux représente la majorité des adénomes (75%) dont la taille est <1 cm.
- L'adénome vilieux est un adénome avec une taille >1 cm. Environ 5% des adénomes ont cette structure et présentent le plus grand risque de cancérisation.
- L'adénome tubulo-villeux est le type d'adénome associant les deux formes tubuleuse et vilieuse et est retrouvé dans 20% des CCR.

Dans les adénomes festonnés, on distinguera des polypes hyperplasiques non néoplasiques (*Hyperplastic Polyp* ou HP) (80-90%), des adénomes sessiles festonnés (*Sessile Serrated Adenoma/Polyp* ou SSA/P) (15-20%) et des adénomes festonnés traditionnels (*Traditional Serrated Adenoma* ou TSA) (1-6%). Seuls les adénomes festonnés traditionnels, caractérisés par une dysplasie cytologique, deviennent invasifs (De Palma et al., 2019).

2.5.4. Classification selon le degré d'évolution cancéreuse

Les analyses histopathologiques des adénomes dysplasiques dans le CCR ont permis de définir deux degrés de dysplasie, un degré de bas grade et un degré de haut grade. Il existe cependant une relation entre le degré de dysplasie et la taille de l'adénome. En général, les adénomes plus gros (> 1 cm) ont une incidence plus élevée de dysplasie de haut grade (Gibson and Odze, 2000, 2016).

2.6. Classification du cancer colorectal

Comme pour tout cancer, il a été nécessaire de définir des critères pour préciser le stade d'a-

Classification de Dukes	Classification TNM	Description
	Stade 0	Carcinome <i>in situ</i> (T0, N0, M0)
A	Stade I	Pas d'envahissement ganglionnaire, pas de métastases, tumeur envahissant la sous-muqueuse (T1, N0, M0) ou tumeur envahissant la musculuse (T2, N0, M0)
B	Stade II	Pas d'envahissement ganglionnaire, pas de métastases, tumeur envahissant la séreuse (T3, N0, M0) ou tumeur envahissant des tissus voisins (T4, N0, M0)
C	Stade III	Envahissement ganglionnaire (tout T, N1, M0)
D	Stade IV	Métastases à distances (Tout T, N1 ou N2, M1)

Tableau 1. Classification du cancer colorectal.
D'après Aga Syed Sameer, 2013.

vancement de la maladie, établir une valeur pronostique et proposer une prise en charge thérapeutique adaptée. Deux systèmes de classification ont été établis : la classification de Dukes et TNM (**Tableau 1**). En effet, la première classification fût la première proposée par Dukes en 1932 (Dukes, 1932; Sameer, 2013). Cependant, c'est le système de classification TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) défini par le comité mixte américain sur le cancer (*American Joint Committee on Cancer* ou *AJCC*) qui est la classification la plus communément utilisée de nos jours (O'Connell et al., 2004).

Ce système est basé sur trois critères qui permettent d'évaluer l'étendue de la maladie à savoir la taille et la profondeur de la tumeur primaire (T avec T0 ou T1 à T4), l'atteinte ou non des ganglions régionaux et leur nombre (N avec N0, N1 ou N2) et la présence ou non de métastases (M avec M0 ou M1). Quatre stades ont été définis dans le système TNM.

- Le stade 0 correspond à la tumeur *in situ*, c'est-à-dire qu'elle est limitée à la paroi de la muqueuse (T0, N0, M0).
- Le stade I, la tumeur commence à s'étendre à la sous-muqueuse ou la musculuse constituant le côlon ou le rectum (T1, N0, M0 ou T2, N0, M0).
- Le stade II, elle traverse les autres couches de la paroi colique et rectale (séreuse ou d'autres organes ou structures et perfore le péritoine viscéral) sans aucun envahissement des ganglions (T3, N0, M0) ou (T4, N0, M0).
- Le stade III est caractérisé par l'envahissement d'au moins un ganglion environnant (tout T, N1 ou N2, M0).
- Le stade IV est la propagation de la tumeur au-delà du côlon et du rectum pour son implantation dans des organes de métastases à distance (tout T, N1 ou N2, M1).

2.7. Phénotypes du cancer colorectal

À la suite des travaux de Fearon et Vogelstein, les CCR ont été classés en trois grands phénotypes selon les anomalies génétiques identifiées (Harada and Morlote, 2020; Lengauer et al., 1998; Sameer, 2013).

2.7.1. Phénotype à instabilité chromosomique ou *Chromosome INstable*

Les tumeurs à instabilité chromosomique ou *Chromosome INstable* (*CIN*) ou encore microsatellite stable (MSS) sont les plus fréquentes et représentent 80 à 85% des cas de CCR (Migliore et al., 2011). Cette instabilité chromosomique est causée par des pertes ou de gains de chromosomes entiers, ou de régions chromosomiques à la suite de réarrangements structurels

induisant une anomalie du nombre de chromosomes (aneuploïdie ou polyploïdie), ou une perte d'hétérozygotie (*Loss Of Heterozygosity (LOH)*).

Les altérations touchent les gènes suppresseurs de tumeurs ou les oncogènes (Jass, 2007b). On retrouve principalement la perte des chromosomes 5, 17 et 18 sur lesquels sont localisés respectivement les gènes *APC* (5q21), *TP53* (17p13), *DCC (Deletion of Colon Cancer)* et de *SMAD2-4* (18q21) ou des gains touchant le chromosome 8 pour le gène *C-MYC* en 8q24 (Fearon and Vogelstein, 1990; Jass, 2007b; Nakayama and Oshima, 2019; Sánchez-Pernaute et al., 2005; Takagi et al., 1998). Cependant, d'autres régions sont également concernées par des pertes. On retrouve notamment les chromosomes 1q, 4p, 6p, 8p, 9q et 22q qui sont détectés dans 25-50% des cas étudiés (Fearon and Vogelstein, 1990; Nguyen and Duong, 2018).

2.7.2. Phénotype à instabilité microsatellitaire ou *MicroSatellite INstability*

Le second phénotype représente des tumeurs caractérisées par une instabilité des microsatellites (MSI) ou *MicroSatellite INstability (MIN)* qui correspond à 15-20% des CCR (Lynch et al., 1992). Ce phénotype se traduit par une défaillance dans le système de réparation des mésappariements de bases ou *Mismatch Repair (MMR)* au cours de la réplication de l'ADN (Eshleman and Markowitz, 1996; Lengauer et al., 1998; Lynch et al., 1992). Ce défaut entraîne une accumulation de mutations dans les microsatellites, séquences répétées de 1 à 20 nucléotides dans la région codante de certains gènes impliqués dans la carcinogénèse du CCR (Lengauer et al., 1998). Les gènes affectés incluent principalement *MLH1* et *MSH2*, qui sont associés au syndrome de Lynch (Lynch and Smyrk, 1996; Lynch et al., 1992; Yamamoto and Imai, 2015), ou encore les gènes *BAX* et de la voie du TGF- β (Shima et al., 2011; Xu and Pasche, 2007).

En dehors des mutations observées dans les microsatellites parmi les mécanismes responsables de l'inactivation du système MMR, il existe également une hyperméthylation du promoteur de *MLH1* conduisant à la perte d'expression du gène. Contrairement au syndrome de Lynch, c'est ce mécanisme qui est retrouvé dans la majorité des tumeurs MSI d'origine sporadique (Lao and Grady, 2011; Lynch and de la Chapelle, 2003).

Les tumeurs de phénotype MSI sont également divisées en MSI-High (MSI-H) et MSI-Low (MSI-L) (Pawlik et al., 2004). Si les critères d'évaluation du statut microsatellitaire des tumeurs varient d'une étude à l'autre, il existe cependant un consensus sur le fait que certains marqueurs, notamment les répétitions mononucléotidiques telles que BAT25, BAT26 et BAT40 et les répétitions dinucléotidiques D5S346, D2S123 et D17S250, sont particulièrement utiles pour l'identification des tumeurs MSI (Pawlik et al., 2004). Par ailleurs, la distinction entre ces deux

groupes dépend fortement à la fois du type et du nombre de microsatellites analysés. Par exemple, les marqueurs dinucléotidiques démontrent à la fois des tumeurs MSI-H et MSI-L, tandis que les marqueurs mononucléotidiques tels que BAT26 et BAT40 sont relativement spécifiques des cancers MSI-H.

D'un point de vue clinique, il est maintenant connu que les CCR de phénotype MSI (sporadiques ou héréditaires) à stade égal ont un meilleur pronostic que les cancers de phénotype MSS (Grady and Pritchard, 2014; Popat et al., 2005; Watanabe et al., 2012).

2.7.3. Phénotype méthylateur ou *CpG Island Methylator Phenotype*

Plus récemment, un troisième phénotype (*CpG Island Methylator Phenotype (CIMP)*) a été établi en étudiant la méthylation/hyperméthylation des séquences répétées des nucléotides CG ou îlots CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) dans les régions promotrices de certains gènes suppresseurs de tumeur, tels que *CDKN2A*, entraînant une répression transcriptionnelle inappropriée du gène (Lao and Grady, 2011; Samowitz et al., 2005; Toyota et al., 1999). La méthylation peut toucher également le promoteur du gène *MLH1* et lorsque les deux allèles sont touchés, cela conduit à l'inactivation du système MMR, retrouvée dans les cancers sporadiques de phénotype MSI (Cunningham et al., 2010; Lynch and de la Chapelle, 2003). Les deux panels de gènes couramment utilisés pour déterminer le statut CIMP d'un CCR, sont un panel classique (*MINT1, MINT2, MINT31, CDKN2A, hMLH1*) et un panel de 5 gènes décrit par Weisenberger et al., (2006) (*CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1*) (Weisenberger et al., 2006). Dans un CCR, le phénotype méthylateur est défini par au moins trois des cinq marqueurs considérés comme hyperméthylés.

D'autre part, le phénotype CIMP peut être associé à l'un ou l'autre des deux précédents phénotypes ; néanmoins, il est généralement associé au phénotype MSI avec 12% des cas contre 8% retrouvés dans les phénotypes MSS. Par ailleurs le phénotype CIMP est retrouvé dans les tumeurs mutées pour *BRAF* et fréquemment localisées dans la partie proximale du côlon (Gallois et al., 2016).

Si le pronostic du phénotype méthylateur n'est pas encore défini, il a été rapporté que les patients avec un CCR CIMP+ ont une survie globale et une survie sans progression plus courtes lorsque ce phénotype est associé au phénotype MSS ; lorsqu'il est associé au phénotype MSI, le pronostic devient plus défavorable avec une mutation du gène *BRAF* (Gallois et al., 2016; Juo et al., 2014).

3. Traitements thérapeutiques

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de CCR est basée sur le stade d'avancement de la maladie au diagnostic. La résection de la tumeur reste le principal traitement pour tous les stades et consiste à enlever la tumeur avec une marge distale et proximale d'au minimum 5 cm et du réseau ganglionnaire associé. Néanmoins, pour les stades avec un envahissement des ganglions (stade III) ou des métastases à distance (stade IV), une chimiothérapie associée ou non à une thérapie ciblée est proposée.

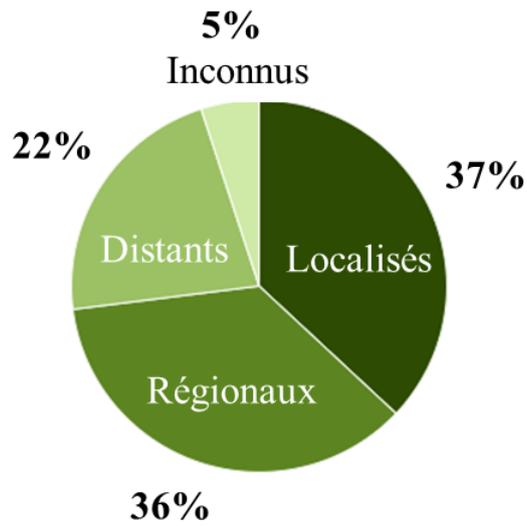
Les traitements chimiothérapeutiques sont utilisés en préventif après une intervention chirurgicale d'une tumeur de stade III. Par contre, pour une tumeur de stade IV, une chimiothérapie néo-adjuvante est préconisée afin de réduire la taille de la tumeur/métastase avant l'exérèse.

Les protocoles utilisés dans la chimiothérapie conventionnelle actuelle comprennent l'association du 5-FU (5-fluorouracile), de l'acide folinique ou la leucovérine et de l'oxaliplatine (FOLFOX-4) ou de l'association du 5-FU, de l'acide folinique et de l'irinotécan (FOLFIRI), qui sont administrés par voie systémique. Une alternative au FOLFOX est le remplacement du 5-FU par la capécitabine (précurseur du 5-FU) qui est actif par voie orale et ne nécessite pas d'utiliser la leucovérine. Cette nouvelle association présente la même efficacité que le FOLFOX mais avec une meilleure tolérance. Par ailleurs, ces agents qui génèrent des dommages à l'ADN, ne sont pas spécifiques qu'aux cellules tumorales car elles induisent une toxicité dans les cellules saines en constante prolifération avec pour conséquence, de nombreux effets secondaires.

Récemment, l'introduction de la thérapie ciblée en combinaison avec la chimiothérapie a permis de réduire ces effets secondaires et d'améliorer l'efficacité thérapeutique pour les stades avancés (Hurwitz et al., 2004; Winder and Lenz, 2010). Cette thérapie repose sur l'utilisation d'anticorps qui ciblent la voie angiogénique (anti-VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou bevacizumab) ou la voie oncogénique EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (cétuximab, panitumumab). À noter que, seuls les patients dont les tumeurs présentent le gène *KRAS* sauvage profitent du traitement anti-EGFR (Van Cutsem et al., 2015), tout comme la présence du gène *BRAF* non muté est également requise pour palier à une résistance (Di Nicolantonio et al., 2008).

Depuis quelques années, de plus en plus d'études s'intéressent à l'immunothérapie. Elle consiste à surmonter les mécanismes qui interviennent dans la tolérance immunitaire aux auto-antigènes

Pourcentage de cas de CCR par stades



Survie relative à 5 ans

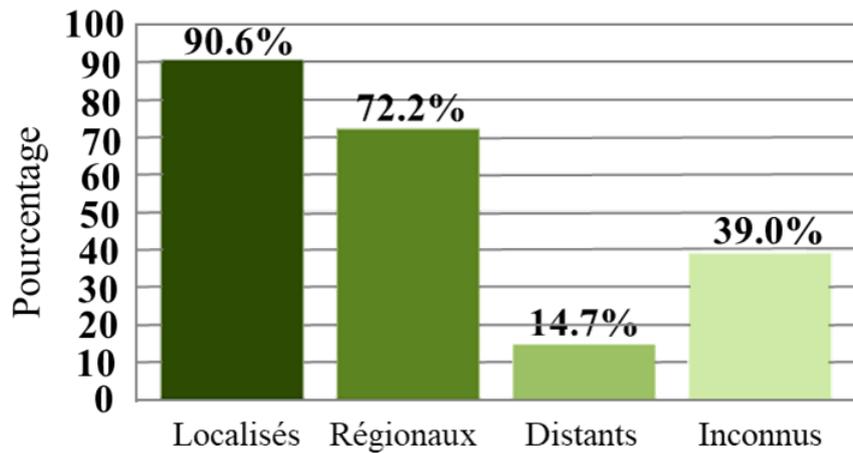


Figure 8. Pourcentage des cas de CCR et survie relative à 5 ans des patients atteints de cancer colorectal selon le stade.

D'après National Cancer Institute (American AJCC), Avril 2022.

tumoraux et à bloquer la réponse immunosuppressive qui se produit dans le microenvironnement tumoral. Ce processus a comme principale origine, l'inactivation et l'épuisement des cellules lymphocytaires T *via* l'activation de récepteurs de points de contrôles immunitaires (*Immune Checkpoints Inhibitors ou ICI*) à la surface des cellules T ; ce qui empêche ces lymphocytes de reconnaître les néo-antigènes tumoraux. Les immunothérapies actuelles ciblent le récepteur PD-1 et son ligand PD-L1 (*Programmed cell Death Protein/Ligand-1*), et l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) avec des anticorps monoclonaux. Ainsi, l'étude exploratoire NICHE (ClinicalTrials.gov : NCT03026140) qui a évalué chez des patients avec une tumeur de phénotype MSS ou MSI à un stade précoce, un traitement néo-adjuvant avec une dose unique d'anti-CTLA-4 (ipilimumab) et deux doses d'anti-PD-1 (nivolumab) a conduit à 100% et 27% de réponses respectivement dans les tumeurs MSI et MSS (Chalabi et al., 2020). Plusieurs essais contrôlés randomisés de phase II et III sont en cours pour évaluer l'efficacité de l'immunothérapie dans les CCR métastatiques des deux phénotypes (en 1^{ère} ligne ou réfractaires), avec/sans chimiothérapie (Franke et al., 2019). Lorsqu'elle sera validée dans des cohortes plus importantes et avec au moins 3 ans de données de survie sans récurrence, l'immunothérapie néo-adjuvante pourrait potentiellement devenir la norme de soins pour un groupe défini de patients.

Tous ces schémas thérapeutiques montrent des améliorations de la survie globale et de la survie sans progression mais limitées à certains patients. En effet, des résistances (innées intrinsèques à la tumeur ou acquises suite à l'adaptation) par la tumeur ouvrent la porte à de la recherche de nouvelles cibles potentielles pour pallier ces problèmes.

4. Pronostic et survie

Grâce aux stratégies mises en place pour le dépistage du CCR et à l'amélioration des traitements, la survie des patients s'est nettement améliorée. Par contre, cette survie dépend directement des stades au diagnostic car plus une tumeur est diagnostiquée précocement, plus les chances de guérison augmentent. Ainsi, la survie globale à 5 ans, tous stades confondus, est de 63% et la chance de guérison est presque totale (> 90%) pour les cancers de stade 0 à II, de 72% pour les tumeurs de stade III et 14% pour les stades IV métastatiques (American Cancer Society's (ACS) - Cancer Facts & Figures 2022) (**Figure 8**). La survie dépend également du phénotype des CCR puisque les patients ayant une tumeur MSI ont un meilleur pronostic que les patients ayant une tumeur MSS (Grady and Pritchard, 2014; Popat et al., 2005; Watanabe et al., 2012) (Popat et al., 2005; Watanabe et al., 2012).

CMS1 MSI – SI activé	CMS2 Voie canonique	CMS3 Métabolique	CMS4 Mésenchymateux
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hyperméthylation	SCNA high	MSI statut mixte, SCNA low, CIMP low	SCNA high
Mutation de <i>BRAF</i>		Mutation de <i>KRAS</i>	
Infiltration et activation immunitaire	Activation de Wnt et MYC	Dérégulation métabolique	Infiltration stromale, activation de TGF- β , angiogénèse
Survie plus faible après rechute			Survie sans rechute et globale plus faible

Figure 9. Classification molaire consensus (CMS) des CCR et valeur pronostique associée.

Identification de 4 sous-types moléculaires de CCR à partir d’approches analytiques et d’analyses d’expression génique. CMS1 (14 % : MSI avec activation immunitaire) ; CMS2 (37 % : canonique avec différenciation épithéliale et activation de la voie WNT/MYC) ; CMS3 (13% : métabolique avec différenciation épithéliale et mutation KRAS) ; CMS4 (23 % : mésenchymateux avec activation de la voie TGF β et angiogénèse avec invasion stromale). *D’après Guinney et al., 2015.*

De manière intéressante, la fréquence de l'apparition des anomalies au niveau des microsatellites diminue également avec la progression tumorale comme indiqué par près de 20% du phénotype MSI retrouvés dans le stade II, 10% dans le stade III et 5% dans le stade IV (Rodriguez-Salas et al., 2017). D'autre part, plusieurs classifications moléculaires basées sur le profil d'expression des gènes ont été proposées, idéalement, pour définir le pronostic afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique avec des interventions plus ciblées (Rodriguez-Salas et al., 2017). Parmi ces classifications, la classification moléculaire consensus des sous-types de CCR (CMS) a été considérée comme la plus robuste actuellement disponible pour le CCR (**Figure 9**). Cette classification a été réalisée à partir de méta-analyses sur des données transcriptomiques en définissant quatre sous-types différents par leurs caractéristiques génétiques, épigénétiques et cliniques ainsi que l'expression des voies de signalisation activées (Guinney et al., 2015). De plus, chaque sous-type a été associé à une valeur pronostique de survie des patients. Ainsi, en cas de CCR non métastatique (stade 0 à III), les tumeurs du sous-groupe CMS1, caractérisées par un phénotype MSI et une infiltration immunitaire montrent un pronostic favorable par rapport au sous-groupe canonique CMS2 présentant une activation des voies Wnt et MYC. En revanche, en situation métastatique (stade IV), c'est le sous type CMS1 qui est lié au plus mauvais pronostic puisque la survie globale des patients était de 14,8 mois contre 31,9 mois pour les tumeurs CMS2 (Thiel and Ristimäki, 2013). À l'inverse, dans le sous-groupe CMS4, la présence de phénotypes de cellules mésenchymateuses est associée à un mauvais pronostic, une récurrence de la maladie et une survie plus courte. De plus, les tumeurs de ce phénotype sont généralement diagnostiquées à des stades avancés III et IV (Guinney et al., 2015).

La localisation tumorale est également un facteur important dans la prévision de l'évolution de la maladie. En effet, des tumeurs du côlon droit sont associées à un bien plus mauvais pronostic pour les tumeurs primaires comme les métastatiques (Schrage et al., 2016; Yahagi et al., 2016). Par ailleurs, cette localisation tient compte également de la réponse des traitements thérapeutiques. En effet, il a été suggéré dans une méta-analyse de CCR métastatiques (études PRIME et CRYSTAL) portant sur des traitements de la chimiothérapie associée à un anticorps anti-EGFR en première ligne, que la localisation de la tumeur primaire dans le côlon gauche donne un bénéfice de survie aux patients avec le gène *Ras* sauvage (Holch et al., 2017). De plus, dans l'essai clinique FIRE-3, le traitement FOLFIRI seul ou associé au cetuximab/bevacizumab en première ligne, donne un bienfait limité sur la survie des patients ayant une tumeur primaire dans le côlon droit alors que les traitements améliorent clairement celle des patients avec une tumeur colique située dans le côlon droit (Tejpar et al., 2017).

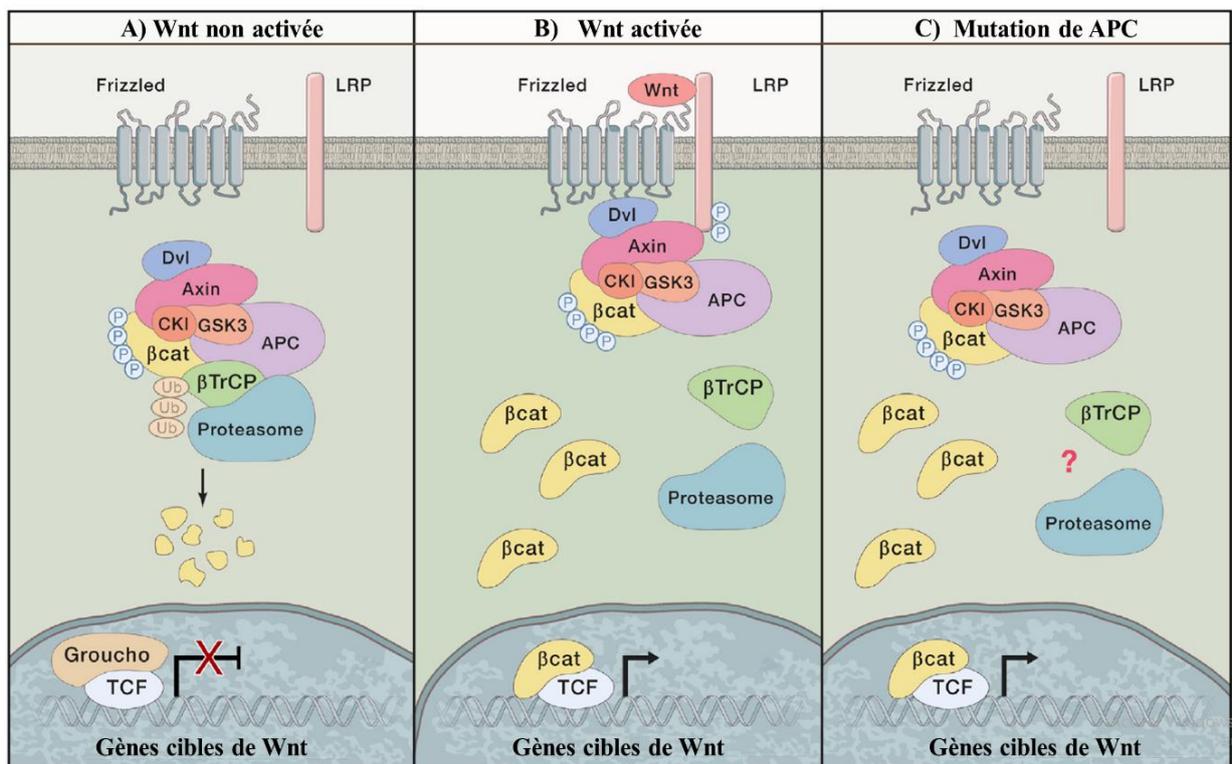


Figure 10. Voie WNT/β-caténine.

En absence d'activation de la voie Wnt, la β-caténine est rapidement dégradée par le protéasome (A). Lorsque la voie WNT est activée suite à la liaison du ligand sur son récepteur, la β-caténine s'accumule dans le cytoplasme et va transloquer dans le noyau et induire la transcription de gènes cibles (B). La mutation de l'APC empêche la dégradation de la β-caténine et conduit à l'activation constitutive de la voie. *D'après Nusse et Clevers, 2017.*

5. Voies de signalisation critiques dans la carcinogénèse colorectale

Les anomalies touchant des gènes régulateurs de différentes voies de signalisation est la conséquence de la transformation cancéreuse des cellules normales (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Ces dérégulations génétiques sont responsables en général de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs suite à des pertes alléliques/des mutations de perte de fonction ou encore elles peuvent être causées par une amplification génique ou des mutations de gain de fonction des oncogènes. En général, les voies altérées dans la carcinogénèse colorectale incluent la signalisation de Wnt, du TGF- β , de Ras/MAPK, de PI3K et de p53.

5.1. La voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt est l'une des voies impliquées dans des processus majeurs tels que l'embryogenèse en régulant la prolifération, la polarité et l'identité cellulaires mais aussi le renouvellement et le maintien des cellules épithéliales (Clevers, 2006).

L'élément central de cette voie est la β -caténine. Ainsi, la voie peut être activée de deux manières différentes, soit par une voie canonique dépendante de la β -caténine et une seconde voie indépendante de cette β -caténine. Par conséquent, le dysfonctionnement de la voie canonique a été rapporté pour conduire au développement du CCR (Clevers and Nusse, 2012; Nusse and Clevers, 2017).

Sans activation de la voie Wnt, la concentration de la β -caténine cytoplasmique est maintenue à un niveau très faible grâce à un complexe protéique constitué par la DVL (*Disheveled*), l'axine, l'APC, CK1 (*Casein Kinase 1*) et GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), qui induisent sa phosphorylation, son ubiquitinylation puis sa dégradation par le protéasome. En présence du ligand Wnt (*Wingless*), sa fixation sur le récepteur *Frizzled* entraîne une interaction avec le récepteur LRP (*Lipoprotein Receptor-related Protein*), qui inhibe la phosphorylation de la β -caténine stabilisant la protéine, qui transloque par la suite dans le noyau. La β -caténine accumulée dans le noyau pourra se lier au facteur de transcription TCF (*T-Cell transcription Factor*) ou LEF (*Lymphoid Enhancer Factor*) pour activer la transcription d'oncogènes comme *C-MYC*, *Cycline-D1* ou *C-JUN* ou de *LGR5* (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5*) impliqués dans la prolifération cellulaire (Behrens et al., 1996) (**Figure 10**). De ce fait, les mutations touchant les acteurs de la voie Wnt conduisent à son activation constitutive confortant son rôle oncogénique dans le développement du CCR même en absence du ligand (Nusse and Clevers, 2017).

Les perturbations communes de cette voie affectent majoritairement le gène *APC* retrouvé dans

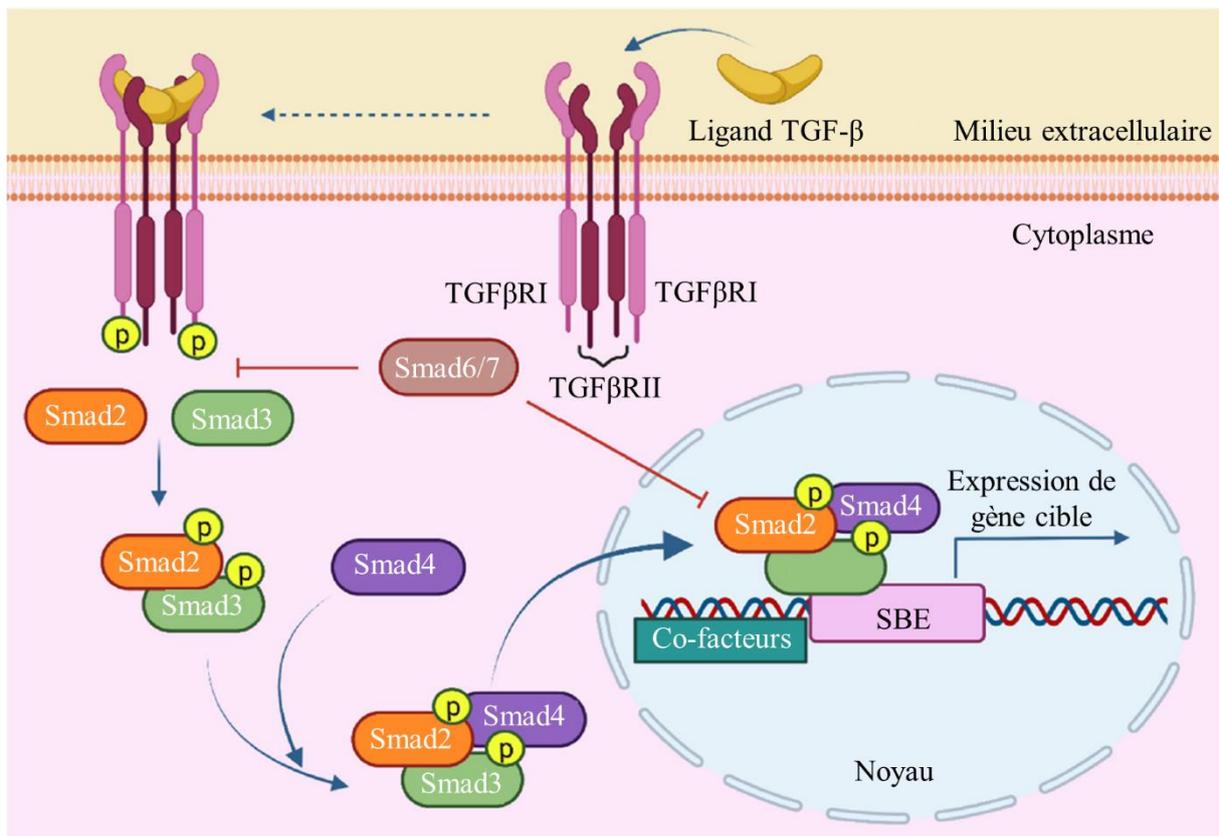


Figure 11. Voie TGF β /SMAD.

La fixation du TGF- β sur son récepteur TGF- β RII entraîne la phosphorylation de TGF- β RI et l'activation secondaire des SMADs. Ces dernières sont transloquées dans le noyau et induisent la transcription d'oncogènes. *D'après Gungor et al., 2022.*

plus de 70% des CCR et localisées dans une zone appelée « *mutation cluster region* » (Aghagolzadeh and Radpour, 2016). Si la mutation de *APC*, qui survient très précocement durant la carcinogénèse, permet l'inactivation du gène, cependant cette perte d'expression est associée à une hyperméthylation de son promoteur dans près de 40% de cancers sporadiques (Arnold et al., 2004; Chen et al., 2005). Par ailleurs, il existe une grande majorité des tumeurs avec la forme sauvage de *APC*, qui présentent plutôt des mutations activatrices du gène *CTNNB1* de la β -caténine, empêchant ainsi sa dégradation (Koveitypour et al., 2019; Souglakos, 2007). Et cette mutation est retrouvée dans 10% des CCR sporadiques ainsi que celle de l'axine fréquente dans 6% des cas (Koveitypour et al., 2019; Sameer, 2013). En outre, il a été décrit également qu'une forte accumulation de la β -caténine au niveau du front invasif est présente chez des patients avec une mauvaise survie globale (Baldus et al., 2004).

5.2. La voie TGF- β /SMAD

La voie de signalisation du TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) intervient dans la réduction de la prolifération des cellules épithéliales coliques en induisant leur apoptose et leur différenciation (Jung et al., 2017). De ce fait, la voie TGF- β est généralement considérée comme une voie suppresseur de tumeur.

La signalisation de la voie canonique est initiée par la fixation du TGF- β sur son récepteur à sérine/thréonine TGFBR2 (*TGF- β Receptor type II*), qui phosphoryle et recrute le récepteur TGFBR1 (*TGF- β Receptor type I*) pour former un hétérodimère. Grâce à la fonction kinase du TGFBR1 activée, le complexe induit la phosphorylation de SMAD2 et SMAD3 qui sont des protéines SMAD associées aux récepteurs (*R-SMAD proteins or Receptor associated SMAD proteins*) leur permettant donc de se lier à la protéine SMAD4. Le complexe hétéroprotéique SMAD2/SMAD3/SMAD4 va transloquer dans le noyau pour induire l'expression des gènes contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire comme *p21* et *p27* (Koveitypour et al., 2019) (**Figure 11**).

En revanche, son rôle paradoxal dans la prédisposition et la progression du CCR a été également documenté (Xu and Pasche, 2007). Malgré son intervention précoce dans la carcinogénèse en tant qu'inhibiteur de tumeur, toutefois, l'activation de la voie peut favoriser la dissémination tumorale en métastases et agit ainsi comme une voie oncogénique (Koveitypour et al., 2019). En effet, les perturbations de la voie dans les stades tardifs sont associées à la transformation maligne de l'adénome (Markowitz and Bertagnolli, 2009), suite à l'augmentation de la production de facteurs de croissance tels que TGF- α , FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et EGF (*Epidermal Growth Factor*) via le croisement avec d'autres voies oncogéniques (Gungor et al., 2022; Xu and Pasche, 2007).

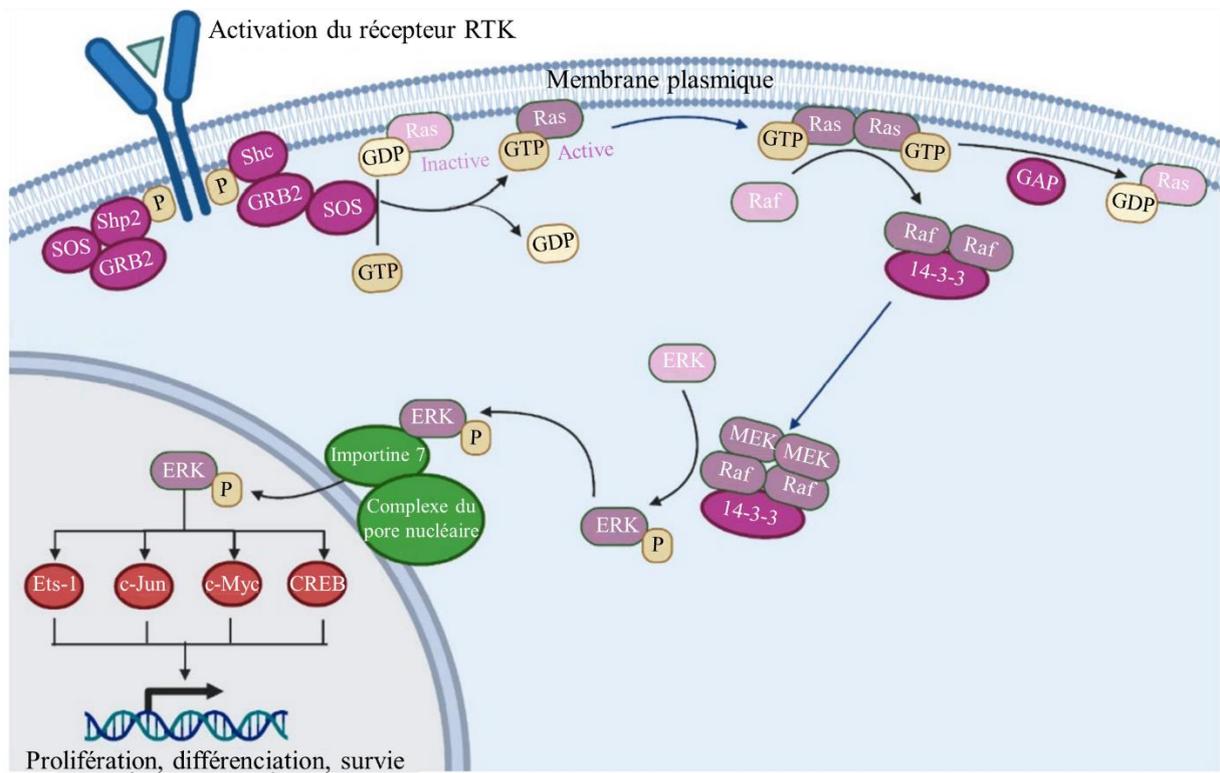


Figure 12. Voie Ras/Raf/MAPK.

L'activation des récepteurs à tyrosines kinases (RTK) par les facteurs de croissance induit une cascade de phosphorylations successives de Ras, Raf et des kinases MEK et ERK. ERK phosphorylée transloque dans le noyau et la transcription d'oncogènes pour permettre la transcription de facteurs de transcriptions cibles impliqués dans la croissance, la prolifération. *D'après Dillon et al., 2021.*

De plus, la perte d'activité de la signalisation TGF- β coïncide également avec la transition épithélio-mésenchymateuse (*Epithelial-Mesenchymal Transition or EMT*), qui est une étape préliminaire à la dissémination métastatique (Zavadil and Böttinger, 2005).

La dérégulation de cette voie touche principalement le gène *TGFBR2* chez qui une mutation est retrouvée dans 1/3 des cas de CCR (Markowitz and Bertagnolli, 2009). Alors que ces mutations somatiques sont rares dans les tumeurs de phénotype CIN (MSS), plus de 80% des tumeurs de phénotype MSI portent une mutation inactivatrice du *TGFBR2* (Grady et al., 1999; Jung et al., 2017).

Par ailleurs, l'inactivation de la voie peut être également influencée par la perte d'hétérozygotie du chromosome 18q, sur lequel sont localisés les gènes *SMAD4* et son partenaire *SMAD2*, retrouvée dans près de 70% des phénotypes CIN (Grady and Pritchard, 2014). Cependant, il a été identifié tout de même des mutations de *SMAD4* dans 15 à 30% des cas de CCR et 6% de mutations de *SMAD2* (Jung et al., 2017; Xu and Pasche, 2007). Des mutations germinales de *SMAD4* existent également et sont responsables de 50% des cas du syndrome de polypose juvénile (Jung et al., 2017). Sur le plan clinique, la mutation ou la perte de *SMAD4* est associée à un mauvais pronostic et à la résistance à la chimiothérapie au 5-FU (Grady and Pritchard, 2014).

5.3. La voie Ras/Raf/MAPK

La voie Ras/Raf/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) est particulièrement importante pour l'activation de la prolifération et la survie de cellules normales (Koveitypour et al., 2019). Cette voie est activée à la suite de la fixation de divers facteurs de croissance ou de cytokines sur leurs récepteurs à tyrosine kinase (*RTK ou Receptor Tyrosine Kinase*) incluant l'EGFR, le FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), l'IGFR (*Insulin-like Growth Factor Receptor*) et le PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*) (Dillon et al., 2021) (**Figure 12**).

Les acteurs principaux de cette voie sont les protéines RAS et RAF qui sont des médiateurs cytoplasmiques nécessaires à la transduction du signal (Kerkhoff and Rapp, 1998). Tout débute lorsque le ligand se fixe sur le récepteur entraînant son activation par autophosphorylation de ses résidus tyrosines et permet au complexe de protéines adaptatrices Grb2 (*Growth factor Receptor Bound protein 2*) et SOS (*Son Of Sevenless*), d'activer et de recruter à la membrane, la protéine RAS. Les protéines RAS sont des enzymes de la famille des GTPases qui existent sous deux états transitoires, un état inactif où elles sont liées à la GDP (*Guanosine DiPhosphate*) et un état actif lié à la GTP (*Guanosine TriPhosphate*). Par la suite, Ras-GTP active à son tour la kinase Raf à la membrane, qui provoque une cascade de phosphorylations successives des

kinases MEK (*MAPK-ERK-Kinase*) et ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). L'activation de ERK l'entraîne dans le noyau pour permettre l'expression des facteurs de transcription comme c-FOS, c-MYC ou c-JUN contrôlant l'entrée et la progression du cycle cellulaire en phase G1-S à travers des protéines comme la cycline D1. En parallèle, la voie oncogénique induit également des signaux anti-apoptotiques par des modifications post-traductionnelles de protéines anti-apoptotiques telles que Bad, Bim, caspase 9 et Bcl2 (McCubrey et al., 2007). Or, une activation anormale de cette voie favorise la croissance tumorale, mais également la migration, l'invasion et la survie cellulaires, de même que l'angiogénèse (Krasinskas, 2011), principalement causées par des mutations somatiques des proto-oncogènes *RAS* ou *RAF* (Grady and Pritchard, 2014).

Dans le CCR, la majorité des mutations activatrices affectent le gène *KRAS* sur les codons 12 et 13 (exon 2) dans 30 à 50% des CCR et semblent plus fréquentes dans les cancers localisés dans le côlon distal (Aghagolzadeh and Radpour, 2016; Markowitz and Bertagnolli, 2009). En plus, jusqu'à 50% des tumeurs de phénotype CIN présentent des mutations de *KRAS* (Yamada et al., 2005). Néanmoins, d'autres acteurs sont également touchés comme le gène *NRAS* avec 5 à 8% de mutations retrouvées (Rodriguez-Salas et al., 2017).

Alors que *BRAF* est muté dans près de 15% des cas de CCR, la majorité de ces mutations correspondent à la substitution de l'acide aminé glutamate en valine (V600E) dans la région d'activation de la kinase et par conséquent, confère une activation constitutive de la voie indépendamment de *KRAS* (Sameer, 2013). Ces mutations surviennent plus fréquemment dans les tumeurs MSI-High sporadiques, dans une localisation proximale du côlon avec une incidence chez les femmes (Aghagolzadeh and Radpour, 2016; Grady and Pritchard, 2014).

Par ailleurs, les mutations des deux gènes s'excluent mutuellement et par conséquent, la mutation activatrice de l'un ou l'autre des gènes est suffisante pour favoriser la tumorigénèse (Grady and Pritchard, 2014). En dehors de ces gènes, l'activation aberrante de la signalisation MAPK peut être provoquée également par la surexpression du récepteur à l'EGF décrite dans 30 à 85% des CCR (Cohen et al., 2016).

Outre l'association de la mutation de *Ras* dans la signalisation Raf/MAPK, son activation constitutive peut également se manifester à travers l'interaction avec la voie PI3K/Akt. En effet, la Ras-GTP active est capable d'induire la translocation membranaire et l'activation de la sous-unité p110 de PI3K, aboutissant à l'activation de mTOR et l'adaptation des cellules suite aux réponses nutritionnelles (McCubrey et al., 2007).

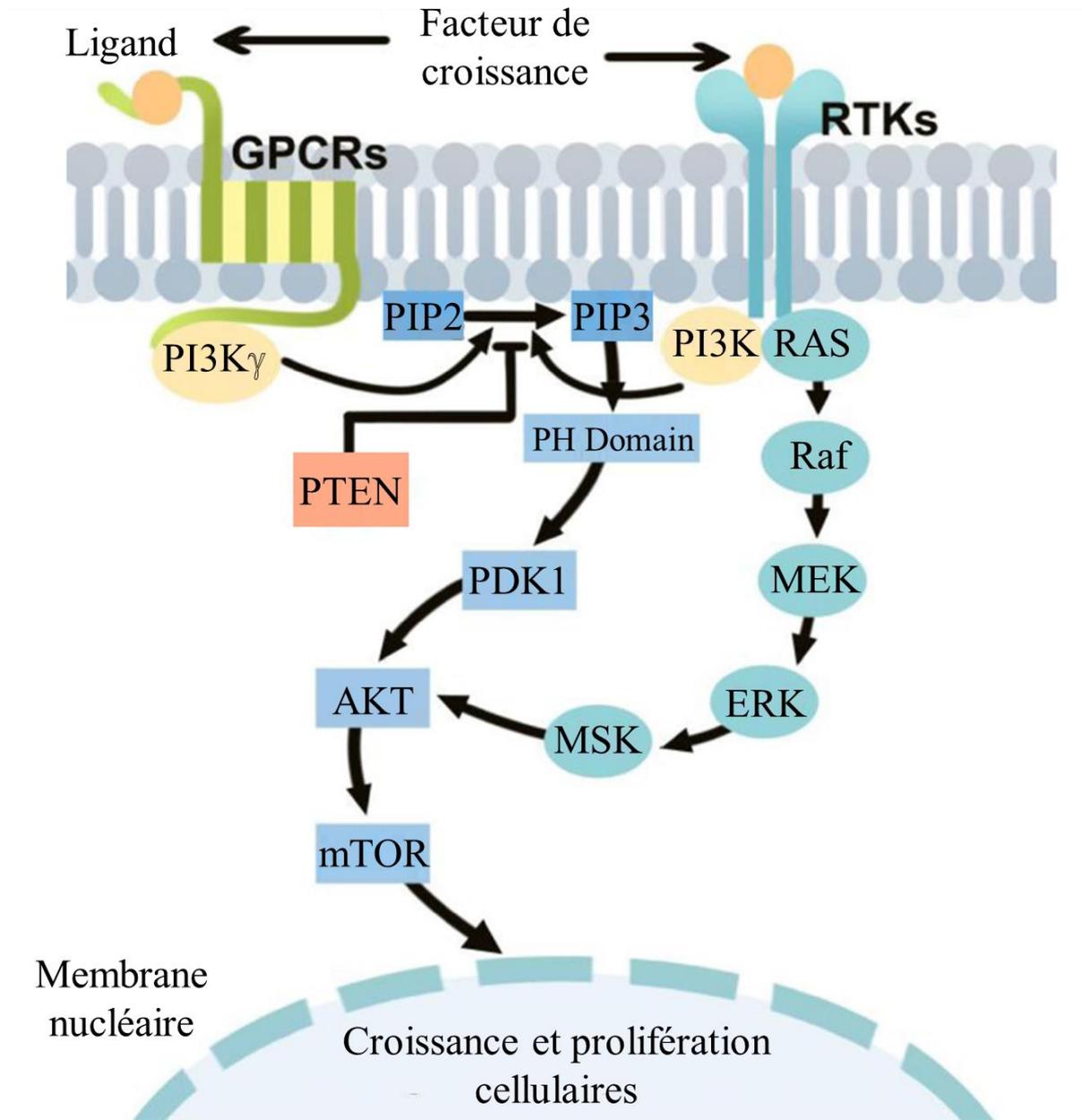


Figure 13. Voie PI3K/Akt.

L'activation du récepteur RTK par le facteur de croissance induit une cascade de phosphorylations qui implique PI3K, Akt et mTOR et active la transcription de gènes favorisant la prolifération, la survie et l'angiogenèse. *D'après Yang et al., 2019.*

5.4. La voie PI3K/Akt

Tout comme la voie oncogénique Ras/Raf/MAPK, la signalisation de PI3K/Akt est régulée par le biais des récepteurs à activité tyrosine kinase. C'est l'une des voies activées principalement par la signalisation induite par l'EGFR pour activer de nombreuses cibles impliquées dans la prolifération, la survie, la migration, l'apoptose et le métabolisme cellulaires (Cathomas, 2014; Hollander et al., 2011; Yang et al., 2019) (**Figure 13**).

Après l'activation du récepteur RTK, la sous-unité PIK3CA est recrutée au niveau de la PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase), éliminant sa sous-unité régulatrice p85 et entraîne la conversion de PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). La formation de PIP3 permet la localisation de Akt (protéine kinase B) à proximité de la membrane plasmique, qui sera à son tour activée par phosphorylation par la *phosphoinositol-dependent kinase-1* (PDK1). Akt, de par son activité kinase, va réguler par deux mécanismes possibles mTOR, un de ses effecteurs en aval : soit indirectement par une phosphorylation inhibitrice du complexe protéique TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex-2*), soit directement par activation de mTOR. La transduction du signal résulte en une traduction accrue de divers ARNm codant pour des régulateurs du cycle cellulaire (MYC et cycline D1) et de l'apoptose (p53 et Bcl2 (*B-cell lymphoma-2*)) de l'angiogénèse (*Hypoxia Inducible Factor* ou *HIF*), du métabolisme et l'adaptation aux besoins nutritionnels (*Glucose Transporter* ou *GLUT*).

Les mutations de PI3K/Akt sont répertoriées dans 10% à 40% des cas de CCR. Elles sont portées préférentiellement par la sous-unité catalytique p110 α (PIK3CA) de la PI3K au niveau des exons 9 et 20 et surviennent dans les étapes tardives de la transition de l'adénome vers le carcinome (Cathomas, 2014; Rodriguez-Salas et al., 2017).

Cependant, il existe d'autres mutations en dehors de celle de PIK3CA responsables de l'hyperactivation de la signalisation et de son rôle oncogénique. En effet, l'activité de PI3K est régulée négativement par *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10*), dont la perte d'expression causée par des mutations inactivatrices ou une délétion génique, est décrite dans 30% des tumeurs MSI et 9% des tumeurs MSS (Grady and Pritchard, 2014). Cette perte de fonction induit ainsi l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt en aval de la signalisation de PI3K. Par conséquent, des études ont identifié une amplification de Akt, une hyper-activation de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) qui contribuent à la transformation de la tumeur bénigne en tumeur maligne (Koveitypour et al., 2019; Markowitz and Bertagnolli, 2009).

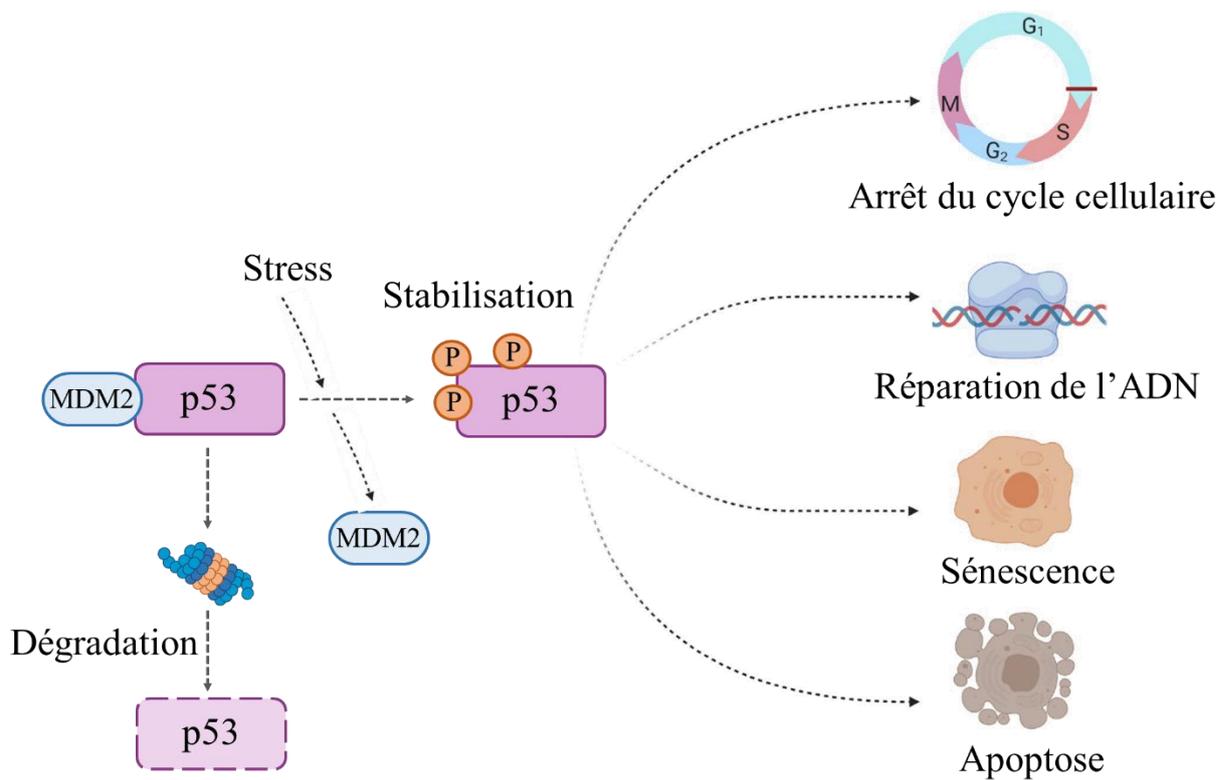


Figure 14. Voie p53.

L'enzyme MDM2 induit la dégradation de p53 dans les conditions normales par le protéasome. Les conditions de stress inhibent MDM2, ce qui stabilise p53 et favorise l'accumulation de la protéine dans le cytoplasme qui rentre dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'apoptose. *D'après Marei et al., 2021.*

5.5. La voie p53

Le facteur de transcription p53 ou "gardien du génome" est un régulateur clé de la transcription de centaines de gènes impliqués dans les processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire et les réponses suite à divers signaux de stress (Kubbutat et al., 1997).

Dans une cellule normale, le niveau de la protéine p53 est maintenu bas grâce à son interaction avec l'enzyme Mdm2 qui induit son ubiquitination causant sa dégradation par le protéasome (Kruse and Gu, 2009; Marei et al., 2021) (**Figure 14**). Cependant, les conditions de stress induisent l'inhibition de Mdm2, ce qui favorise la stabilisation et l'accumulation de p53 dans le cytoplasme, qui pourra transloquer dans le noyau et promouvoir la transcription de gènes dans l'arrêt du cycle cellulaire afin de réparer les dommages à l'ADN, ou encore favoriser la mort cellulaire dans les situations de stress prolongé (Hernández Borrero and El-Deiry, 2021).

En général, le dysfonctionnement du gène *TP53* (*Tumor Protein 53*) est une caractéristique commune à plusieurs cancers humains (Kandoth et al., 2013; Soussi and Bérout, 2001). Ainsi, sa perte d'expression causée par des mutations inactivatrices touchent généralement les exons 5 à 8. Une perte allélique est rarement observée dans les adénomes, par contre, elle est retrouvée dans 50-75% des carcinomes CCR soulignant l'implication de p53 très tardivement dans la carcinogénèse colorectale (Aghagolzadeh and Radpour, 2016; Fearon and Vogelstein, 1990). Ces mutations pour la majorité sont des mutations faux-sens et sont moins fréquentes dans le côlon proximal (34%) que le côlon distal (45%) (Russo et al., 2005).

Les altérations génétiques de p53 peuvent résulter également à des mutations de gain de fonction qui soutiennent un rôle oncogénique de la protéine (Hernández Borrero and El-Deiry, 2021; Li et al., 2015). En effet, Rodrigues et al., avaient déjà observé une surexpression de p53 muté dans des tissus tumoraux coliques (Rodrigues et al., 1990), qui proviendrait probablement d'une stabilisation de la protéine dans le noyau prolongeant ainsi sa demi-vie. De plus, ce mutant a la capacité de se lier à la forme sauvage de p53 pour induire son inhibition, et favorise donc un phénotype agressif et métastatique (Hernández Borrero and El-Deiry, 2021).

Par ailleurs, le statut mutationnel de *TP53* dans le pronostic et la progression des tumeurs colorectales est reconnu (Russo et al., 2005). En effet, les mutations de p53 sont associées à une invasion lymphatique dans les tumeurs coliques proximales et montrent une forte corrélation avec une invasion vasculaire et lymphatique dans les tumeurs du côlon distal (Li et al., 2015). Le rôle oncogénique de p53 a été également décrit dans la chimiorésistance associée à un mauvais pronostic chez des patients porteurs de mutations par rapport aux porteurs de la forme

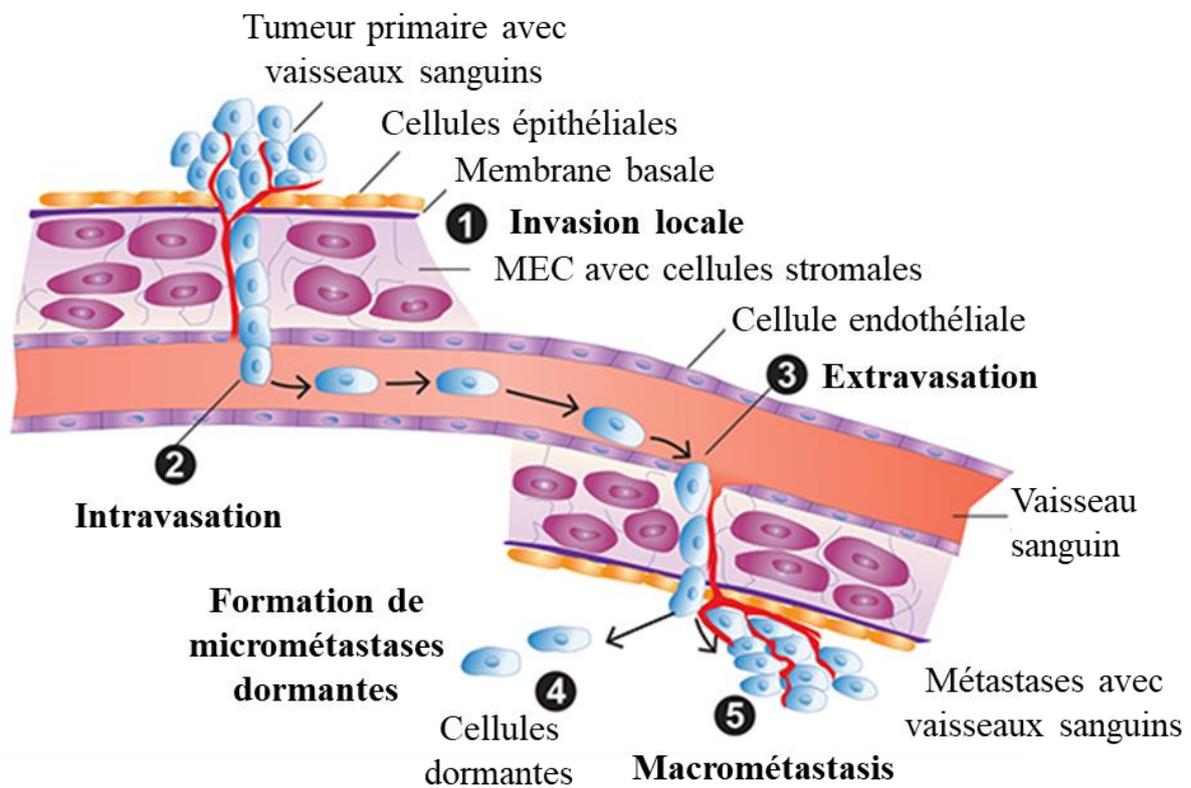


Figure 15. Représentation schématique des étapes de la dissémination métastatique.

Les cellules tumorales envahissent le tissu environnant et passent dans la circulation sanguine où elles peuvent s'implanter par extravasation dans le site secondaire pour former des micrométastases pouvant évoluer en macrométastases. *D'après Meadows et Zhang, 2015.*

sauvage (Huang et al., 2019; Iacopetta, 2003).

6. Dissémination métastatique

Malgré des améliorations significatives dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients, la majorité des décès liés au cancer sont dus à des métastases détectées tardivement et souvent incurables par les thérapies conventionnelles. Les métastases sont des tumeurs formées (tumeurs secondaires) à partir de la dissémination de certaines cellules issues de la tumeur à partir de son site d'origine (tumeur primaire) vers des organes à distance.

Même si les fondements biologiques menant à la formation de métastases ne sont pas totalement bien compris, différents aspects du programme métastatique ont été révélés. Ainsi, la dissémination métastatique est un processus séquentiel à plusieurs étapes, connu sous le nom de cascade invasion-métastase (Lambert et al., 2017; Meadows and Zhang, 2015) (**Figure 15**). Ces étapes sont par ailleurs interdépendantes car un échec de l'une d'elles peut arrêter l'ensemble du processus (Fidler, 2003).

Les étapes initiales de cette cascade impliquent l'invasion locale des cellules tumorales primaires dans les tissus proches de la tumeur primaire. Cette invasion se fait à partir des caractéristiques acquises comme une perte d'adhérence et une capacité de dégrader les composants de la matrice extracellulaire (MEC), qui confèrent aux cellules une motilité accrue. Puis les cellules invasives franchissent le système circulatoire (sanguin ou lymphatique) par intravasation qui facilite leur déplacement vers les organes distants. Cependant, le passage en toute sécurité des cellules cancéreuses circulantes vers ces sites anatomiques distants n'est guère garanti. En effet, leur survie dans l'environnement hostile pendant le transit hématogène/lymphatique nécessite des interactions protectrices contre le flux sanguin/lymphatique et une surveillance immunitaire dans le sang. L'extravasation dans l'organe où elles s'implanteront nécessite que les cellules traversent la paroi des vaisseaux sanguins par le processus de la migration trans-endothéliale (pour intravasation aussi) pour s'implanter et former des micrométastases.

La colonisation du tissu requiert des propriétés d'initiation de tumeur et d'adaptation dans le nouvel microenvironnement, qui permettent aux cellules de proliférer et d'évoluer en macrométastases.

7. Les chimiokines et les récepteurs de chimiokines

7.1. Les chimiokines

Les chimiokines regroupent un ensemble de protéines de petites tailles de 8 à 12 kDa apparte-

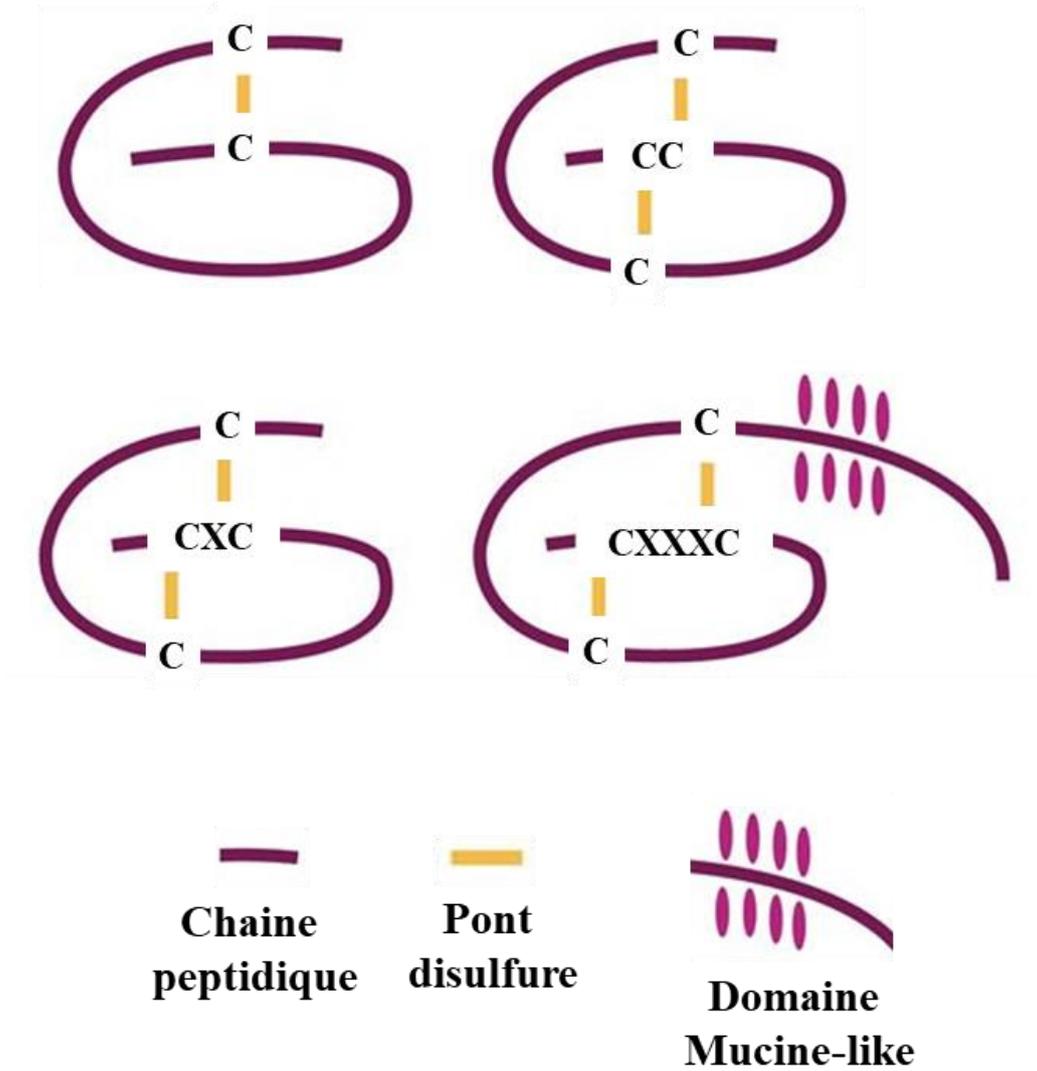


Figure 16. Structure des différentes classes de chimiokines.
D'après PEPROTECH.

nant à la famille des cytokines chimio-attractantes (Murphy, 1996; Rollins, 1997). À ce jour, une cinquantaine de chimiokines ont été identifiées. Elles sont classées en sous-familles de chimiokines C, CC, CXC et CX3C en fonction de la présence du “domaine chimiokine”, représenté par la localisation de quatre (4) résidus cystéines conservés dans la partie N-terminale, nécessaires à la formation des ponts disulfures (IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature, 2003) (**Figure 16**). Cette classification est basée sur la présence d’acide aminé quelconque (X) qui sépare les deux premières cystéines comme un (1) acide aminé pour les chimiokines CXC, trois (3) acides aminés pour la sous-famille CX3C alors que ces deux (2) résidus cystéines sont adjacents chez les chimiokines CC. Contrairement aux autres sous-familles, les chimiokines C présentent seulement deux (2) résidus cystéines, dont une seule retrouvée dans la région N-terminale.

Par ailleurs, dans la sous-famille des chimiokines CXC, on trouve deux groupes selon la présence du motif glutamate-leucine-arginine (ERL) situé entre la partie N-terminale et la première cystéine dans cette région (Strieter et al., 1995). Ce motif confère aux chimiokines ERL positifs (chimiokines ERL), la capacité d’induire l’angiogenèse contrairement aux chimiokines ELR négatives, qui ont plutôt une action anti-angiogénique (Murphy, 1996; Strieter et al., 1995). Il est également suggéré que cette particularité leur donne la capacité d’une chimioattraction spécifique sur les neutrophiles exprimant le récepteur CXCR2 alors que la majorité des chimiokines ELR négatives ou non-ERL ont une action sur les lymphocytes T et B, les monocytes et les cellules dendritiques *via* des récepteurs différents (Murphy, 1996, 2007). Cependant, il existe une exception pour la chimiokine CXCL12, qui malgré qu’elle soit dépourvue du motif ELR, est capable d’induire l’angiogenèse dépendant du type cellulaire. En effet, le rôle pro-angiogénique de CXCL12 a été initialement mis en évidence dans des modèles murins dans lesquels la délétion génique entraînait un défaut de vascularisation du système gastrointestinal (Tachibana et al., 1998). Par ailleurs, CXCL12 peut favoriser l’angiogenèse tumorale *via* la sécrétion de médiateurs angiogéniques comme le VEGF (Brand et al., 2005).

Un autre système de classification des chimiokines est basé que sur leur fonction. Ainsi, on distingue les chimiokines homéostatiques des chimiokines inflammatoires. Les chimiokines homéostatiques sont exprimées de manière constitutive et sont importantes pour de nombreux processus physiologiques tandis que l’expression des chimiokines inflammatoires est induite par des stimuli inflammatoires. Il existe toutefois certaines chimiokines qui puissent avoir une fonction mixte et dépendant des conditions, elles peuvent être homéostatiques ou inflammatoires (Janssens et al., 2018; Mantovani et al., 2006).

La grande majorité des chimiokines décrites sont regroupées dans les deux grandes sous-familles des chimiokines CXC (chimiokines α) et chimiokines CC (chimiokines β), les autres familles contenant peu de membres identifiés aujourd'hui. En effet, les seuls membres encore connus des chimiokines C sont la lymphotactine (XCL1) et la chimiokine XCL2, la fractalkine encore appelée neurotactine appartenant à la sous-famille des chimiokines CX3C, qui sont des molécules attractantes des lymphocytes T.

L'activité et la distribution des chimiokines sont modulées par différents mécanismes. En général, elles sont affectées par des modifications post-traductionnelles comme la citrullination, la nitration et le clivage par des protéases. Ces modifications peuvent entraîner une augmentation ou une inhibition de l'activité de la chimiokine dépendant de la région et des acides aminés touchés. Par exemple, la nitration des résidus de tyrosine de CCL2 réduit la capacité de cette chimiokine à attirer les monocytes par l'intermédiaire de son récepteur CCR2 (Barker et al., 2017). Par contre, c'est le clivage de la partie C-terminale de CCL16 qui augmente ses capacités à se fixer sur les glycosaminoglycanes (GAG) (Starr et al., 2012).

De l'autre côté, l'interaction des chimiokines avec les GAG permet leur adhésion à la surface de la MEC pour créer un gradient de concentrations de chimiokines ; cette interaction leur attribue également une résistance dans la circulation sanguine qui a pour conséquence de prolonger leur durée de vie dans un tissu (Sarris et al., 2012). En outre, l'oligomérisation des chimiokines (homo/hétérodimères) tout comme leur internalisation par des récepteurs « *scavengers* » peuvent également influencer leur distribution et leur activité (Ulvmar et al., 2011).

7.2. Les récepteurs de chimiokines

Les chimiokines exercent leurs fonctions en se fixant sur des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7 TMD), qui sont apparentés aux récepteurs rhodopsines (Murphy, 1996). Ces récepteurs ont été initialement nommés comme les chimiokines qu'ils lient. De ce fait, on retrouve la sous-famille des récepteurs CR, CCR, CXCR et CX3CR. Plus récemment, un nouveau groupe de récepteurs a été découvert, ce qui a permis de les classer en deux familles : les récepteurs conventionnels (cCKRs) et les récepteurs atypiques (ACKRs) (Hughes and Nibbs, 2018).

Les récepteurs conventionnels au nombre de dix huit (18), sont des récepteurs à sérine/thréonine couplés aux protéines G dont la transduction du signal fait intervenir les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt (Teicher and Fricker, 2010). À l'inverse, l'activité des récepteurs atypiques (ACKR1-4) est indépendante de l'activation des protéines G puisqu'ils sont dépourvus de la

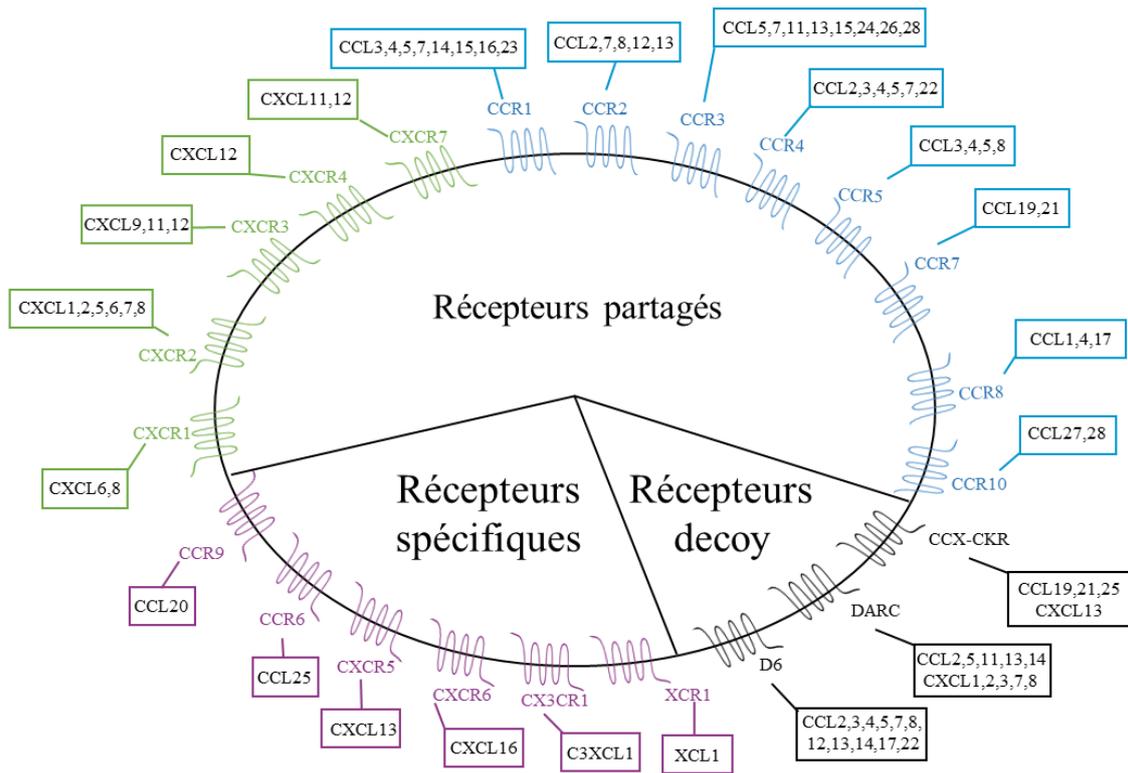


Figure 17. Famille des chimiokines et leurs récepteurs apparentés.

La plupart des chimiokines peuvent se lier à plusieurs récepteurs, et un seul récepteur peut se lier à plusieurs chimiokines, comme c'est le cas pour la plupart des chimiokines CC (bleu) et CXC (vert). Les récepteurs leurres (noirs) peuvent également interagir avec plusieurs chimiokines. En revanche, une minorité de récepteurs (rouge) n'ont qu'un seul ligand. D'après Sun *et al.*, 2010.

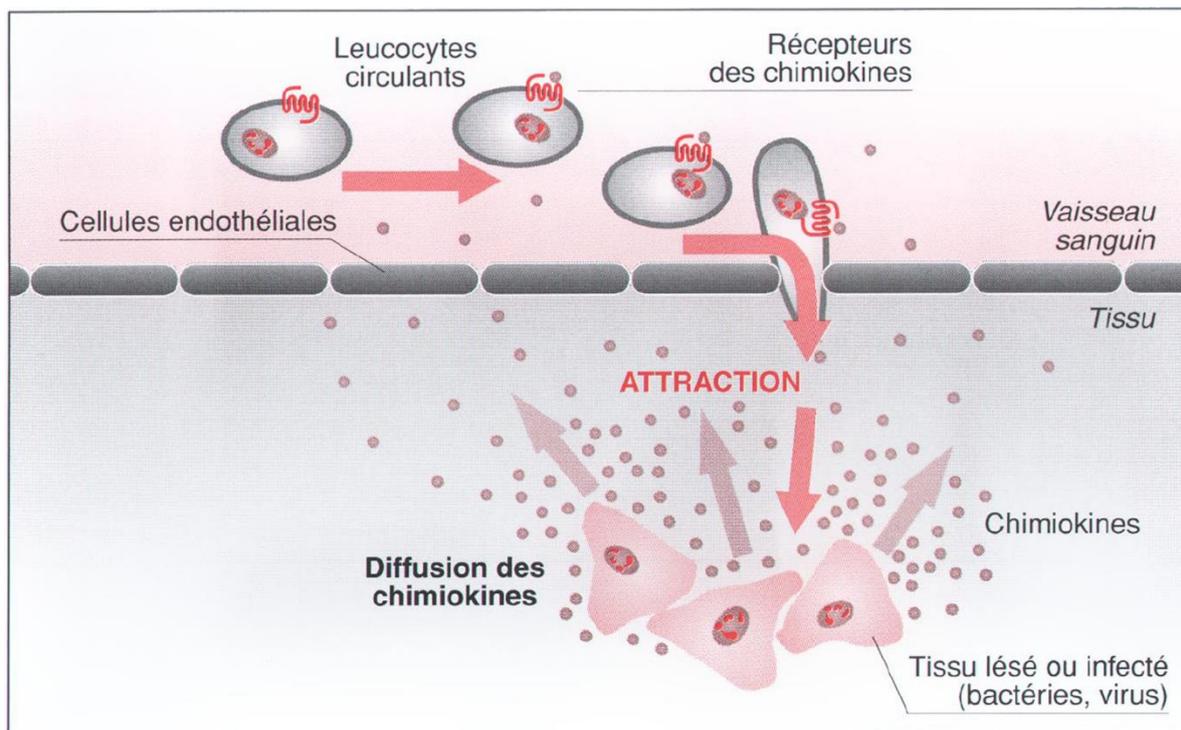


Figure 18. Représentation schématique du recrutement des leucocytes sur un site inflammatoire.

D'après Samson, 1999.

séquence de sept (7) acides aminés DRYLAIV, qui est nécessaire pour leur couplage aux protéines G (Ulvmar et al., 2011). Ces récepteurs sont connus principalement pour leur capacité à internaliser puis dégrader leurs ligands par voie endolysosomale. Ce rôle de « *scavenger* » ou de « *decoy receptor* », permet d'établir un gradient de concentrations des chimiokines et par conséquent de réguler l'activation d'autres récepteurs (Ulvmar et al., 2011).

S'il n'est pas clair que les récepteurs atypiques peuvent transmettre des signaux après leur liaison avec des chimiokines, de nombreuses études ont mis en évidence une signalisation et des réponses biologiques après la liaison d'un ligand au récepteur ACKR3 (ou CXCR7) (Hattermann et al., 2010; Rajagopal et al., 2010).

L'interaction chimiokine/récepteur est très complexe. Si une même chimiokine a la capacité de se fixer sur plusieurs récepteurs, inversement, les récepteurs peuvent lier plusieurs chimiokines (**Figure 17**). Par ailleurs, certaines chimiokines peuvent agir comme des antagonistes naturels pour des récepteurs sur lesquels ils se fixent et donc la réponse physiologique sera dépendante du couple chimiokine/récepteur (Xanthou et al., 2003; Zlotnik and Yoshie, 2012).

7.3. Rôles des chimiokines et récepteurs dans la physiologie et les pathologies

L'interaction chimiokine-récepteur a été initialement décrite pour induire la migration et le recrutement des leucocytes sur les sites inflammatoires (Bleul et al., 1996; Murphy, 1996). Dans ce contexte, les chimiokines guident la migration de ces cellules et favorise leur extravasation à l'intérieur du tissu concerné par une cascade d'évènements le long du gradient de concentration (**Figure 18**) (Samson et al., 1999). D'un autre côté, les chimiokines sont nécessaires pour la mise en place de l'immunité innée et adaptative, en assurant le trafic continu des leucocytes dans les tissus de l'organisme (Griffith et al., 2014; Moser and Willmann, 2004) et pour favoriser la réparation des tissus endommagés. Par ailleurs, les chimiokines ont été décrites pour leur implication dans la différenciation, la mobilisation et la prolifération des cellules souches de la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes secondaires (Chen et al., 2018; Rollins, 1997). Leur fonction s'étend également à l'angiogenèse où elles peuvent être un régulateur positif ou négatif de ce processus (Murphy, 1996; Strieter et al., 1995).

Cependant, il est maintenant connu que l'activité des chimiokines va au-delà de la migration des cellules immunitaires. En effet, les fonctions physiologiques des chimiokines homéostatiques sont bien définies dans les tissus dans lesquels leur expression est constitutive. Elles sont importantes durant le développement embryonnaire où elles vont contrôler la migration directionnelle des cellules souches vers les sites de différenciation pour former les organes (Aiuti et al., 1997; Bleul et al., 1996; Nagasawa et al., 1996). Des études ont également

montré que les chimiokines permettent la migration des neurones, des cellules de la crête neurale, des cellules germinales et des entérocytes et régulent la structuration et le remodelage du système vasculaire (Agle et al., 2011; Lewellis and Knaut, 2012; Petit et al., 2007; Siekmann et al., 2009).

En dehors de ces rôles physiologiques, les couples chimiokines/récepteurs sont décrits dans diverses pathologies dont les maladies infectieuses, les maladies inflammatoires et auto-immunes et le développement des cancers (Raman et al., 2011; Rezaeeyan et al., 2018). Dans les maladies infectieuses, des agents pathogènes comme le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) utilisent les récepteurs des chimiokines comme co-récepteurs à l'entrée dans les cellules cibles (Martínez-Muñoz et al., 2014; Murphy, 1996) et dans les maladies auto-immunes et inflammatoires dont les inflammations chroniques de l'intestin, l'arthrite rhumatoïde et l'asthme, elles favoriseraient l'infiltration de cellules immunitaires inflammatoires dans les tissus cibles (Asquith et al., 2015; Ekbom et al., 1990; Zimmerman et al., 2008).

Dans les cancers, plusieurs études ont démontré l'importance de ces protéines dans l'initiation et la progression tumorale et la formation de métastases, en particulier dans les cancers mammaires, colorectaux, pulmonaires, pancréatiques, ovariens, prostatiques, les leucémies et glioblastomes (Chow and Luster, 2014; Hattermann et al., 2010; Itatani et al., 2016; Müller et al., 2001; O'Hayre et al., 2008; Payne and Cornelius, 2002; Sun et al., 2010).

Leur rôle dans la progression tumorale a été établi initialement à travers des corrélations d'expression élevée de récepteurs et/ou de ligands dans les tumeurs de patients (Rezaeeyan et al., 2018). Toutefois, de nombreuses fonctions décrites pour ces protéines viennent d'études *in vitro* et *in vivo*, avec des délétions géniques ou de répression de l'expression de gènes et avec l'utilisation d'inhibiteurs/antagonistes pharmacologiques (Gómez-Cuadrado et al., 2017).

Un des mécanismes par lequel les chimiokines interviendraient dans les cancers est de favoriser le recrutement des cellules immunitaires au sein de la tumeur, lesquelles peuvent avoir une activité pro/anti-tumorale (Joyce and Pollard, 2009; Mollica Poeta et al., 2019). Leur implication dans la progression tumorale passe également par l'inhibition de l'apoptose, la stimulation de la prolifération cellulaire et la croissance tumorale. Elles interviennent également dans l'angiogenèse et le remodelage de la MEC par la sécrétion de métalloprotéases (MMPs) qui donnent la capacité des cellules à migrer et métastaser dans les organes à distance (Joyce and Pollard, 2009).

En général, les sites privilégiés de métastases sont des sites dans lesquels l'expression des chimiokines est importante, ce qui peut favoriser la migration directionnelle des cellules tumo-

rales exprimant leurs récepteurs (Zlotnik et al., 2011).

8. La chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7

L'axe CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 est majoritairement décrit comme un facteur majeur dans l'invasion et les métastases dans plusieurs cancers (Balkwill, 2004; Duda et al., 2011; Sun et al., 2010). Dans cette partie, nous mentionnons le rôle de l'axe CXCL12 et ses deux récepteurs dans d'autres pathologies et d'autres cancers que le CCR. Le rôle physiologique de CXCL12 et ses deux récepteurs et leur implication dans le CCR sont décrits plus loin et ont fait l'objet d'une revue publiée dans le journal *Cancers* en Avril 2022.

8.1. Rôles dans les pathologies

Si de nombreuses études rapportent l'implication de l'axe CXCL12 et ses deux récepteurs dans le développement des cancers, plusieurs données décrivent les conséquences d'altérations de cet axe dans d'autres pathologies, telles que des maladies auto-immunes, des infections, des dysfonctionnements du système nerveux central et cardiaque (García-Cuesta et al., 2019; Huynh et al., 2020). Le récepteur CXCR4 est bien connu pour son rôle de co-récepteur essentiel à l'entrée du VIH dans les lymphocytes T (Bleul et al., 1996; Hou et al., 2015; Yu et al., 2018). Cependant, des études sur la fonction de CXCR7 ont également mis en évidence qu'il peut également contribuer à l'infection par le VIH (Shimizu et al., 2000).

8.1.1. Dans le syndrome de WHIM

Le syndrome d'immunodéficience WHIM ou *Warts, Hypogammaglobulinaemia, Infections and Myelokathexis*, est un trouble immunodéficientaire rare causé par des mutations autosomiques dominantes de type gain de fonction dans le gène codant pour CXCR4 (Hernandez et al., 2003). C'est d'ailleurs la seule immunodéficience humaine associée à un défaut dans un récepteur de chimiokine (Bryant and Slade, 2015). Les mutations associées touchent la partie C-terminale cytoplasmique du récepteur et aboutissent à l'expression d'une protéine tronquée. Les conséquences sont une altération de l'internalisation du récepteur et par conséquent, une activation constitutive de la signalisation de CXCR4 (Balabanian et al., 2005).

Cette maladie se caractérise par une neutropénie associée à une hyperplasie des neutrophiles matures dans la moelle osseuse, appelée myélokathexie et une lymphopénie qui réduit les cellules B et T matures. Par ailleurs, il a été récemment rapporté que le traitement des patients à faible dose d'AMD3100, un antagoniste de CXCR4, améliore les symptômes du syndrome de WHIM et la qualité de vie des patients (McDermott et al., 2019).

8.1.2. Dans d'autres cancers

La participation de CXCL12, CXCR4 et CXCR7 est rapportée dans divers cancers. Même si CXCL12 est décrite comme importante dans plusieurs cancers, son niveau d'expression fait l'objet de débats. Dans certaines études sur le cancer mammaire, gastrique, colorectal et pancréatique, une forte expression de CXCL12 favoriserait la migration, l'invasion et la capacité métastatique des cellules (Greijer et al., 2008; Izumi et al., 2016; Müller et al., 2001; Roy et al., 2014). Par contre, Rubie et al., dans des carcinomes gastriques (Rubie et al., 2016), nos travaux (Romain et al., 2017) et les travaux de Wendt et al., (Wendt et al., 2006) décrivent une faible ou perte d'expression de CXCL12 liée à la progression tumorale. En outre, comparée aux tissus sains, une expression élevée des récepteurs est retrouvée et décrite comme associée à l'agressivité de la tumeur et une baisse de la survie des patients (Fan et al., 2018; Zhao et al., 2015).

L'implication de l'un ou des deux récepteurs dans la migration, l'invasion et la dissémination tumorale a été démontrée à travers plusieurs approches allant des modèles de perte et de gain de fonction des gènes *in vitro* jusqu'aux études *in vivo* chez les souris. Dans ces modèles, il a été montré que l'interaction CXCL12 avec CXCR4 et CXCR7 favorise la prolifération, la migration, l'invasion des cellules du cancer du sein, du poumon, de la prostate, de l'ovaire puisque des antagonistes, des anticorps ou des ARN interférents dirigés contre les récepteurs, inhibent fortement ces effets (Burns et al., 2006; Ma et al., 2016; Sun et al., 2010; Wang et al., 2012). Dans le gliome, l'expression de CXCR7 confère des capacités anti-apoptotiques aux cellules (Hattermann et al., 2010). À l'opposé, la surexpression des récepteurs dans des xénogreffes sous-cutanées ou orthotopiques, exacerbe le chimiotactisme et la dissémination tumorale de lignées tumorales de cancer du sein et des voies aéro-digestives (Kim et al., 2019; Sun et al., 2010; Xu et al., 2015) et l'usage des antagonistes inhibent fortement ces effets en réduisant la croissance tumorale (Domanska et al., 2013; Lapteva et al., 2005; Miao et al., 2007; Smith et al., 2004). Par ailleurs, le rôle oncogénique des récepteurs fait intervenir des mécanismes tels que l'EMT en modulant l'adhésion et la sécrétion de MMPs, en favorisant l'angiogenèse et l'activation de nombreuses voies de signalisations (Santagata et al., 2021; Shi et al., 2020).

L'implication de CXCR4 et CXCR7 n'est pas seulement limitée aux cancers solides (Santagata et al., 2021; Teixidó et al., 2018). De nombreuses évidences montrent que l'expression forte des récepteurs est également liée au caractère agressif des cancers hématologiques (Burger and Kipps, 2006; Melo et al., 2014; Möhle et al., 1999). Même si peu d'études ont adressé le rôle

de CXCR7 dans ce domaine, il a été montré que l'expression du récepteur est requise pour la migration des cellules dans la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) et leur infiltration dans le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) (Hattermann et al., 2010; Puddinu et al., 2017).

Par ailleurs, des études rapportent des rôles opposés ou contradictoires de l'un ou l'autre des récepteurs. En effet, la surexpression de CXCR4 favorise l'invasion du cancer du sein alors que celle de CXCR7 empêche le processus invasif mais favorise la croissance tumorale et l'angiogenèse (Hernandez et al., 2011). Un rôle anti-tumoral de CXCR7 est même décrit dans le neuroblastome où CXCR7 va inhiber la croissance tumorale et empêcher la dissémination métastatique médiée par des cellules exprimant CXCR4 (Lieberman et al., 2012). Par contre Décaillot et al., ont montré que la co-expression des deux récepteurs dans les cellules mammaires *in vitro* favorise une migration plus importante qu'avec l'expression de CXCR4 seul (Décaillot et al., 2011). D'autre part, c'est l'expression de CXCR4 et non celle de CXCR7, qui engage les cellules tumorales pulmonaires vers un comportement métastatique (Choi et al., 2014).

Sur le plan thérapeutique, de nombreuses études cliniques ciblent CXCR4, en particulier dans les cancers hématologiques en utilisant des antagonistes combinés ou non à d'autres inhibiteurs (Domanska et al., 2013; Duda et al., 2011; Teixidó et al., 2018) ; par contre, l'évaluation thérapeutique d'inhibiteurs/antagonistes de CXCR7 n'a pas fait l'objet de beaucoup d'investigations à ce jour.

8.2. Rôles physiologiques et pathologiques dans le cancer colorectal

Publication

Goïta AA, Guenot D. Colorectal Cancer: The Contribution of CXCL12 and Its Receptors CXCR4 and CXCR7. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 2;14(7):1810. doi: 10.3390/cancers14071810. PMID: 35406582; PMCID: PMC8997717. (Goïta and Guenot, 2022).

Review

Colorectal Cancer: The Contribution of CXCL12 and Its Receptors CXCR4 and CXCR7

Aïssata Aimée Goïta and Dominique Guenot *

INSERM U1113/Unistra, IRFAC—Interface de Recherche Fondamentale et Appliquée en Cancérologie, 67200 Strasbourg, France; goitaaissata@yahoo.fr

* Correspondence: guenot@unistra.fr; Tel.: +33-388275362

Simple Summary: Many signaling pathways are involved in cancer progression, and among these pathways, the CXCL12 axis and its two receptors CXCR4 and CXCR7 are well described for many cancers. This review presents the current knowledge on the role played by each of the actors of this axis in colorectal cancer and on its consideration in the development of new therapeutic strategies.

Abstract: Colorectal cancer is one of the most common cancers, and diagnosis at late metastatic stages is the main cause of death related to this cancer. This progression to metastasis is complex and involves different molecules such as the chemokine CXCL12 and its two receptors CXCR4 and CXCR7. The high expression of receptors in CRC is often associated with a poor prognosis and aggressiveness of the tumor. The interaction of CXCL12 and its receptors activates signaling pathways that induce chemotaxis, proliferation, migration, and cell invasion. To this end, receptor inhibitors were developed, and their use in preclinical and clinical studies is ongoing. This review provides an overview of studies involving CXCR4 and CXCR7 in CRC with an update on their targeting in anti-cancer therapies.

Keywords: colorectal cancer; chemokine; ACKR3; metastasis; microenvironment; signaling pathways; epigenetics; prognosis; therapy; resistance

1. Cancer Colorectal

1.1. Epidemiology

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the world, with an annual estimate in 2020 of 1,148,515 new cases affecting both men and women. Because most patients are diagnosed at metastatic stages of the disease [1], it is the cause of 576,858 deaths per year, making it the second most deadly cancer. Similar to many cancers, the etiology of CRC involves a variety of environmental and individual risk factors, including genetic causes, chronic disease, lifestyle, and age [2].

An average risk is attributed to men and women over 50 years of age with no known predisposing factors. In absence of genetic factors or family history, environmental factors such as diet, a sedentary lifestyle, alcohol, and tobacco abuse influence the development of CRC [3,4]. The high risk, about 20% of the general population, considers family (familial adenomatous polyposis or FAP or Lynch syndrome) and personal history. Thus, this risk is two to five times higher than the average risk of developing CRC for people who have had an adenoma >1 cm, or with at least one first-degree relative who has developed colorectal adenomas or CRC [5]. The risk is also elevated for people affected by a chronic inflammatory bowel disease (IBD) such as ulcerative colitis or Crohn's disease [5].

1.2. Molecular Definition of Colorectal Cancer

CRC occurs and progresses because of an accumulation of sequential mutations and/or genomic abnormalities. Molecular biology techniques have classified CRCs into

three major phenotypes according to the abnormalities identified [6]. Tumors with a Chromosome INstability phenotype (CIN) or a MicroSatellite Stability phenotype (MSS) are the most frequently observed (80–85%) [7]. This instability is a result of loss or gain of chromosomes or chromosome fragments leading to loss of tumor suppressor genes or gain of oncogenes [8]. Examples include the loss of chromosomes 5, 17 and 18 on which the APC (5q21), TP53 (17p13) and SMAD2-3 (18q21) genes are located, respectively, and the gains on chromosome 8 for the C-MYC gene on 8q24 [8–12].

The second phenotype represents tumors characterized by MicroSatellite Instability (MSI) and is present in 15–20% of CRCs [13]. This phenotype is characterized by a deficiency in the base MisMatch Repair (MMR) system during replication [14]. This defect results in an accumulation of mutations in microsatellites and repeated sequences of one to twenty nucleotides in the coding region of certain genes involved in colorectal carcinogenesis [15].

Among the genes affected are mainly MLH1 and MSH2, which are also associated with Lynch syndrome [16,17]. The MSI phenotype is also classified into MSI-High and MSI-Low.

A third phenotype has been established by observing methylation/hypermethylation of CG repeat sequences or CpG (cytosine–phosphate–guanine) islands in the promoter regions of some genes, thus repressing their transcriptional expression [18]. These repressions typically affect many tumor suppressor genes such as MLH1, CDKN2A [19]. The latter phenotype can be found associated with either of the previous two phenotypes, as 12% of CIMP cases are found associated with the MSI phenotype and 8% in MSS phenotypes [20].

In general, CRC survival depends directly on the stages. Thus, the overall survival at 5 years for all stages combined is 63%, and the chance of cure is almost total for stage 0 to II cancers (>90%) and 72% for stage III, but it drops to 14% for stage IV, the stage of dissemination to distant organs [21]. Survival also depends on CRC phenotype since patients with MSI tumors have a better prognosis than patients with MSS tumors [22,23]. Other studies have been performed using meta-analyses on transcriptomic data to propose a consensus molecular classification (CMS) of CRCs by defining four subtypes that have been associated with a prognostic value for patient survival [24]. The CMS classification has an important prognostic value and indicates that in non-metastatic CRC (stages 0 to III), the prognosis is favorable for tumors in the CMS-1 subgroup and to a lesser extent for the CMS-2 subgroup. Conversely, in a metastatic situation (stage IV), it is the CMS-1 subgroup that is linked to the worst prognosis since the overall survival of patients with a CMS-1 tumor was 14.8 months against 31.9 months for CMS-2 tumors [25].

Therapeutically, tumor resection remains the primary treatment for all stages of the disease. However, for stages with lymph node involvement or distant metastases (in the liver and lungs), chemotherapy combined or not, with targeted therapy is proposed. Note that therapy using cetuximab or panitumumab, two anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) antibodies, is proposed only to treat CRCs with wild-type KRAS [26]. In recent years, an increasing number of studies have focused on immunotherapy. The basis of immunotherapy is to overcome the mechanisms involved in immune tolerance to tumor self-antigens and to block the immunosuppressive response that occurs in the tumor microenvironment. This process is primarily driven by the inactivation and depletion of T cells via the activation of immune checkpoint inhibitors (ICIs) on the surface of T cells, which prevent them from recognizing tumor neoantigens. Current therapies target the PD-1 receptor (Programmed cell Death protein 1) and its ligand PD-L1 (Programmed cell Death protein Ligand 1), and CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4).

In the exploratory NICHE study (ClinicalTrials.gov: NCT03026140), patients with early-stage MSS or MSI CRC and neoadjuvant treatment with a single dose of anti-CTLA-4 (ipilimumab) and two doses of anti-PD1 (nivolumab) led to 100% and 27% response in MSI and MMS tumors, respectively [27]. Several phase II and III randomized controlled trials are underway to evaluate the efficacy of immunotherapy in metastatic CRC of both phenotypes (first-line or refractory), with/without chemotherapy [28]. Once it will be validated in larger cohorts and with at least 3 years of recurrence-free survival data, neoad-

juvant immunotherapy could potentially become the standard of care for a defined group of patients.

2. CXCL12 and Its Two Receptors CXCR4 and CXCR7

Chemokines are a group of small proteins of 8 to 12 kDa from the family of chemoattractant cytokines [29,30]. To date, about fifty chemokines have been identified, and they are structurally classified into subfamilies of chemokines C, CC, CXC and CX3C according to the presence of the “chemokine domain”, represented by the location of four cysteine residues conserved in the N-terminal domain necessary for the formation of disulfide bridges [29,30]. These proteins exert their function by binding to receptors with seven transmembrane domains, which are related to rhodopsin receptors [31]. Thus, there is the CR, CCR, CXCR and CX3CR receptor subfamily. Within each group, several chemokines can bind to several receptors, and inversely, one receptor can bind several chemokines. Because of this redundancy, the absence of chemokines or their receptors by gene invalidation of chemokines or their receptors does not necessarily lead to major effects, except for CXCL12 and its two receptors CXCR4 and CXCR7. Mice invalidated for each of these three proteins die during the embryonic or postnatal period, demonstrating the essential role of these proteins during embryogenesis [32–34].

The chemokine–receptor interaction was initially described to induce lymphocyte migration and recruitment [35,36]. However, it is now clear that their activity extends beyond immune cell migration. Numerous studies have documented that chemokine signaling also guides the migration of neurons, neural crest cells and germ cells during embryonic development and regulates the patterning and remodeling of the vascular system [37–39]. The chemokine–receptor is also a factor in inflammatory diseases [36,40,41], infections [30,40,41] and cancers [42–44]. One of the most studied chemokines is CXCL12, which exerts its biological functions by activating the two receptors CXCR4 and CXCR7.

3. Physiological Roles of CXCL12 and Its Two Receptors CXCR4 and CXCR7

3.1 Chemokine CXCL12

The chemokine CXCL12, also known as stromal-cell-derived factor 1 of the bone marrow (SDF-1), was originally discovered as a factor stimulating the growth of pre-B lymphocyte progenitors CD34+ (pre-B CD34+) [33,35,45,46] and is mainly responsible for the homing and maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow.

CXCL12 is a homeostatic chemokine whose expression is constitutive in a wide range of tissues and organs such as bone marrow, liver, lung, heart, brain, spleen, and intestine [35,47]; however, its expression can be induced during inflammatory conditions [48,49]. It is expressed in human and mouse with a highly conserved structure, and the gene undergoes splicing that generates six isoforms (CXCL12 α to ϕ), the alpha and beta forms being the predominant and ubiquitously expressed forms [50,51].

In the intestinal epithelium, CXCL12 is expressed in an increasing gradient of concentration from the base to the crypt surface [52]. This high expression at the crypt surface contributes to the constant turnover of epithelial tissue as the CXCL12-CXCR4 signaling axis stimulates intestinal epithelial cell migration and enhances the integrity of the innate barrier of the intestinal mucosal epithelium [53].

3.2 CXCR4 Receptor

The CXCR4 receptor (C-X-C motif receptor 4) was originally discovered as a co-receptor for HIV entry into lymphocytes [54]. Human (352 amino acids) and murine (359 amino acids) CXCR4 receptors share 89% homology and are ubiquitously expressed in both embryonic and adult tissue [55]. As the first receptor that can bind CXCL12, it was considered for a long time as its only receptor, since mice deficient in CXCL12 or CXCR4 have similar phenotypes with abnormalities in hematopoiesis, blood vessel formation in the gastrointestinal tract, cerebellar development, cardiac ventricular septum formation and significant embryonic lethality [32,33,56]. The monogamy relationship between CXCL12

and CXCR4 was disproved by the discovery of the orphan receptor RDC1, identified by cDNA cloning in the dog thyroid [57,58].

The interaction of CXCR4 with its ligand CXCL12 activates downstream signaling pathways, including Ras-MAPK, PI3K-AKT-mTOR, Jak2/3-STAT2/4, PLC β and γ 2, NF- κ B, and JNK/p38 MAPK via interaction with G $\beta\gamma$ subunits, while inhibiting adenylate cyclase and cAMP formation via interaction with G α i [59]. This signaling pathways activation leads to an alteration in the expression of genes that will modulate different cellular functions such as actin polymerization, cell skeleton rearrangement or cell migration [60,61]. The physiological functions of CXCR4 are not only critical for development and homeostasis but also for the survival of cancer cells.

3.3 CXCR7 Receptor

More recently, another receptor CXCR7 (C-X-C motif receptor 7), renamed ACKR3 (Atypical Chemokine Receptor 3) in 2014, has been described to bind CXCL12 with 10-fold higher affinity than CXCR4 [62] and can also bind with CXCL11. A particularity is that the CXCL12-ACKR3 complex does not couple to a G protein but through activation of the β -arrestin pathway [63]. However, a study by Nguyen et al. in HEK293 cells shows that binding of CXCL12 to CXCR7 does not result in activation of signaling pathways via G α i subunits but activates G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) via $\beta\gamma$ subunits and phosphorylation of the receptor by recruitment of β -arrestin 2 [64]. In contrast to CXCR4, CXCR7 internalization occurs even in the absence of ligand binding and does not lead to receptor degradation [65].

Similar to CXCR4, CXCR7 can activate many intracellular signaling pathways, including AKT and MAPK pathways, via β -arrestins [63]. CXCR7, which does not activate calcium responses in the presence of CXCL12, is able to modulate CXCR4-activated calcium signaling through the formation of CXCR4/CXCR7 heterodimers [65–67], which can form in the absence of CXCL12 ligand [65]. However, contradictory data indicate that the activation of such heterodimers by CXCL12 leads either to a potentiation of the calcium response with a loss of early activation of ERK kinase [65], or conversely, to a decrease in this calcium response [67].

The physiological implications of the CXCR7 receptor have been demonstrated in CXCR7 knockout mice (CXCR7^{-/-}), which die at birth due to abnormal heart valve development, highlighting the critical role of CXCR7 in cardiogenesis [68]. Other studies have shown that CXCR7 allows for the migration of central nervous system neurons during development by indirectly controlling their migration, through the regulation of the expression level of CXCR4, and the loss of CXCR7 function results in the production of neurons functionally deficient for both receptors [69].

The phenotypic differences described for CXCR4^{-/-} and CXCR7^{-/-} mice [32,34], and recent work examining the role of these receptors in zebrafish development [70,71], support the hypothesis that CXCR7 and CXCR4 have specific and distinct biological roles. In addition, several groups have established that CXCR7 acts as a “scavenger” or “decoy receptor” for extracellular CXCL12 but also for CXCL11, promoting constant cycling between the plasma membrane and the cytoplasm, and thus establishing a CXCL12 gradient. Thus, CXCR7 controls chemokine concentrations in the extracellular space, limiting signaling via other receptors [72,73]. According to a recent study, the balance between intracellular and membrane expression of CXCR7, and thus its scavenger function, is tightly regulated by CXCL12-induced phosphorylation of CXCR7 that ensures its subsequent protection against degradation [74]. This atypical function of CXCR7 is essential for the development of many organs, for the control and coordination of cell migration and positioning [75], and is not only dependent on CXCR7 but requires an intimate interaction between CXCL12, CXCR4 and CXCR7.

4. CXCL12/CXCR4/CXCR7: Pathological Role in CRC

Pathologically, chemokines and their receptors are involved in the development of infectious diseases, in particular the role of CXCR4 as a gateway for the HIV virus in CD4+ T cells [54]. However, recently, the involvement of chemokines has aroused a lot of interest in oncology [43,76,77]. The first evidence emerges from studies in breast cancer, with the involvement of CXCR4 in the control of metastatic dissemination [78].

4.1 Receptor Expression

Numerous studies have investigated the expression level of CXCR4 and CXCR7 receptors in solid cancers and in hematological cancers, given their involvement in the development of the hematopoietic system. These studies show elevated expression of one or both receptors in tumors compared to adjacent healthy tissues [79–81]. Furthermore, in CRC, Romain et al. showed that CXCR4 and CXCR7 expression increases with clinical stages [82]. Several authors have reported that receptor overexpression reflects disease progression and is therefore associated with tumor aggressiveness, decreased survival and poor prognosis [80,81,83–87]. Receptor expression is not only associated with tumor cells but also with endothelial cells of tumor microvessels [88,89] whether in colon, liver, pancreas, prostate, or lung cancers [90,91]. In contrast, Guillemot et al. described CXCR7 expression only in vessels of primary colorectal tumors and in liver and lung metastases [92].

4.2 CXCL12 Expression

In CRC, different expression patterns have been reported. The expression of CXCL12 can be increasing from healthy mucosa to adenomas and adenocarcinomas [93] or, on the contrary, decreasing [94]. Other studies show that CXCL12 expression is higher in tumors compared to healthy tissues [95], and still, others describe heterogeneous tumors since within the same cohort, some tumors express the chemokine strongly while others express it weakly or not at all [96,97]. In tumors, CXCL12 is expressed by epithelial cells but also by vascular endothelial cells [96] and stromal fibroblasts [97]. Finally, some studies observe no difference in expression between healthy mucosa and tumor [98]. In contrast, we showed that CXCL12 expression is strongly decreased in 94% of adenomas and 85% and 75% of MSI and MSS carcinomas, respectively [52]. Similarly, Wendt et al. describe an absence of CXCL12 expression in the CRC epithelium [99]. It is always difficult to understand the reasons underlying different levels of expression of a factor in the same cancer in different studies.

One of the reasons for these discrepancies could be the mixture of colon and rectal tumors in the cohorts and the fact that part of rectal tumors are either irradiated and/or chemically treated before resection, leading to changes in CXCL12 expression level [100,101]. Another reason might be the technique used. For instance, in immunohistochemistry, there may be differences in the reference of the antibody, its dilution, and in the unmasking and revelation technique (enzymatic, immunofluorescence). The heterogeneity of the tumor must also be taken into account, as analyses are usually performed on only a fragment of the tumor. Depending on how the samples are collected, it is possible to be in areas with high, low or no expression of the protein. The number of tissue sections must also be considered; with a limited number of sections, it is possible to be in a tumor area expressing or not the protein. For these reasons, it could be recommended to separately study rectal and colon tumors, as well as to combine the expression of the transcript with that of the protein since these two techniques request separate tumor samples [52].

4.3 CXCL12/CXCR4/CXCR7 Axis in Cellular Interactions

The interaction between tumor cells and the tumor microenvironment, which includes fibroblasts, immune cells and endothelial cells, participates to the development of tumor malignancy through the modulation of a wide variety of proteins in both cancer and stromal cells [102]. For example, there is bidirectional crosstalk between tumor cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). This crosstalk is mediated by cancer cells releasing factors

that enhance the ability of fibroblasts to release various tumor-promoting chemokines, which in turn act on malignant cells to promote their proliferative, migratory and invasive properties. In this aspect, the CXCL12-CXCR4 pair plays a fundamental role in a large number of malignancies [103].

More specifically, mesenchymal stromal cells (MSCs) can be recruited to the stroma of developing tumors to enhance metastasis through their ability to secrete growth factors such as CXCL12 to promote tumor cell proliferation and tumor angiogenesis [104,105]. However, MSCs are also able to differentiate into CAFs by enhancing CXCR4 expression and activating the TGF (Tumor Growth Factor) pathway, therefore promoting growth and metastasis by secreting protumor factors [106]. Similarly, Todaro et al. showed that medium conditioned with fibroblasts isolated from primary colon tumors increases the clonogenicity of sphere-cultured colon cells and enhances the migration of CD44 stem cells isolated from CXCR4-expressing human tumors; this medium also converts non-migrating CD44v6-negative cells into migrating CD44v6-positive cells [107]. This phenotype can be mimicked by CXCL12, which also confers metastatic potential and a more aggressive phenotype to these progenitors in vivo.

MSCs present in the tumor stroma may also exert indirect pro-malignant actions by promoting tumor angiogenesis through the recruitment of endothelial progenitor cells and by facilitating the formation and maturation of the tumor vasculature [108]. These patterns are relevant in situations where the primary tumor expresses CXCL12.

In tumors not expressing CXCL12, other chemokines or growth factors (CCL4 or CCL5/CCL1 or CXCL8) released by CRCs have the ability to attract cells of the immune repertoire, angiogenic progenitors, and mesenchymal stem cells, resulting in a metastatic phenotype [109,110]; these molecules can also be produced by stromal cells [111]. In addition, MIF (Macrophage migration Inhibitory Factor) was shown to recruit MSCs to tumors by a physical interaction between MIF and CXCR4 expressing cells observed in vitro and in vivo [112]. Other factors such as fibroblast growth factor (bFGF), VEGF, platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF), and TGF- β have been further described for their contribution to tumor growth to MSCs [108].

Conversely, in the liver, hepatic stellate cells (HSCs) constitute the predominant population of CAFs, which are the main components of the tumor microenvironment [113]. Tumor/fibroblast interaction has been involved the progression of cancer, the CXCR4/CXCL12 chemokine axis being a main leader of malignancy [114]. In addition, HSCs, together with liver sinusoidal endothelial cells, are one of the principal sources of CXCL12 secretion in the liver, where they mediate not only the recruitment of CXCR4-expressing tumor cells, but also of CXCR4-expressing immune cells [114]. Immunohistochemical analysis of human liver show that the sinusoidal endothelial cells lining the hepatic vessel wall abundantly express the CXCL12 protein, which is therefore perfectly positioned to interact with circulating tumor cells for the formation of metastases [115].

Therefore, CXCL12 promotes communication between cancer cells and the surrounding non-neoplastic cells in the tumor microenvironment, including endothelial cells and fibroblasts, through activation of CXCR4 and CXCR7. The hypoxic tumor microenvironment can favor the upregulation of CXCR4 and CXCL12 in several cell types such as endothelial cells and cancer cells through mobilization of the hypoxia induced factor 1 (HIF-1 α).

Concerning CXCR7-expressing cells, Guillemot et al. found that, in the primary CRC, the presence of the CXCR7 protein was restricted to tumor-associated endothelial cells, whereas it was absent in tumor cells [92]. However, others described CXCR7 expression in tumor-associated blood vessels but also by the malignant cells in CRC [82,116] and other cancer types [117,118].

We could speculate that CXCR7 expression in tumor vessels is a common feature of all cancers, whereas the presence of this receptor in malignant cells would be restricted to a particular type of cancer.

5. Prognostic Value of CXCL12/CXCR4/CXCR7 Axis

5.1 CXCL12 as a Prognostic Factor

Clinically, there are divergent viewpoints on the prognostic value of CXCL12 expression level. High expression is significantly associated with high tumor stage, lymphatic invasion, venous invasion, lymph node and distant metastases, and decreased survival [93,96,97]. Likewise, other studies suggest an association between CXCL12/CXCR4 expression and the induction of adenomas, carcinomas, and the development of metastases [94]. Transcriptomic analysis of a cohort of 49 CRCs and RNA-Seq data from TCGA for 375 CRCs indicate that increased CXCR4/CXCR7+CXCL12 signature expression is the only independent prognostic marker for the presence/occurrence of metastasis and decreased overall survival in both datasets [119].

In contrast, in two cohorts of 290 and 306 patients with stage III CRC, high cytoplasmic expression of CXCL12, assessed by *in situ* hybridization and immunohistochemistry, is associated with a better 5-year event-free survival [120]. Several studies, conversely, did not find a correlation between high CXCL12 expression levels and clinico-pathological parameters [88,121]. For example, in a meta-analysis of 25 articles published through 2017, increased transcript or protein expression of CXCL12 was not associated with TNM stage, age, gender, or diagnosis, but only with degree of tumor differentiation [121]. In another cohort of 444 CRCs with MSS phenotype [104], the two molecular subgroups C4 and C6 have higher levels of CXCL12 expression than the other four subgroups and are associated with a worse prognosis for patients [122].

Fushimi et al. showed that overexpression of CXCL12 in the CT26 syngeneic colorectal cell line in Balb/C mice resulted in an accumulation of dendritic cells and CD8+ T cells, which significantly slowed tumor growth after subcutaneous implantation [123]. A significant number of studies have shown that CD8+ T-cell infiltration of a tumor is associated with a better prognosis in CRC [124–127]. In a study of 613 stage III CRC specimens, high CD8+ T cell infiltration combined with high CXCL12 expression is associated with superior 5-year overall survival compared to patients with tumors with high CD8+ T cell expression alone [128].

In order to address these conflicting results, it can be hypothesized that during the early stages of carcinogenesis, CXCL12 production might participate in the transformation of the colonic mucosa at the beginning of the carcinogenesis process, whereas at later stages, a lower expression would avoid the recruitment of cytotoxic lymphocytes and facilitate the development of metastasis. Wendt et al. reported that tumor cells that do not express endogenous CXCL12 respond better to exogenous CXCL12 produced by distant organs, leading to metastasis in mice [99].

5.2 CXCR4 as a Prognostic Factor

Regarding the prognostic implication of CXCR4, the literature agrees that high CXCR4 expression in CRC patients is unfavorable, as it correlates with advanced tumor stage and increased risk of recurrence and distant metastasis [96,121,122]. Several meta-analyses conclude that there is a significant association between high CXCR4 expression and poor overall survival [80,121,129–131]. In a similar way, a recent study indicated a particularly poor prognosis for patients having CRCs jointly and strongly express CXCR4 and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in more than 50% of cells, and this combination of high expression is a strong and independent predictor of early distant relapse [132]. In another cohort, the CXCR4+CXCR7+CXCL12-β+ signature stratifies patients with risk of metastasis and in a TCGA dataset (n = 375), this signature predicts the presence of metastasis and overall survival [119]. Consistent with these observations, low CXCR4 expression in resections of CRC liver metastases is independently associated with a lower overall recurrence rate and thus improved disease-related survival [133].

In tumor–stromal cell interactions, CXCR4 and CXCL12 form an important signaling axis, with the interaction influencing adhesion, migration and invasion, reflecting the strong association of CXCR4 with the development of metastasis. In addition to being

a prognostic biomarker, these findings are of clinical relevance given the emergence of new drugs targeting the CXCR4 receptor. In the context of a combination of molecular alterations, patients whose tumors overexpress CXCR4 and express the mutated KRAS gene have the worst prognosis [134,135].

Nevertheless, some studies describe the absence of significant correlation between CXCR4 expression and metastasis development. For example, Nagasawa et al., by multivariate regression analysis, found no significant association between CXCR4 transcript expression and a clinico-pathological factor in a cohort of 200 patients with CRC [136]. In the same way, work on a small cohort of liver metastases from CRC identified no difference in the level of CXCR4 expression between tumor tissue and adjacent healthy tissue [137]. Finally, Xu et al. observed that the level of CXCR4 expression in the center of tumors is not predictive of a poor prognosis, but instead its expression at the invasive border is [138].

5.3 CXCR4 as Stem Cell Marker

The following markers are considered markers of CRC stem cells (CSCs): CD133, CD144, CD24, CD166, CD44, CD29, ALDH1, LGR5, and emerging studies have also reported the involvement of the CXCL12/CXCR4 axis in several adult stem cells [131]. CD133 is one of the markers described to identify tumor-initiating cells (TICs) in several cancers and in colon cancer; it has been used to isolate CSCs [139,140]. However, CD133 expression is not only limited to CSCs [141,142], and in order to identify these cells more accurately, additional markers have been considered. This is the case, for example, in the study by Zhang et al. who demonstrated that CXCR4 expression could be used in addition to CD133 expression to characterize colorectal CSCs [143]. In addition, a high percentage of double-positive cells for these two markers in human CRCs positively correlates with the presence of lymph node metastases [144]. Another example has been described where Lgr5+/CXCR4+ colonic cancer cells respond to the properties of CSCs through a greater ability to form spheres in vitro, develop tumors in vivo and resist chemotherapy. Furthermore, high levels of Lgr5 and CXCR4 expression in resected human CRCs correlate with poor prognosis [145].

5.4 CXCR7 as a Prognostic Factor

Since its discovery in 2005 [62], the role of CXCR7 in the carcinogenesis of many cancers has been well documented, and it is expressed in a wide variety of cancers and tumor-associated blood vessels, including colon, liver, pancreatic, prostate and lung cancers [83,146]. There are conflicting observations regarding the role of CXCR7 in the nature of the site of metastasis development. The expression of CXCR7 and CXCL12 is higher in lung metastases than in primary CRC, whereas the expression of CXCR4 in both sites is not statistically different [147]. Previous studies have observed that CXCR4 expression is higher in liver metastases than in primary CRC tumor tissue [148,149] and suggest that the mechanism of development of liver and lung metastases is different. This agrees with the in vivo experience of Guillemot et al., who showed that CXCR7 is a key factor in the progression of CRC metastases specifically in the lungs, since systemic treatment of mice with CXCR7 antagonists reduces metastasis in the lungs but not in the liver, after intravenous injection of HT-29 or C26 cells expressing CXCR7 [92].

In the study by Yang et al., positive CXCR7 expression is associated with the presence of lymph node metastases, distant metastases and advanced TNM stage [85]. Sherif et al. significantly observed cytoplasmic expression of CXCR7 in 11% of colorectal adenomas and 72.4% of CRC [150]. In contrast to studies favoring a poor prognosis for high CXCR4 and CXCR7 expression in CRC, Kheirleisid et al. observe that patients with above-median expression have lower mortality (mean survival 46 months) than patients with below-median CXCR7 expression (mean survival 27 months). Similarly, lower expression of CXCR4/CXCR7 and CXCL12 is associated with increased tumor size, local invasion, poor differentiation, advanced lymph node stage, advanced tumor stage, and lymphovascular invasion [151].

Therefore, although the expression level of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 has been considered a prognostic factor in several human tumor types (Table 1), none of the actors of this axis have yet been definitively validated as pro-tumoral factors. Studies suggest that the CXCL12 axis is a promoter rather than a tumor initiator.

Table 1. Clinical significance of CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression levels in CRC

Authors	CXCL12		CXCR4		CXCR7		References
	Expression	Prognosis	Expression	Prognosis	Expression	Prognosis	
Romain, 2017	↓; ↓	If ↑; ↓ OS					[52]
Fan (meta-analysis), 2018	-				↑	↓ OS; ↓ DFS	[81]
Romain, 2014	-		↑		↑		[82]
Kim, 2005; 2006	-		↑	↓ OS			[84–121]
Yang, 2015	-				↑	↓ OS; ↓ DFS	[85]
Yang, 2015	-				↑	↓ OS; ↓ PFS	[85]
Xu, 2018	-		↑	↓ OS			[86]
Ingold, 2009	↑		vascular	↓ OS			[88]
Guillemot, 2012	↑		↑		↑		[92]
Greijer, 2008	↑						[93]
Frick, 2011	↓		↑				[94]
Amara, 2015	↑	↓ OS	↑	↓ OS			[95]
Yoshitake, 2008	If ↑	↓ OS	If ↑	↓ OS			[96]
Akishima-Fukasawa, 2009	If ↑	↓ OS					[97]
Mousavi, 2018	→	→	→	→			[98]
Wendt, 2006	↓						[99]
Mitchell, 2019	↑	↓ OS	↑	↓ OS	↑	↓ OS	[111]
Stanisavljević, 2016	↓; ↑	↓ DFS; ↑ DFS	↑	stage III, ↓ DFS			[112]
Li (meta-analysis), 2017	↑	↓ OS; ↓ DFS	↑	↓ OS; ↓ DFS			[113]
Lalos, 2021	↑	↑ OS					[120]
Schimanski, 2005	-		If ↑	↓ OS			[122]
Lv, 2014	-		↑	↓ OS; ↓ DFS			[123]
Li, 2015	-		↑	↓ OS			[122]
Jiang, 2019	-		↑	↓ OS			[125]
Ottaiano, 2020	-		↑	↓ OS			[124]
Yopp, 2012	↓; ↑	→	If ↑	↓ OS; ↓ DFS			[127]
Nagasawa, 2021	-		→	→			[128]
Jiao (CRC liver metastases), 2019	→	→	→	→			[129]
Xu, 2007	-		↑ invasive border	↓ OS			[132]
Kheirelseid, 2013	-				If ↑	↑ OS	[144]

↑: upregulated; ↓: downregulated; →: no change; -: not evaluated; DFS: disease-free survival; PFS: progression-free survival.

6. Mechanisms of Expression Regulation

6.1 Regulation of CXCL12 Expression

For both overexpression and loss of CXCL12 expression, several molecular mechanisms have been proposed. Intratumoral hypoxia has been shown to be a factor that promotes the overexpression of CXCL12 in vivo [152–154], ex vivo [155] and in vitro [153,155]. In these studies, CXCL12 expression is associated with hypoxic or HIF-1 α -expressing areas and this association has been confirmed using siRNAs directed against HIF-1 α [93,152–154]. In endothelial cells and under hypoxic conditions, the hypoxia-induced upregulation of CXCL12 expression was clearly attributed to the direct binding of HIF-1 α to its specific binding sites on the CXCL12 promoter [153].

Moreover, several mechanisms have been proposed to explain the loss of CXCL12 expression. Hypermethylation of the CXCL12 promoter in CRCs has been proposed by Wendt et al. [99], as well as in cervical tumor lines and biopsies, observed by Yadav et al. [156]. In our study of a cohort of 444 MSS CRCs, we showed that the CpG islands of the CXCL12 promoter are methylated in only 30% of tumors [82]. In the same studies, we also reported that, in vitro, treatment of three colonic lines with histone deacetylases (HDAC) inhibitors such as butyrate and valproate restored CXCL12 expression and increased acetylation of histone H3 of the CXCL12 promoter [52]. In vivo, valproate treatment of APC mutant mice (APC^{Min/+}) decreases the number of intestinal tumors and slows down tumor growth in ectopic xenografts while restoring CXCL12 expression [52]. In these CRCs tissues, an analysis of the expression of 85 genes regulating epigenetic processes showed a loss of expression of a histone acetyltransferase, the protein P300/CBP-associated factor (PCAF), and forced expression of PCAF in colon cancer cell lines restored the expression of CXCL12 [52]. A further study in the blood–brain barrier, with endothelial cells lacking CXCL12 expression and pericytes expressing it, shows that the CXCL12 promoter is not methylated in both cell types; in contrast, ChIP experiments indicate reduced levels of histone acetylation of the promoter in endothelial cells compared with pericytes [157]. It is well documented that histone deacetylation of promoters generates a compact chromatin configuration that renders chromatin inaccessible to transcriptional factors and induces transcriptional repression [158]. Therefore, histone acetylation changes/defects associated with methylation of the CXCL12 promoter in some CRC subtypes would be involved in CXCL12 expression changes [52].

Functionally, cells with a decrease/loss in CXCL12 expression would be likely to be attracted to tissues expressing CXCL12, such as metastasis sites [47]. Moreover, this expression defect would contribute to the resistance to anoikis with, consequently, a migration and dissemination of tumor cells favoring the development of metastasis [159].

6.2 Regulation of CXCR4 Expression

The mechanisms leading to the high receptor expression are not clearly defined. A mode of regulation of gene expression is related to the intrinsic instability of transcripts due to the presence of adenylate-uridylylate-rich element (AREs) in their 3^t-UTRs, which are targeted by RNA-binding proteins for degradation, among which are those of cytokines or chemokines [160]. However, the role of these AREs may be compromised in cancer, largely due to a deficiency in proteins that promote mRNA degradation. These sequences were found in the 3^tUTR of many labile mRNAs that encode proto-oncoproteins (c-myc, c-fos, c-jun) and cytokines [160]. Al-Souhibani et al. showed that in breast tumor cells, the CXCR4 gene harbors a functional ARE in its 3^t-UTR portion, a potential target for the RNA degradation proteins, TTP and HuR [161]. They also demonstrate that overexpression of HuR combined with low expression of TTP results in increased stability of CXCR4 mRNA and consequently higher levels of protein that will promote detachment and migration of breast tumor cells to distant sites [161].

Tumor progression is associated with intratumor hypoxia, which leads to increased vascular density, and HIF-1 α is a transcription factor that allows for adaptation of tumor cells to hypoxia [162]. In CRC, hypoxia has been shown to promote increased expression of

CXCR4 [82,163], and in human colonic cell lines, this effect is mediated by the transcription factor HIF-1 α [82]. Many studies have shown that HIF-1 α is expressed at elevated levels in highly aggressive CRCs [164] and plays a major role in regulating the expression of many genes involved in angiogenesis and chemotaxis via the CXCL12/CXCR4 axis [165]. Our team has demonstrated that CXCR4 expression is increased by hypoxia in human colonic cell lines [82]. Additionally, the combined expression of CXCR4, HIF-1 α and VEGF is strongly correlated with the presence of lymph node metastasis and distant metastasis in human CRC [166]. Zong et al. performed a bioinformatics analysis of Gene Expression Omnibus (GEO) data of HCT-116 cells subjected to acute and chronic hypoxia to identify genes differentially expressed in normoxic and hypoxic conditions. Among these genes, they found CXCR4 whose expression is upregulated under these conditions [163]. Numerous publications have reported the direct involvement of the two hypoxia-inducible factors, HIF-1 α and HIF-2 α , on the increase in CXCR4 expression [167], as the promoter of the gene encoding CXCR4 contains a hypoxia response element (HRE) [168,169].

Studies have suggested that the ERK1/2 and PI3K/Akt pathways, mediators of chemokine-induced migration, are activated by hypoxia in many cell types [170]. In addition, in vitro treatment of endothelial progenitor cells with specific inhibitors of the ERK1/2 or PI3K/Akt pathway indicates that only Akt activation is required for hypoxia-induced increase in CXCR4 expression and increased chemotaxis [171]. Other studies report that activation of the PI3K/Akt pathway can increase translation of HIF-1 α -coding mRNA and stabilization of the protein under hypoxic conditions [172], which would promote increased CXCR4 expression. Likewise, reduction of CXCR4 expression by siRNA in human colonic tumor cells cultured in hypoxia decreases CXCL12-induced phosphorylation and activation of Akt, while ERK activation is unchanged [82].

Epigenetic alterations have also been described to regulate CXCR4 expression in CRC. MicroRNAs (miRNAs or miRs) have emerged as critical regulators of carcinogenesis and tumor progression and are described to modulate cell proliferation, apoptosis, invasion, angiogenesis, and metastasis [173]. It is now evident that certain miRNAs may be involved in the activation of the CXCL12/CXCR4 axis and thus participate in the progression of CRC to metastasis by controlling CXCR4 expression. For example, miR-9 expression is decreased in late-stage CRC and low miR-9 levels are significantly associated with lymph node metastasis [174]. Furthermore, Kaplan–Meier analysis reveals that decreased miR-9 expression is significantly correlated with shorter median survival time, suggesting that miR-9 is an independent prognostic marker for overall survival of CRC patients and acts as a potential tumor suppressor gene [174]. In the same study, the authors show that in vitro, this miR inhibits cell migration and invasion. Moreover, a bioinformatics analysis of miR-9 target genes identified CXCR4, whose transcript has a possible miR-9 binding element in its 3^t-UTR region. Using a Dual-Reporter assay, this observation was validated by demonstrating that miR-9 negatively modulates the transcriptional and protein expression of CXCR4 by binding directly to its 3^t-UTR. In vivo, injections of colonic tumor cells overexpressing miR-9 into the tail vein of mice resulted in fewer lung metastases than with control cells, a similar effect obtained with cells deleted for CXCR4 expression [174].

Another study investigated the prognostic value of miR-126 expression level associated with that of CXCR4 in CRC, and an inverse correlation was observed between miR-126 and CXCR4 protein expression in CRC [175]. Furthermore, low miR-126 and high CXCR4 expression is associated with distant metastasis, TNM clinical stage, and poor survival. Multivariate analysis indicates that miR-126 is an independent prognostic factor for overall survival [176]. In another study, the same team showed that miR-126 negatively regulates CXCR4 through the AKT and ERK1/2 signaling pathways, and thus this miR functions as a tumor suppressor in CRC cells [175].

Another miR might be involved in the regulation of CXCR4, miR-622, which is underexpressed in CRC metastases and has been described as a potential tumor suppressor gene by slowing down KRAS-dependent tumor and metastasis formation in mice [177]. By overexpressing KRAS in cells, the authors restore normal tumor growth. The same authors

subsequently showed that in vitro, overexpression of miR-622 in HUVEC cells inhibits capillary tube formation and that in vivo, this overexpression in HT29 cells xenografted to mice, slows tumor growth by strongly decreasing angiogenesis [177]. In parallel, analyses also showed that CXCR4 and VEGF- α expression is strongly decreased in these tumors. Similarly, as for miR-9, miR-622 has a binding site in the 3^t-UTR region of the CXCR4 transcript and can therefore directly inhibit CXCR4 expression. Since VEGF is a target of CXCR4, the anti-angiogenic impact of miR-622 can be mediated by the repression of CXCR4 and consequently, reduces VEGF expression [178].

MiR-133b has also been described as a regulator of CXCR4 expression, with its expression being much lower in metastatic CRCs (stages C and D) than in early tumors (stages A and B) [179]. Using bioinformatics algorithms to identify targets of this miRNA, several targets including CXCR4 have emerged from the analysis, and a luciferase assay showed the existence of a binding site for miR-133b in the 3^t-UTR of the CXCR4 transcript [179], as had also been described for miR-9 [174], miR-622 [177] or miR-139 [180].

Finally, the relative expression of the CXCR4 transcript and protein are significantly suppressed by transfecting DLD-1 and SW480 colonic cells with miR-140-3p, and this effect is reinforced by the existence of a binding site of this miR on the CXCR4 messenger [181]. In another context, the human miR-125b has been described to positively regulate Wnt/ β -catenin signaling by targeting APC expression; however, in a positive feedback, the increase in miR-125b in turn leads to increased expression of CXCR4 [182].

Studies also highlight the possibility of modulation of CXCR4 expression by changes in the DNA methylation profile and/or histones of the promoter. A recent work by Stuckel et al. showed that the overexpression of CXCR4 in human CRCs is observed in both colonocytes and stromal cells. The authors found that this overexpression is not the result of hypermethylation of the CpG islands of the CXCR4 promoter but rather of an increase in 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), a marker of active demethylation of a gene [183]; and in this case, the accumulation of 5hmC would reflect increased transcription of CXCR4 in the CRC [184]. This work complements other studies demonstrating the regulation of CXCR4 expression by epigenetic processes associated with genome methylation. Such 5hmC marks have been described for genomic and circulating DNA from different cancer types, including CRC, and were distributed in transcriptionally active regions. In addition, by using 5hmCs as biomarkers, it was possible to separate patients who developed CRC from those who did not, which also allowed the definition of marks to discriminate genomic DNA from tumor and healthy tissues [185].

In addition, studies carried out in vitro [186] and in vivo [187] show that cells lacking CXCR4 expression under stress conditions can begin to express the receptor. This is the case in Ewing's sarcoma cell lines, in which the CXCR4 promoter is highly enriched in activating but also repressive histone marks. These cells, once under stress, show a loss of the repressive mark H3K27me3 while the activating mark H3K4me3 is increased with a consequent increase in the expression of CXCR4 [187].

Demonstrating that increased CXCR4 expression facilitates the development of liver but not lung metastases, and that decreased CXCR4 also reduces liver metastasis without affecting lung metastasis, Urosevic et al. also showed that transcription factors of the ETS family mediate CXCR4 expression downstream of RAS-ERK1/2 signaling. ETV4 and ETV5 factors induce a strong expression of CXCR4 in human colorectal lines [188]. It is also known that the deregulation of genes of the HOX family of transcription factors facilitates the progression of cancers through various mechanisms [189]. In two independent CRC cohorts, high HOXB5 expression was positively correlated with the presence of lymph node metastases, distant metastases, poor tumor differentiation and advanced clinical stage [190]. Moreover, overexpression of HOXB5 in the Caco-2 colorectal cell line leads to changes in the expression of several genes involved in metastasis, including CXCR4, and the use of reporter gene systems shows that CXCR4 is a transcriptional target of HOXB5 [190].

6.3 Regulation of CXCR7 Expression

While the literature provides numerous studies regarding the mechanisms of regulation of CXCR4 expression in CRC, much less data are available for CXCR7. Evidence for an impact of hypoxia and the transcription factors HIF-1 and -2 exists in other cell types, such as in bone marrow-derived mesenchymal stem cells where the PI3K/Akt-HIF-1 α -CXCR4/CXCR7 pathway is essential for cell migration, adhesion, and survival [168] or in glioblastoma cells [191]. The only study published to date in CRC is a work by our team that showed that in human colonic cells, hypoxia or HIF-1 α silencing does not alter the expression level of CXCR7 [82].

Gene expression can be regulated by transcription factors such as the HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1), which is hypermethylated in many tumors including CRC [192,193], and inactivation following hypermethylation is thought to be a tumorigenesis-triggering event [194]. The search for HIC1 consensus binding sites (HiRE) in the CXCR7 regulatory region identified 11 putative HiREs to which HIC1 could bind directly [195]. HIC1 gene knockdown, CXCR7 promoter HiRE mutations and ChiP-seq approaches demonstrate that CXCR7 is a direct target of HIC1, which acts as a direct repressor of CXCR7 expression [195]. This suggests that in tumors with loss of HIC1 expression, the subsequent increase in CXCR7 may participate in tumor progression.

Although, similar to its partner CXCR4, CXCR7 expression can be regulated by epigenetic mechanisms involving miRs in different tumor types [195–198]; to date, no data in the literature have demonstrated the involvement of a miR to regulate CXCR7 expression in CRC.

7. Implication of CXCL12/CXCR4/CXCR7 Axis in Metastatic Dissemination

For many years, the signaling mediated by this axis has been described to participate in the different aspects of tumor progression and dissemination (Figure 1). To better determine the respective involvement of each partner of this axis, different approaches have been used, such as interfering RNA, genetic editing by overexpression or loss of function, pharmacological inhibitors, neutralizing antibodies in vitro or in vivo. To understand the involvement of CXCL12 in tumor dissemination, it is necessary to separate the role of the chemokine itself from that of the CXCR4 and CXCR7 receptors, as well as the level of expression of CXCL12 in the primary tumor and the sites of metastatic implantation where it is highly expressed [52,78].

One hypothesis is that before metastasis develops, many CRC cells undergo DNA hypermethylation on the CXCL12 promoter [99], such that autocrine and paracrine CXCL12 signaling is reduced and tumor cells can migrate along a gradient that leads them to distant organs, known to highly express the chemokine [47]. This process would be initiated early in colonic carcinogenesis since CXCL12 expression is already lost at the adenoma stage [52]. This downregulation of CXCL12 expression also prevents colonic tumor cells from undergoing anoikis, a form of apoptosis when cell–cell contact is lost between epithelial cells [159].

7.1 CXCL12

The implication of CXCL12 has been demonstrated in different models. For example, in the dorsal skinfold chamber model of syngenic BALB/c mice, Kollmar et al. studied the effects of increasing concentrations of CXCL12 on tumor growth and angiogenesis induced by CT26 cell implantation [199]. In vivo, CXCL12 accelerates tumor growth through induction of angiogenesis, cell proliferation and inhibition of apoptosis [199]. In another study, the same authors used the same experimental model but performed a hepatectomy in mice [200]. It is known that liver resection is associated with liver regeneration and a local and systemic release of potent growth factors, including chemokines [201,202]. This model permits to understand the role of CXCL12 on the dissemination of CT26 cells in the tissues around the skinfold chamber. The authors report that neutralization of CXCL12 with an antibody promotes tumor extension to nearby tissues, accelerates angiogenesis and neovascularization, increases VEGF expression, microvascular permeability and increases

CXCR7 expression [199]. Moreover, neovascularization and tumor growth are reduced after CXCR4 neutralizing treatment. Therefore, in the absence of CXCL12, signaling by CXCR4 is interrupted and an alternative pathway must be considered that would be carried by CXCR7. CXCR7 has been described to increase the production of VEGF [182], which would be the trigger of the pro-angiogenic effect observed after neutralization of CXCL12 [199].

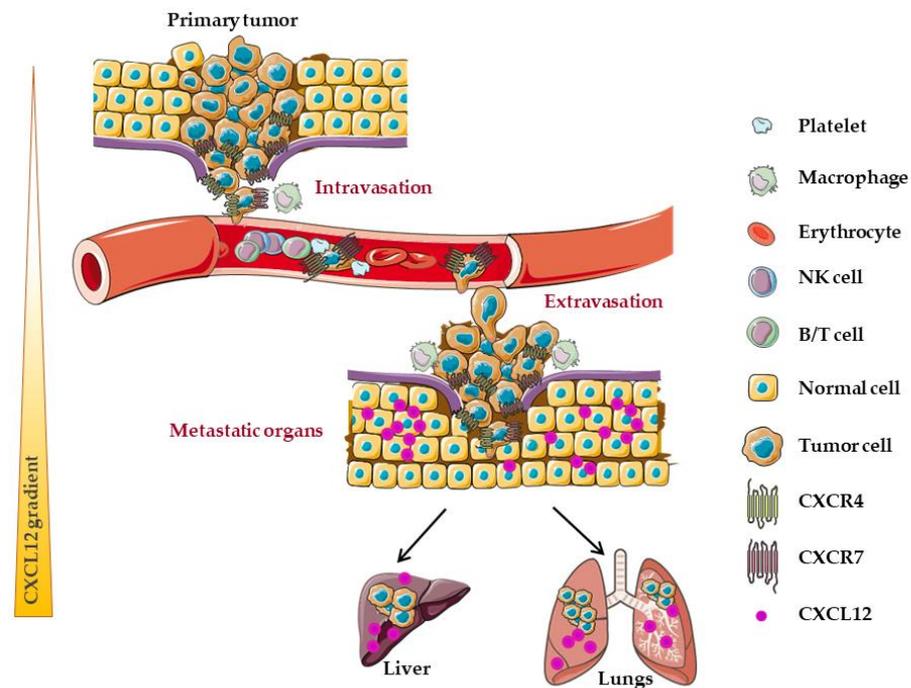


Figure 1. Process of metastatic dissemination in CRC. Tumor cells that no longer express CXCL12 will migrate to organs of metastasis via blood circulation. The expression of the CXCR4 and CXCR7 receptors allows for the intra- and extravasation of the cells through the vessels and then the implantation in the liver and the lungs where CXCL12 is strongly expressed. During intravasation of tumor cells into circulation, macrophages localized to perivascular areas within tumors help tumor cells traverse vessel barriers. In the circulation, platelets support tumor cell survival by protecting them from cytotoxic immune cell recognition.

Conversely, CXCL12 has also been described as an anti-tumor molecule in pancreatic cancer [203]. In CRC, Wendt et al. described a strong decrease in CXCL12 expression [99] and when colon cells treated with a demethylation agent to restore CXCL12, are injected into the tail vein of mice, metastatic tumor formation is greatly reduced as compared to cells lacking CXCL12. A similar situation has been observed in APC mutant mice that spontaneously develop CRCs. When these mice are treated with a histone deacetylase inhibitor, such as valproate, there is a re-expression of CXCL12 and a decrease in the number of tumors [52].

7.2 CXCL12 and CXCR4

The contribution of CXCR4 in tumor cell migration involves several cellular aspects that all converge toward the facilitation of cell migration and invasion. For example, overexpression of CXCR4 promotes the formation of pseudopodia through actin polymerization [78] and reorganization of the cytoskeleton [204]. Other processes are induced under hypoxic conditions such as epithelial–mesenchymal transition (EMT) and overexpression of $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrins [205].

Migration and invasion processes also involve proteolytic activities induced by the important secretion of gelatinases such as MMP-2, MMP-9 or matrylisin-1 (MMP-7) [204,206,207].

One study showed that the ability of CXCL12-mediated cell migration and invasion is highly dependent on MMP-9 secretion and activity via Akt and ERK/MAPK signaling [204] and on β -catenin translocation in the nucleus, suggesting the interaction of the CXCL12/CXCR4 axis with the Wnt- β -catenin signaling [206].

At the signaling level, CXCR4 regulates the migratory and invasive ability of cells via the MAPK/ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways activated by CXCL12-CXCR4 binding [82,204,208,209]. Similarly, CXCL12 binding to CXCR4 activates pro-metastatic signaling by decreasing E-cadherin expression but inducing ICAM-1 expression (InterCellular Adhesion Molecule) [210]; however, it has been shown that high levels of ICAM-1 in CRCs are associated with decreased tumor progression and liver metastasis [211]. Activation of the CXCR4/CXCL12 axis also involves the TGF- β pathway to promote invasion, angiogenesis, and promotion of distant metastasis by promoting differentiation of hepatic stellate cells into CAFs [212]. Furthermore, CXCR4 knockdown strongly reduces in vivo tumor growth associated with the reduction of tumor capillaries and intra-tumoral blood flow without affecting VEGF expression [213]. Moreover, in HUVEC cells, CXCR4 knockdown strongly inhibits angiogenesis after stimulation with CXCL12 ligand, by reducing EGFR, VEGF, and MMP-2, affecting MAPK/ERK, PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin pathways [207]. Another study showed that CXCL12 could stimulate the metastatic behavior of colonic cells expressing CXCR4 by increasing cell proliferation and adhesion to fibronectin [214]. These studies agree with those of Gouveia-Fernandes et al. who show that overexpression of fibronectin confers invasive and disseminative potential to HCT15 cells by promoting activation of the CXCL12/CXCR4 axis through modulation of α 3 and β 3 integrin expression [215].

Furthermore, Zeelenberg et al. demonstrate that CXCR4 expression is regulated positively by the tumor microenvironment, but it appears that CXCR4 is not required for tumor cell entry into metastatic sites, but rather for the establishment of micro-metastases [216]. Mice in which murine CT-26 colonic cells deficient in CXCR4 by retention of the receptor at the level of the endoplasmic reticulum, were injected into the spleen or the tail vein, indicate that CXCR4 would not play a role in invasion, but rather in the survival of the cells to form micro-metastases without impacting their proliferation [216].

In the same idea, Matsusue et al. showed that HCT116 cells stimulated by CXCL12 become resistant to apoptosis, and the use of AMD3100 reduces this CXCL12-dependent anti-apoptotic ability [217]. In vivo, these cells metastasize because CXCR4-positive cancer cells selectively survive by an anti-apoptotic effect and by the secretion of CXCL12 by stellate liver cells. Thus, these liver cells, under the action of TGF- β 1 secreted by the tumor cells, will differentiate into CAFs [217]. The involvement of CXCR4 in the metastatic process could also be potentiated by another receptor, CXCR3 [218], which is activated by the chemokine CXCL10 by inducing cytoskeletal rearrangements, migration, invasion, expression of the matrix metalloproteinase MMP-2/9, and cell survival through the activation of ERK1/2, Akt and protein kinase G [219]. These ideas are supported by the findings of Tan et al. who propose that overexpression of CXCR4 by tumor cells in the hepatic metastatic microenvironment stimulates the production of CXCL12 by stellate cells, which through a paracrine action, stimulates the secretion of TGF- β 1 by tumor cells, necessary for the differentiation of hepatic stellate cells into CAFs [212]. These studies suggest that modulation of the CXCL12-CXCR4 interaction can have a strong impact on tumor dissemination to target organs.

7.3 CXCL12 and CXCR7

A growing number of studies are emerging to understand the mechanisms by which CXCR7 participates in the growth and progression of colon cancer to organs of metastasis. Thus, the involvement of CXCR7 in colorectal tumorigenesis has been discussed in several models and is through the regulation of proliferation, survival, migration, invasion, angiogenesis, tumor growth and metastatic dissemination [89,218]. CXCR7 gene silencing represses cell proliferation and invasion and induces apoptosis with decreased expression of p-ERK, β -arrestin, PCNA and MMP-2 but with increased expression of caspase-3 [220].

Subcutaneous tumors induced by SW480 cells deleted for CXCR7 expression are significantly smaller than those in control groups [220]. CXCR7, but not CXCR4, expression can be increased by lipopolysaccharide treatment in cells expressing both TLR4 and the MD2 coreceptor [221]; additionally, in patients, high expression of TLR4, MD2 and CXCR7 is associated with tumor cell infiltration in lymph nodes and distant metastases [221].

The involvement of CXCR7 has also been described in transendothelial migration, and CXCR7 expression is found both in tumor cells and in tumor-associated vessels. However, using the endothelial cell line HUVEC, it was shown that this expression by vessels is not necessary for CXCL12-mediated transendothelial migration, and this process requires CXCR7 expressed by tumor cells, without involving CXCR4 [222]. CXCR7 appears to have angiogenic activity since its overexpression in colonic cells cultured with HUVEC cells promotes the formation of capillary tubes, and the stable extinction of CXCR7 in colonic cells prevents this tube formation [89]. CXCR7 exhibits low levels of expression in normal mature vascular endothelial cells but is highly expressed in endothelial cells of neovascularized tumors [223]. This effect might be a consequence of the stimulation by CXCR7 of VEGF production by endothelial cells via activation of the ERK and AKT pathways [89].

An *in vivo* study with transgenic mice overexpressing CXCR7 in the intestine showed that this overexpression exacerbates DSS treatment-induced inflammation by causing extensive infiltration of myeloid suppressor cells, M2-like macrophages, and Tregs in the colon, associated with elevated amounts of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and c-Myc but decreased numbers of CD8⁺ T cells [205]. This CXCR7 overexpression also increases tumorigenesis in APC^{Min/+} mice and these effects are amplified when mice overexpress the CXCR4/CXCR7 heterodimer [224].

Although the implication of CXCR7 in the metastatic process is well demonstrated, there are still some questions about its capacity to direct the dissemination more specifically in an organ. Guillemot et al. have shown that in mice, systemic treatment with specific CXCR7 antagonists prevents the dissemination of cells in the lungs but not in the liver [92]. Concomitantly, higher expression of CXCL12 and CXCL11 was found in tumor areas in the lung compared with the liver, indicating that distinct pathways regulate the mechanism of pulmonary and hepatic metastatic spread. In another study in human CRCs, CXCR7 expression was also found to be higher in lung metastases than in the primary tumor [138].

7.4 CXCL12, CXCR4 and CXCR7

For a possible mechanism of action of CXCL12 in promoting metastasis, numerous works have highlighted the role of matrix metalloproteinases (MMPs), proteinases responsible for degradation and remodeling of the extracellular matrix (ECM). Thus, the persistent localization of these enzymes at the interface between migrating CRC cells and the surrounding stroma has been demonstrated, supporting a role for MMPs in CRC invasion and metastasis [225]. This study shows that none of the three CRC cell lines tested express MMP-2 or MMP-9. In contrast, subcutaneous tumors induced by transplantation of these cells express limited amounts of MMP-2 and MMP-9 while caecal tumors express them in large amounts [225] showing the role of murine stromal cells in the production of these proteinases.

Similarly, in myeloma cells, CXCL12 induces the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) such as MMP-9, membrane MMPs such as MT1-MMP, represses the expression of inhibitors such as TIMP-1, promoting cell invasion *in vitro* [226]. However, these observations do not support a possible role for CXCL12 in the invasiveness of colonic tumor cells that no longer express CXCL12 [53,123]. In addition, it is possible to speculate that *in vivo*, colonic tumor cells acquire the ability to produce MMP regulatory factors other than CXCL12, such as mutations in tumor suppressor genes or proto-oncogenes, changes in the microenvironment, extracellular matrix composition, tissue oxygenation and inflammation [227].

8. Targeting of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Axis in CRC

8.1 Preclinical Studies

A recent report found that CXCL12 and relative expression of the CXCL12-CXCR4 axis are independent prognostic factors for 5-year relapse-free survival [120]. Multiple preclinical studies have evaluated the efficacy of many agents; however, only a few drugs targeting this axis have been approved for clinical use. These agents include anti-CXCR4 neutralizing antibodies, interfering RNAs or antagonist molecules targeting CXCR4 or CXCR7, or small peptides specifically blocking CXCR4 (Table 2).

In the clinic, the molecules used mainly target CXCR4, and a molecule more specifically targets CXCL12 [228]. Many preclinical studies targeting the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis have been published, but few have focused on CRC.

8.2. AMD3100

The best-known molecule to inhibit the biological effect of CXCR4 is the molecule commonly known as AMD3100 or plerixafor (Mozobil). The Food and Drug Administration (FDA) approved AMD3100 in 2008 for use in the mobilization of hematopoietic stem cells for transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma [229,230]. AMD3100 is a specific antagonist of CXCR4 of the bicyclam family [231]. This drug acts as an antagonist by binding to one glutamine and two aspartate residues in the CXCR4 receptor, preventing the conformational change necessary to activate intracellular kinases [232]. It is the most frequently used drug in clinical trials targeting the CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis and has been described in several studies in hematological, breast, pancreatic, lung cancer [231,233]. In an orthotopic model of liver metastasis using the murine colonic line C26, blocking CXCR4 with AMD3100 reduces the number and size of liver metastatic sites [234]. Immunohistochemical analyses revealed a significant decrease in the expression of α -SMA, a marker for hepatic stellate cells, in the liver foci of AMD3100-treated mice compared with control mice [234]. The promotion of VEGF production by stellate cells has been demonstrated in liver metastases in vivo [102], facilitating the recruitment of sinusoidal endothelial cells and the transition from avascular to vascular stage in these metastatic sites. In this context, a decrease in stellate cells induced by AMD3100 could therefore alter the angiogenic response and the blood supply of oxygen and nutrients to the tumor. However, AMD3100 has been described to also interact with CXCR7 but as an agonist [235]. AMD3100 alone can induce β -arrestin recruitment to CXCR7. Moreover, and in contrast to the antagonistic effect observed for CXCR4, AMD3100 increases 125 I-CXCL12 binding to HEK293 cells expressing CXCR7 and CXCL12-facilitated recruitment of β -arrestin to CXCR7, recruitment that is also possible in the absence of CXCL12, albeit at relatively high concentrations (≥ 10 nM) [235]. To date and to the best of our knowledge, no molecular mechanism has been proposed to justify the agonistic property of AMD3100 on CXCR7.

Data about mode of action of AMD100 are limited in CRC. An in vitro study in the SW480 colon cell line demonstrated that the anti-tumor effect of AMD3100 was mediated through the reduction of VEGF and MMP-9 expression, but not MMP-2 [236]. Further evidence comes from a study on mammary stem cells that identified among the proteins showing CXCL12-induced phosphorylation, up to 22% are involved in signaling pathways related to cell adhesion and migration, actin and microtubule association in cytoskeletal remodeling. These mechanisms are known to support the involvement of CXCL12/CXCR4 in the metastatic process. By exposing cells to AMD3100, the phosphorylation of key proteins in these signaling pathways is blocked, such as the catalytic subunit of serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma (PP1C) [237]. Conversely, in prostate cancer where CXCR4 strongly regulates the development of metastasis, treatment of prostate cells with dihydrotestosterone increased the expression of the androgen receptor, CXCR4, PI3K and AKT phosphorylation as well as EMT and downstream cell cycle control genes. Conversely, treatment with resveratrol and AMD3100 reversed all these changes associated with increased expression of apoptosis-related genes [238].

Taken together, these observations suggest that AMD3100 is an allosteric agonist to CXCR7. Therefore, while this antagonist has proved effective in controlling tumor progression in various cancers, these observations suggest caution in its use to understand the respective roles of CXCR4 and CXCR7 as mediators of the biological effects of CXCL12.

8.3. LY2510924

In addition to AMD3100, novel CXCR4 inhibitors have been identified, including the cyclic peptide LY2510924. From X-ray crystal structures of CXCR4 [239], LY2510924 is suggested to occupy a binding pocket and possess ligand–receptor interactions with CXCR4 residues such as Asp187, Arg188, Gln200, His113, and Tyr190 [240]. The antagonistic effect of this new molecule was confirmed in an SDF-1-induced GTP (guanine-triphosphate)-binding assay where LY2510924 completely inhibits SDF-1-mediated binding to GTP γ S35 with a K_b of 0.38 nmol/L. Furthermore, LY2510924 was found to inhibit CXCL12-mediated chemotaxis by blocking SDF-1-stimulated phosphorylation of ERK and Akt in a concentration-dependent manner [240].

In vivo, its antagonistic effect has been proven by the dose-dependent decrease in tumor growth in colonic, pulmonary, renal or non-Hodgkin’s lymphoma xenografts and on the formation of mammary tumor metastases after intravenous injection of mammary tumor cells [240]. In the latter model, pre-treatment of mice with LY2510924 strongly decreases lung colonization and prevents the proliferation of implanted cells.

In a separate study, the inhibitory effects of LY2510924 were evaluated in ortho- topic xenografts of three human colonic lines in the rectal mucosa. While treatment with LY2510924 strongly reduces tumor size, it does not affect the size of metastases and only when combined with 5-FU reduced metastasis [241]. A possible explanation for the lack of effect of LY2510924 on metastasis is the presence of a population of TICs, which is the source of many therapeutic resistances, or else this molecule is only fully effective when combined with other conventional therapies.

8.4. PepR

Peptide R (PepR) is a new CXCR4 antagonist peptide, effective mainly in combination with conventional chemotherapies such as 5-FU and oxaliplatin. In subcutaneous xenografts of HCT116 or HT-29 cells, mice treatment with PepR potentiates the inhibitory effect of chemotherapy on the proliferation and activation of EMT [242]. As a proposed mechanism, an analysis of TCGA dataset RNA-Seq indicates that adding the PepR compound to chemotherapy reverted the increased expression of the mesenchymal markers as well as PD-L1, all markers being induced by chemotherapy alone [242]. This suggests a role for CXCR4 in controlling EMT marker expression. In addition, treatment of colon cells with chemotherapy/radiochemotherapy induced a population of CD133+CXCR4+ cells, supposed to be stem-resistant cancer cells, while adding Pep R reduced this population. In a previous study, the same authors showed that this novel antagonist enhances the efficacy of anti-PD-1 therapy in a mouse model of colon cancer induced with MC38 cells [243]. The increased efficacy of anti-PD-1 therapy by PeR results from changes in the microenvironment by recruiting Granzyme B-positive cells and decreasing Tregs cells. Thus, PeR treatment makes the microenvironment more immunosensitive to anti-PD-1 therapy [243]. Other studies have shown that Pep R reduced the expression of CXCL12 and PD-L1, probably by inhibiting the immunosuppressive effect of the microenvironment and preventing the recruitment of stromal cells (CAFs, Tumor Associated Macrophages (TAM), Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs)) responsible for the exclusion of cytotoxic T lymphocytes approximately tumor cells [244,245].

8.5. MSX-122

Unlike other inhibitors that prevent the binding of CXCL12 to its receptor, this molecule MSX-122, when binding to CXCR4 could interfere with the “lock and key” mechanism between CXCR4 and CXCL12, and modulates functional signaling such as reductions

in pErbB2, pAKT, pERK and increase in cAMP production, without displacing CXCL12 from the receptor [246].

The efficacy of this CXCR4 antagonist was evaluated in APC^{Min/+} mice exposed to azoxymethane (AOM) and treated with MSX-122 [247]. APC^{Min/+} mice are known to develop mainly small bowel tumors, while when exposed to AOM, they develop cancers in the colon [248]. As expected, AOM induced colonic tumors in these mice, whereas treatment with MSX-122 significantly reduced the incidence of colonic tumors and tumor volume through decreased cell proliferation as assessed by Ki-67 labeling. The authors propose that MSX-122, having been well tolerated in a phase Ib clinical trial, may serve as a chemopreventive agent in individuals at increased risk of developing CRC.

8.6 CCX754 and CCX771

In contrast to CXCR4, studies describing the use of CXCR7 antagonists in CRC are uncommon despite the development of several of its inhibitors by ChemoCentryx (CCX226, CCX733, CCX754, CCX771 and CCX773). These molecules have been described as ligands that do not induce phosphorylation of AKT or ERK. CCX754 and CCX771, two of these antagonists, were tested in mouse injected with human or mouse lung carcinoma cells [249] or in models of lung metastasis by injection of murine C26 and human HT-29 colon cancer cells [92]. Systemic treatment with CCX754 or CCX771 antagonist strongly reduced tumor expansion in the lungs of mice injected with these cells but not the expansion of metastases into the liver [92]. However, CCX771 has also been described as an agonist that recruits β -arrestin-2 to CXCR7 and blocks trans-endothelial migration of human cancer cells [250]. A theory of receptor desensitization has been proposed to explain the agonist/antagonistic effect of the molecule. CCX771 would not stimulate chemotactic activity but rather induce internalization of CXCR7 from the cell surface. This has been observed for a CCR5-targeting molecule in search for anti-HIV-1 agent [251] or described for a CCL7 agonist non-glycosaminoglycans (GAGs) binding and evaluated for its anti-inflammatory effect [252].

The lack of data on the efficacy of these antagonists can be explained by the following studies showing that those molecules initially designed to inhibit CXCR7 activation also act as agonists in different pathologies [253]. Likewise, some CXCR4 receptor antagonists are agonists for the CXCR7 receptor, such as the cyclic peptide TC14012 [254].

There may be several reasons why molecules presented as antagonists/agonists, exert inverse physiological activity. One possibility is that the mode of action of the molecules is more related to CXCL12-mediated effects than to CXCR7-mediated effects. For example, CXCR7 antagonists prevent CXCL12 internalization leading to increased extracellular CXCL12 concentrations. They may therefore generate pathophysiological effects such as those of CXCR7 agonists, as described in experimental autoimmune encephalomyelitis [255].

CCX771 alone induced a concentration-dependent association of CXCR7 with β -arrestin2. CCX771 was substantially more potent than its natural protein ligand CXCL12 in triggering β -arrestin2 association.

8.7 Chalcones

In 2008, a screening of 3200 molecules from a medicinal library identified a new class of molecules that bind to the chemokine CXCL12 and act as neutral inhibitor of its biological activity in a way similar to neutralizing antibodies. The most potent compound which belongs to the chalcone family and named chalcone 4, has been shown to bind the chemokine CXCL12 with high affinity thus preventing the binding of the chemokine to both CXCR4 and CXCR7, and thus blocking the downstream pathways [256]. Later on, a study from our team demonstrated that chalcone 4 was able to reduce colorectal cell migration and when combined to irinotecan, further increased the inhibition [82]. However, this compound would need further characterization, yet no data has reported its capacity to block the dissemination process in vivo. CXCL12 is efficient in solubilizing chalcone

molecules with a stoichiometry 3:1 for chalcone 4: CXCL12 and that chalcone 4 binds to one high affinity site and two low affinity sites in CXCL12 [256].

8.8 NOX-A12

Noxxon Pharma has developed a molecule called NOX-A12 or olaptesed pegol [257]. This molecule is an RNA aptamer (or spiegelmer), which acts by binding to CXCL12, preventing it from linking and activating its two receptors. It binds to CXCL12 with high affinity and specificity across various species such as humans, mice, and rats. NOX-A12 has been shown to bind directly to and inhibit CXCL12 but also detach the cell-surface bound CXCL12, leading to abrogation of the CXCL12 gradient [258]. In tissues, stromal cells secrete and present CXCL12 on the surface, via GAGs, and NOX-A12 can compete with GAGs to bind CXCL12, leading to the release of CXCL12 from the cell surface and thus neutralize the chemokine [258]. A study by Zboralski et al. showed in vitro that in tumor and stromal cell spheroids that mimic a solid tumor with a CXCL12-rich microenvironment, NOX-A12 promotes spheroid infiltration by T and NK cells in a dose-dependent manner. The combination of NOX-A12 and PD-1 checkpoint inhibitor acts synergistically to facilitate T cell infiltration into spheroids. These observations were validated in vivo in a mouse model of syngeneic CRC in which treatment with NOX-A12 improved the response to anti-PD-1 therapy to reduce tumor size [259]. A Phase I/II clinical trial is underway to study the effects of the NOX-A12 and anti-PD-1 combination in patients with advanced CRC or pancreatic carcinoma (NCT03168139).

Table 2. Chemical modulators of CXCR4 and CXCR7/ACKR3 activation.

Inhibitor/Antagonist	Formula	IC50	Target	References
AMD3100	1-[[4-(1,4,8,11-tetrazacyclotetradec-1-ylmethyl)phenyl]methyl]-1,4,8,11-tetrazacyclotetradecane	37.5 nM	CXCR4	[260]
LY2510924	N(1)Phe-D-Tyr-Lys(iPr)-D-Arg-2Nal-Gly-D-Glu(1)-Lys(iPr)-NH ₂	0.079 nM	CXCR4	[240]
PepR	(H-Arg-Ala-[Cys-Arg-Phe-Phe-Cys]-CO ₂ H)	nd	CXCR4	[242,243]
MSX-122	N,N-9-(1,4-phenylenebis(methylene)dipyrimidin-2-amine	10 nM	CXCR4	[260]
CCX754	nd	5 nM	CXCR7	[249]
CCX771	nd	4.1 nM	CXCR7	[260]
Chalcone 4	((E)-1-(4'-chlorophenyl)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one)	150 nM	CXCL12	[256]
NOX-A12	nd	5–200 nM	CXCL12	[257]

nd: not determined; IC50: 50% inhibitory concentration.

9. Clinical Trials

While many cases of CRC are diagnosed at an early stage and are treated with curative surgery, many patients develop synchronous or metachronous metastatic disease with a five-year survival rate of roughly 13% [261]. The routine treatment of metastatic CRC is based on the combination of different treatment schedules such as Folfiri/Folfox/Folfoxiri or Capiri/Capox, which resulted in a survival of about 18 months. However, more recently, the approval of targeted therapies with EGFR or VEGF antibodies has importantly improved the overall survival, approaching 30 months in clinical trials [262], but the relative unavailability of biomarkers in metastatic CRC has slowed the progress in tumor curacy. Because of the bad prognostic value of CXCR4 overexpression across different tumors, CXCR4-inhibition-based therapies have been therapeutically evaluated in hematologic and

solid malignancies, either as monotherapy or in combination with chemotherapies or immunotherapies (for review, see [263–265]). Among the drugs tested in clinical trials, CXCR4 small molecule antagonists, fully humanized anti-CXCR4 antibodies and CXCR4 or CXCL12 peptide inhibitors represent the most advanced programs of CXCR4 inhibition in solid tumors. Galsky et al. published the first in-human phase I study in patients with advanced or metastatic CRC that explored the safety and tolerability of LY25110924 among other solid tumors [266]. To date, AMD3100 is the only approved CXCR4 inhibitor drug [231], while multiple antagonists are in different stages of development. Presently, the clinical trials are mainly ongoing phase I/II trials. They mainly concern the CXCR4 peptide inhibitor LY2510924 (NCT02737072), the anti-CXCR4 antibody LY2624587 (NCT01139788), the small molecule inhibitors Plerixafor (NCT20179970, NCT03277209), MSX-122 (NCT00591682, suspended), USL311 (NCT02765165); however, for a number of these trials, the cancer type is not always indicated, as it only specified that the targeted diseases are solid tumors.

The only available data from completed phase I/II trials evaluated the application of the NOX-A12 molecule (OPERA trial, NCT03168139), first as monotherapy, and then continued with pembrolizumab in patients with advanced stage pretreated metastatic colorectal or pancreatic cancer. The NOX-A12 was well tolerated and allowed for a disease control rate of 25%, and an overall survival close to 12 months could be achieved [267]. This effect was mediated by a transformation of the tumor immune microenvironment with the expression of a specific cytokine signature consisting of IL-2, IL-16 and IFN- γ as an indicator of activation in tumor tissue. Following this success, a phase II trial is currently underway to evaluate the effect of the combination of NOX-A12 and pembrolizumab in glioblastoma and pancreatic cancer.

Conversely, treating patients with CRC for seven days with continuous infusion of the CXCR4 inhibitor AMD3100/Plerixafor induces an integrated immune response with enhanced intratumoral immune B and T cell responses as observed in paired biopsies of metastatic lesions (NCT02179970) [268], an immune response that is predictive of a clinical response to T cell checkpoint inhibition. For other trials, no results are currently available, due to the required time to exploit the data.

Although several CXCR7 antagonists (CCX771, CCX662, CCX733, CCX754, and CCX777) have been investigated in preclinical models [253,269], to date, CXCR7 modulators have not been clinically investigated.

10. Resistance to Treatment

It is well established today that the increase in cancer mortality is partly due to the resistance of tumor cells to numerous anti-cancer treatments. Thus, understanding the mechanisms at the origin of this tumor resistance would lead to the development of new approaches to maximize the effectiveness of treatments. Two types of resistance are described in cancerology: innate resistance, which is a consequence of the high molecular heterogeneity of cells within a tumor, and resistance acquired during treatment [270]. In a tumor, inhibition of apoptotic signals promoting proliferation, DNA repair, genomic amplification, a defect in drug metabolism, or epigenetic modifications can generate acquired resistance [271,272]. Given the relevance of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis in the development and progression of CRC, several studies have investigated its role in resistance to anti-cancer therapies.

In tumors, it is a common knowledge that a small population of cells known as Tumor Initiating Cells with stem cell characteristics are responsible for many tumor recurrences [273]. A subpopulation of tumor cells positive for TIC marker CD133 has been isolated from patient CRCs or colonic lines, and these cells are more tumorigenic than cells not sorted on marker expression CD133 [274]. Thus, the CD133+ cell population isolated and enriched for CXCR4 expression shows significant tumorigenicity with an increased in vitro cell proliferation, tumor size and angiogenesis in vivo [274,275]. By analyzing the secretion of soluble factors by the HK stromal ganglion cells, the authors found a significant

expression of CXCL12, which by a paracrine action, promotes tumor vascular development and protects the cells from the therapeutic agents 5-FU and oxaliplatin [274,275].

Another study described co-expression of CXCR4 and Lgr5, a colonic stem cell marker receptor, in patients with stage IV CR [145]. In vitro, Caco-2 and HT-29 cells isolated by flow cytometry and strongly expressing CXCR4 and Lgr5 promote sphere formation and increase cell viability when treated with cytotoxic agents. Similarly in vivo, the concomitant expression of CXCR4/Lgr5 in cells implanted subcutaneously in mice confers a more important potential to develop a tumor mass [145].

In another study, combined treatment with endostar or endostatin (an angiogenesis inhibitor) and oxaliplatin synergistically decreased the proliferation, adhesion, and invasion of Matrigel [276]. This synergy is a consequence of decreased expression of CXCR4, as well as those of the hypoxic factors HIF-1 α and HIF-2 α [276]. The authors showed that only the accumulation of HIF-2 α is responsible for this cell resistance to oxaliplatin, and the combination of endostar with oxaliplatin overcomes this resistance by making the cells more sensitive. These data suggest that CXCR4 could be used as a marker to identify tumor stem cell populations responsible for the resistance and recurrence seen in cancers.

MiRNAs, which are also involved in cancer pathology, are either tumor suppressors or oncomiRs, largely involved in proliferation, invasion, and resistance to treatment. Some miRNAs are targets of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis, and one study investigated the role of miR-125b in 5-FU resistance of cells expressing CXCR4 [182]. Expression of miR-125b, increased by the treatment of HCT116 cells with CXCL12, accelerates invasive ability and promotes EMT, which in turn increases CXCR4 expression, forming a reciprocal positive feedback loop between CXCR4 and miR-125b. Upregulation of miR-125b also activates Wnt/ β -catenin signaling and the APC gene and contributes to 5-FU resistance by enhancing cellular autophagy [182].

Contrary to these studies, Heckmann et al. described that overexpression of CXCR4 in the SW480 colonic line and strong endogenous expression in HT-29 cells is associated with a higher sensitivity to treatments such as 5-FU, oxaliplatin or irinotecan. This chemosensitivity, assessed by a decrease in cell survival, cytotoxicity, and apoptosis, is further increased when one of these molecules is combined with plerixafor [277]. In this case, contrary to CXCR4, it would rather be the overexpression of CXCR7 that results in the resistance [278].

11. Conclusions

In CRC, activation of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis leads to progression and development of metastases with an unfavorable disease outcome and poor patient survival. Disruption of the CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis remains an interesting target for pharmacological treatment (Figure 2). CXCR4 and CXCR7 antagonists are being tested in several preclinical and clinical trials for the treatment of CRC, and other gastrointestinal cancers, but with limited success and the development of combined antagonists, targeting both receptors are still lacking. Therefore, tumor immunotherapy entered a phase of rapid development in cancer treatments, but there are too many patients resistant to this therapy. Furthermore, the use of inhibitors targeting the oncogenic CXCL12 axis in combination with current immunotherapies should be considered and may provide hope for improving cancer treatments.

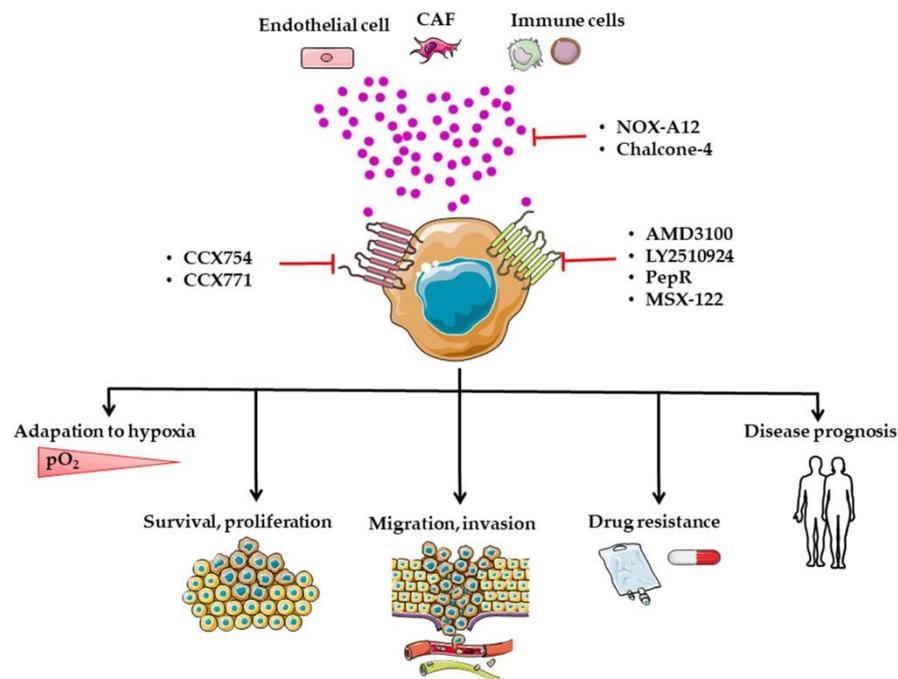


Figure 2. Involvement of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis in regulating primary tumor growth and metastasis and its pharmaceutical targeting. The expression levels of either partner of this axis have a prognostic value and participate in tumor progression through the activation of multiple signaling pathways involved in cell survival, proliferation, invasion, and migration/dissemination. Each step of the process can be activated/facilitated by local hypoxia within the primary tumor. At sites of metastasis, CXCL12-producing cells (endothelial cells, CAFs, immune cells) allow for the implantation of receptor-expressing tumor cells. In colorectal cancer, several therapeutic molecules targeting receptors or chemokines are undergoing clinical trials to improve patient management and/or overcome tumor resistance. Pink dots indicate CXCL12 molecules.

Author Contributions: Both authors equally contributed to the writing of the review. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments: Work in the author’s laboratory is supported by the Inserm (AD10 Grand Est) and the Ligue Contre le Cancer (Comité du Grand Est). Aïssata Aimée GOÏTA is a predoctoral fellow from the French Ministère de la Recherche et de l’Enseignement Supérieur. Dominique Guenot is a research director at the CNRS.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ACKR3	atypical chemokine receptor 3
Akt	protein kinase B
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
AOM	azoxymethane
APC	adenomatous polyposis coli
ARE	AU-rich element
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CIN	chromosome instability
CIMP	CpG island methylator phenotype
CpG	cytosine-phosphate-guanine
CRC	colorectal cancer
CAF	cancer-associated fibroblasts
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte Antigen 4

CXCL-10/12	C-X-C motif ligand 10/12
CXCR-3/4/7	C-X-C motif receptor 3/4/7
DSS	dextran sodium sulfate
ECM	extracellular matrix
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial–mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FAP	familial adenomatous polyposis
FGF	fibroblast growth factor
5-FU	5-fluorouracil
GAG	glycosaminoglycans
GEO	Gene Expression Omnibus
GRK2	G-protein-coupled receptor kinase 2
GTP	guanine–triphosphate
HDAC	histone deacetylases
HIC1	hypermethylated in cancer 1
HIF	hypoxia-inducible factor
HiRE	HIC1-responsive elements
HIV	human immunodeficiency virus
IBD	chronic inflammatory bowel disease
ICAM	intercellular adhesion molecule
ICI	immune checkpoint inhibitor
IGF	insulin-like growth factor
IL-2/6	interleukin-2/6
ITG	integrin
Jak	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Lgr5	leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MDSCs	myeloid-derived suppressor cells
MMP	matrix metalloproteinase
MMR	mismatch Repair
MSC	mesenchymal stromal cells
MSS	microsatellite stability
MSI	microsatellite instability
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF-κB	nuclear factor-kappa B
PCAF	P300/CBP-associated factor
PDGF	platelet-derived growth factor
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death protein ligand 1
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PLC	Phospholipase C
PPPC1	serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic
SDF-1	stromal-cell-derived factor 1
α-SMA	alpha-smooth muscle actin
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAM	tumor associated macrophages
TCGA	the cancer genome atlas program
TGF	tumor growth factor
TIC	tumor-initiating cell
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	tumor necrosis factor
TNM	tumor, node, metastasis
TTP	tristetraprolin
UTR	untranslated transcribed region
VEGF	vascular endothelial growth factor

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Pradilla Dieste, A.; Cerrada, E.; Rodríguez Yoldi, M.J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 197. [[CrossRef](#)]
3. Ahmed, F.E. Effect of Diet, Life Style, and Other Environmental/Chemopreventive Factors on Colorectal Cancer Development, and Assessment of the Risks. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **2004**, *22*, 91–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Keum, N.N.; Giovannucci, E. Global Burden of Colorectal Cancer: Emerging Trends, Risk Factors and Prevention Strategies. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 713–732. [[CrossRef](#)]
5. Lukas, M. Inflammatory Bowel Disease as a Risk Factor for Colorectal Cancer. *Dig. Dis.* **2010**, *28*, 619–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Harada, S.; Morlote, D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv. Anat. Pathol.* **2020**, *27*, 20–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Migliore, L.; Migheli, F.; Spisni, R.; Coppedè, F. Genetics, Cytogenetics, and Epigenetics of Colorectal Cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 792362. [[CrossRef](#)]
8. Jass, J.R. Classification of Colorectal Cancer Based on Correlation of Clinical, Morphological and Molecular Features. *Histopathology* **2007**, *50*, 113–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* **1990**, *61*, 759–767. [[CrossRef](#)]
10. Nakayama, M.; Oshima, M. Mutant P53 in Colon Cancer. *J. Mol. Cell. Biol.* **2019**, *11*, 267–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Takagi, Y.; Koumura, H.; Futamura, M.; Aoki, S.; Ymaguchi, K.; Kida, H.; Tanemura, H.; Shimokawa, K.; Saji, S. Somatic Alterations of the SMAD-2 Gene in Human Colorectal Cancers. *Br. J. Cancer* **1998**, *78*, 1152–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sánchez-Pernaute, A.; Pérez-Aguirre, E.; Cerdán, F.J.; Iniesta, P.; Díez Valladares, L.; de Juan, C.; Morán, A.; García-Botella, A.; García Aranda, C.; Benito, M.; et al. Overexpression of C-Myc and Loss of Heterozygosity on 2p, 3p, 5q, 17p and 18q in Sporadic Colorectal Carcinoma. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2005**, *97*, 169–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lynch, H.T.; Watson, P.; Smyrk, T.C.; Lanspa, S.J.; Boman, B.M.; Boland, C.R.; Lynch, J.F.; Cavalieri, R.J.; Leppert, M.; White, R. Colon Cancer Genetics. *Cancer* **1992**, *70*, 1300–1312. [[CrossRef](#)]
14. Eshleman, J.R.; Markowitz, S.D. Mismatch Repair Defects in Human Carcinogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 1489–1494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Genetic Instability in Colorectal Cancers. *Nature* **1997**, *386*, 623–627. [[CrossRef](#)]
16. Yamamoto, H.; Imai, K. Microsatellite Instability: An Update. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 899–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lynch, H.T.; Smyrk, T. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome). An Updated Review. *Cancer* **1996**, *78*, 1149–1167. [[CrossRef](#)]
18. Samowitz, W.S.; Albertsen, H.; Herrick, J.; Levin, T.R.; Sweeney, C.; Murtaugh, M.A.; Wolff, R.K.; Slattery, M.L. Evaluation of a Large, Population-Based Sample Supports a CpG Island Methylator Phenotype in Colon Cancer. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 837–845. [[CrossRef](#)]
19. Lao, V.V.; Grady, W.M. Epigenetics and Colorectal Cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *8*, 686–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gallois, C.; Laurent-Puig, P.; Taieb, J. Methylator Phenotype in Colorectal Cancer: A Prognostic Factor or Not? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *99*, 74–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kazama, Y.; Watanabe, T.; Kanazawa, T.; Tanaka, J.; Tanaka, T.; Nagawa, H. Poorly Differentiated Colorectal Adenocarcinomas Show Higher Rates of Microsatellite Instability and Promoter Methylation of P16 and HMLH1: A Study Matched for T Classification and Tumor Location. *J. Surg. Oncol.* **2008**, *97*, 278–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Popat, S.; Hubner, R.; Houlston, R.S. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 609–618. [[CrossRef](#)]
23. Watanabe, T.; Kobunai, T.; Yamamoto, Y.; Matsuda, K.; Ishihara, S.; Nozawa, K.; Yamada, H.; Hayama, T.; Inoue, E.; Tamura, J.; et al. Chromosomal Instability (CIN) Phenotype, CIN High or CIN Low, Predicts Survival for Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 2256–2264. [[CrossRef](#)]
24. Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; de Reyniès, A.; Schlicker, A.; Sonesson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; et al. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1350–1356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Thiel, A.; Ristimäki, A. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Van Cutsem, E.; Lenz, H.-J.; Köhne, C.-H.; Heinemann, V.; Tejpar, S.; Melezínek, I.; Beier, F.; Stroh, C.; Rougier, P.; van Krieken, J.H.; et al. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 692–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chalabi, M.; Fanchi, L.F.; Dijkstra, K.K.; Van den Berg, J.G.; Aalbers, A.G.; Sikorska, K.; Lopez-Yurda, M.; Grootcholten, C.; Beets, G.L.; Snaebjornsson, P.; et al. Neoadjuvant Immunotherapy Leads to Pathological Responses in MMR-Proficient and MMR-Deficient Early-Stage Colon Cancers. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 566–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Franke, A.J.; Skelton, W.P.; Starr, J.S.; Parekh, H.; Lee, J.J.; Overman, M.J.; Allegra, C.; George, T.J. Immunotherapy for Colorectal Cancer: A Review of Current and Novel Therapeutic Approaches. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2019**, *111*, 1131–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Rollins, B.J. Chemokines. *Blood* **1997**, *90*, 909–928. [[CrossRef](#)]

30. IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature Chemokine/Chemokine Receptor Nomenclature. *Cytokine* **2003**, *21*, 48–49. [[CrossRef](#)]
31. Murphy, P.M. Chemokine Receptors: Structure, Function and Role in Microbial Pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **1996**, *7*, 47–64. [[CrossRef](#)]
32. Zou, Y.R.; Kottmann, A.H.; Kuroda, M.; Taniuchi, I.; Littman, D.R. Function of the Chemokine Receptor CXCR4 in Haematopoiesis and in Cerebellar Development. *Nature* **1998**, *393*, 595–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nagasawa, T.; Hirota, S.; Tachibana, K.; Takakura, N.; Nishikawa, S.; Kitamura, Y.; Yoshida, N.; 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. [[CrossRef](#)]
34. Yu, S.; Crawford, D.; Tsuchihashi, T.; Behrens, T.W.; Srivastava, D. The Chemokine Receptor CXCR7 Functions to Regulate Cardiac Valve Remodeling. *Dev. Dyn.* **2011**, *240*, 384–393. [[CrossRef](#)]
35. Bleul, C.C.; Fuhlbrigge, R.C.; Casasnovas, J.M.; Aiuti, A.; Springer, T.A. A Highly Efficacious Lymphocyte Chemoattractant, Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 1101–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ekblom, A.; Helmick, C.; Zack, M.; Adami, H.O. Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer. A Population-Based Study. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 1228–1233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lewellis, S.W.; Knaut, H. Attractive Guidance: How the Chemokine SDF1/CXCL12 Guides Different Cells to Different Locations. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2012**, *23*, 333–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Petit, I.; Jin, D.; Rafii, S. The SDF-1-CXCR4 Signaling Pathway: A Molecular Hub Modulating Neo-Angiogenesis. *Trends Immunol.* **2007**, *28*, 299–307. [[CrossRef](#)]
39. Siekmann, A.F.; Standley, C.; Fogarty, K.E.; Wolfe, S.A.; Lawson, N.D. Chemokine Signaling Guides Regional Patterning of the First Embryonic Artery. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 2272–2277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Moser, B.; Willmann, K. Chemokines: Role in Inflammation and Immune Surveillance. *Ann. Rheum. Dis.* **2004**, *63* (Suppl. 2), ii84–ii89. [[CrossRef](#)]
41. White, G.E.; Iqbal, A.J.; Greaves, D.R. CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation—Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. *Pharm. Rev.* **2013**, *65*, 47–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Balkwill, F. Cancer and the Chemokine Network. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 540–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zlotnik, A. Chemokines and Cancer. *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 2026–2029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Raman, D.; Baugher, P.J.; Thu, Y.M.; Richmond, A. Role of Chemokines in Tumor Growth. *Cancer Lett.* **2007**, *256*, 137–165. [[CrossRef](#)]
45. Nagasawa, T.; Kikutani, H.; Kishimoto, T. Molecular Cloning and Structure of a Pre-B-Cell Growth-Stimulating Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2305–2309. [[CrossRef](#)]
46. Aiuti, A.; Webb, I.J.; Bleul, C.; Springer, T.; Gutierrez-Ramos, J.C. The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34+ Progenitors to Peripheral Blood. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 111–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zlotnik, A. Involvement of Chemokine Receptors in Organ-Specific Metastasis. *Contrib. Microbiol.* **2006**, *13*, 191–199. [[CrossRef](#)]
48. Janssens, R.; Struyf, S.; Proost, P. Pathological Roles of the Homeostatic Chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2018**, *44*, 51–68. [[CrossRef](#)]
49. Roy, I.; Evans, D.B.; Dwinell, M.B. Chemokines and Chemokine Receptors: Update on Utility and Challenges for the Clinician. *Surgery* **2014**, *155*, 961–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Shirozu, M.; Nakano, T.; Inazawa, J.; Tashiro, K.; Tada, H.; Shinohara, T.; Honjo, T. Structure and Chromosomal Localization of the Human Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF1) Gene. *Genomics* **1995**, *28*, 495–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Yu, L.; Cecil, J.; Peng, S.-B.; Schrementi, J.; Kovacevic, S.; Paul, D.; Su, E.W.; Wang, J. Identification and Expression of Novel Isoforms of Human Stromal Cell-Derived Factor 1. *Gene* **2006**, *374*, 174–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Romain, B.; Benbrika-Nehmar, R.; Marisa, L.; Legrain, M.; Lobstein, V.; Oravec, A.; Poidevin, L.; Bour, C.; Freund, J.-N.; Duluc, I.; et al. Histone Hypoacetylation Contributes to CXCL12 Downregulation in Colon Cancer: Impact on Tumor Growth and Cell Migration. *Oncotarget* **2017**, *8*, 38351–38366. [[CrossRef](#)]
53. Smith, J.M.; Johanesen, P.A.; Wendt, M.K.; Binion, D.G.; Dwinell, M.B. 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–G326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bleul, C.C.; Farzan, M.; Choe, H.; Parolin, C.; Clark-Lewis, I.; Sodroski, J.; Springer, T.A. The Lymphocyte Chemoattractant SDF-1 Is a Ligand for LESTR/Fusin and Blocks HIV-1 Entry. *Nature* **1996**, *382*, 829–833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Loetscher, M.; Geiser, T.; O’Reilly, T.; Zwahlen, R.; Baggiolini, M.; Moser, B. Cloning of a Human Seven-Transmembrane Domain Receptor, LESTR, That Is Highly Expressed in Leukocytes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 232–237. [[CrossRef](#)]
56. Ma, Q.; Jones, D.; Borghesani, P.R.; Segal, R.A.; Nagasawa, T.; Kishimoto, T.; Bronson, R.T.; Springer, T.A. Impaired B-Lymphopoiesis, Myelopoiesis, and Derailed Cerebellar Neuron Migration in CXCR4- and SDF-1-Deficient Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9448–9453. [[CrossRef](#)]
57. Libert, F.; Parmentier, M.; Lefort, A.; Dumont, J.E.; Vassart, G. Complete Nucleotide Sequence of a Putative G Protein Coupled Receptor: RDC1. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Heesen, M.; Berman, M.A.; Charest, A.; Housman, D.; Gerard, C.; Dorf, M.E. Cloning and Chromosomal Mapping of an Orphan Chemokine Receptor: Mouse RDC1. *Immunogenetics* **1998**, *47*, 364–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Mellado, M.; Rodríguez-Frade, J.M.; Mañes, S.; Martínez, A.C. Chemokine Signaling and Functional Responses: The Role of Receptor Dimerization and TK Pathway Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 397–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Walenkamp, A.M.E.; Lapa, C.; Herrmann, K.; Wester, H.-J. CXCR4 Ligands: The Next Big Hit? *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 77S–82S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Teixidó, J.; Martínez-Moreno, M.; Díaz-Martínez, M.; Sevilla-Movilla, S. The Good and Bad Faces of the CXCR4 Chemokine Receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *95*, 121–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Balabanian, K.; Lagane, B.; Infantino, S.; Chow, K.Y.C.; Harriague, J.; Moepps, B.; Arenzana-Seisdedos, F.; Thelen, M.; Bachelier, F. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35760–35766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Rajagopal, S.; Kim, J.; Ahn, S.; Craig, S.; Lam, C.M.; Gerard, N.P.; Gerard, C.; Lefkowitz, R.J. Beta-Arrestin- but Not G Protein-Mediated Signaling by the “Decoy” Receptor CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 628–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Nguyen, H.T.; Reyes-Alcaraz, A.; Yong, H.J.; Nguyen, L.P.; Park, H.-K.; Inoue, A.; Lee, C.S.; Seong, J.Y.; Hwang, J.-I. CXCR7: A β -Arrestin-Biased Receptor That Potentiates Cell Migration and Recruits β -Arrestin2 Exclusively through G $\beta\gamma$ Subunits and GRK2. *Cell Biosci.* **2020**, *10*, 134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Sierro, F.; Biben, C.; Martínez-Muñoz, L.; Mellado, M.; Ransohoff, R.M.; Li, M.; Woehl, B.; Leung, H.; Groom, J.; Batten, M.; 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. [[CrossRef](#)]
66. Luker, K.; Gupta, M.; Luker, G. Bioluminescent CXCL12 Fusion Protein for Cellular Studies of CXCR4 and CXCR7. *Biotechniques* **2009**, *47*, 625–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Levoye, A.; Balabanian, K.; Baleux, F.; Bachelier, F.; Lagane, B. CXCR7 Heterodimerizes with CXCR4 and Regulates CXCL12-Mediated G Protein Signaling. *Blood* **2009**, *113*, 6085–6093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. 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.; Gossen, J.A. Early Postnatal Lethality and Cardiovascular Defects in CXCR7-Deficient Mice. *Genesis* **2008**, *46*, 235–245. [[CrossRef](#)]
69. Sánchez-Alcañiz, J.A.; Haegel, S.; Mueller, W.; Pla, R.; Mackay, F.; Schulz, S.; López-Bendito, G.; Stumm, R.; Marín, O. Cxcr7 Controls Neuronal Migration by Regulating Chemokine Responsiveness. *Neuron* **2011**, *69*, 77–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Dambly-Chaudière, C.; Cubedo, N.; Ghysen, A. Control of Cell Migration in the Development of the Posterior Lateral Line: Antagonistic Interactions between the Chemokine Receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev. Biol.* **2007**, *7*, 23. [[CrossRef](#)]
71. Valentin, G.; Haas, P.; Gilmour, D. The Chemokine SDF1 α Coordinates Tissue Migration through the Spatially Restricted Activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 1026–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Luker, K.E.; Steele, J.M.; Mihalko, L.A.; Ray, P.; Luker, G.D. Constitutive and Chemokine-Dependent Internalization and Recycling of CXCR7 in Breast Cancer Cells to Degrade Chemokine Ligands. *Oncogene* **2010**, *29*, 4599–4610. [[CrossRef](#)]
73. Koenen, J.; Bachelier, F.; Balabanian, K.; Schlecht-Louf, G.; Gallego, C. Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3): A Comprehensive Overview of Its Expression and Potential Roles in the Immune System. *Mol. Pharm.* **2019**, *96*, 809–818. [[CrossRef](#)]
74. Lau, S.; Feitzinger, A.; Venkiteswaran, G.; Wang, J.; Lewellins, S.W.; Koplinski, C.A.; Peterson, F.C.; Volkman, B.F.; Meier-Schellersheim, M.; Knaut, H. A Negative-Feedback Loop Maintains Optimal Chemokine Concentrations for Directional Cell Migration. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 266–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Quinn, K.E.; Mackie, D.I.; Caron, K.M. Emerging Roles of Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3) in Normal Development and Physiology. *Cytokine* **2018**, *109*, 17–23. [[CrossRef](#)]
76. Balkwill, F.R. The Chemokine System and Cancer. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 148–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Raman, D.; Sobolik-Delmaire, T.; Richmond, A. Chemokines in Health and Disease. *Exp. Cell Res.* **2011**, *317*, 575–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Müller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M.E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S.N.; et al. Involvement of Chemokine Receptors in Breast Cancer Metastasis. *Nature* **2001**, *410*, 50–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Hattermann, K.; Mentlein, R. An Infernal Trio: The Chemokine CXCL12 and Its Receptors CXCR4 and CXCR7 in Tumor Biology. *Ann. Anat.* **2013**, *195*, 103–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Zhao, H.; Guo, L.; Zhao, H.; Zhao, J.; Weng, H.; Zhao, B. CXCR4 Over-Expression and Survival in Cancer: A System Review and Meta-Analysis. *Oncotarget* **2015**, *6*, 5022–5040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Fan, H.; Wang, W.; Yan, J.; Xiao, L.; Yang, L. Prognostic Significance of CXCR7 in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Cancer Cell Int.* **2018**, *18*, 212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Romain, B.; Hachet-Haas, M.; Rohr, S.; Brigand, C.; Galzi, J.-L.; Gaub, M.-P.; Pencreach, E.; Guenot, D. Hypoxia Differentially Regulated CXCR4 and CXCR7 Signaling in Colon Cancer. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Sun, X.; Cheng, G.; Hao, M.; Zheng, J.; Zhou, X.; Zhang, J.; Taichman, R.S.; Pienta, K.J.; Wang, J. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. *Cancer Metastasis Rev.* **2010**, *29*, 709–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kim, J.; Takeuchi, H.; Lam, S.T.; Turner, R.R.; Wang, H.-J.; Kuo, C.; Foshag, L.; Bilchik, A.J.; Hoon, D.S.B. Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Colorectal Cancer Patients Increases the Risk for Recurrence and for Poor Survival. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2744–2753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Yang, D.; Dai, T.; Xue, L.; Liu, X.; Wu, B.; Geng, J.; Mao, X.; Wang, R.; Chen, L.; Chu, X. Expression of Chemokine Receptor CXCR7 in Colorectal Carcinoma and Its Prognostic Significance. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 13051–13058. [[PubMed](#)]
86. Xu, C.; Zheng, L.; Li, D.; Chen, G.; Gu, J.; Chen, J.; Yao, Q. CXCR4 Overexpression Is Correlated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Life Sci.* **2018**, *208*, 333–340. [[CrossRef](#)]
87. Wani, N.; Nasser, M.W.; Ahirwar, D.K.; Zhao, H.; Miao, Z.; Shilo, K.; Ganju, R.K. C-X-C Motif Chemokine 12/C-X-C Chemokine Receptor Type 7 Signaling Regulates Breast Cancer Growth and Metastasis by Modulating the Tumor Microenvironment. *Breast Cancer Res.* **2014**, *16*, R54. [[CrossRef](#)]
88. Ingold, B.; Schulz, S.; Budczies, J.; Neumann, U.; Ebert, M.P.A.; Weichert, W.; Röcken, C. The Role of Vascular CXCR4 Expression in Colorectal Carcinoma. *Histopathology* **2009**, *55*, 576–586. [[CrossRef](#)]
89. Li, X.; Wang, X.; Li, Z.; Zhang, Z.; Zhang, Y. Chemokine Receptor 7 Targets the Vascular Endothelial Growth Factor via the AKT/ERK Pathway to Regulate Angiogenesis in Colon Cancer. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 5327–5340. [[CrossRef](#)]
90. Chen, Y.; Teng, F.; Wang, G.; Nie, Z. Overexpression of CXCR7 Induces Angiogenic Capacity of Human Hepatocellular Carcinoma Cells via the AKT Signaling Pathway. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 2275–2281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Gentilini, A.; Caligiuri, A.; Raggi, C.; Rombouts, K.; Pinzani, M.; Lori, G.; Correnti, M.; Invernizzi, P.; Rovida, E.; Navari, N.; et al. CXCR7 Contributes to the Aggressive Phenotype of Cholangiocarcinoma Cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 2246–2256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Guillemot, E.; Karimjee-Soilihi, B.; Pradelli, E.; Benchetrit, M.; Goguet-Surmenian, E.; Millet, M.-A.; Larbret, F.; Michiels, J.-F.; Birnbaum, D.; Alemanno, P.; et al. CXCR7 Receptors Facilitate the Progression of Colon Carcinoma within Lung Not within Liver. *Br. J. Cancer* **2012**, *107*, 1944–1949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Greijer, A.E.; Delis-van Diemen, P.M.; Fijneman, R.J.A.; Giles, R.H.; Voest, E.E.; van Hinsbergh, V.W.M.; Meijer, G.A. Presence of HIF-1 and Related Genes in Normal Mucosa, Adenomas and Carcinomas of the Colorectum. *Virchows Arch.* **2008**, *452*, 535–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Oliveira Frick, V.; Rubie, C.; Ghadjar, P.; Faust, S.K.; Wagner, M.; Gräber, S.; Schilling, M.K. Changes in CXCL12/CXCR4-Chemokine Expression during Onset of Colorectal Malignancies. *Tumour Biol.* **2011**, *32*, 189–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Amara, S.; Chaar, I.; Khiari, M.; Ounissi, D.; Weslati, M.; Boughriba, R.; Hmidia, A.B.; Bouraoui, S. Stromal Cell Derived Factor-1 and CXCR4 Expression in Colorectal Cancer Promote Liver Metastasis. *Cancer Biomark* **2015**, *15*, 869–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Yoshitake, N.; Fukui, H.; Yamagishi, H.; Sekikawa, A.; Fujii, S.; Tomita, S.; Ichikawa, K.; Imura, J.; Hiraishi, H.; Fujimori, T. Expression of SDF-1 Alpha and Nuclear CXCR4 Predicts Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 1682–1689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Akishima-Fukasawa, Y.; Nakanishi, Y.; Ino, Y.; Moriya, Y.; Kanai, Y.; Hirohashi, S. Prognostic Significance of CXCL12 Expression in Patients with Colorectal Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **2009**, *132*, 202–210; quiz 307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Mousavi, A.; Hashemzadeh, S.; Bahrami, T.; Estiar, M.A.; Feizi, M.A.H.; Pouladi, N.; Rostamizadeh, L.; Sakhinia, E. Expression Patterns of CXCL12 and Its Receptor in Colorectal Carcinoma. *Clin. Lab.* **2018**, *64*, 871–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Wendt, M.K.; Johanesen, P.A.; Kang-Decker, N.; Binion, D.G.; Shah, V.; Dwinell, M.B. Silencing of Epithelial CXCL12 Expression by DNA Hypermethylation Promotes Colonic Carcinoma Metastasis. *Oncogene* **2006**, *25*, 4986–4997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Kim, H.J.; Bae, S.B.; Jeong, D.; Kim, E.S.; Kim, C.-N.; Park, D.-G.; Ahn, T.S.; Cho, S.W.; Shin, E.J.; Lee, M.S.; et al. Upregulation of Stromal Cell-Derived Factor 1 α Expression Is Associated with the Resistance to Neoadjuvant Chemoradiotherapy of Locally Advanced Rectal Cancer: Angiogenic Markers of Neoadjuvant Chemoradiation. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 2493–2500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Tamas, K.; Domanska, U.M.; van Dijk, T.H.; Timmer-Bosscha, H.; Havenga, K.; Karrenbeld, A.; Sluiter, W.J.; Beukema, J.C.; van Vugt, M.A.T.M.; de Vries, E.G.E.; et al. CXCR4 and CXCL12 Expression in Rectal Tumors of Stage IV Patients Before and After Local Radiotherapy and Systemic Neoadjuvant Treatment. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 2276–2283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Olaso, E.; Salado, C.; Egilegor, E.; Gutierrez, V.; Santisteban, A.; Sancho-Bru, P.; Friedman, S.L.; Vidal-Vanaclocha, F. Proangiogenic Role of Tumor-Activated Hepatic Stellate Cells in Experimental Melanoma Metastasis. *Hepatology* **2003**, *37*, 674–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Guo, F.; Wang, Y.; Liu, J.; Mok, S.C.; Xue, F.; Zhang, W. CXCL12/CXCR4: A Symbiotic Bridge Linking Cancer Cells and Their Stromal Neighbors in Oncogenic Communication Networks. *Oncogene* **2016**, *35*, 816–826. [[CrossRef](#)]
104. Yu, P.F.; Huang, Y.; Xu, C.L.; Lin, L.Y.; Han, Y.Y.; Sun, W.H.; Hu, G.H.; Rabson, A.B.; Wang, Y.; Shi, Y.F. Downregulation of CXCL12 in Mesenchymal Stromal Cells by TGF β Promotes Breast Cancer Metastasis. *Oncogene* **2017**, *36*, 840–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Shinagawa, K.; Kitadai, Y.; Tanaka, M.; Sumida, T.; Kodama, M.; Higashi, Y.; Tanaka, S.; Yasui, W.; Chayama, K. Mesenchymal Stem Cells Enhance Growth and Metastasis of Colon Cancer. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 2323–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Ma, J.-C.; Sun, X.-W.; Su, H.; Chen, Q.; Guo, T.-K.; Li, Y.; Chen, X.-C.; Guo, J.; Gong, Z.-Q.; Zhao, X.-D.; et al. Fibroblast-Derived CXCL12/SDF-1 α Promotes CXCL6 Secretion and Co-Operatively Enhances Metastatic Potential through the PI3K/Akt/MTOR Pathway in Colon Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 5167–5178. [[CrossRef](#)]
107. Todaro, M.; Gaggianesi, M.; Catalano, V.; Benfante, A.; Iovino, F.; Biffoni, M.; Apuzzo, T.; Sperduti, I.; Volpe, S.; Cocorullo, G.; et al. CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 342–356. [[CrossRef](#)]
108. Cui, B.G.; Karnoub, A.E. Mesenchymal Stem Cells in Tumor Development. *Cell Adh. Migr.* **2012**, *6*, 220–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

109. Erreni, M.; Bianchi, P.; Laghi, L.; Miolo, M.; Fabbri, M.; Locati, M.; Mantovani, A.; Allavena, P. Expression of Chemokines and Chemokine Receptors in Human Colon Cancer. *Meth. Enzymol.* **2009**, *460*, 105–121. [[CrossRef](#)]
110. 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. 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.* **2014**, *348*, 77–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Oladipo, O.; Conlon, S.; O’Grady, A.; Purcell, C.; Wilson, C.; Maxwell, P.J.; Johnston, P.G.; Stevenson, M.; Kay, E.W.; Wilson, R.H.; et al. The Expression and Prognostic Impact of CXC-Chemokines in Stage II and III Colorectal Cancer Epithelial and Stromal Tissue. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*, 480–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Lourenco, S.; Teixeira, V.H.; Kalber, T.; Jose, R.J.; Floto, R.A.; Janes, S.M. Macrophage Migration Inhibitory Factor–CXCR4 Is the Dominant Chemotactic Axis in Human Mesenchymal Stem Cell Recruitment to Tumors. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 3463–3474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Cojoc, M.; Peitzsch, C.; Trautmann, F.; Polishchuk, L.; Telegeev, G.D.; Dubrovskaya, A. Emerging Targets in Cancer Management: Role of the CXCL12/CXCR4 Axis. *Onco Targets* **2013**, *6*, 1347–1361. [[CrossRef](#)]
114. Mishra, P.; Banerjee, D.; Ben-Baruch, A. Chemokines at the Crossroads of Tumor-Fibroblast Interactions That Promote Malignancy. *J. Leukoc. Biol.* **2011**, *89*, 31–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Gassmann, P.; Haier, J.; Schlüter, K.; Domikowsky, B.; Wendel, C.; Wiesner, U.; Kubitz, R.; Engers, R.; Schneider, S.W.; Homey, B.; et al. CXCR4 Regulates the Early Extravasation of Metastatic Tumor Cells in Vivo. *Neoplasia* **2009**, *11*, 651–661. [[CrossRef](#)]
116. Yang, J.; Li, Y.-N.; Pan, T.; Miao, R.-R.; Zhang, Y.-Y.; Wu, S.-H.; Qu, X.; Cui, S.-X. Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3) Induces the Perturbation of RRNA Biogenesis in Colonic Cells: A Novel Mechanism of Colorectal Tumorigenesis. *bioRxiv* **2021**. Posted 2 September 2021. [[CrossRef](#)]
117. 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. CXCR7 (RDC1) Promotes Breast and Lung Tumor Growth in Vivo and Is Expressed on Tumor-Associated Vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15735–15740. [[CrossRef](#)]
118. Salmaggi, A.; Maderna, E.; Calatozzolo, C.; Gaviani, P.; Canazza, A.; Milanese, I.; Silvani, A.; DiMeco, F.; Carbone, A.; Pollo, B. CXCL12, CXCR4 and CXCR7 Expression in Brain Metastases. *Cancer Biol.* **2009**, *8*, 1608–1614. [[CrossRef](#)]
119. Mitchell, A.; Hasanali, S.L.; Morera, D.S.; Baskar, R.; Wang, X.; Khan, R.; Talukder, A.; Li, C.S.; Manoharan, M.; Jordan, A.R.; et al. A Chemokine/Chemokine Receptor Signature Potentially Predicts Clinical Outcome in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Biomark* **2019**, *26*, 291–301. [[CrossRef](#)]
120. Stanisavljević, L.; Aßmus, J.; Storli, K.E.; Leh, S.M.; Dahl, O.; Myklebust, M.P. CXCR4, CXCL12 and the Relative CXCL12-CXCR4 Expression as Prognostic Factors in Colon Cancer. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 7441–7452. [[CrossRef](#)]
121. Li, Y.-P.; Pang, J.; Gao, S.; Bai, P.-Y.; Wang, W.; Kong, P.; Cui, Y. Role of CXCR4 and SDF1 as Prognostic Factors for Survival and the Association with Clinicopathology in Colorectal Cancer: A Systematic Meta-Analysis. *Tumour Biol.* **2017**, *39*, 1010428317706206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. 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. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Med.* **2013**, *10*, e1001453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Fushimi, T.; O’Connor, T.P.; Crystal, R.G. Adenoviral Gene Transfer of Stromal Cell-Derived Factor-1 to Murine Tumors Induces the Accumulation of Dendritic Cells and Suppresses Tumor Growth. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3513–3522. [[CrossRef](#)]
124. Galon, J.; Mlecnik, B.; Bindea, G.; Angell, H.K.; Berger, A.; Lagorce, C.; Lugli, A.; Zlobec, I.; Hartmann, A.; Bifulco, C.; et al. Towards the Introduction of the “Immunoscore” in the Classification of Malignant Tumours. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 199–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Pagès, F.; Kirilovsky, A.; Mlecnik, B.; Asslaber, M.; Tosolini, M.; Bindea, G.; Lagorce, C.; Wind, P.; Marliot, F.; Bruneval, P.; et al. In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 5944–5951. [[CrossRef](#)]
126. Prall, F.; Dührkop, T.; Weirich, V.; Ostwald, C.; Lenz, P.; Nizze, H.; Barten, M. Prognostic Role of CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Stage III Colorectal Cancer with and without Microsatellite Instability. *Hum. Pathol.* **2004**, *35*, 808–816. [[CrossRef](#)]
127. Chiba, T.; Ohtani, H.; Mizoi, T.; Naito, Y.; Sato, E.; Nagura, H.; Ohuchi, A.; Ohuchi, K.; Shiiba, K.; Kurokawa, Y.; et al. Intraepithelial CD8+ T-Cell-Count Becomes a Prognostic Factor after a Longer Follow-up Period in Human Colorectal Carcinoma: Possible Association with Suppression of Micrometastasis. *Br. J. Cancer* **2004**, *91*, 1711–1717. [[CrossRef](#)]
128. Lalos, A.; Tülek, A.; Tosti, N.; Mechera, R.; Wilhelm, A.; Soysal, S.; Daester, S.; Kancherla, V.; Weixler, B.; Spagnoli, G.C.; et al. Prognostic Significance of CD8+ T-Cells Density in Stage III Colorectal Cancer Depends on SDF-1 Expression. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 775. [[CrossRef](#)]
129. Lv, S.; Yang, Y.; Kwon, S.; Han, M.; Zhao, F.; Kang, H.; Dai, C.; Wang, R. The Association of CXCR4 Expression with Prognosis and Clinicopathological Indicators in Colorectal Carcinoma Patients: A Meta-Analysis. *Histopathology* **2014**, *64*, 701–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Li, L.-N.; Jiang, K.-T.; Tan, P.; Wang, A.-H.; Kong, Q.-Y.; Wang, C.-Y.; Lu, H.-R.; Wang, J. Prognosis and Clinicopathology of CXCR4 in Colorectal Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2015**, *16*, 4077–4080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Jiang, Q.; Sun, Y.; Liu, X. CXCR4 as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Cancer: A Meta-Analysis. *Biomarkers* **2019**, *24*, 510–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

132. Ottaiano, A.; Scala, S.; Normanno, N.; Botti, G.; Tatangelo, F.; Di Mauro, A.; Capozzi, M.; Facchini, S.; Tafuto, S.; Nasti, G. Prognostic and Predictive Role of CXC Chemokine Receptor 4 in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2020**, *28*, 755–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Yopp, A.C.; Shia, J.; Butte, J.M.; Allen, P.J.; Fong, Y.; Jarnagin, W.R.; DeMatteo, R.P.; D’Angelica, M.I. CXCR4 Expression Predicts Patient Outcome and Recurrence Patterns after Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. *Ann. Surg. Oncol.* **2012**, *19* (Suppl. S3), S339–S346. [[CrossRef](#)]
134. D’Alterio, C.; Nasti, G.; Polimeno, M.; Ottaiano, A.; Conson, M.; Circelli, L.; Botti, G.; Scognamiglio, G.; Santagata, S.; De Divitiis, C.; et al. CXCR4-CXCL12-CXCR7, TLR2-TLR4, and PD-1/PD-L1 in Colorectal Cancer Liver Metastases from Neoadjuvant-Treated Patients. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1254313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Alamo, P.; Gallardo, A.; Di Nicolantonio, F.; Pavón, M.A.; Casanova, I.; Trias, M.; Manges, M.A.; Lopez-Pousa, A.; Villaverde, A.; Vázquez, E.; et al. Higher Metastatic Efficiency of KRas G12V than KRas G13D in a Colorectal Cancer Model. *FASEB J.* **2015**, *29*, 464–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Nagasawa, S.; Tsuchida, K.; Shiozawa, M.; Hiroshima, Y.; Kimura, Y.; Hashimoto, I.; Watanabe, H.; Kano, K.; Numata, M.; Aoyama, T.; et al. Clinical Significance of Chemokine Receptor CXCR4 and CCR7 mRNA Expression in Patients With Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **2021**, *41*, 4489–4495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Jiao, X.; Shu, G.; Liu, H.; Zhang, Q.; Ma, Z.; Ren, C.; Guo, H.; Shi, J.; Liu, J.; Zhang, C.; et al. The Diagnostic Value of Chemokine/Chemokine Receptor Pairs in Hepatocellular Carcinoma and Colorectal Liver Metastasis. *J. Histochem. Cytochem.* **2019**, *67*, 299–308. [[CrossRef](#)]
138. Xu, F.; Wang, F.; Di, M.; Huang, Q.; Wang, M.; Hu, H.; Jin, Y.; Dong, J.; Lai, M. Classification Based on the Combination of Molecular and Pathologic Predictors Is Superior to Molecular Classification on Prognosis in Colorectal Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5082–5088. [[CrossRef](#)]
139. O’Brien, C.A.; Pollett, A.; Gallinger, S.; Dick, J.E. A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice. *Nature* **2007**, *445*, 106–110. [[CrossRef](#)]
140. Ricci-Vitiani, L.; Lombardi, D.G.; Pilozzi, E.; Biffoni, M.; Todaro, M.; Peschle, C.; De Maria, R. Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells. *Nature* **2007**, *445*, 111–115. [[CrossRef](#)]
141. Shmelkov, S.V.; Butler, J.M.; Hooper, A.T.; Hormigo, A.; Kushner, J.; Milde, T.; St Clair, R.; Baljevic, M.; White, I.; Jin, D.K.; et al. CD133 Expression Is Not Restricted to Stem Cells, and Both CD133+ and CD133- Metastatic Colon Cancer Cells Initiate Tumors. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 2111–2120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Yu, X.; Lin, Y.; Yan, X.; Tian, Q.; Li, L.; Lin, E.H. CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **2011**, *7*, 253–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Zhang, S.; Han, Z.; Jing, Y.; Tao, S.; Li, T.; Wang, H.; Wang, Y.; Li, R.; Yang, Y.; Zhao, X.; et al. CD133(+)CXCR4(+) Colon Cancer Cells Exhibit Metastatic Potential and Predict Poor Prognosis of Patients. *BMC Med.* **2012**, *10*, 85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Silinsky, J.; Grimes, C.; Driscoll, T.; Green, H.; Cordova, J.; Davis, N.K.; Li, L.; Margolin, D.A. CD 133+ and CXCR4+ Colon Cancer Cells as a Marker for Lymph Node Metastasis. *J. Surg. Res.* **2013**, *185*, 113–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Wu, W.; Cao, J.; Ji, Z.; Wang, J.; Jiang, T.; Ding, H. Co-Expression of Lgr5 and CXCR4 Characterizes Cancer Stem-like Cells of Colorectal Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 81144–81155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Shi, Y.; Riese, D.J.; Shen, J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front. Pharm.* **2020**, *11*, 574667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Wang, M.; Yang, X.; Wei, M.; Wang, Z. The Role of CXCL12 Axis in Lung Metastasis of Colorectal Cancer. *J. Cancer* **2018**, *9*, 3898–3903. [[CrossRef](#)]
148. Yamada, S.; Shimada, M.; Utsunomiya, T.; Morine, Y.; Imura, S.; Ikemoto, T.; Mori, H.; Arakawa, Y.; Kanamoto, M.; Iwahashi, S.; et al. CXC Receptor 4 and Stromal Cell-Derived Factor 1 in Primary Tumors and Liver Metastases of Colorectal Cancer. *J. Surg. Res.* **2014**, *187*, 107–112. [[CrossRef](#)]
149. Rubie, C.; Kollmar, O.; Frick, V.O.; Wagner, M.; Brittner, B.; Gräber, S.; Schilling, M.K. Differential CXC Receptor Expression in Colorectal Carcinomas. *Scand. J. Immunol.* **2008**, *68*, 635–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Sherif, M.F.; Ismail, I.M.; Ata, S.M.S. Expression of CXCR7 in Colorectal Adenoma and Adenocarcinoma: Correlation with Clinicopathological Parameters. *Ann. Diagn. Pathol.* **2020**, *49*, 151621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Kheirelseid, E.A.H.; Miller, N.; Chang, K.H.; Nugent, M.; Kerin, M.J. Clinical Applications of Gene Expression in Colorectal Cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* **2013**, *4*, 144–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Selvaraj, U.M.; Ortega, S.B.; Hu, R.; Gilchrist, R.; Kong, X.; Partin, A.; Plautz, E.J.; Klein, R.S.; Gidday, J.M.; Stowe, A.M. Preconditioning-Induced CXCL12 Upregulation Minimizes Leukocyte Infiltration after Stroke in Ischemia-Tolerant Mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 801–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Ceradini, D.J.; Kulkarni, A.R.; Callaghan, M.J.; Tepper, O.M.; Bastidas, N.; Kleinman, M.E.; Capla, J.M.; Galiano, R.D.; Levine, J.P.; Gurtner, G.C. Progenitor Cell Trafficking Is Regulated by Hypoxic Gradients through HIF-1 Induction of SDF-1. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 858–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Karshovska, E.; Zerneck, A.; Sevilimis, G.; Millet, A.; Hristov, M.; Cohen, C.D.; Schmid, H.; Krotz, F.; Sohn, H.-Y.; Klaus, V.; et al. Expression of HIF-1alpha in Injured Arteries Controls SDF-1alpha Mediated Neointima Formation in Apolipoprotein E Deficient Mice. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 2540–2547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

155. Hitchon, C.; Wong, K.; Ma, G.; Reed, J.; Lyttle, D.; El-Gabalawy, H. Hypoxia-Induced Production of Stromal Cell-Derived Factor 1 (CXCL12) and Vascular Endothelial Growth Factor by Synovial Fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46*, 2587–2597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Yadav, S.S.; Prasad, S.B.; Prasad, C.B.; Pandey, L.K.; Pradhan, S.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Seo, J.; Kim, Y.-O.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **2007**, *128*, 693–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Wendt, M.K.; Drury, L.J.; Vongsa, R.A.; Dwinell, M.B. Constitutive CXCL12 Expression Induces Anoikis in Colorectal Carcinoma Cells. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 508–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Halees, A.S.; El-Badrawi, R.; Khabar, K.S.A. ARED Organism: Expansion of ARED Reveals AU-Rich Element Cluster Variations between Human and Mouse. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D137–D140. [[CrossRef](#)]
161. Al-Souhibani, N.; Al-Ghamdi, M.; Al-Ahmadi, W.; Khabar, K.S.A. Posttranscriptional Control of the Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Cancer Cells. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 1983–1992. [[CrossRef](#)]
162. Semenza, G.L. Life with Oxygen. *Science* **2007**, *318*, 62–64. [[CrossRef](#)]
163. Zong, S.; Li, W.; Li, H.; Han, S.; Liu, S.; Shi, Q.; Hou, F. Identification of Hypoxia-Regulated Angiogenic Genes in Colorectal Cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 461–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Zhong, H.; De Marzo, A.M.; Laughner, E.; Lim, M.; Hilton, D.A.; Zagzag, D.; Buechler, P.; Isaacs, W.B.; Semenza, G.L.; Simons, J.W. Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5830–5835. [[PubMed](#)]
165. Harris, A.L. Hypoxia—a Key Regulatory Factor in Tumour Growth. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 38–47. [[CrossRef](#)]
166. Wu, Y.; Jin, M.; Xu, H.; Shimin, Z.; He, S.; Wang, L.; Zhang, Y. Clinicopathologic Significance of HIF-1 α , CXCR4, and VEGF Expression in Colon Cancer. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, *2010*, 537531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Korbecki, J.; Simińska, D.; Ga, ssowska-Dobrowolska, M.; Listos, J.; Gutowska, I.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF-KB Activation: A Review of the Molecular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10701. [[CrossRef](#)]
168. Schioppa, T.; Uranchimeg, B.; Sacconi, A.; Biswas, S.K.; Doni, A.; Rapisarda, A.; Bernasconi, S.; Sacconi, S.; Nebuloni, M.; Vago, L.; et al. Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1391–1402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Staller, P.; Sulitkova, J.; Lisztwan, J.; Moch, H.; Oakeley, E.J.; Krek, W. Chemokine Receptor CXCR4 Downregulated by von Hippel-Lindau Tumour Suppressor PVHL. *Nature* **2003**, *425*, 307–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Risbud, M.V.; Fertala, J.; Vresilovic, E.J.; Albert, T.J.; Shapiro, I.M. Nucleus Pulposus Cells Upregulate PI3K/Akt and MEK/ERK Signaling Pathways under Hypoxic Conditions and Resist Apoptosis Induced by Serum Withdrawal. *Spine* **2005**, *30*, 882–889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Dai, T.; Hu, Y.; Zheng, H. Hypoxia Increases Expression of CXC Chemokine Receptor 4 via Activation of PI3K/Akt Leading to Enhanced Migration of Endothelial Progenitor Cells. *Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.* **2017**, *21*, 1820–1827.
172. Treins, C.; Giorgetti-Peraldi, S.; Murdaca, J.; Semenza, G.L.; Van Obberghen, E. Insulin Stimulates Hypoxia-Inducible Factor 1 through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Target of Rapamycin-Dependent Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 27975–27981. [[CrossRef](#)]
173. Calin, G.A.; Croce, C.M. MicroRNA Signatures in Human Cancers. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 857–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Xiong, W.-C.; Han, N.; Ping, G.-F.; Zheng, P.-F.; Feng, H.-L.; Qin, L.; He, P. MicroRNA-9 Functions as a Tumor Suppressor in Colorectal Cancer by Targeting CXCR4. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2018**, *11*, 526–536. [[PubMed](#)]
175. Liu, Y.; Zhou, Y.; Feng, X.; An, P.; Quan, X.; Wang, H.; Ye, S.; Yu, C.; He, Y.; Luo, H. MicroRNA-126 Functions as a Tumor Suppressor in Colorectal Cancer Cells by Targeting CXCR4 via the AKT and ERK1/2 Signaling Pathways. *Int. J. Oncol.* **2014**, *44*, 203–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Liu, Y.; Zhou, Y.; Feng, X.; Yang, P.; Yang, J.; An, P.; Wang, H.; Ye, S.; Yu, C.; He, Y.; et al. Low Expression of MicroRNA-126 Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **2014**, *53*, 358–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Fang, Y.; Sun, B.; Li, Z.; Chen, Z.; Xiang, J. MiR-622 Inhibited Colorectal Cancer Occurrence and Metastasis by Suppressing K-Ras. *Mol. Carcinog.* **2016**, *55*, 1369–1377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Fang, Y.; Sun, B.; Wang, J.; Wang, Y. MiR-622 Inhibits Angiogenesis by Suppressing the CXCR4-VEGFA Axis in Colorectal Cancer. *Gene* **2019**, *699*, 37–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Duan, F.-T.; Qian, F.; Fang, K.; Lin, K.-Y.; Wang, W.-T.; Chen, Y.-Q. MiR-133b, a Muscle-Specific MicroRNA, Is a Novel Prognostic Marker That Participates in the Progression of Human Colorectal Cancer via Regulation of CXCR4 Expression. *Mol. Cancer* **2013**, *12*, 164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Bao, W.; Fu, H.-J.; Xie, Q.-S.; Wang, L.; Zhang, R.; Guo, Z.-Y.; Zhao, J.; Meng, Y.-L.; Ren, X.-L.; Wang, T.; et al. HER2 Interacts with CD44 to Up-Regulate CXCR4 via Epigenetic Silencing of MicroRNA-139 in Gastric Cancer Cells. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 2076–2087.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Zhao, Q.; Li, J.-Y.; Zhang, J.; Long, Y.-X.; Li, Y.-J.; Guo, X.-D.; Wei, M.-N.; Liu, W.-J. Role of Visfatin in Promoting Proliferation and Invasion of Colorectal Cancer Cells by Downregulating SDF-1/CXCR4-Mediated MiR-140-3p Expression. *Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.* **2020**, *24*, 5367–5377. [[CrossRef](#)]

182. Yu, X.; Shi, W.; Zhang, Y.; Wang, X.; Sun, S.; Song, Z.; Liu, M.; Zeng, Q.; Cui, S.; Qu, X. CXCL12/CXCR4 Axis Induced MiR-125b Promotes Invasion and Confers 5-Fluorouracil Resistance through Enhancing Autophagy in Colorectal Cancer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Stuckel, A.J.; Zhang, W.; Zhang, X.; Zeng, S.; Dougherty, U.; Mustafi, R.; Zhang, Q.; Perreand, E.; Khare, T.; Joshi, T.; et al. Enhanced CXCR4 Expression Associates with Increased Gene Body 5-Hydroxymethylcytosine Modification but Not Decreased Promoter Methylation in Colorectal Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 539. [[CrossRef](#)]
184. Branco, M.R.; Ficz, G.; Reik, W. Uncovering the Role of 5-Hydroxymethylcytosine in the Epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *13*, 7–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Li, W.; Zhang, X.; Lu, X.; You, L.; Song, Y.; Luo, Z.; Zhang, J.; Nie, J.; Zheng, W.; Xu, D.; et al. 5-Hydroxymethylcytosine Signatures in Circulating Cell-Free DNA as Diagnostic Biomarkers for Human Cancers. *Cell Res.* **2017**, *27*, 1243–1257. [[CrossRef](#)]
186. Krook, M.A.; Nicholls, L.A.; Scannell, C.A.; Chugh, R.; Thomas, D.G.; Lawlor, E.R. Stress-Induced CXCR4 Promotes Migration and Invasion of Ewing Sarcoma. *Mol. Cancer Res.* **2014**, *12*, 953–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Krook, M.A.; Hawkins, A.G.; Patel, R.M.; Lucas, D.R.; Van Noord, R.; Chugh, R.; Lawlor, E.R. A Bivalent Promoter Contributes to Stress-Induced Plasticity of CXCR4 in Ewing Sarcoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 61775–61788. [[CrossRef](#)]
188. Urosevic, J.; Blasco, M.T.; Llorente, A.; Bellmunt, A.; Berenguer-Llargo, A.; Guiu, M.; Cañellas, A.; Fernandez, E.; Burkov, I.; Clapés, M.; et al. ERK1/2 Signaling Induces Upregulation of ANGPT2 and CXCR4 to Mediate Liver Metastasis in Colon Cancer. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 4668–4680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Li, B.; Huang, Q.; Wei, G.-H. The Role of HOX Transcription Factors in Cancer Predisposition and Progression. *Cancers* **2019**, *11*, 528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Feng, W.; Huang, W.; Chen, J.; Qiao, C.; Liu, D.; Ji, X.; Xie, M.; Zhang, T.; Wang, Y.; Sun, M.; et al. CXCL12-Mediated HOXB5 Overexpression Facilitates Colorectal Cancer Metastasis through Transactivating CXCR4 and ITGB3. *Theranostics* **2021**, *11*, 2612–2633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Esencay, M.; Sarfraz, Y.; Zagzag, D. CXCR7 Is Induced by Hypoxia and Mediates Glioma Cell Migration towards SDF-1 α . *BMC Cancer* **2013**, *13*, 347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Nosh, K.; Kure, S.; Irahara, N.; Shima, K.; Baba, Y.; Spiegelman, D.; Meyerhardt, J.A.; Giovannucci, E.L.; Fuchs, C.S.; Ogino, S. A Prospective Cohort Study Shows Unique Epigenetic, Genetic, and Prognostic Features of Synchronous Colorectal Cancers. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 1609–1620.e1-3. [[CrossRef](#)]
193. Bagci, B.; Sari, M.; Karadayi, K.; Turan, M.; Ozdemir, O.; Bagci, G. KRAS, BRAF Oncogene Mutations and Tissue Specific Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor SFRP2, DAPK1, MGMT, HIC1 and P16 Genes in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Biomark.* **2016**, *17*, 133–143. [[CrossRef](#)]
194. Van Rechem, C.; Rood, B.R.; Touka, M.; Pinte, S.; Jenal, M.; Guérardel, C.; Ramsey, K.; Monté, D.; Bégue, A.; Tschan, M.P.; et al. Scavenger Chemokine (CXC Motif) Receptor 7 (CXCR7) Is a Direct Target Gene of HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1). *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 20927–20935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Zhou, S.-M.; Zhang, F.; Chen, X.-B.; Jun, C.-M.; Jing, X.; Wei, D.-X.; Xia, Y.; Zhou, Y.-B.; Xiao, X.-Q.; Jia, R.-Q.; et al. MiR-100 Suppresses the Proliferation and Tumor Growth of Esophageal Squamous Cancer Cells via Targeting CXCR7. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 3453–3459. [[CrossRef](#)]
196. Liu, L.; Zhao, X.; Zhu, X.; Zhong, Z.; Xu, R.; Wang, Z.; Cao, J.; Hou, Y. Decreased Expression of MiR-430 Promotes the Development of Bladder Cancer via the Upregulation of CXCR7. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *8*, 140–146. [[CrossRef](#)]
197. Ge, Y.; Shu, J.; Shi, G.; Yan, F.; Li, Y.; Ding, H. MiR-100 Suppresses the Proliferation, Invasion, and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells via Targeting CXCR7. *J. Immunol. Res.* **2021**, *2021*, 9920786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Cao, Y.; Song, J.; Ge, J.; Song, Z.; Chen, J.; Wu, C. MicroRNA-100 Suppresses Human Gastric Cancer Cell Proliferation by Targeting CXCR7. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 453–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Kollmar, O.; Rupertus, K.; Scheuer, C.; Nickels, R.M.; Haberl, G.C.Y.; Tilton, B.; Menger, M.D.; Schilling, M.K. CXCR4 and CXCR7 Regulate Angiogenesis and CT26.WT Tumor Growth Independent from SDF-1. *Int. J. Cancer.* **2010**, *126*, 1302–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Kollmar, O.; Rupertus, K.; Scheuer, C.; Junker, B.; Tilton, B.; Schilling, M.K.; Menger, M.D. Stromal Cell-Derived Factor-1 Promotes Cell Migration and Tumor Growth of Colorectal Metastasis. *Neoplasia* **2007**, *9*, 862–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Picardo, A.; Karpoff, H.M.; Ng, B.; Lee, J.; Brennan, M.F.; Fong, Y. Partial Hepatectomy Accelerates Local Tumor Growth: Potential Roles of Local Cytokine Activation. *Surgery* **1998**, *124*, 57–64. [[CrossRef](#)]
202. Rashidi, B.; An, Z.; Sun, F.X.; Sasson, A.; Gamagammi, R.; Moossa, A.R.; Hoffman, R.M. Minimal Liver Resection Strongly Stimulates the Growth of Human Colon Cancer in the Liver of Nude Mice. *Clin. Exp. Metastasis* **1999**, *17*, 497–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Roy, I.; Zimmerman, N.P.; Mackinnon, A.C.; Tsai, S.; Evans, D.B.; Dwinell, M.B. CXCL12 Chemokine Expression Suppresses Human Pancreatic Cancer Growth and Metastasis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Brand, S.; Dambacher, J.; Beigel, F.; Olszak, T.; Diebold, J.; Otte, J.-M.; Göke, B.; Eichhorst, S.T. CXCR4 and CXCL12 Are Inversely Expressed in Colorectal Cancer Cells and Modulate Cancer Cell Migration, Invasion and MMP-9 Activation. *Exp. Cell Res.* **2005**, *310*, 117–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

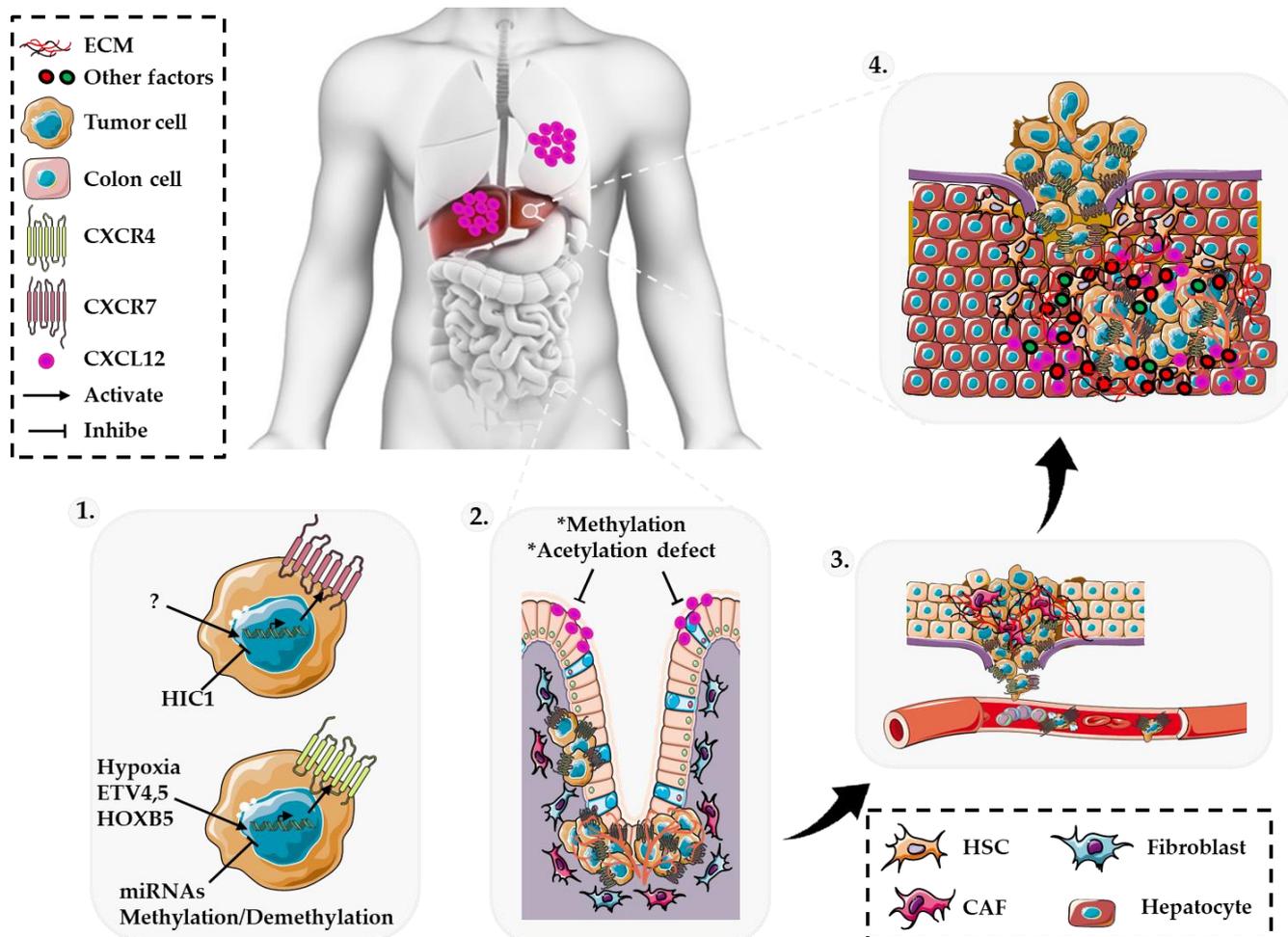
205. Hongo, K.; Tsuno, N.H.; Kawai, K.; Sasaki, K.; Kaneko, M.; Hiyoshi, M.; Murono, K.; Tada, N.; Nirei, T.; Sunami, E.; et al. Hypoxia Enhances Colon Cancer Migration and Invasion through Promotion of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Surg. Res.* **2013**, *182*, 75–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Song, Z.-Y.; Gao, Z.-H.; Chu, J.-H.; Han, X.-Z.; Qu, X.-J. Downregulation of the CXCR4/CXCL12 Axis Blocks the Activation of the Wnt/ β -Catenin Pathway in Human Colon Cancer Cells. *Biomed. Pharm.* **2015**, *71*, 46–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Song, Z.-Y.; Wang, F.; Cui, S.-X.; Qu, X.-J. Knockdown of CXCR4 Inhibits CXCL12-Induced Angiogenesis in HUVECs through Downregulation of the MAPK/ERK and PI3K/AKT and the Wnt/ β -Catenin Pathways. *Cancer Investig.* **2018**, *36*, 10–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Zheng, F.; Zhang, Z.; Flamini, V.; Jiang, W.G.; Cui, Y. The Axis of CXCR4/SDF-1 Plays a Role in Colon Cancer Cell Adhesion Through Regulation of the AKT and IGF1R Signalling Pathways. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 4361–4369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Wang, L.; Li, C.-L.; Wang, L.; Yu, W.-B.; Yin, H.-P.; Zhang, G.-Y.; Zhang, L.-F.; Li, S.; Hu, S.-Y. Influence of CXCR4/SDF-1 Axis on E-Cadherin/ β -Catenin Complex Expression in HT29 Colon Cancer Cells. *World J. Gastroenterol.* **2011**, *17*, 625–632. [[CrossRef](#)]
210. Tung, S.-Y.; Chang, S.-F.; Chou, M.-H.; Huang, W.-S.; Hsieh, Y.-Y.; Shen, C.-H.; Kuo, H.-C.; Chen, C.-N. CXCR4 Chemokine Ligand 12/Stromal Cell-Derived Factor-1 Regulates Cell Adhesion in Human Colon Cancer Cells by Induction of Intercellular Adhesion Molecule-1. *J. Biomed. Sci.* **2012**, *19*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. Maeda, K.; Kang, S.-M.; Sawada, T.; Nishiguchi, Y.; Yashiro, M.; Ogawa, Y.; Ohira, M.; Ishikawa, T.; Hirakawa, Y.S.; Chung, K. Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 and Prognosis in Colorectal Cancer. *Oncol. Rep.* **2002**, *9*, 511–514. [[CrossRef](#)]
212. Tan, H.-X.; Gong, W.-Z.; Zhou, K.; Xiao, Z.-G.; Hou, F.-T.; Huang, T.; Zhang, L.; Dong, H.-Y.; Zhang, W.-L.; Liu, Y.; et al. CXCR4/TGF- β 1 Mediated Hepatic Stellate Cells Differentiation into Carcinoma-Associated Fibroblasts and Promoted Liver Metastasis of Colon Cancer. *Cancer Biol.* **2020**, *21*, 258–268. [[CrossRef](#)]
213. Guleng, B.; Tateishi, K.; Ohta, M.; Kanai, F.; Jazag, A.; Ijichi, H.; Tanaka, Y.; Washida, M.; Morikane, K.; Fukushima, Y.; et al. Blockade of the Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCR4 Axis Attenuates in Vivo Tumor Growth by Inhibiting Angiogenesis in a Vascular Endothelial Growth Factor-Independent Manner. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5864–5871. [[CrossRef](#)]
214. Shin, H.-N.; Moon, H.-H.; Ku, J.-L. Stromal Cell-Derived Factor-1 α and Macrophage Migration-Inhibitory Factor Induce Metastatic Behavior in CXCR4-Expressing Colon Cancer Cells. *Int. J. Mol. Med.* **2012**, *30*, 1537–1543. [[CrossRef](#)]
215. Gouveia-Fernandes, S. Colorectal Cancer Aggressiveness Is Related to Fibronectin Over Expression, Driving the Activation of SDF-1: CXCR4 Axis. *Int. J. Cancer Clin. Res.* **2016**, *3*, 1–9. [[CrossRef](#)]
216. Zeelenberg, I.S.; Ruuls-Van Stalle, L.; Roos, E. The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3833–3839. [[PubMed](#)]
217. Matsusue, R.; Kubo, H.; Hisamori, S.; Okoshi, K.; Takagi, H.; Hida, K.; Nakano, K.; Itami, A.; Kawada, K.; Nagayama, S.; et al. Hepatic Stellate Cells Promote Liver Metastasis of Colon Cancer Cells by the Action of SDF-1/CXCR4 Axis. *Ann. Surg. Oncol.* **2009**, *16*, 2645–2653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Wang, H.; Tao, L.; Qi, K.E.; Zhang, H.; Feng, D.; Wei, W.; Kong, H.; Chen, T.; Lin, Q.; Chen, D. CXCR7 Functions in Colon Cancer Cell Survival and Migration. *Exp. Med.* **2015**, *10*, 1720–1724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
219. Murakami, T.; Kawada, K.; Iwamoto, M.; Akagami, M.; Hida, K.; Nakanishi, Y.; Kanda, K.; Kawada, M.; Seno, H.; Taketo, M.M.; et al. The Role of CXCR3 and CXCR4 in Colorectal Cancer Metastasis. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 276–287. [[CrossRef](#)]
220. Li, X.-X.; Zheng, H.-T.; Huang, L.-Y.; Shi, D.-B.; Peng, J.-J.; Liang, L.; Cai, S.-J. Silencing of CXCR7 Gene Represses Growth and Invasion and Induces Apoptosis in Colorectal Cancer through ERK and β -Arrestin Pathways. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 1649–1657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
221. Xu, H.; Wu, Q.; Dang, S.; Jin, M.; Xu, J.; Cheng, Y.; Pan, M.; Wu, Y.; Zhang, C.; Zhang, Y. Alteration of CXCR7 Expression Mediated by TLR4 Promotes Tumor Cell Proliferation and Migration in Human Colorectal Carcinoma. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Zabel, B.A.; Lewén, S.; Berahovich, R.D.; Jaén, J.C.; Schall, T.J. The Novel Chemokine Receptor CXCR7 Regulates Trans-Endothelial Migration of Cancer Cells. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Würth, R.; Bajetto, A.; Harrison, J.K.; Barbieri, F.; Florio, T. CXCL12 Modulation of CXCR4 and CXCR7 Activity in Human Glioblastoma Stem-like Cells and Regulation of the Tumor Microenvironment. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Song, Z.-Y.; Wang, F.; Cui, S.-X.; Gao, Z.-H.; Qu, X.-J. CXCR7/CXCR4 Heterodimer-Induced Histone Demethylation: A New Mechanism of Colorectal Tumorigenesis. *Oncogene* **2019**, *38*, 1560–1575. [[CrossRef](#)]
225. Mc Donnell, S.; Chaudhry, V.; Mansilla-Soto, J.; Zeng, Z.S.; Shu, W.P.; Guillem, J.G. Metastatic and Non-Metastatic Colorectal Cancer (CRC) Cells Induce Host Metalloproteinase Production in Vivo. *Clin. Exp. Metastasis* **1999**, *17*, 341–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Pardo-Cabañas, M.; Molina-Ortiz, I.; Matías-Román, S.; García-Bernal, D.; Carvajal-Vergara, X.; Valle, I.; Pandiella, A.; Arroyo, A.G.; Teixidó, J. Role of Metalloproteinases MMP-9 and MT1-MMP in CXCL12-Promoted Myeloma Cell Invasion across Basement Membranes. *J. Pathol.* **2006**, *208*, 108–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Turunen, S.P.; Tatti-Bugaeva, O.; Lehti, K. Membrane-Type Matrix Metalloproteases as Diverse Effectors of Cancer Progression. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 1974–1988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

228. Halama, N.; Pruefer, U.; Frömming, A.; Beyer, D.; Eulberg, D.; Jungnelius, J.U.B.; Mangasarian, A. Experience with CXCL12 Inhibitor NOX-A12 plus Pembrolizumab in Patients with Microsatellite-Stable, Metastatic Colorectal or Pancreatic Cancer. *JCO* **2019**, *37*, e14143. [[CrossRef](#)]
229. Micallef, I.N.; Stiff, P.J.; Nademanee, A.P.; Maziarz, R.T.; Horwitz, M.E.; Stadtmauer, E.A.; Kaufman, J.L.; McCarty, J.M.; Vargo, R.; Cheverton, P.D.; et al. Plerixafor Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Patients with Non-Hodgkin Lymphoma and Multiple Myeloma: Long-Term Follow-Up Report. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **2018**, *24*, 1187–1195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
230. Micallef, I.N.; Stiff, P.J.; DiPersio, J.F.; Maziarz, R.T.; McCarty, J.M.; Bridger, G.; Calandra, G. Successful Stem Cell Remobilization Using Plerixafor (Mozobil) plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma: Results from the Plerixafor NHL Phase 3 Study Rescue Protocol. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **2009**, *15*, 1578–1586. [[CrossRef](#)]
231. De Clercq, E. The Bicyclam AMD3100 Story. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 581–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
232. De Clercq, E. AMD3100/CXCR4 Inhibitor. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Wang, J.; Tannous, B.A.; Poznansky, M.C.; Chen, H. CXCR4 Antagonist AMD3100 (Plerixafor): From an Impurity to a Therapeutic Agent. *Pharm. Res.* **2020**, *159*, 105010. [[CrossRef](#)]
234. Benedicto, A.; Romayor, I.; Arteta, B. CXCR4 Receptor Blockage Reduces the Contribution of Tumor and Stromal Cells to the Metastatic Growth in the Liver. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 2022–2030. [[CrossRef](#)]
235. Kalatskaya, I.; Berchiche, Y.A.; Gravel, S.; Limberg, B.J.; Rosenbaum, J.S.; Heveker, N. AMD3100 Is a CXCR7 Ligand with Allosteric Agonist Properties. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 1240–1247. [[CrossRef](#)]
236. Li, J.-K.; Yu, L.; Shen, Y.; Zhou, L.-S.; Wang, Y.-C.; Zhang, J.-H. Inhibition of CXCR4 Activity with AMD3100 Decreases Invasion of Human Colorectal Cancer Cells in Vitro. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 2308–2313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Yi, T.; Zhai, B.; Yu, Y.; Kiyotsugu, Y.; Raschle, T.; Eitzkorn, M.; Seo, H.-C.; Nagiec, M.; Luna, R.E.; Reinherz, E.L.; et al. Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveals System-Wide Signaling Pathways Downstream of SDF-1/CXCR4 in Breast Cancer Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E2182–E2190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Jang, Y.-G.; Go, R.-E.; Hwang, K.-A.; Choi, K.-C. Resveratrol Inhibits DHT-Induced Progression of Prostate Cancer Cell Line through Interfering with the AR and CXCR4 Pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *192*, 105406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Wu, B.; Chien, E.Y.T.; Mol, C.D.; Fenalti, G.; Liu, W.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Brooun, A.; Wells, P.; Bi, F.C.; et al. Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. *Science* **2010**, *330*, 1066–1071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
240. Peng, S.-B.; Zhang, X.; Paul, D.; Kays, L.M.; Gough, W.; Stewart, J.; Uhlik, M.T.; Chen, Q.; Hui, Y.-H.; Zamek-Gliszczynski, M.J.; et al. Identification of LY2510924, a Novel Cyclic Peptide CXCR4 Antagonist That Exhibits Antitumor Activities in Solid Tumor and Breast Cancer Metastatic Models. *Mol. Cancer* **2015**, *14*, 480–490. [[CrossRef](#)]
241. Levine, D.; Hellmers, L.; Maresh, G.; Zhang, X.; Moret, R.; Green, H.; Margolin, D.; Li, L. Evaluating the Inhibitory Effects of LY2510924, a Cyclic Peptide CXCR4 Antagonist, in Human Colon Cancer Metastasis Using an Orthotopic Xenograft Model. *J. Am. Coll. Surg.* **2018**, *227*, S64–S65. [[CrossRef](#)]
242. D’Alterio, C.; Zannetti, A.; Trotta, A.M.; Ieranò, C.; Napolitano, M.; Rea, G.; Greco, A.; Maiolino, P.; Albanese, S.; Scognamiglio, G.; et al. New CXCR4 Antagonist Peptide R (Pep R) Improves Standard Therapy in Colorectal Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 1952. [[CrossRef](#)]
243. D’Alterio, C.; Buoncervello, M.; Ieranò, C.; Napolitano, M.; Portella, L.; Rea, G.; Barbieri, A.; Luciano, A.; Scognamiglio, G.; Tatangelo, F.; et al. Targeting CXCR4 Potentiates Anti-PD-1 Efficacy Modifying the Tumor Microenvironment and Inhibiting Neoplastic PD-1. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Joyce, J.A.; Fearon, D.T. T Cell Exclusion, Immune Privilege, and the Tumor Microenvironment. *Science* **2015**, *348*, 74–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Lesokhin, A.M.; Hohl, T.M.; Kitano, S.; Cortez, C.; Hirschhorn-Cymerman, D.; Avogadri, F.; Rizzuto, G.A.; Lazarus, J.J.; Pamer, E.G.; Houghton, A.N.; et al. Monocytic CCR2(+) Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Immune Escape by Limiting Activated CD8 T-Cell Infiltration into the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 876–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Liang, Z.; Zhan, W.; Zhu, A.; Yoon, Y.; Lin, S.; Sasaki, M.; Klapproth, J.-M.A.; Yang, H.; Grossniklaus, H.E.; Xu, J.; et al. Development of a Unique Small Molecule Modulator of CXCR4. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Bissonnette, B.; Dougherty, U.; Mustafi, R.; Haider, H.; Joseph, L.; Souris, J.; Hart, J.; Pewkow, J.; LI, Y. CXCR4 Inhibitor, MSX-122 Suppresses AOM-induced Colon Cancer in Apc+/Min Mouse. *FASEB J.* **2018**, *32*, 677.4. [[CrossRef](#)]
248. Suzui, M.; Okuno, M.; Tanaka, T.; Nakagama, H.; Moriwaki, H. Enhanced Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane in Min Mice Occurs via a Mechanism Independent of Beta-Catenin Mutation. *Cancer Lett.* **2002**, *183*, 31–41. [[CrossRef](#)]
249. 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. A Novel Chemokine Receptor for SDF-1 and I-TAC Involved in Cell Survival, Cell Adhesion, and Tumor Development. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 2201–2213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. 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. Elucidation of CXCR7-Mediated Signaling Events and Inhibition of CXCR4-Mediated Tumor Cell Transendothelial Migration by CXCR7 Ligands. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 3204–3211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
251. Saita, Y.; Kodama, E.; Orita, M.; Kondo, M.; Miyazaki, T.; Sudo, K.; Kajiwara, K.; Matsuoka, M.; Shimizu, Y. Structural Basis for the Interaction of CCR5 with a Small Molecule, Functionally Selective CCR5 Agonist. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 3116–3122. [[CrossRef](#)]

252. Ali, S.; O'Boyle, G.; Mellor, P.; Kirby, J.A. An Apparent Paradox: Chemokine Receptor Agonists Can Be Used for Anti-Inflammatory Therapy. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 1477–1482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Lounsbury, N. Advances in CXCR7 Modulators. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. Gravel, S.; Malouf, C.; Boulais, P.E.; Berchiche, Y.A.; Oishi, S.; Fujii, N.; Leduc, R.; Sinnett, D.; Heveker, N. The Peptidomimetic CXCR4 Antagonist TC14012 Recruits Beta-Arrestin to CXCR7: Roles of Receptor Domains. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37939–37943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
255. Cruz-Orengo, L.; Holman, D.W.; Dorsey, D.; Zhou, L.; Zhang, P.; Wright, M.; McCandless, E.E.; Patel, J.R.; Luker, G.D.; Littman, D.R.; et al. CXCR7 Influences Leukocyte Entry into the CNS Parenchyma by Controlling Abluminal CXCL12 Abundance during Autoimmunity. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 327–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
256. Hachet-Haas, M.; Balabanian, K.; Rohmer, F.; Pons, F.; Franchet, C.; Lecat, S.; Chow, K.Y.C.; Dagher, R.; Gizzi, P.; Didier, B.; et al. Small Neutralizing Molecules to Inhibit Actions of the Chemokine CXCL12. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 23189–23199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
257. Roccaro, A.M.; Sacco, A.; Purschke, W.G.; Moschetta, M.; Buchner, K.; Maasch, C.; Zboralski, D.; Zöllner, S.; Vonhoff, S.; Mishima, Y.; et al. SDF-1 Inhibition Targets the Bone Marrow Niche for Cancer Therapy. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 118–128. [[CrossRef](#)]
258. Hoellenriegel, J.; Zboralski, D.; Maasch, C.; Rosin, N.Y.; Wierda, W.G.; Keating, M.J.; Kruschinski, A.; Burger, J.A. The Spiegelmer NOX-A12, a Novel CXCL12 Inhibitor, Interferes with Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Motility and Causes Chemosensitization. *Blood* **2014**, *123*, 1032–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
259. Zboralski, D.; Hoehlig, K.; Eulberg, D.; Frömmling, A.; Vater, A. Increasing Tumor-Infiltrating T Cells through Inhibition of CXCL12 with NOX-A12 Synergizes with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 950–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
260. Adlere, I.; Caspar, B.; Arimont, M.; Dekkers, S.; Visser, K.; Stuijt, J.; de Graaf, C.; Stocks, M.; Kellam, B.; Briddon, S.; et al. Modulators of CXCR4 and CXCR7/ACKR3 Function. *Mol. Pharm.* **2019**, *96*, 737–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
261. Gómez-España, M.A.; Gallego, J.; González-Flores, E.; Maurel, J.; Páez, D.; Sastre, J.; Aparicio, J.; Benavides, M.; Feliu, J.; Vera, R. SEOM Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer (2018). *Clin. Transl. Oncol.* **2019**, *21*, 46–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
262. Formica, V.; Roselli, M. Targeted Therapy in First Line Treatment of RAS Wild Type Colorectal Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 2871–2874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
263. Khare, T.; Bissonnette, M.; Khare, S. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Colorectal Cancer: Therapeutic Target in Preclinical and Clinical Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
264. Martin, M.; Mayer, I.A.; Walenkamp, A.M.E.; Lapa, C.; Andreeff, M.; Bobirca, A. At the Bedside: Profiling and Treating Patients with CXCR4-Expressing Cancers. *J. Leukoc. Biol.* **2021**, *109*, 953–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
265. Santagata, S.; Ieranò, C.; Trotta, A.M.; Capilungo, A.; Auletta, F.; Guardascione, G.; Scala, S. CXCR4 and CXCR7 Signaling Pathways: A Focus on the Cross-Talk Between Cancer Cells and Tumor Microenvironment. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 591386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
266. Galsky, M.D.; Vogelzang, N.J.; Conkling, P.; Raddad, E.; Polzer, J.; Roberson, S.; Stille, J.R.; Saleh, M.; Thornton, D. A Phase I Trial of LY2510924, a CXCR4 Peptide Antagonist, in Patients with Advanced Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 3581–3588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
267. Suarez-Carmona, M.; Williams, A.; Schreiber, J.; Hohmann, N.; Pruefer, U.; Krauss, J.; Jäger, D.; Frömmling, A.; Beyer, D.; Eulberg, D.; et al. Combined Inhibition of CXCL12 and PD-1 in MSS Colorectal and Pancreatic Cancer: Modulation of the Microenvironment and Clinical Effects. *J. Immunother. Cancer* **2021**, *9*, e002505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
268. Biasci, D.; Smoragiewicz, M.; Connell, C.M.; Wang, Z.; Gao, Y.; Thaventhiran, J.E.D.; Basu, B.; Magiera, L.; Johnson, T.I.; Bax, L.; et al. CXCR4 Inhibition in Human Pancreatic and Colorectal Cancers Induces an Integrated Immune Response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 28960–28970. [[CrossRef](#)]
269. Shimizu, S.; Brown, M.; Sengupta, R.; Penfold, M.E.; Meucci, O. CXCR7 Protein Expression in Human Adult Brain and Differentiated Neurons. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
270. Lubner, S.J.; Uboha, N.V.; Deming, D.A. Primary and Acquired Resistance to Biologic Therapies in Gastrointestinal Cancers. *J. Gastrointest Oncol.* **2017**, *8*, 499–512. [[CrossRef](#)]
271. Gottesman, M.M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
272. Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Davudian, S.; Shirjang, S.; Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 339–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
273. Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* **2001**, *414*, 105–111. [[CrossRef](#)]
274. Margolin, D.A.; Silinsky, J.; Grimes, C.; Spencer, N.; Aycock, M.; Green, H.; Cordova, J.; Davis, N.K.; Driscoll, T.; Li, L. Lymph Node Stromal Cells Enhance Drug-Resistant Colon Cancer Cell Tumor Formation through SDF-1 α /CXCR4 Paracrine Signaling. *Neoplasia* **2011**, *13*, 874–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
275. Margolin, D.A.; Myers, T.; Zhang, X.; Bertoni, D.M.; Reuter, B.A.; Obokhare, I.; Borgovan, T.; Grimes, C.; Green, H.; Driscoll, T.; et al. The Critical Roles of Tumor-Initiating Cells and the Lymph Node Stromal Microenvironment in Human Colorectal Cancer Extranodal Metastasis Using a Unique Humanized Orthotopic Mouse Model. *FASEB J.* **2015**, *29*, 3571–3581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

276. Jin, F.; Ji, H.; Jia, C.; Brockmeier, U.; Hermann, D.M.; Metzen, E.; Zhu, Y.; Chi, B. Synergistic Antitumor Effects of Endostar in Combination with Oxaliplatin via Inhibition of HIF and CXCR4 in the Colorectal Cell Line SW1116. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
277. Heckmann, D.; Maier, P.; Laufs, S.; Wenz, F.; Zeller, W.J.; Fruehauf, S.; Allgayer, H. CXCR4 Expression and Treatment with SDF-1 α or Plerixafor Modulate Proliferation and Chemosensitivity of Colon Cancer Cells. *Transl. Oncol.* **2013**, *6*, 124–132. [[CrossRef](#)]
278. Heckmann, D.; Maier, P.; Laufs, S.; Li, L.; Sleeman, J.P.; Trunk, M.J.; Leupold, J.H.; Wenz, F.; Zeller, W.J.; Fruehauf, S.; et al. The Disparate Twins: A Comparative Study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1 α -Induced Gene Expression, Invasion and Chemosensitivity of Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 604–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Summary



CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis plays a critical role in regulation of tumor growth and metastasis in colon cancer.

1. Colon tumor cells express CXCR4 and CXCR7 receptors which expression is controlled by hypoxia, epigenetic events and/or transcription factors. 2. Upon genomic and epigenetic deregulation, normal colon epithelial cells will lose CXCL12 expression and will transform into tumor cells with the help of several types of cells, such as fibroblasts, cancer-associated fibroblasts (CAF), tumor-associated macrophages (TAM), mesenchymal stem cells (MSC) to participate to the formation of the tumor microenvironment. 3. A subset of CRC cells acquire the capacity to evade from the primary CRC, by morphological changes, migration through the ECM, vessel intravasation, survival in the circulation and extravasation to colonize distant organs like liver or lungs (4). In the liver, hepatic stellate cells (HSC) are present in a quiescent form but upon activation by cancer cells, they will secrete cytokines, growth factors, enzymes such as TGF- β , MMPs, TIMPs, interleukines (colored dots) to stimulate the proliferation, adhesion, and migration of cancer cells. In addition, activated HSC also secrete CXCL12 (pink dots) which activates CXCR4 on colon tumor cells, protecting them from apoptosis and promoting their invasion. In the lungs, the metastatic process is driven by different factors, the primary tumor-secreted IL-6 activated STAT3 in endothelial cells, which then induced the expression of HIF-1, VEGF, and the chemokine ligand 5 (CCL5). IL-6 also induced recruitment of MDSCs and macrophage polarization, which inhibits host immunity.

OBJECTIFS

Le but de mon projet de doctorat a visé à définir le rôle de l'axe CXCL12/CXCR4/CXCR7 dans la migration et la dissémination de cellules tumorales coliques pour développer des métastases à distance, en partant de l'hypothèse que les cellules de la tumeur primaire dépourvues de l'expression de CXCL12 mais exprimant un niveau élevé de récepteurs, vont migrer dans les organes exprimant fortement CXCL12 pour former des métastases préférentiellement dans le foie et les poumons.

Mes travaux ont porté sur trois objectifs :

- Établir un modèle d'étude de cellules invalidées des gènes codant pour les récepteurs dans le but de mieux connaître le rôle respectif de chacun d'eux dans le développement de métastases dans le cancer colique. Pour cela, nous avons choisi de générer des cellules invalidées pour CXCR4 (*Knock Out* ou KO CXCR4), CXCR7 (KO CXCR7) et les deux récepteurs (double KO CXCR4/CXCR7), par la technologie CRISPR-Cas9, en ciblant l'exon 2 des cellules de la lignée colique humaine SW480, qui n'exprime pas CXCL12. Les clones générés ont été caractérisés sur le plan génomique, transcriptionnel et protéique pour valider la perte ou non de l'expression des récepteurs.
- Étudier les conséquences fonctionnelles de la perte d'expression des récepteurs *in vitro*. Ces conséquences ont été évaluées à différentes étapes de la dissémination métastatique, à savoir la prolifération, la migration, l'invasion cellulaires et la migration trans-endothéliale. Certains mécanismes moléculaires par lesquels les récepteurs interviennent dans ces processus ont également été étudiés.
- Déterminer le rôle respectif de CXCR4 et de CXCR7 dans la dissémination métastatique du cancer colique *in vivo*. Cette partie du projet a visé à évaluer les conséquences de la perte d'expression des récepteurs sur la capacité des cellules à former une tumeur primaire dans le côlon et/ou des métastases dans le foie et les poumons, en réalisant des xénogreffes orthotopiques dans le caecum, ou en injectant les cellules dans la veine de la queue de souris immunodéficientes.

PARTIE I

Établissement d'un modèle de cellules invalidées pour les récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7

1. Préambule

De nombreuses études ont rapporté que les récepteurs CXCR4 et CXCR7 de la chimiokine CXCL12 exprimés par un large panel de cancers, sont impliqués dans la progression des tumeurs et de la formation de métastases dans des organes à distance (Burns et al., 2006; Guillemot et al., 2012; Ma et al., 2016). Cependant, les nombreuses divergences quant aux rôles joués par chacun des récepteurs dans la dissémination métastatique, n'ont pas permis de préciser le rôle exact de chaque récepteur.

Pour déterminer leur rôle respectif dans la dissémination métastatique du cancer colique, nous avons utilisé la technologie CRISPR-Cas9 (Ran et al., 2013) dans la lignée colique humaine SW480, pour générer des cellules invalidées pour CXCR4 (KO CXCR4), CXCR7 et CXCR4 et CXCR7 (double KO CXCR4/CXCR7) par excision de l'exon 2.

Le gène de chaque récepteur est composé de deux exons où l'exon 2 correspond à la région codante. L'excision a été réalisée à l'aide de deux ARN guides différents, qui permettent à l'endonucléase Cas9 d'exciser la quasi-totalité de l'exon 2 codant pour les deux récepteurs.

De ce fait, le ciblage doit entraîner la perte de la majorité des acides aminés (336/356 acides aminés) avec seulement les cinq (5) premiers acides aminés restants (MEGIS) spécifiques de la forme B non épissée du récepteur CXCR4. Pour CXCR7, l'excision induite par la Cas9 doit conduire à la perte totale du gène et donc de la protéine puisqu'elle correspond à la traduction intégrale de l'exon 2 (362 acides aminés).

Par ailleurs, parmi les clones générés, trois clones ont été sélectionnés et caractérisés sur le plan génomique, transcriptionnel et protéique pour vérifier l'invalidation des gènes codant pour les récepteurs.

2. Matériels et méthodes

2.1. Invalidation des récepteurs par la technique CRISPR-Cas9

Dans le but de générer des cellules invalidées pour l'un ou les deux récepteurs, nous avons utilisé la technique CRISPR-Cas 9 pour cibler l'exon 2 codant chacun des récepteurs à partir de la lignée colique humaine SW480.

La production des clones invalidés pour CXCR4 et/ou CXCR7 a été effectuée par une ancienne

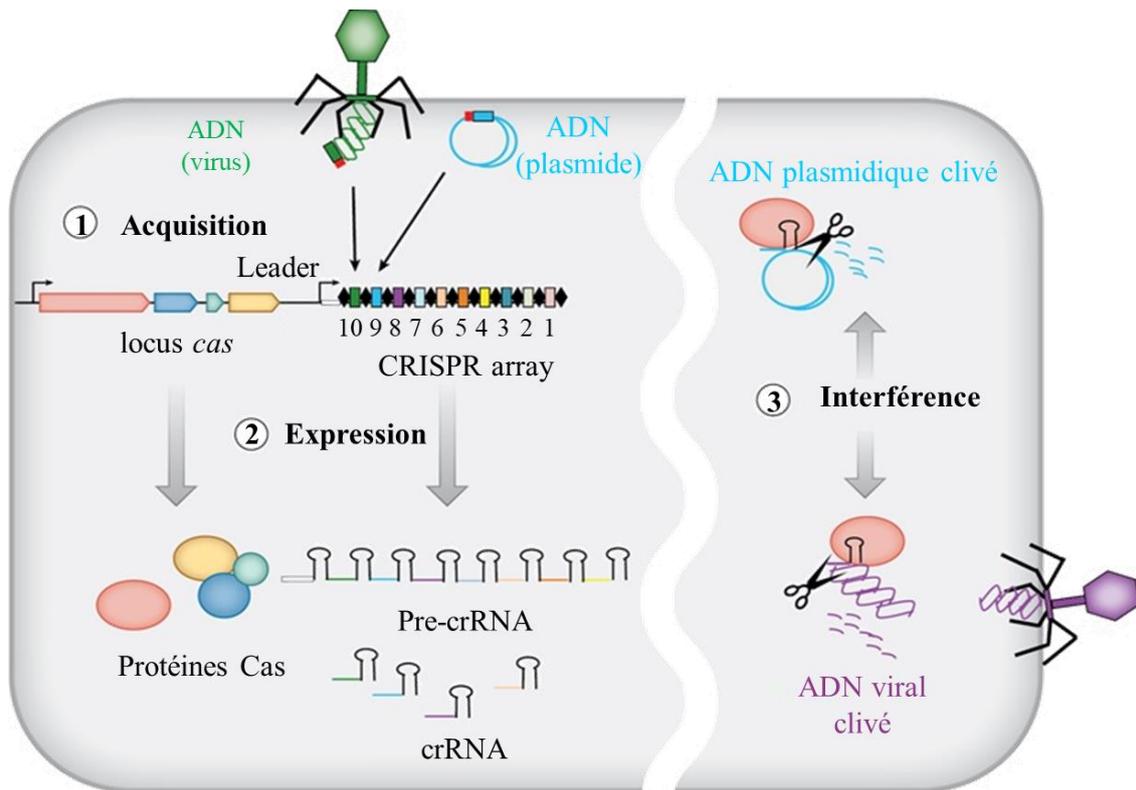


Figure 19. Mécanisme d'action de l'immunité adaptative bactérienne par le système CRISPR-Cas9. En présence d'un virus/ plasmide, la bactérie fragmente l'ADN pour intégrer un fragment "spacer" dans son génome sur le CRISPR Array (étape d'acquisition). Lors d'une réexposition, l'ADN envahissant est maturé en crRNA (l'étape d'expression). Ce crRNA sert de guide au complexe formé par l'ARNg et la nucléase Cas9, pour interférer avec l'ADN envahissant, et entraîner sa dégradation (étape d'interférence). *D'après Carnegie Institution for Science, 2016.*

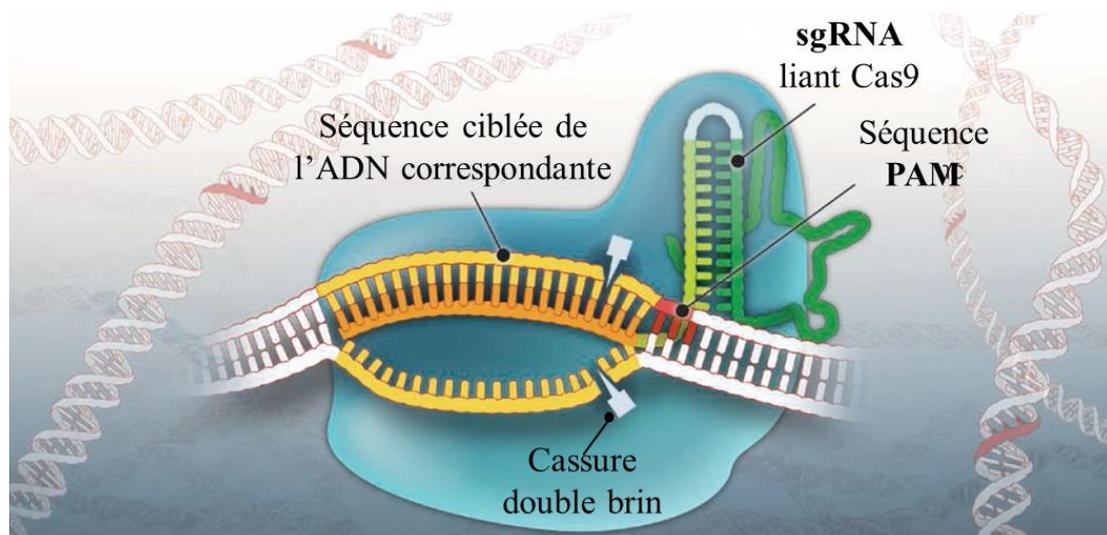


Figure 20. Composition du système CRISPR-Cas9. Le système CRISPR est composé d'un ARNg spécifique à la séquence ciblée et d'une endonucléase Cas9 qui induit la cassure double brin de l'ADN cible en amont des séquences PAM (rouge). L'ARNg est formé d'une séquence conservée (vert) qui permet l'échafaudage entre l'ARNg et une séquence variable spécifique (jaune) qui correspond à la séquence ciblée. *D'après Doudna et Charpentier, 2014.*

doctorante du laboratoire (Radhia Benbrika - Thèse soutenue en 2018) avant que j'intègre l'équipe.

2.1.1. Principe de la technique CRISPR-Cas9

Initialement découvert comme système immunitaire adaptatif des bactéries et des archées face aux infections par des virus ou des acides nucléiques exogènes (**Figure 19**) (Barrangou et al., 2007; Horvath and Barrangou, 2010; Makarova et al., 2015), la majorité de ces organismes ont développé ce système de défense, qui est l'équivalent du mécanisme de l'ARN interférence chez les eucaryotes. Depuis, le système CRISPR-Cas9 pour *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, a été adopté comme technique de la génétique, pour modifier, inactiver, corriger des gènes ou même moduler leur expression de manière spécifique (Doudna and Charpentier, 2014).

Le système CRISPR-Cas9 est composé d'un ARN guide (ARNg), lui-même constitué de l'ARNcr (*crRNA* ou *CRISPR RNA*) et de l'ARNtracr (*tracrRNA* ou *trans-activating crRNA*) qui sert d'échafaudage dans la liaison de l'ARNcr à l'endonucléase Cas-9. Ainsi, cette nouvelle technologie est basée sur sa capacité d'insérer ou d'enlever avec précision par le mode "rechercher-couper-coller", après reconnaissance par homologie, de la séquence d'intérêt grâce à l'ARNcr qui permet à la Cas9, d'induire une cassure double-brin de l'ADN, trois nucléotides en amont de la séquence PAM (*Proto-spacer Adjacent Motif*) (**Figure 20**). Les séquences PAM sont des séquences de 3 à 5 nucléotides localisées en amont de la séquence ciblée et elles sont requises pour sa reconnaissance par le complexe ARNg-Cas9. Cette séquence change en fonction de la source de la nucléase Cas9. Par exemple, la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* reconnaît spécifiquement le motif NGG (tout nucléotide, guanine, guanine) (Tremblay, 2015). Après la cassure dans l'ADN, deux mécanismes de réparation de l'ADN peuvent être utilisés par la cellule (**Figure 21**). Soit le système de recombinaison non-homologue (*Non-Homologous End Joining (NHEJ)*), où la réparation se fait en joignant les deux extrémités de manière aléatoire, induit des erreurs de décalage du cadre de lecture qui conduisent à une inactivation du gène. Soit par une réparation par recombinaison homologue directe (*Homology Directed Repair (HDR)*) qui n'est possible que lors d'une insertion de séquence d'ADN ou d'un gène entier. Par ailleurs, cette séquence à insérer appelée ADN donneur, doit contenir de part et d'autre, des séquences homologues (50-200 bp) à la séquence ciblée (Ran et al., 2013). Par conséquent, les produits de recombinaison souhaitée doivent être analysés pour valider le taux d'efficacité par séquençage.

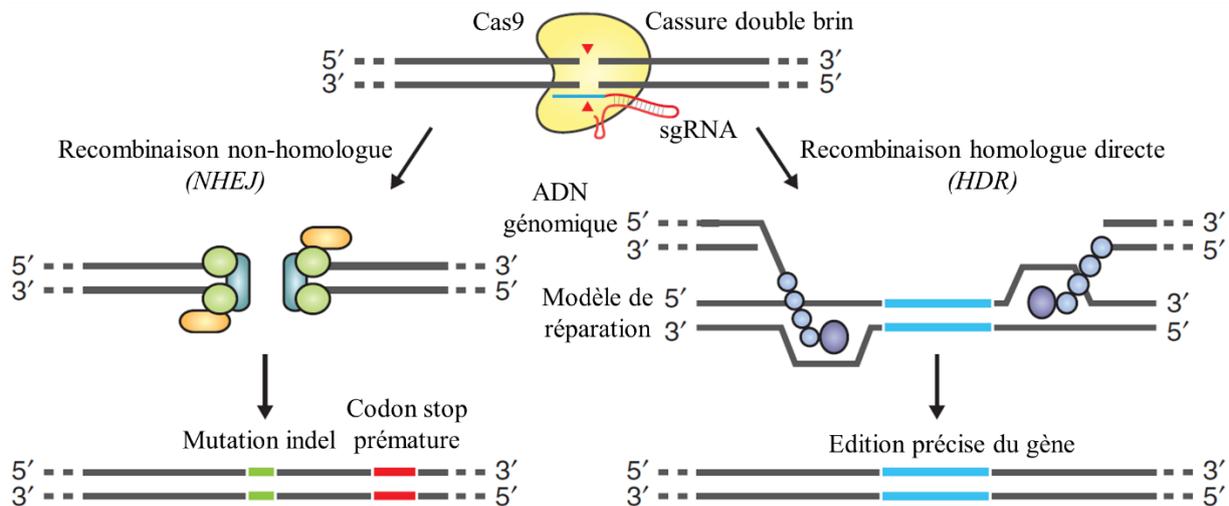


Figure 21. Mécanismes de réparation double-brin dans le système CRISPR-Cas9.

Après la cassure double brin dans l'ADN par Cas9, deux systèmes de réparation de l'ADN sont possibles. Soit une réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ), de façon aléatoire, entraînant des erreurs et une mutation inactive du gène. Soit par recombinaison homologue (HDR) lors de l'insertion d'une séquence ou d'un gène. La séquence de l'ADN à ajouter (donneur) doit être flanqué aux deux extrémités de séquences homologues à celles de l'ADN pour permettre la recombinaison. *D'après Ran et al., 2013.*

Amorces des ARNg	Séquences (5'-3')
ARNg1_CXCR4_Sens	GTTAATGCTTGCTGAAT
ARNg1_CXCR4_Antisens	ATTCAGCAAGCATTAAC
ARNg2_CXCR4_Sens	GCTAACACAGATGTAAAA
ARNg2_CXCR4_Antisens	TTTTACATCTGTGTTAGC
ARNg1_CXCR7_Sens	CAGAACGATGGATCTGCA
ARNg1_CXCR7_Antisens	TGCAGATCCATCGTTCTG
ARNg2_CXCR7_Sens	CACCAAATGATCTGCCC
ARNg2_CXCR7_Antisens	GGGCAGATCATTGGTG

Tableau 2. Séquences des deux ARN guides.

Amorces utilisées pour cibler l'exon 2 codant pour les gènes de CXCR4 et de CXCR7 dans la technique CRISPR-Cas9.

2.1.2. Méthodologie de la technique CRISPR-Cas9 par Radhia Benbrika (Thèse 2018)

Dans le projet, pour procéder à l'invalidation spécifique des gènes de CXCR4 et/ou CXCR7, deux ARNg différents (Tableau 2) ont été utilisés ciblant des séquences dans l'exon 2 codant de chaque récepteur. Ce ciblage permet d'enlever des séquences qui correspondent à la majorité de cet exon.

Les séquences des ARNg ont tout d'abord été clonées dans des plasmides d'expression flanqués des deux côtés des gènes correspondants, de même que le gène de la Cas9. Les vecteurs obtenus ont été ensuite amplifiés dans des bactéries compétentes (Top10) avant de transfecter 4.10^5 cellules de la lignée SW480,ensemencées 24 h plus tôt et incubées pendant 48 h avec les transfectants. En parallèle, deux plasmides contrôles qui témoignent de l'entrée des plasmides ont été utilisés. Ce sont des plasmides exprimant la Cas9 fusionnée à la *Green Fluorescent Protein* (GFP) pour les cellules ayant reçu les plasmides des ARNg dirigés contre CXCR4 (KO CXCR4) ou à la mCherry pour les cellules dans lesquelles CXCR7 a été ciblé (KO CXCR7) et d'un plasmide contrôle négatif n'exprimant que les deux ARNg et la Cas9. 48 h après la transfection, une sélection avec les antibiotiques spécifiques à chaque plasmide est réalisée et au bout de 48 h post-sélection, les clones obtenus sont triés en fonction de l'expression de ces protéines fluorescentes.

2.1.3. Tri cellulaire

À mon arrivée au laboratoire, j'ai commencé à travailler sur quatre (4) des clones cellulaires générés et sélectionnés préalablement en fonction des données génomiques préliminaires. Les cellules de ces clones ont été triées à raison d'une cellule/puits, sur la base de la présence ou pas de l'expression protéique afin d'isoler spécifiquement les différentes populations *knock-out* pour l'un ou les deux récepteurs, le tri étant réalisé en collaboration avec Claudine EBEL sur la plateforme du tri cellulaire à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Strasbourg.

2.2. Lignée et culture cellulaire

La lignée colique humaine SW480 sauvage (SW480 WT) provient de l'ATCC (*American Type Culture Collection*). Les cellules SW480 WT et des clones générés (Clone 9-1, Clone 9-3, Clone 30-3) sont cultivés dans du milieu *Dulbecco Modified Essential Medium* (DMEM 4,5 g/L, Dutcher/Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal inactivé (SVF), avec 100 U/mL et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Dominique Dutcher/Gibco) et maintenus

Amorces de PCR génomique	Séquences (5'-3')
CXCR4_Fwd1	TGGGGAGGAGAGTTGTAGGATT
CXCR4_Fwd2	GAAACCCTCAGCGTCTCAGT
CXCR4_Fwd3	GTTGGCTGCCTTACTACATTGG
CXCR4_Rev1	GAAGCATGACGGACAAGTACAG
CXCR4_Rev2	TTGCTGTATGTCTCGTGGTAGGA
CXCR4_Rev3	CTGTAGAAAAGGGAAGTGAAC
CXCR7_Fwd1	GCCCCTGTACTGTGTTGATTTC
CXCR7_Fwd2	CATCTTCTCCATCCTGCACTACAT
CXCR7_Fwd3	GCCTTGAAAAGCATTTTTG
CXCR7_Rev1	CCACAGGCTATGACACGCA
CXCR7_Rev2	GTCAGAGCCAGCTGAGGACA
CXCR7_Rev3	TATTGTTTGGGAGGCATAGTGC

Tableau 3. Séquences des amorces en PCR génomique.

Amorces utilisées lors de la validation de l'excision de l'exon 2 des récepteurs CXCR4 et CXCR7.
Fwd = Forward ; Rev = Reverse.

dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂.

2.3. Caryotypage

Le caryotype des cellules SW480 WT a été réalisé sur la plateforme de Cytogénétique de l'Hôpital de Hautepierre, en collaboration avec le Dr. Carine GERVAIS, à partir de 5.10⁵ cellules dans 5 ml de *Phosphate-Buffered Salin* 1X (PBS).

2.4. Validation de l'excision du gène des récepteurs

2.4.1. Extraction et purification de l'ADN génomique des cellules

L'ADN est extrait de 5.10⁶ cellules après rinçage au PBS 1X puis l'ajout de 200 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K (Kit Qiagen). La purification se fait sur une colonne de silice suivant le protocole de *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook Kit* (Qiagen) et l'ADN est récupéré dans un volume d'élution de 200 µl d'eau ultrapure. Le dosage des échantillons est ensuite réalisé par lecture spectrophotométrique avec le NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

2.4.2. PCR génomique ou réaction de polymérisation en chaîne et électrophorèse sur gel d'agarose

Les amplifications par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) des fragments de l'exon 2 des gènes codant pour CXCR4 et CXCR7 sont réalisées avec 20 ng d'ADN de chaque type cellulaire, 0,5 µM de couples d'amorces spécifiques (sens et anti-sens) (**Tableau 3**) et un mix de PCR du kit *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen) pour un volume réactionnel final de 50 µl. Le programme utilisé est de : 3 min à 94°C, 40 cycles de 45 s à 94°C, 30 s à 55°C, 2,5 min à 72°C et 10 min à 72°C, avec le système MyCycler™ Thermalcycler (Biorad).

Les produits de PCR sont analysés après migration sur un gel d'agarose (1%) dans du Tris-Acétate-EDTA (TAE, 0,5X) avec 500 pg/µl de bromure d'éthidium (BET, Eurobio). Les résultats sont analysés sous UV avec le système Alphasager Mini (Protein simple).

Pour confirmer les résultats obtenus des amplifications, les ADN extraits des cellules sont ensuite envoyés au séquençage par la technique de Sanger chez GATC Biotech.

Mix PCR Invitrogen : Tampon PCR 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen).

2.4.3. Séquençage ciblé par capture

Le séquençage ciblé par capture a été réalisé en collaboration avec Bernard JOST et Stéphanie

LE GRAS sur la plateforme GenomEast à l'IGBMC. Ce séquençage porte sur la région couvrant tout l'exon 2 des deux gènes de CXCR4 et CXCR7 pour détecter avec précision la présence ou pas, de l'excision des séquences ciblées. Le principe de cette technique repose sur la capture de fragments d'ADN des régions d'intérêt, qui sont capturés par hybridation à des sondes complémentaires spécifiques de ces régions. Dans notre projet, la capture a été réalisée en solution attachées à des billes magnétiques, et après le lavage et élution, les fragments d'intérêts sont séquencés par séquençage de nouvelle génération (*NGS ou Next Generation Sequencing*).

2.5. Validation de la perte d'expression transcriptionnelle des récepteurs par RT-qPCR

2.5.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits des cellules après une lyse avec 800 µl de Trizol (*TRI Reagent®*, *Molecular Research Center Inc.*). Au lysat, sont ensuite rajoutés 200 µl de chloroforme et laissé incubé pendant 15 min à température ambiante. La phase aqueuse est récupérée (~ 300 µl) par centrifugation à 12 000 g pendant 15 min à 4°C et les ARN sont précipités avec de l'isopropanol après une incubation de 10 min à température ambiante. Une centrifugation à 12 000 g pendant 8 min à 4°C est réalisée et les culots sont rincés 3 fois à l'éthanol 75% par une centrifugation de 7 500 g pendant 5 min à 4°C. Ensuite, les ARN séchés sont dissous dans de l'eau ultrapure (volume adapté à la taille du culot) et la concentration des échantillons est déterminée au NanoDrop. Ils sont ensuite conservés à -80°C avant leur utilisation pour la transcription inverse.

2.5.2. Transcription inverse (*Reverse transcription (RT)*)

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

Mix réactionnel de RT : Mix VILO™ 1X (amorces aléatoires, dNTP, MgCl₂) et un Mix Enzyme SuperScript™ 1X (SuperScript III, inhibiteur de RNase, protéine helper).

2.5.3. PCR quantitative (qPCR) pour l'expression des transcrits

La PCR est réalisée avec 2 µL d'ADNc dilué au 1/5 dans de l'eau ultrapure, 0,5 µM ou 0,3 µM des amorces de chaque gène (**Tableau 4**) et d'un *Master Mix QuantiTect SYBR Green PCR 1X* (Qiagen) pour un volume final de 20 µl. Les réactions sont réalisées suivant le programme : 15

Gènes	Séquences (5'-3')
CXCR4	nd – Ref QuantiTect, Qiagen – QT00223188
CXCR7	nd - QuantiTect, Qiagen – QT00069650
TBP	nd – QuantiTect Qiagen – QT00069650
E-Cadhérine	TACTGCCCAGGAGCCAGA TGGCACCAGTGTCCGGATTA
Vimentine	TGAGTACCGGAGACAGGTGCAG TAGCAGCTTCAACGGCAAAGTTC
Fibronectine	TGCCTTGACGATGATATGGA CTTGTGGGTGTGACCTGAGTGAA
SNAIL	GACCACTATGCCGCGCTCTT TCGCTGTAGTTAGGCTTCCGATT
SLUG	ATGCATATTCGGACCCACACATTAC AGATTTGACCTGTCTGCAAATGCTC
ZEB1	GAAAGTGATCCAGCCAAATGGAA TTTGGGCGGTGTAGAATCAGAG
ZEB2	AAATGCACAGAGTGTGGCAAGG CTGCTGATGTGCGAACTGTAGGA
MMP-2	CACTTTCTGGGCAACAAAT CCTGGTCAGGGCAGAAGC
MMP-9	CAACTACGACCGGACAAGC GTGGTAGCGCACCAGAGG
MT1-MMP-14	GGAACCCTGTAGCTTTGTGTCTGTC TGAGGGTCTGCCTTCAAGTG
TIMP-2	GCGTTTTGCAATGCAGATGT CTTCTCAGGCCCTTGAACAT
Intégrine $\alpha 5$	TGCTGACTCCATTGGTTTCACAG TCTCTCTGCAATCCTCTCGAGC
Intégrine αV	AGGTGCCTACGAAGCTGAGC AAGGCTTCATTGTTTCGGACA
Intégrine $\beta 1$	TGTAACCAACCGTAGCAAAGGA CCCTGATCTTAATCGCAAAAC C

Tableau 4. Amorces (sens et antisens) utilisées pour analyser l'expression des gènes par RT-qPCR.
n.d : non définie.

min à 95°C, 40 cycles de 15 s à 94°C, 30 s à 55°C et 30 s à 72°C, avec le système LightCycler® 480 Instrument II (Roche). À la fin de chaque cycle, la fluorescence est mesurée et utilisée pour la quantification relative par la méthode de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, avec le gène de la *Tata box Binding Protein* (TBP, Qiagen) utilisé comme gène de référence afin de normaliser les résultats par rapport à la quantité d'ADN initialement utilisée. Le calibrateur est défini selon le type d'expérience.

Mix PCR QuantiTect SYBR Green 2X Qiagen : ADN Polymérase HotStarTaq®, tampon QuantiTect SYBR Green PCR, dNTP, incluant dUTP, SYBR Green I, ROX™ passive reference dye, 5 mM MgCl₂.

2.6. Validation de la perte d'expression protéique des récepteurs

2.6.1. Western blot

2.6.1.1. Extraction des protéines totales

Pour extraire les protéines, le tampon de lyse contenant le détergent NP-40 est ajouté sur les cellules dont le volume est adapté en fonction de leur confluence. Les lysats sont ensuite soniqués pendant 10 min à 4°C (cycles de 30 secondes *ON* et 30 secondes *OFF*) dans un bain à ultrasons pour rompre les membranes et centrifugés à 13 000 rpm pendant 15 min à 4°C. Les protéines totales obtenues dans le surnageant sont dosées selon la méthode colorimétrique de Bradford par mesure de l'absorbance à 595 nm au spectrophotomètre BertholdTech TriStar2.

Tampon de lyse NP-40 : 50 mM Tris-Cl pH 8, 150 mM NaCl, 2% NP-40, ¼ de pastille d'inhibiteurs de protéases *MiniComplete* (Sigma-Aldrich).

2.6.1.2. Électrophorèse, transfert et détection des protéines spécifiques

Les protéines totales (40 µg) sont séparées sur un gel de polyacrylamide avec un gradient de réticulation de 4 à 20% (Biorad, #4561094) en condition dénaturante ou *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)* et transférées sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF, Amersham, #10600021) selon les instructions du fournisseur dans un système de transfert semi-sec au Transblot (*Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*, Biorad).

Après le transfert, les membranes sont saturées avec 5% de lait demi-écrémé (*Blotting-Grade Blocker*, Biorad, #1706404) dans du PBS 1X pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Elles sont ensuite lavées 3 fois pendant 5 min au PBST 0,1 % (PBS 1X Tween 20 à 0,1%) et incubées sur la nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués dans 5% de lait dans du PBS 1X (**Tableau 5**). Après 3 lavages au PBST 0,1% les membranes sont incubées

Anticorps	Dilution	Références
Rat anti-CXCR4	1/1000	Invitrogen, #14-9991-82
Lapin anti-CXCR7	1/1000	Abcam, #138509
Souris anti-actine	1/15000	Millipore, #MAB1501
Souris anti-Rac1	1/500	Biochem, #ARC03
Lapin anti-Phospho-Akt (Ser473)	1/2000	Cell signaling, #406
Lapin anti-Akt total	1/2000	Cell signaling, #9272
Souris anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	1/2000	Cell signaling, #9106
Lapin anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) total	1/2000	Cell signaling, #9102
Lapin anti-Intégrine $\alpha 5$	1/1000	Cell signaling, #98204S
Lapin anti-Intégrine $\beta 1$	1/1000	Millipore, #AB1952
Cheval anti-lapin-HRP	1/10000	Cell signaling, #7074
Chèvre anti-souris-HRP	1/10000	Cell signaling, #7076
Chèvre anti-rat-HRP	1/50000	Cell signaling, #7077

Tableau 5. Liste des anticorps utilisés en western blot.

Anticorps	Dilution	Références
Rat anti-CXCR4	1/200	Invitrogen, #14-9991-82
Lapin anti-CXCR7	1/100	Diagomics/GeneTex, #GTX100027
Lapin anti-Paxilline-Phosphorylée (Y31)	1/250	Abcam, #4832
Lapin anti-ZO-1	1/100	ThermoFisher, #40-2200
Lapin anti-E-Cadhérine	1/100	Invitrogen, #13-1900
Chèvre anti-lapin-Alexa488	1/1000	ThermoFisher, #A-11034
Chèvre anti-rat-Alexa488	1/1000	ThermoFisher, #A-11006
Chèvre anti-rat-Cy3	1/1000	ThermoFisher, #A10522

Tableau 6. Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.

pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (*HRP ou HorseRadish Peroxidase*) (**Tableau 5**) dilués au 1/10 000 dans 5% de lait dans du PBS 1X. La révélation se fait par chimioluminescence sur un film photographique (Amersham, #28-9068-37) à l'abri de la lumière, par le système ECL (Amersham, #RPN2106). Pour la détection de CXCR4, l'ECL Prime (Amersham, #RPN2232) est utilisé à une dilution au 1/50 000 pour l'anticorps secondaire et 6 lavages de 5 min au PBST 0,1% à température ambiante avant la détection. À la fin, la normalisation des protéines par rapport à l'actine, protéine de référence, est réalisée grâce au logiciel ImageJ.

2.6.2. Immunofluorescence

Les cellules sontensemencées à 5.10^4 cellules dans des chambres de culture en verre de 8 puits (*Lab-Tek™ II Chamber Slide™*). À 80% de confluence, elles sont rincées 3 fois avec du PBS 1X et fixées pendant 20 min avec 4% de paraformaldéhyde (PFA). Après 3 lavages de 10 min au tampon de lavage PBS Triton 0,1%, les cellules sont saturées avec 5% de *Normal Goat Serum (NGS)* ou de *Normal Donkey Serum (NDS)* (selon la source de l'anticorps primaire) dans du tampon de lavage et incubées avec les anticorps primaires (**Tableau 6**) dilués dans du PBS Triton 0,1% pendant toute la nuit à 4°C (Triton 0,3% pour les autres protéines). Les cellules sont ensuite lavées 3 fois pendant 10 min et les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome sont ajoutés (**Tableau 6**). Après 1 heure d'incubation à l'obscurité et 2 lavages de 10 min, les noyaux sont marqués 5 min avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) dilué au 1/20 000 dans du PBS 1X. Les cellules sont lavées 2 fois au PBS 1X et les lames sont montées sous lamelle grâce au liquide de montage Aqua-Poly/Mount (Polysciences). Les marquages sont visualisés avec un microscope à fluorescence ApoTome.2 (Zeiss).

2.6.3. Expression membranaire des récepteurs par cytométrie en flux

Les cellules sont mises en suspension et après une centrifugation à 1 000 rpm pendant 5 min à température ambiante et 1.10^6 cellules sont reprises dans 80 µl d'un tampon de blocage avant d'ajouter 20 µl du réactif *FcR blocking reagent* (Miltenyi Biotec, #130-059-901), réactif qui bloque la liaison des anticorps aux récepteurs Fc (FcR). Les cellules sont ensuite incubées avec 10 µl d'un anticorps anti-CXCR4-couplé à l'APC (Allophycocyanine) et/ou anti-CXCR7-couplé au PE (Phycoérythrine) ou de leurs isotypes contrôles (**Tableau 7**) pendant 20 min à 4°C ou sur glace, à l'abri de la lumière. Les cellules sont rincées avec 500 µl de tampon de blocage des FcR et centrifugées à 300 g pendant 10 min à température ambiante. Elles sont reprises directement dans 300 µl de DAPI (1/40 000) dilué dans du PBS 1X et filtrées sur un tamis ayant des pores de 70 µm (Cell strainer Falcon, #352350), avant de les passer au cytomètre BD LSR-

Anticorps	Références
Souris anti-CXCR4 couplé à l'APC	R&D, #FAB170A
Souris anti-CXCR7/RDC-1 couplé au PE	R&D, #FAB4227P-100
Souris anti-IgG _{2A} couplé à l'APC	R&D, #IC003A
Souris anti-IgG1 couplé au PE	R&D, #IC002P

Tableau 7. Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.

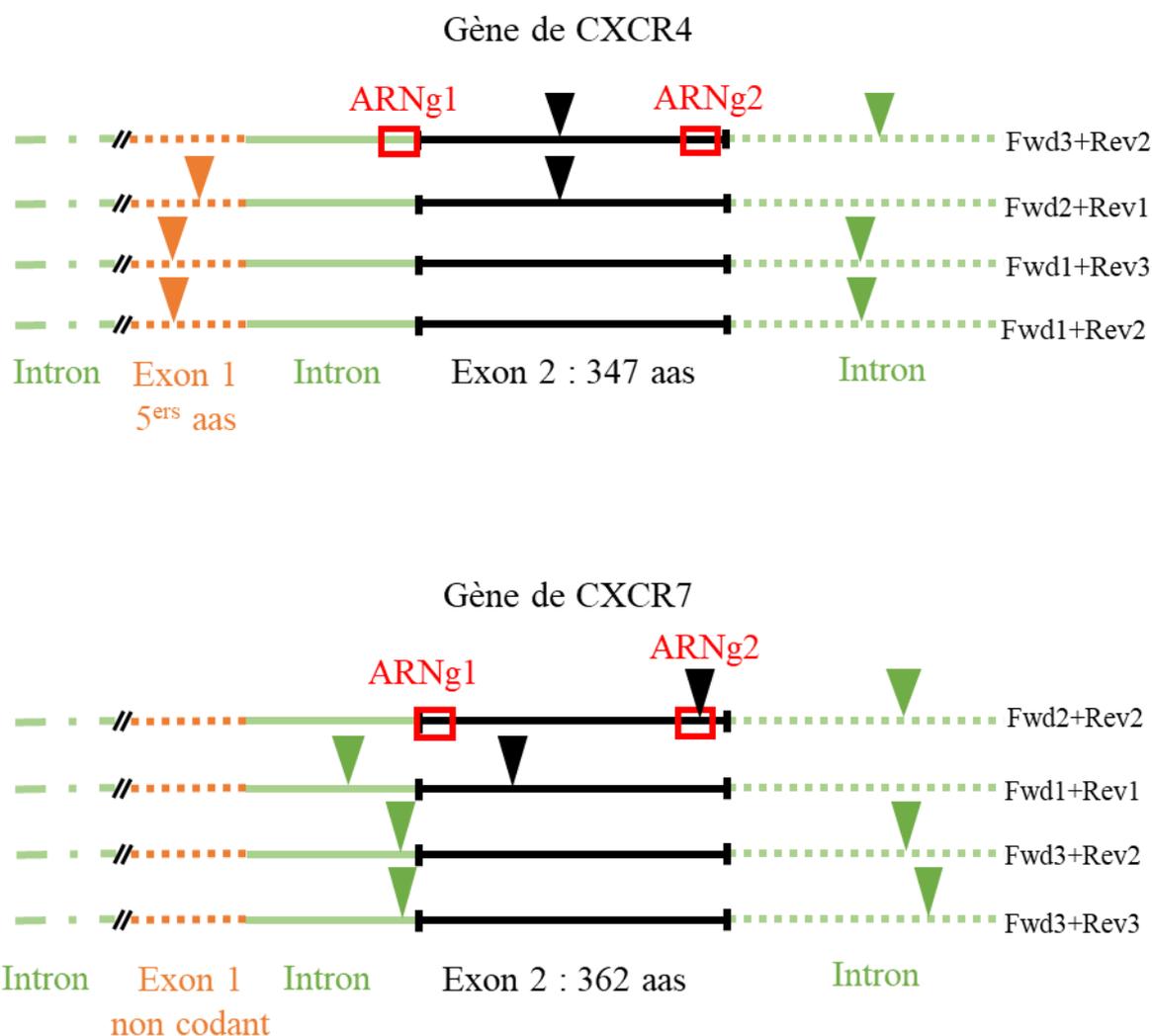


Figure 22. Schémas représentatifs des gènes de CXCR4 et CXCR7 et localisation des ARNg 1 et 2 et des couples d'amorces utilisés pour la PCR génomique.

Selon les couples utilisés, il sera possible de détecter une excision de l'exon 2. Avec les amorces (triangle noir) il n'y aura pas d'amplification si l'exon 2 a été excisé. De même, les amorces (triangle vert) permettront d'amplifier des fragments plus courts si l'exon 2 a été excisé, Fwd : Forward. Rev : Reverse.

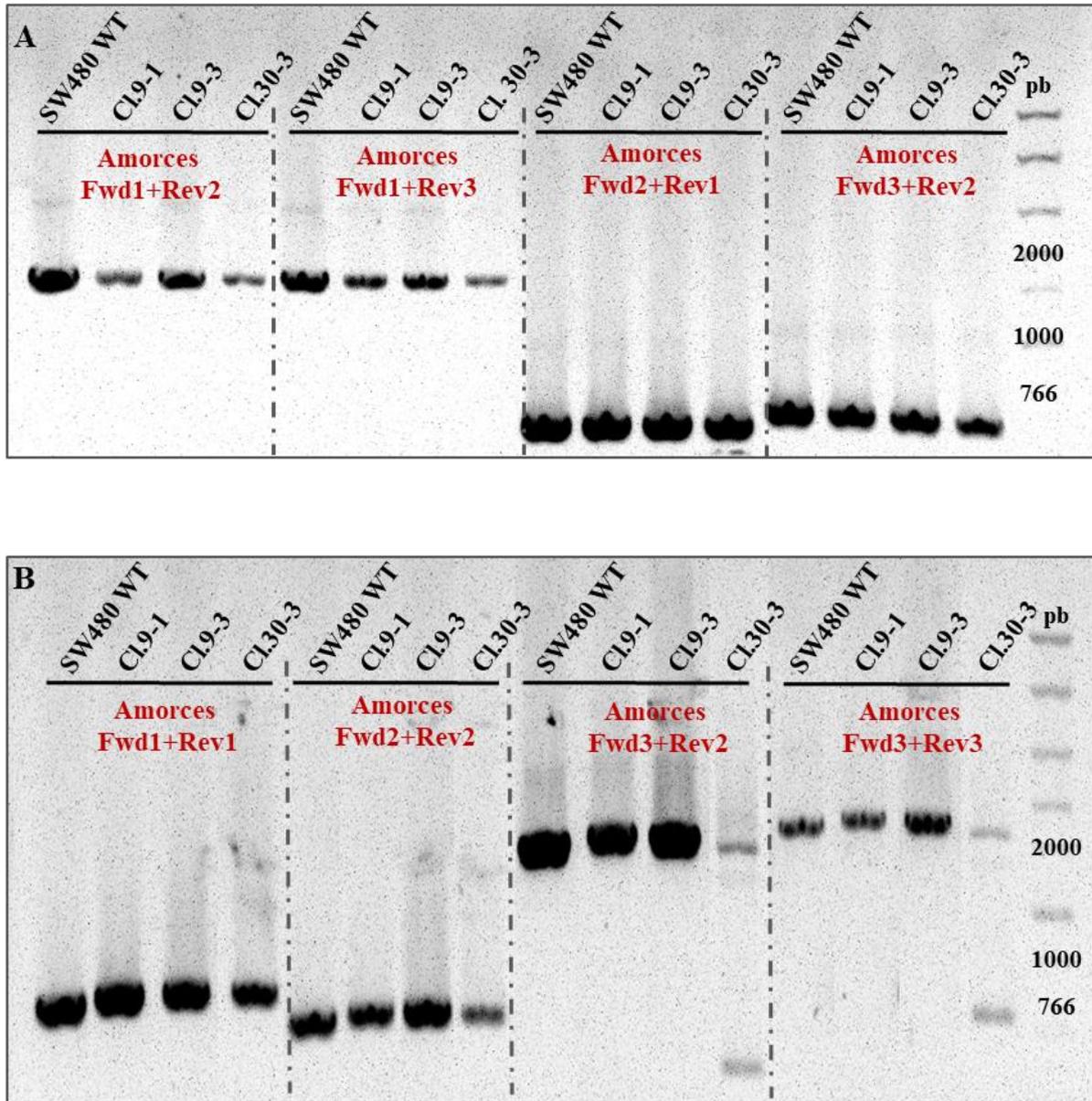


Figure 23. Recherche de l'excision de l'exon 2 codant pour CXCR4 et CXCR7.
 Amplification par PCR génomique avec quatre couples d'amorces dans les cellules des Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 pour CXCR4 (A) et pour CXCR7 (B). Pour CXCR4, les amplicons de l'exon 2 normal sont détectés avec les amorces (Fwd1+Rev2), (Fwd1+Rev3), (Fwd2+Rev1) et (Fwd3+Rev2). Pour CXCR7, les amplicons de l'exon 2 normal sont détectés avec les amorces (Fwd1+Rev1), (Fwd2+Rev2), (Fwd3+Rev2) et (Fwd3+Rev3) tandis que les fragments de taille courte issus de l'exon 2 excisé sont détectés avec les amorces (Fwd3+Rev2) et (Fwd3+Rev3). pb : paires de bases. Fwd : Forward. Rev : Reverse.

Fortessa™ X-20. Les analyses sont réalisées avec le logiciel BD FACS Diva.

Tampon de blocage : 500 mM d'EDTA pH8 (Ethylène diaminetétraacétique) dans du PBS 1X.

2.7. Analyses statistiques

Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm SEM (Erreur Standard de la Moyenne) et la détermination des p-values a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 5. Les comparaisons statistiques de deux groupes sont réalisées par le test non paramétrique de Mann-Whitney U.

3. Résultats

3.1. Caractérisation génomique des clones invalidés pour les gènes codant pour CXCR4 et/ou CXCR7

Pour valider l'excision de l'exon 2 de chacun des récepteurs, nous avons amplifié des fragments de l'ADN génomique extrait des cellules SW480 WT et des trois clones générés, en réalisant une PCR avec quatre couples d'amorces positionnées de part et d'autre de la région ciblée par l'excision (**Figure 22**). Dans le cas d'une excision, il n'y aura pas de fragment génomique amplifié ou des produits de PCR de taille réduite.

Pour CXCR4, chaque couple d'amorces ciblant l'exon 2 a permis la production d'amplicons de taille attendue de 1468 pb (Fwd1+Rev2), 1489 pb (Fwd1+Rev3), 491 pb (Fwd2+Rev1) et 553 pb (Fwd3+Rev2) dans les cellules SW480 sauvages (**Figure 23A**). Cependant, ces amplicons sont également détectés dans les trois clones (Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3) (**Figure 23A**). De même, aucun amplicon n'est détecté avec les deux couples d'amorces choisies (Fwd1+Rev3) et (Fwd1+Rev2) pour n'amplifier que l'ADN excisé (**Figure 23A**), suggérant que le système CRISPR-Cas9 n'a pas excisé l'exon 2 du gène codant pour CXCR4.

Comme pour CXCR4, des amplicons de 590 pb (Fwd1+Rev1), 521 pb (Fwd2+Rev2), 1464 pb (Fwd3+Rev2) et 1628 pb (Fwd3+Rev3) ciblant l'exon 2 normal de CXCR7 sont retrouvés dans les cellules SW480 WT mais également dans les trois clones (**Figure 23B**). Par contre, dans le Clone 30-3, les deux couples d'amorces (Fwd3+Rev2) et (Fwd3+Rev3) produisent respectivement des amplicons de tailles réduites (367 pb et 531 pb), indiquant une excision de l'exon 2 de CXCR7 par la nucléase Cas9 au niveau des sites de reconnaissance de chacun des ARNg (**Figure 23B**). Dans le but de confirmer les résultats de la PCR génomique, l'ADN de chaque type cellulaire a été séquencé par la technique de Sanger par la société GATC Biotech (Eurofins Scientific). Les résultats confirment l'absence de l'excision de l'exon 2 codant pour

**Région ciblée par le
CRISPR-Cas9**

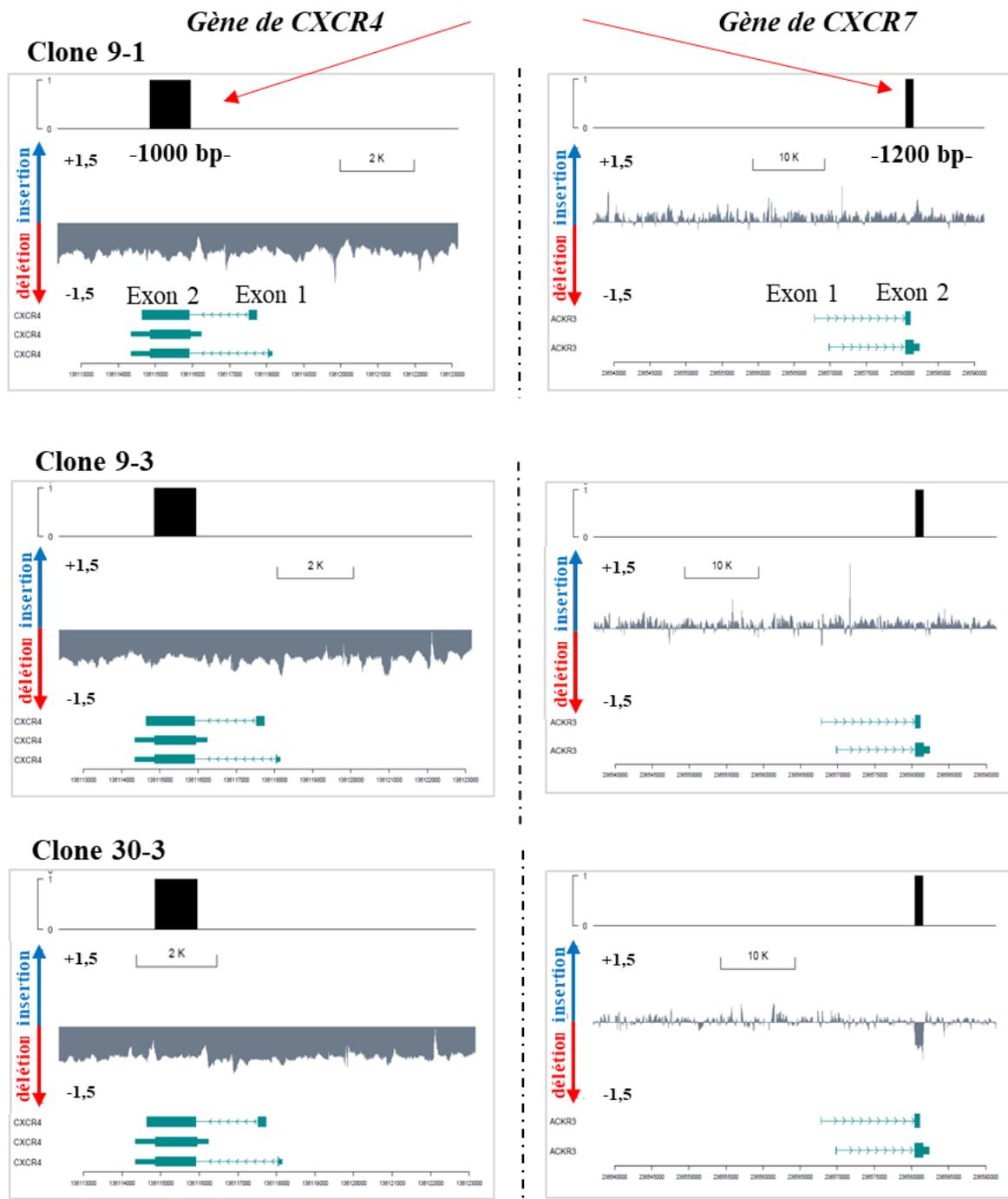


Figure 24. Graphes de la détection de l’excision effectuée par CRISPR-Cas9 lors du séquençage par capture du gène de CXCR4 et de CXCR7.

Le graphe en haut représente la région ciblée et le graphe en bas représente des potentielles insertions ou délétions dans les clones par rapport à SW480 WT lorsque le log₂ du ratio est positif ou négatif respectivement. Pour CXCR4, tous les clones (Clone 9-1, Clone 9-3, Clone 30-3) présentent une délétion dans la moitié des allèles d’une grande région allant au-delà de la localisation du gène. Pour CXCR7, la délétion partielle de la région ciblée n’est observée que dans le Clone 30-3.

CXCR4 dans les trois clones et dans les Clone 9-1 et Clone 9-3 pour CXCR7 (**résultats non montrés**). Cependant, dans le Clone 30-3, les profils de séquençage du gène de CXCR7 révèlent une coupure au site de reconnaissance de l'ARNg1 (séquence PAM) et en aval de cette zone, des séquences identiques à celles des cellules SW480 WT. Par contre, les séquences localisées en amont du site de coupure de l'ARNg1 sont différentes de celles présentes dans les cellules SW480 WT (**résultats non montrés**) et ne correspondent pas à la séquence génique du chromosome 2 en amont de l'ARNg1. Ces résultats suggèrent qu'il y a eu une excision dans l'exon 2 de CXCR7, mais le fragment excisé semble s'être recombinaison sur un autre chromosome. Toutefois, cette délétion ne touche pas tous les allèles puisque l'exon 2 normal est toujours présent.

Dans l'optique de confirmer ces résultats complexes à interpréter, nous avons procédé à un séquençage ciblé, qui par opposition à la technique de Sanger, permet de séquencer tout l'exon 2 à partir de l'ADN fragmenté puis de réaliser la capture spécifique de ses fragments avec un panel de sondes spécifiques. Ce séquençage permet également de mettre en évidence/détecter les événements génétiques comme les SNV (*Single Nucleotide Variant*), les indels (insetions/délétions) ou des variants structuraux. Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec Bernard JOST et Stéphanie LE GRAS sur la plateforme GenomEast à l'IGBMC.

Les données regroupées sous forme de graphes représentent le log₂ du ratio des nombres de lectures ou « *reads* » par fenêtre de 15 nucléotides pour chaque clone sur le nombre de reads pour les cellules SW480 WT, couvrant 10 000 bp du gène codant pour CXCR4 et 50 000 bp pour CXCR7, régions dans lesquelles est situé l'exon 2 codant de chaque gène. Pour CXCR4, on retrouve les mêmes profils pour les trois clones montrant une délétion non seulement de la région encadrée par les deux ARNg (**Figure 24**), mais qui s'étend en amont et en aval de l'exon 2. Cependant, cette délétion est partielle puisque qu'elle ne touche que la moitié des *reads* (**Figure 24**), indiquant une perte que de la moitié des allèles de CXCR4 dans les clones.

Pour CXCR7, la seule délétion observée se trouve dans le Clone 30-3, avec à nouveau, une perte partielle des allèles, confirmant les résultats du séquençage de Sanger et de la PCR génomique (**Figure 24**).

Ces analyses montrent que sur le plan génomique aucun des trois clones ne présentent d'excision dans l'exon 2 de CXCR4, mais ils se caractérisent par une délétion de la moitié des allèles. De manière similaire, une délétion partielle de CXCR7 n'est détectée que dans le Clone 30-3.

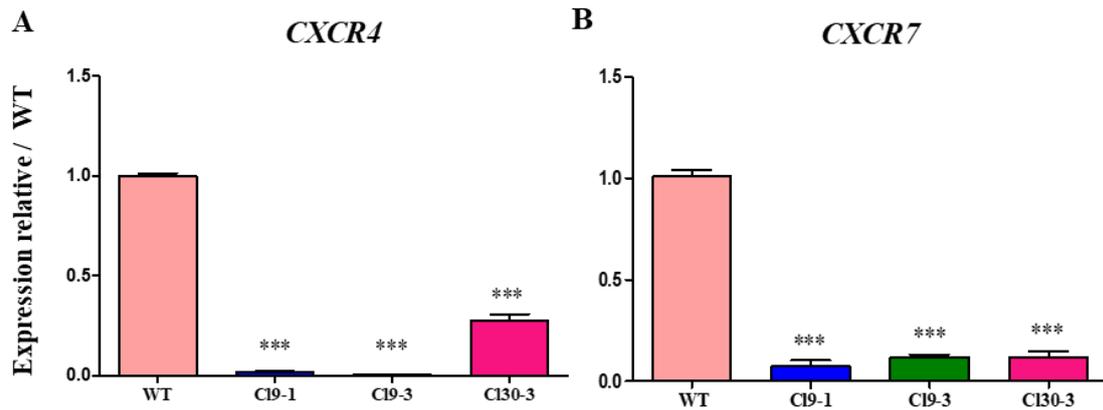


Figure 25. Expression transcriptionnelle de CXCR4 et CXCR7 par RT-qPCR.
 Expression relative des ARNm codant pour CXCR4 (A) et CXCR7 (B) dans les Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 par rapport aux cellules SW480 WT. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 10 expériences indépendantes. *** $p < 0,0001$.

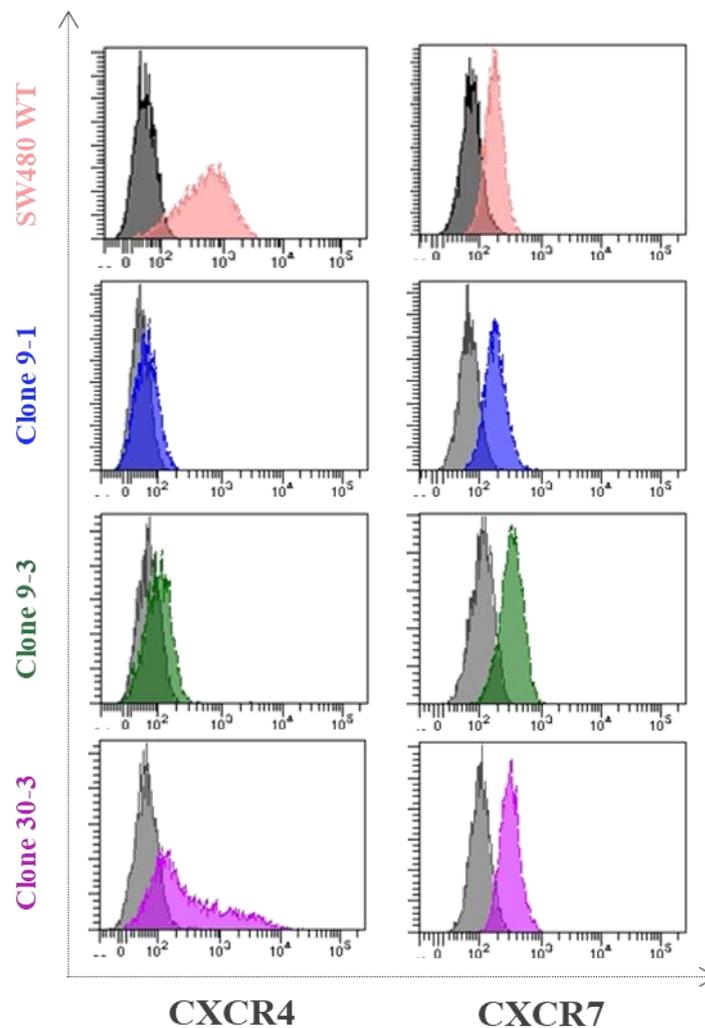


Figure 26. Expression protéique de CXCR4 et CXCR7 par cytométrie en flux.
 Expression membranaire de CXCR4 (gauche) et de CXCR7 (droite) avec des anticorps spécifiques (couleur) ou de leurs isotopes contrôles (gris) dans les cellules SW480 WT et les Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3. Les histogrammes représentent les analyses de 3 expériences indépendantes.

3.2. Caractérisation transcriptionnelle de l'expression des récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7

Dans cette partie, il s'agit d'évaluer l'impact des invalidations géniques des récepteurs sur leur expression transcriptionnelle par RT-qPCR. Ainsi, les Clone 9-1 et Clone 9-3 dans lesquels une perte allélique de CXCR4 est observée, n'expriment plus les transcrits codant pour le récepteur (2% et 0,07% respectivement) en comparaison aux cellules SW480 sauvages (**Figure 25A**). Cependant, le Clone 30-3, qui a les mêmes caractéristiques génomiques, montre plutôt une forte diminution de l'expression de 73% des ARNm de CXCR4 (**Figure 25A**). De la même manière, les transcrits de CXCR7 ne sont pas exprimés dans le Clone 9-1 (seulement 7%) alors que leur niveau est très faible dans les Clone 9-3 et Clone 30-3 (11%) (**Figure 25B**).

Ces résultats montrent une perte d'expression transcriptionnelle de CXCR4 et de CXCR7 dans tous les clones, ces données n'étant pas en accord avec les profils géniques.

3.3. Caractérisation protéique de l'expression des récepteurs CXCR4 et/ou CXCR7

Afin de valider les conséquences de la perte transcriptionnelle sur l'expression protéique, des analyses par cytométrie en flux, western blot et immunofluorescence ont été réalisées.

L'analyse par cytométrie en flux montre une perte d'expression membranaire de CXCR4 dans les Clone 9-1 et Clone 9-3 et une expression diminuée dans le Clone 30-3 en comparaison aux cellules sauvages (**Figure 26**) ; ces résultats étant en accord avec l'expression transcriptionnelle du récepteur (**Figure 25A**). À l'inverse, aucune diminution ni de perte d'expression membranaire de CXCR7 n'est observée dans les trois clones (**Figure 26**). En effet, le niveau de la protéine reste similaire dans les clones comme dans les cellules SW480 WT.

La perte d'expression de CXCR4 dans les Clone 9-1 et Clone 9-3 et sa baisse dans le Clone 30-3 a été confirmée par western blot (**Figure 27A,C**). De manière surprenante, l'expression de CXCR7 est respectivement 1,6 fois pour le Clone 30-3 à 2,8 et 3,6 fois plus élevée dans les Clone 9-1 et Clone 9-3 que dans les cellules SW480 WT (**Figure 27B,D**).

L'immunofluorescence montre une expression membranaire de CXCR4 avec un marquage punctiforme dans les cellules SW480 WT alors que dans les Clone 9-1 et Clone 9-3, cette expression est absente (**Figure 28**). Par contre, dans le Clone 30-3, CXCR4 reste exprimé que dans certaines cellules avec le même type de marquage punctiforme comme dans les cellules SW480 WT (**Figure 28**).

Ce résultat est cohérent avec la baisse d'expression observée en cytométrie en flux et en western

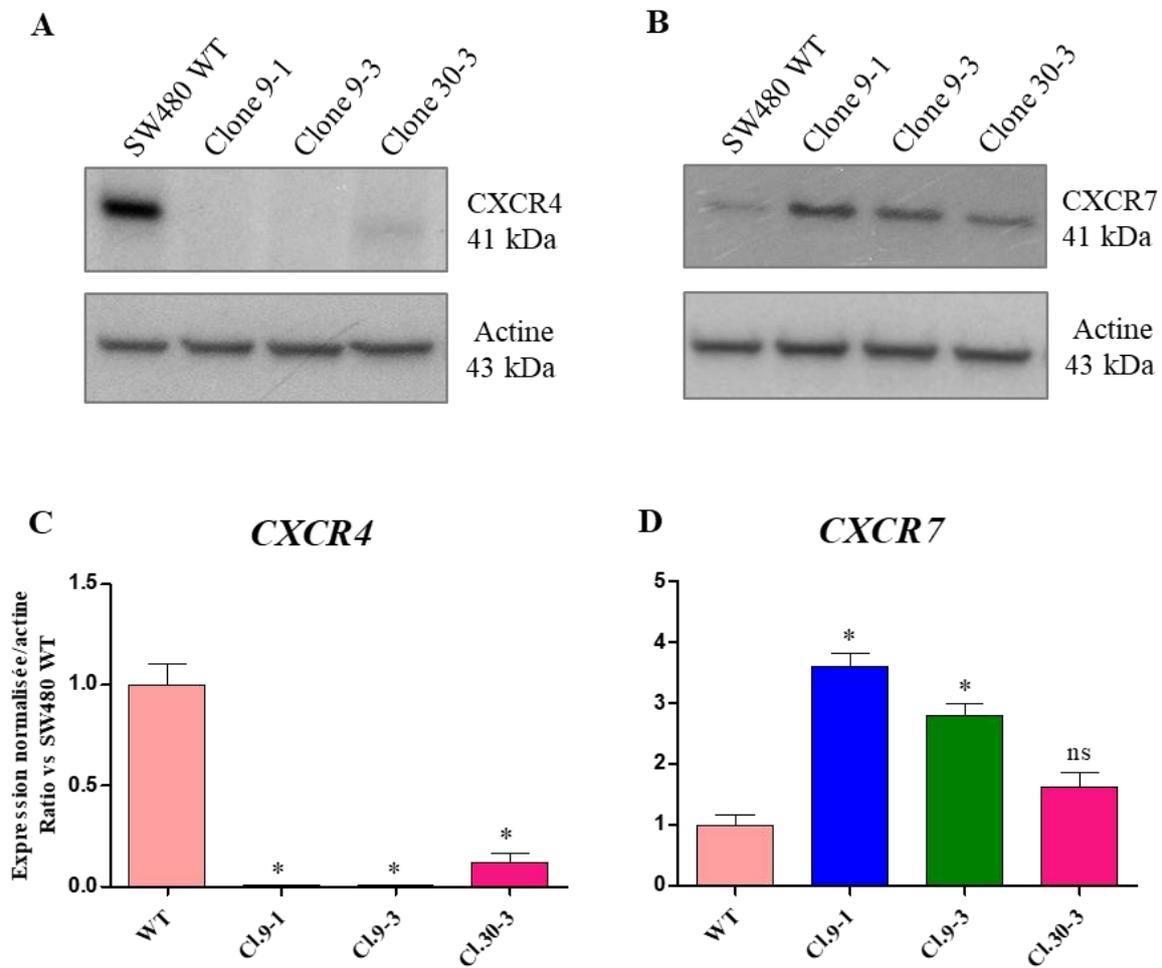


Figure 27. Expression protéique de CXCR4 et CXCR7 par western blot.

Expression relative des récepteurs CXCR4 (A) et CXCR7 (B) dans les cellules SW480 WT et les Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3. La quantification de l'intensité des bandes correspondantes est normalisée avec l'actine et rapportée aux cellules SW480 WT pour l'expression de CXCR4 (C) et de CXCR7 (D). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ns: non significatif.

et indique la coexistence de deux populations de cellules, une exprimant toujours le récepteur et l'autre pas. Comme pour CXCR4, le marquage de CXCR7 est également ponctiforme mais uniquement dans les cellules SW480 WT. Dans les clones, le marquage est plutôt homogène à la membrane (**Figure 28**). De plus, le double marquage de CXCR4 et CXCR7 dans les cellules SW480 WT montre des cellules exprimant les deux récepteurs tandis que d'autres n'expriment que l'un ou l'autre des récepteurs (**Figure 29**).

Ces données ensemble confirment la perte totale et partielle de l'expression de CXCR4 dans les clones.

4. Discussion

Le ciblage de l'exon 2 codant pour les récepteurs CXCR4 et CXCR7 par la technique CRISPR-Cas9 dans la lignée colique humaine SW480 nous a permis de générer trois clones qui ne portent pas d'excision dans l'exon 2 de CXCR4, mais une perte de la moitié des allèles dans une région qui va au-delà de la région ciblée par les deux ARNg. Cependant, les conséquences de ces événements sont une perte d'expression transcriptionnelle et protéique du récepteur CXCR4 dans les Clone 9-1 et Clone 9-3 et une perte partielle dans le Clone 30-3.

Décrit pour sa spécificité à se fixer à l'ADN, le système CRISPR-Cas9 a permis aux chercheurs d'induire des modifications génétiques avec plus de précision et de rapidité que la technologie du ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*) ou de TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) (Gaj et al., 2013). Cependant, toutes ces méthodes peuvent cibler des séquences non désirées et générer des effets hors cibles ou *off-target effects*.

Ainsi, dans les clones, l'absence de la délétion de la région ciblée dans l'exon 2 serait une conséquence d'un ciblage non spécifique par les ARNg, de séquences localisées hors de l'exon 2 des gènes codant CXCR4 et CXCR7. En effet, l'outil CRISPR-Cas9 est décrit, pour générer un taux important de mutations hors cibles qui surviennent dans les zones dont la séquence est identique à celle des sites d'intérêt et ces effets peuvent parfois surpasser ceux de la mutagenèse induite dans les régions ciblées (Gupta and Musunuru, 2014). Le séquençage complet du génome aurait permis de mettre en évidence de tels effets hors cible.

Cependant, il est également possible d'envisager que lors de l'inactivation du gène, une sous-population de cellules déjà dépourvues de la moitié des allèles, ait été sélectionnée et par conséquent, la perte d'expression de CXCR4 serait une conséquence de cette perte allélique plutôt que de l'action de CRISPR-Cas9. Mais cette perte allélique bien que partielle, serait tout de même suffisante pour empêcher l'expression de CXCR4.

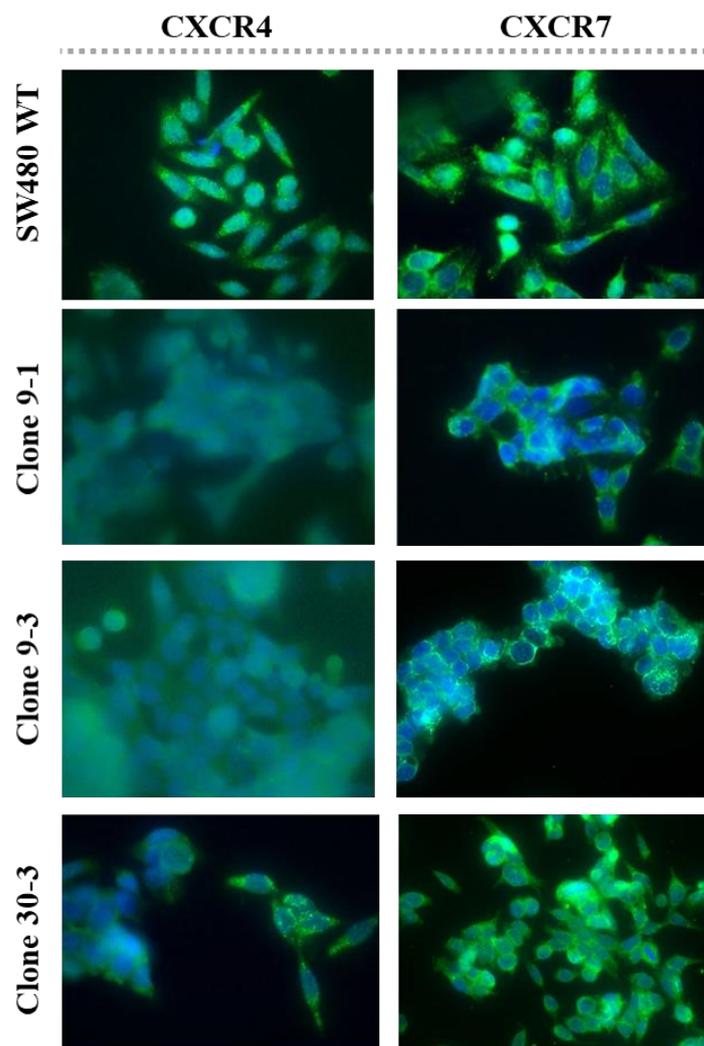


Figure 28. Expression protéique et localisation des récepteurs CXCR4 et CXCR7 par immunofluorescence.

Marquage membranaire (vert) de CXCR4 et de CXCR7 dans les cellules SW480 WT et les Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3. Marquage du noyau au DAPI (bleu). Grossissement x40.

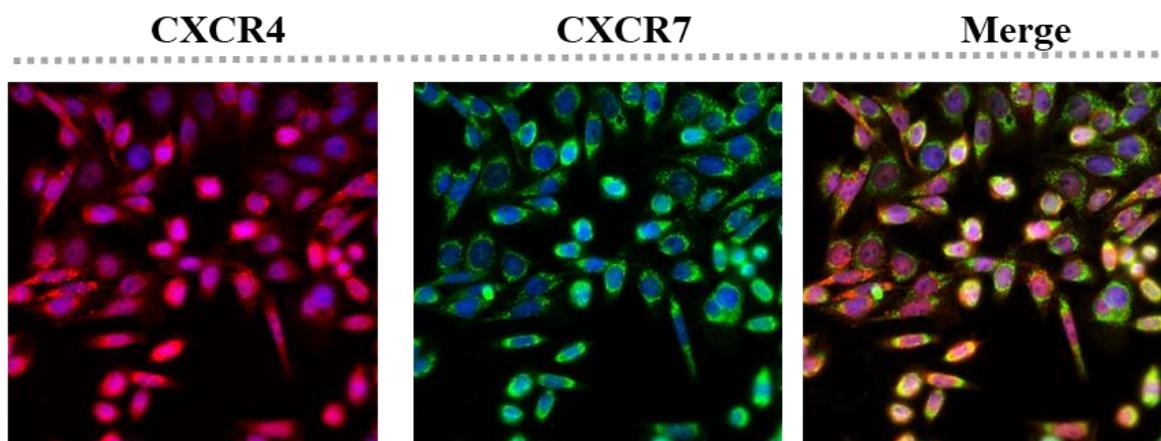


Figure 29. Co-localisation des récepteurs CXCR4 et CXCR7 par immunofluorescence.

Marquage membranaire de CXCR4 (rouge) et de CXCR7 (vert) dans les cellules SW480 WT. Marquage du noyau au DAPI (bleu). Grossissement x63.

À l'opposé pour CXCR7, étonnamment la présence de l'exon 2 non excisé dans deux des clones (Clone 9-1 et Clone 9-3) entraîne une perte d'expression du transcrit de CXCR7 mais maintient une expression protéique et ce niveau est supérieur à celui des cellules SW480 sauvages. Par contre dans le Clone 30-3, l'excision est partielle pour l'exon 2 et ne permet pas une expression transcriptionnelle mais conduit une expression protéique du récepteur à un niveau plus faible que dans les Clones 9-1 et Clone 9-3 non excisés de son exon 2. Il n'est pas simple de trouver une hypothèse à ces effets contradictoires.

Une possibilité serait une différence de sensibilité de la lignée SW480 due à l'hétérogénéité des cellules tumorales, qui se manifeste en général par la polyploïdie (Melcher et al., 2000). Cette hypothèse est confortée par la découverte de trois caryotypes différents, montrant que la lignée contient au moins trois chromosomes 2, chromosome sur lequel sont localisés les gènes de CXCR4 et de CXCR7 (). En outre, cette polyploïdie peut réduire l'efficacité de la coupure induite par l'endonuclease Cas9. D'autre part, le recyclage constant de CXCR7 du cytoplasme à la surface cellulaire décrit dans la littérature (Luker et al., 2010), peut donc expliquer le maintien de son expression dans le Clone 30-3.

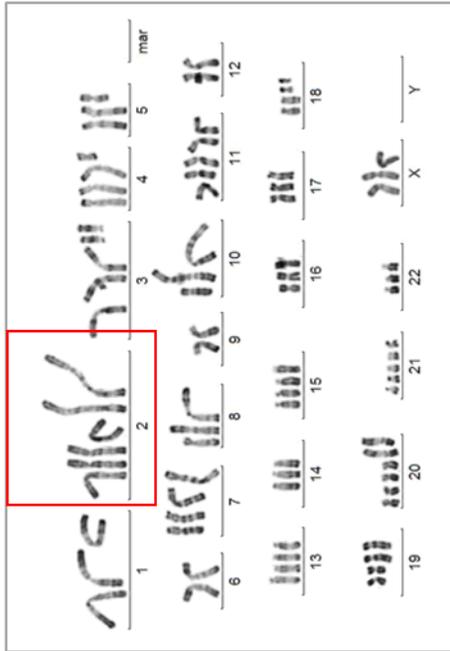
L'absence de la perte d'expression de CXCR7 dans le clone excisé pour son exon 2 et l'impossibilité d'obtenir des cellules invalidées pour les deux récepteurs suggère que ce récepteur est impliqué dans la survie cellulaire. Des données *in vivo* chez la souris, montrent que l'inactivation génique de CXCR7 entraîne une létalité post-natale (Gerrits et al., 2008). Or l'inactivation de CXCR4 entraîne également une létalité en fin de gestation ou périnatale dans le modèle murin (Nagasawa et al., 1996). De ce fait, il est possible d'envisager que l'expression perdue de CXCR4 puisse être compensée par une augmentation d'expression de CXCR7 dans les Clones 9-1 et Clone 9-3 et par une augmentation moins importante dans le Clone 30-3, puisque la perte d'expression de CXCR4 n'est que partielle.

Concernant la localisation des récepteurs, l'immunofluorescence indique un marquage punctiforme associé à la membrane dans les cellules SW480 WT mais aussi dans certaines cellules du Clone 30-3, venant conforter que dans ce clone, l'expression est diminuée. D'autre part, le double marquage de CXCR4 et CXCR7 dans les cellules SW480 WT montre que la co-localisation des deux récepteurs n'est pas fréquente et les cellules expriment plutôt l'un ou l'autre récepteur.

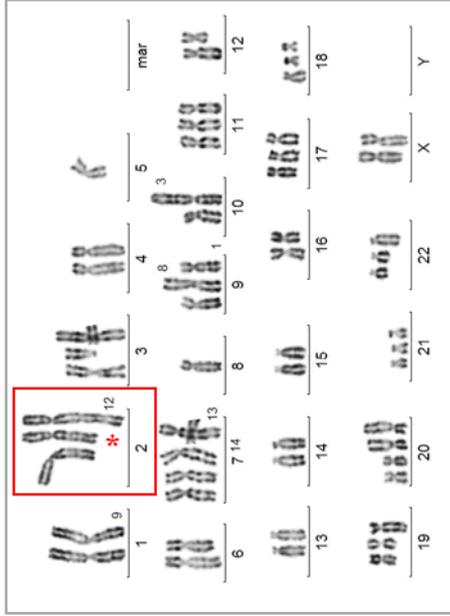
5. Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons montré par différentes techniques (PCR génomique, séquençage de Sanger et par capture) que parmi les clones générés après le ciblage de CXCR4 et/ou CXCR7,

Caryotype 1



Caryotype 2



Caryotype 3

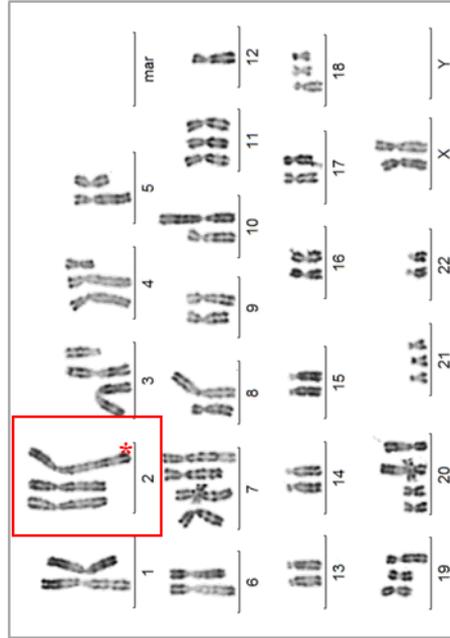


Figure 30 : Caryotypes dans les cellules de la lignée colique humaine SW480.

Trois caryotypes différents détectés dans les cellules SW480 sauvages avec au moins trois chromosomes 2 sur lesquels sont localisés les gènes de CXCR4 et CXCR7. Des réarrangements sont présents comme un fragment du chromosome 12 collé sur le chromosome 2 (*).

deux présentent une perte d'expression du récepteur CXCR4 et un clone, une perte partielle de cette expression. Cependant, cette perte d'expression ne semble pas être une conséquence d'un effet de l'outil CRISPR-Cas9 utilisé pour invalider le gène de CXCR4. Dans ces clones, nous n'avons pas obtenu de perte d'expression de CXCR7, ni des deux récepteurs.

Dans le but d'obtenir des cellules invalidées pour CXCR7, l'utilisation d'autres outils peut être envisagée. Une des pistes potentielles serait d'utiliser ou de tester des shRNA pour créer des cellules stables dans lesquelles l'expression de CXCR7 sera inhibée afin d'évaluer l'impact fonctionnel de la perte *in vitro* mais également *in vivo* sur les étapes de dissémination métastatique. Il faut noter également que lors du ciblage des gènes, aucun contrôle négatif n'a été réalisé à savoir les cellules transfectées avec un plasmide vide n'exprimant pas la Cas9 ou un plasmide exprimant un ARNg dépourvu de la région de reconnaissance du site spécifique (Ran et al., 2013). Afin de répondre à cette question, il sera concevable de réaliser ces contrôles.

PARTIE II

Détermination des conséquences fonctionnelles de la perte d'expression des récepteurs *in vitro*

1. Préambule

La propagation tumorale dans des organes à distance est un mécanisme complexe qui requiert plusieurs étapes séquentielles (Lambert et al., 2017). Cette partie du projet vise à déterminer l'implication des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans cette dissémination métastatique. La question principale est d'identifier le rôle respectif de chaque récepteur dans chaque étape de la dissémination, à savoir, la prolifération cellulaire, le franchissement de la lame basale de la tumeur primaire, l'entrée dans la circulation sanguine par intravasation, la migration sanguine/lymphatique pour atteindre les organes cibles, l'extravasation et l'implantation locale. Etant donné que nous ne disposons que de clones présentant une perte totale/partielle d'expression de CXCR4, les résultats présentés sont focalisés sur le rôle spécifique de ce récepteur, tout en essayant de moduler l'activité de CXCR7 ou CXCL12. Nous avons donc évalué les conséquences fonctionnelles des niveaux d'expression de CXCR4 sur la prolifération, la migration, l'invasion et la migration trans-endothéliale (modèle d'extravasation) *in vitro*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Lignées et culture cellulaire

La lignée endothéliale HUVEC ou *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* est cultivée dans du milieu basal *Endothelial Cell Growth Medium 2 (ECGM2)* supplémenté avec un *SupplementMix* (PromoCell, #C-22011).

Les cellules HUVEC, les cellules SW480 sauvages et les clones sont cultivés comme décrit dans la « **Partie I - Lignées et culture cellulaire** ».

2.2. Transfection cellulaire

Les transfections ont porté sur les ARN interférents dirigés contre les ARNm des récepteurs ou les plasmides d'expression pour leur expression, selon le type d'expérience.

2.2.1. Transfection des cellules par ARN interférence (siRNA)

Les cellules SW480 WT sont transfectées deux fois avec 48 h d'intervalle afin d'augmenter l'efficacité de la transfection et en utilisant une combinaison de deux siRNA (*Small Interfering*

RNA ; Qiagen). La première transfection est effectuée par transfection directe en déposant le complexe de transfection-siRNA sur les cellules et la seconde par la méthode indirecte, en décollant les cellules pour les ensemercer sur le complexe de transfection. Ce dernier type de transfection est décrit pour forcer l'entrée du complexe dans les cellules.

La lipofectamine (*RNAimax Transfection Reagent*, Invitrogen) est mélangée avec les siRNA spécifiques suivants : 40 nM du siRNA_Scramble ou siRNA_Contrôle (Eurogentec, #SR-CL000-005), 20 nM de chaque siRNA_CXCR4 (Flexitube – Qiagen, siCXCR4_7 #SI02664235 et siCXCR4_8, #SI02664242) dans du milieu DMEM sans SVF pour un volume final de 250 µl/puits dans une plaque de 6 puits. Après une incubation de 20 min à température ambiante, le mélange est ajouté sur 7.10^5 cellules ensemençées 24 h avant. Après 48 heures, la seconde transfection est effectuée à la même concentration de siRNA que lors de la première transfection, ensuite les ARN et protéines totaux sont extraits 72 h après pour vérifier l'efficacité de la transfection par RT-qPCR et western blot. Tous les résultats sont exprimés par rapport au siRNA contrôle.

2.2.2. Transfection des cellules par des plasmides d'expression

Les cellules des Clone 9-1 et Clone 9-3 sont ensemençées à 7.10^5 cellules/puits dans une plaque de 6 puits et transfectées avec le mélange de 1 µg du plasmide contrôle pcDNA3.1 (Invitrogen, #V79020) ou du plasmide pcDNA3-CXCR4 d'expression de CXCR4 (Addgene, #98942) avec les réactifs de transfection *JetPRIME® transfection reagent* (Polyplus). Après une incubation de 10 min à température ambiante, 100 µl/puits du complexe formé est ajouté sur les cellules et l'efficacité de la transfection est confirmée par RT-qPCR et western blot après 48 h de transfection pour la migration ou après 72 h pour l'invasion.

2.3. Expression transcriptionnelle par RT-qPCR

La transcription inverse sur les ARN totaux et la qPCR sont réalisées comme décrit dans la « **Partie I – Extraction des ARN totaux – RT et qPCR** ».

2.4. Expression protéique par western blot

Le western blot sur les protéines totales est réalisé comme décrit dans la « **Partie I – Western blot** ».

2.5. Mesure de l'activation de la Rac1

L'activation de la protéine GTPase monomérique Rac1 est mesurée par la méthode de "pull-down" avec la *Rac1 Activation Assay Biochem Kit* (#BK035). Les cellules sont rincées au PBS

1X froid avant d'être lysées avec du tampon de lyse complété d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X. Le surnageant est récupéré après une centrifugation à 10 000 g pendant 1 min à 4°C et ne doit pas dépasser 130% du volume initial du tampon de lyse ajouté. De ce lysat, 20 µl sont utilisés pour la quantification des protéines par la méthode de Bradford afin de normaliser les échantillons à 0,5 µg/µl qui sont directement congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Ensuite, 300 µg de protéines totales sont mélangées avec 20 µg de billes PAK-PBD (*p21 Activated Kinase 1-p21 Binding Domain*) et incubées pendant 1 h à 4°C sous rotation. La Rac1-GTP active fixée aux billes PAK-PBD est ensuite centrifugée à 5 000 g pendant 1 min à 4°C et ~90% du volume total sont retirés puis les billes sont remises en suspension dans 500 µl de tampon de lavage. Après ce rinçage à 5 000 g pendant 3 min à 4°C, les billes sont remises en suspension dans 10 µl de tampon de charge Laemmli (Biorad). Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 2 min à 95°C avant d'être analysés par western blot comme dans la « **Partie I – Western blot** ». En parallèle, la quantité de Rac1 totale est déterminée à partir de 20 µg de protéines totales. Après le transfert des protéines sur la membrane PVDF, la membrane est rincée 1 fois au *Tris-Buffer-Saline* 1X (TBS) et laissée sécher pendant 30 min à température ambiante. Elle est ensuite incubée dans du tampon de lavage TBS Tween 20 à 0,05% (TBST 0,05%) sur la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, la membrane est bloquée dans 5% de lait écrémé dans du TBST 0,05% pendant 30 min à température ambiante et après un lavage rapide, elle est incubée avec l'anticorps primaire (**Tableau 5**) dilué dans le tampon de lavage pendant 2 h à température ambiante sous agitation. Ensuite, l'anticorps secondaire dilué au 1/10 000 est incubé avec la membrane pendant 1 h à température ambiante après 1 min de lavage au TBST 0,05%. Elle est par la suite lavée 5 fois pendant 10 min et révélée comme décrit dans la section western blot.

Tampon TBS : 10 mM Tris-HCL pH8 – 150 mM NaCl.

2.6. Expression et localisation des protéines par immunofluorescence

L'immunofluorescence est réalisée comme décrit dans la « **Partie I – Immunofluorescence** ».

2.7. Test de prolifération

La prolifération des cellules est étudiée en marquant les cellules au CFSE (Carboxyfluorescéine HydroxySuccinimidyle Ester). Le CFSE est une molécule qui rentre passivement dans les cellules et émet de la fluorescence une fois fixée sur les protéines cytoplasmiques. Cette fluorescence est conservée au cours des divisions cellulaires où les cellules filles héritent de la moitié de la fluorescence de la cellule mère ; cela se traduit par la dilution de l'intensité de la

fluorescence au fur et à mesure des divisions cellulaires.

Les cellules en suspension sont rincées 2 fois au PBS 1X à 300 g pendant 10 min à température ambiante et 1.10^6 cellules sont reprises dans 700 μ l de PBS 1X. Elles sont ensuite marquées avec 1 μ l de CFSE (50 μ M) (Invitrogène, #C34554) pendant 10 min à 37°C à l'abri de la lumière. L'excès de CFSE est capté par l'ajout de 700 μ l de SVF froid pendant 5 min et les cellules maintenues sur la glace sont rincées 2 fois avec du DMEM à 1 000 rpm pendant 7 min à température ambiante. Elles sont reprises dans du DMEM - 10% SVF etensemencées à raison de 5.10^5 cellules/boite pour une durée de 24, 48, 72 et 96 h respectivement. En parallèle, des cellules non-marquées sontensemencées pour évaluer leur auto-fluorescence. Le jour des analyses, les cellules sont mises en suspension dans 300 μ l de DAPI (1/40 000) dilué dans du PBS 1X puis analysées au cytomètre comme décrit dans la « **Partie I – Expression membranaire des récepteurs par cytométrie en flux** ».

2.8. Tests de migration et d'invasion

Les tests de migration et d'invasion sont réalisés en utilisant des chambres de Boyden (ThinCert™) avec des inserts ayant des pores de 8 μ m (Greiner Bio-one, #662638).

Les cellules sont sevrées avec du DMEM - 1% de SVF et pour l'invasion, 250 μ g/ml de matrigel (Corning, #356237) sont coulés dans les inserts. Après 5 h à 37°C, 5.10^4 cellules / 500 μ l de DMEM - 1% de SVF sontensemencées dans le compartiment supérieur avec ou sans le matrigel et dans le compartiment inférieur, 100 ou 10 ng/ml du ligand CXCL12- β (GeneScript, #P48061) sont ajoutés dans 1200 μ l de DMEM. Pour les contrôles, le compartiment inférieur contient soit du DMEM sans CXCL12, soit du DMEM - 10% de SVF.

Les cellules sont maintenues à 37°C pendant 24 h pour la migration et 48 h pour l'invasion, puis fixées avec 4% de PFA pendant 20 min, rincées au PBS 1X et colorées au crystal violet 0,1% pendant 10 min. Le crystal violet est éliminé avec 3 bains d'eau du robinet et 1 bain d'eau ultrapure et les inserts sont laissés sécher toute la nuit. Les cellules n'ayant pas migré (partie supérieure du filtre) sont grattées avec un coton tige et le filtre est découpé et monté entre lame et lamelle avec de la résine eukitt, la face supérieure du filtre faisant face à la lamelle. Les lames sont observées au microscope optique et les cellules comptées manuellement ou grâce au logiciel ImageJ sur la totalité de chaque insert.

Dans les expériences utilisant les antagonistes, le schéma expérimental est le même mais les cellules sont traitées 24 h avant d'êtreensemencées dans les inserts, avec des concentrations croissantes d'antagonistes seuls ou combinés ou avec les solvants à 0,1% pour les contrôles (diméthylsulfoxyde DMSO ou éthanol). Les antagonistes sont : l'AMD3100 (SelleckChem,

#S8030 ; 1 et 10 μ M), antagoniste de CXCR4, le CCX771 (ChemoCentryx, #CO 330 771-14 ; 5 et 50 nM) antagoniste de CXCR7 et un neutralisant de CXCL12, la chalcone 4 (ProbeChem, #PC-60261 ; 1 et 10 μ M). Dans le traitement avec la chalcone, deux conditions ont été utilisées : une condition où les cellules sont traitées avec le neutralisant et une seconde condition dans laquelle la chalcone 4 est incubée avec 10 ng/ml de CXCL12- β pour former un complexe qui va piéger le ligand et le rendre inactif pendant le traitement.

2.9. Test de migration trans-endothéliale

La migration trans-endothéliale est réalisée dans les chambres de Boyden (*voir section Tests de migration et d'invasion*). Les cellules HUVEC sontensemencées à une densité de 1.10^5 cellules dans 500 μ l de milieu HUVEC dans le compartiment supérieur préalablement recouvert de Matrigel pendant 5 h et en mettant 1200 μ l du milieu HUVEC dans le compartiment inférieur. Quarante-huit heures après la mise en culture, les cellules SW480 sauvages et les clones sont sevrés avec du DMEM - 1% SVF puis marqués avec le colorant vital *Vybrant DiI cell-labelling solution* (Thermofisher, #V-22885) à raison de 5 μ l pour 1.10^6 cellules/ml pendant 20 min à 37°C. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS 1X par centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min à température ambiante. Elles sont ensuite reprises dans du DMEM - 1% SVF et 5.10^4 cellules/500 μ l sontensemencées sur les cellules HUVEC préalablement rincées au DPBS 1X (PBS sans Ca^{2+} et Mg^{2+}). Du DMEM avec ou sans CXCL12 est ajouté dans le compartiment inférieur comme pour la migration et l'invasion. Après 48 h de migration, les cellules tumorales ayant migré sont fixées pendant 20 min avec 4% de PAF puis incubées avec du DAPI (1/20 000 dans du PBS 1X) et les filtres découpés et grattés sont montés entre lames et lamelles avec le liquide de montage Aqua-Poly/Mount (Polysciences). Les lames sont observées au microscope à fluorescence et les cellules comptées comme pour la migration et l'invasion.

2.10. Analyses statistiques

Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne) et la détermination des p-values a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 5. Les comparaisons de deux groupes sont réalisées par le test non paramétrique de Mann-Whitney U. Les comparaisons de plusieurs groupes sont réalisées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi par le test de Dunns pour la comparaison des groupes deux à deux.

3. Résultats

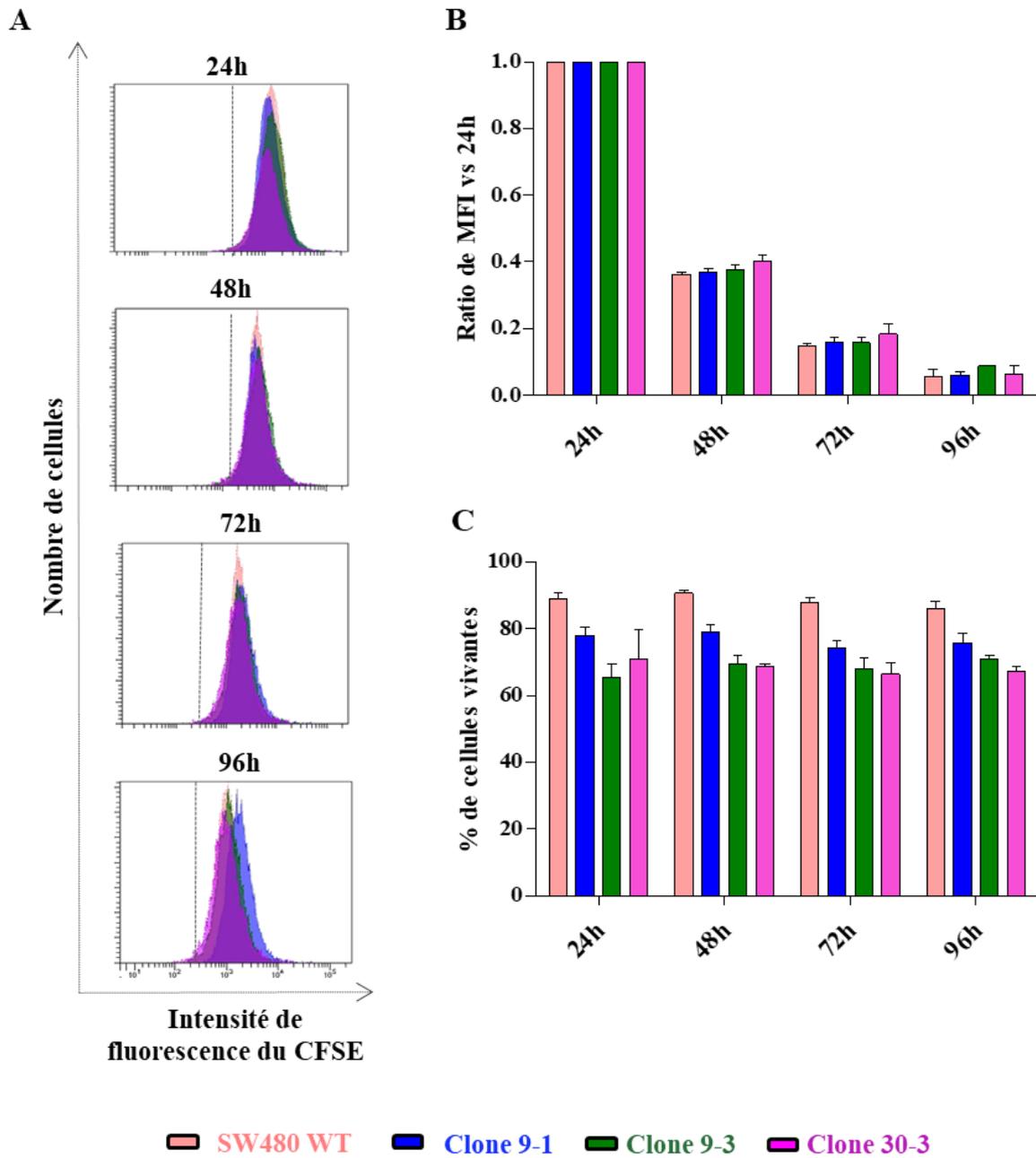


Figure 31. Prolifération des cellules marquées au CFSE par cytométrie en flux.

Mesure de l'intensité de la fluorescence émise dans les cellules SW480 WT, du Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 marquées au CFSE pendant 24, 48, 72 et 96 h (A). Ratio de la moyenne de l'intensité de la fluorescence émise par rapport à l'intensité à 24 h dans les différentes cellules (B). Pourcentage de la population de cellules vivantes (DAPI négatives) dans lesquelles la prolifération a été analysée (C). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. MFI : mean fluorescence intensity.

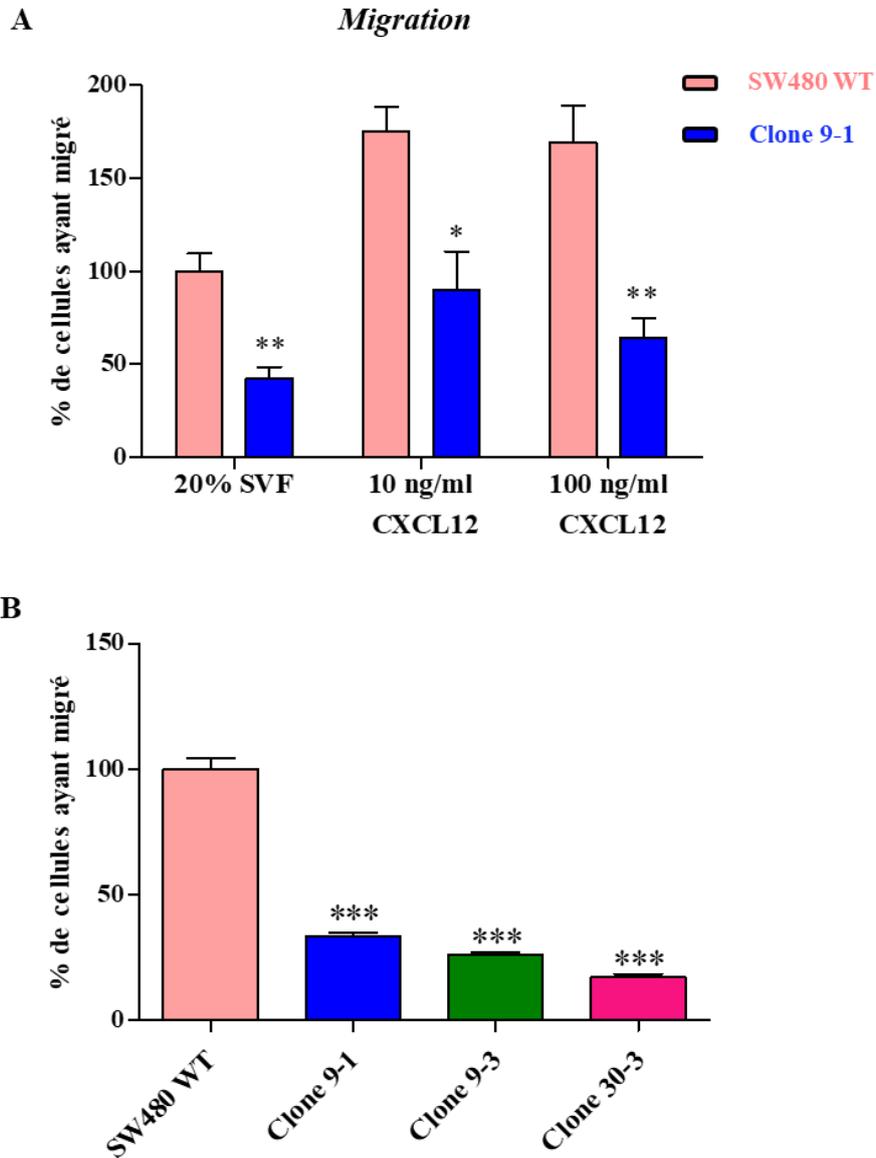


Figure 32. Migration cellulaire dans les chambres de Boyden.

Les cellules SW480 WT et le Clone 9-1 migrent en présence de 20% de SVF, 10 et 100 ng/ml de CXCL12- β pendant 24 h (A). Les cellules SW480 WT et les Clone 9-1, Clone 9-3, Clone 30-3 migrent en présence de 10 ng/ml de CXCL12- β pendant 24 h (B). Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules migrantes par rapport aux cellules SW480 WT à 20% de SVF (A) ou aux cellules SW480 WT (B). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1. Étude de la prolifération cellulaire

Dans le but d'étudier si l'absence d'expression de CXCR4 impacte la prolifération cellulaire, l'intensité de la fluorescence du CFSE dans les cellules a été analysée pendant 24, 48, 72 et 96 h de culture par cytométrie en flux. Les résultats montrent que la perte totale ou partielle de l'expression de CXCR4 ne diminue pas la capacité proliférative des cellules. En effet, la prolifération est identique dans les cellules SW480 WT comme tous les clones (Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3), puisque nous observons la même diminution de l'intensité de fluorescence de 24 à 96 h de culture (**Figure 31A**). Ces analyses indiquent que le temps de doublement de plus de la moitié de la population est de 24 h (**Figure 31B**).

Malgré le profil de prolifération identique avec ou sans CXCR4, le pourcentage de cellules vivantes (négatives à la coloration au DAPI) dans tous les clones, baisse mais de manière non significative de ~13% pour le Clone 9-1 et ~17 à 24% pour les Clone 9-3 et Clone 30-3 comparées aux cellules SW480 WT (**Figure 31C**), diminution observée dès 24 h de culture.

Ces résultats montrent que la perte d'expression de CXCR4 n'affecte pas la prolifération des cellules, mais diminue la viabilité cellulaire.

3.2. Étude de la migration cellulaire

3.2.1. Impact de la perte d'expression de CXCR4 sur la migration

Pour évaluer la conséquence de la perte/diminution d'expression du récepteur CXCR4 sur la migration des cellules, nous avons analysé leur potentiel de migration à travers un test en chambre de Boyden.

Nous avons vérifié que CXCL12, le ligand naturel de CXCR4 et CXCR7 exerce une action chimio-attractante sur les cellules. La migration des cellules SW480 sauvages et du Clone 9-1 est ~2 fois plus importante en présence de 10 et 100 ng/ml de CXCL12 qu'en présence de SVF 20% (**Figure 32A**). Par contre, il n'y a pas d'effet dose de CXCL12 puisque le nombre de cellules qui migrent est identique avec 10 ou 100 ng/ml. Par conséquent, la suite des expériences a été réalisée en présence de 10 ng/ml de CXCL12. D'autre part, les résultats montrent une baisse de ~50% de la migration du Clone 9-1 *versus* les cellules SW480 WT, que ce soit avec du SVF ou CXCL12 (**Figure 32A**).

Ces conditions expérimentales ont été appliquées aux cellules SW480 sauvages et aux trois clones et les résultats indiquent une diminution respective de 68% et 74% de la migration pour les Clone 9-1 et Clone 9-3 qui n'expriment plus CXCR4 (**Figure 32B**). De manière étonnante, la diminution de la migration atteint 87% pour les cellules du Clone 30-3 qui expriment faible-

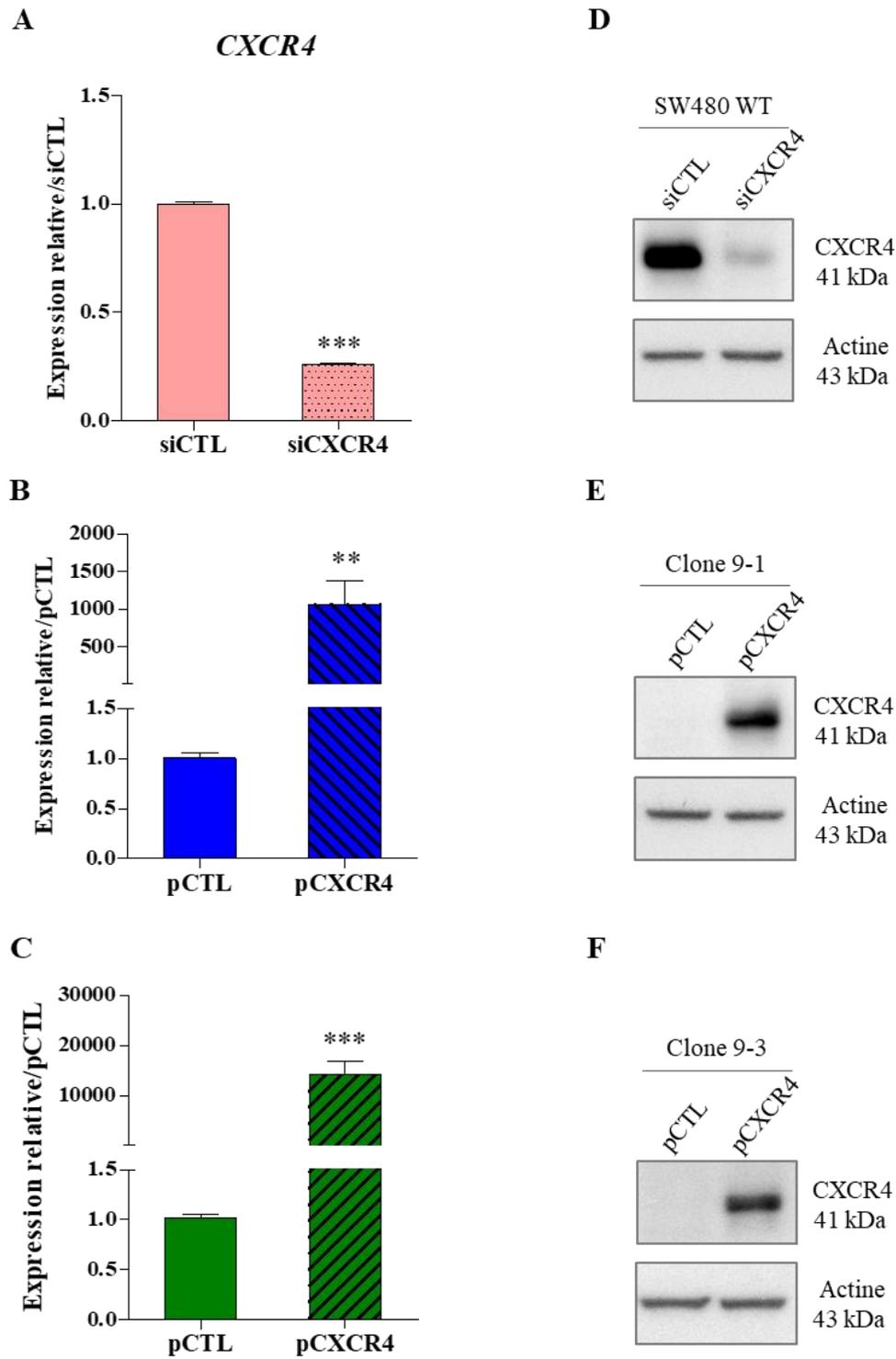


Figure 33. Efficacité des transfections pour la validation de l'implication de CXCR4 dans la migration cellulaire.

Expression transcriptionnelle (A-C) et protéique (D-F) de CXCR4 dans les cellules SW480 WT transfectées avec les siCXCR4 (A,D) et les Clone 9-1 (B,E) et Clone 9-3 (C,F) transfectés avec le plasmide pCXCR4. La quantification de l'expression de CXCR4 est normalisée par rapport aux groupes contrôles siCTL ou pCTL respectivement. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM d'expériences indépendantes (n=6 pour A et C et n=3 pour B). **p<0,01 ; ***p<0,001.

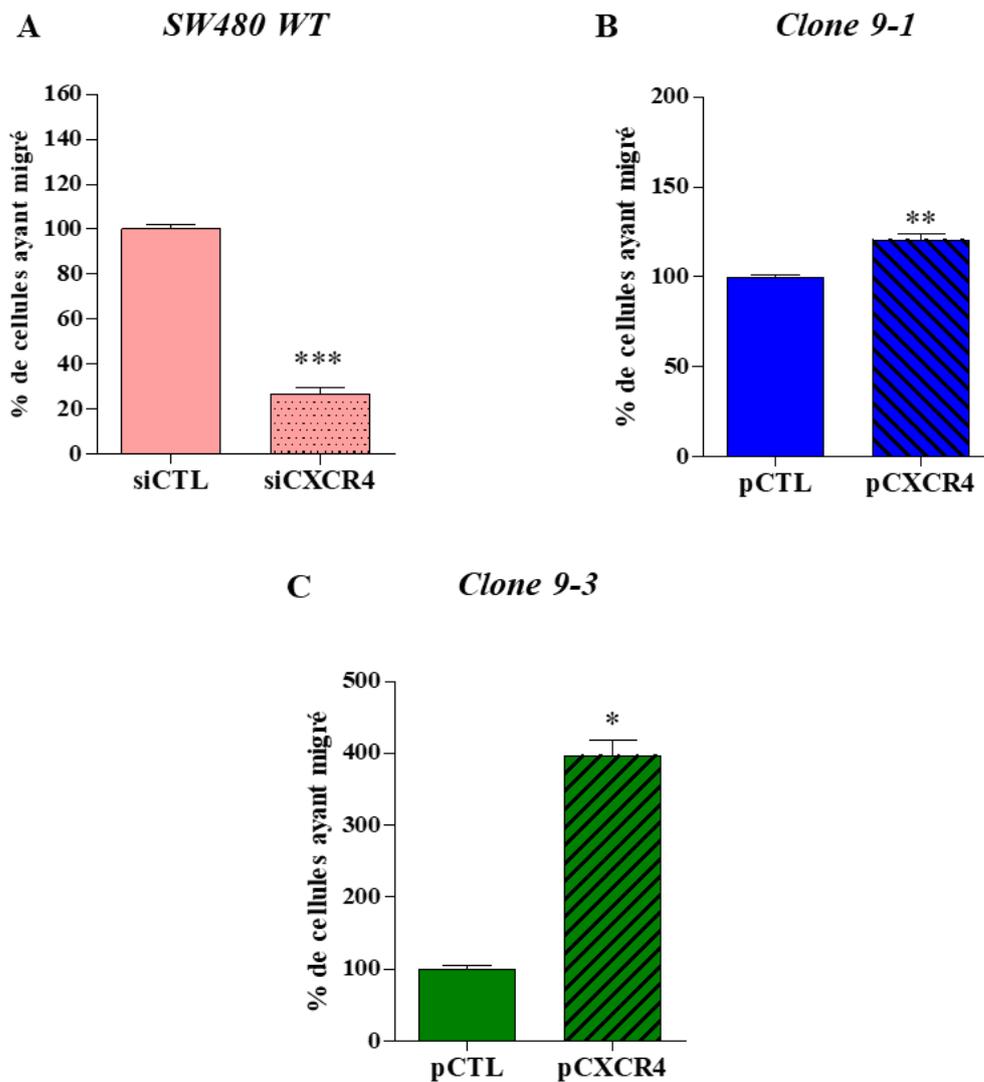


Figure 34. Validation de l'implication de CXCR4 dans la migration cellulaire.

Les cellules SW480 WT transfectées avec les siCXCR4 (A) et les Clone 9-1 (B) et Clone 9-3 (C) transfectés avec le plasmide pCXCR4 ayant migré sous en présence de 10 ng/ml de CXCL12- β pendant 24 h. Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules migrantes par rapport aux cellules des groupes contrôles siCTL ou pCTL respectivement. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

ment CXCR4 (**Figure 32B**). Ces résultats suggèrent une implication de CXCR4 dans la migration des cellules tumorales coliques.

Pour valider le rôle de CXCR4 dans la migration, nous avons évalué la migration des cellules SW480 sauvages et des Clone 9-1 et Clone 9-3 transfectés respectivement avec des siRNA dirigés contre CXCR4 (siCXCR4) et un plasmide d'expression de CXCR4 (pCXCR4). L'efficacité des transfections est évaluée sur le niveau d'expression des transcrits par RT-qPCR et des protéines par western blot. Les résultats montrent que les siRNA entraînent une réduction de 74% de l'expression de CXCR4 par rapport au siRNA contrôle (siCTL) (**Figure 33A,D**) et à l'opposé, une expression de plus de 1000X avec le plasmide d'expression en comparaison au plasmide contrôle (pCTL) (**Figure 33B à F**).

Ainsi, la diminution d'expression de CXCR4 dans les cellules SW480 sauvages par siCXCR4 diminue la capacité de migration des cellules de 74% (**Figure 34A**). Inversement, la migration est augmentée de 1,2 et 8 fois dans les deux clones KO CXCR4 transfectés avec le plasmide pCXCR4 (**Figure 34B,C**).

Ces données confirment que le récepteur CXCR4 régule le processus migratoire de ces cellules tumorales coliques.

3.2.2. Impact du ciblage de l'axe CXCL12 et ses deux récepteurs sur la migration

Une autre façon de confirmer l'implication de CXCR4 dans la migration cellulaire, est de cibler le récepteur par un de ses antagonistes, l'AMD3100 dans les cellules SW480 sauvages. En parallèle, le rôle de CXCR7 et de l'axe CXCL12/récepteurs a été évalué avec le CCX771, un antagoniste de CXCR7 et la chalcone 4, qui se fixe à CXCL12 et bloque son interaction avec ses récepteurs. Les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes des antagonistes pendant 24 h avant la migration et la chalcone 4 est utilisée combinée ou non à CXCL12.

Les résultats montrent que la capacité de migration des cellules SW480 WT est diminuée de 41% et 29% respectivement avec 1 et 10 μ M de l'AMD3100 (**Figure 35A**). Le ciblage de CXCR7 avec 5 et 50 nM de CCX771, inhibe la migration de 41% et 46% respectivement (**Figure 35A**). En présence de 1 μ M et 10 μ M de chalcone 4, une diminution de la migration de 19% et de 51% respectivement est observée ; cependant ces effets inhibiteurs sont amplifiés lorsque les deux concentrations de la chalcone 4 sont appliquées combinées à CXCL12, puisque la migration diminue de 65% et 77% respectivement.

Nous avons également évalué les effets de combinaison de ces molécules. Les résultats révèlent

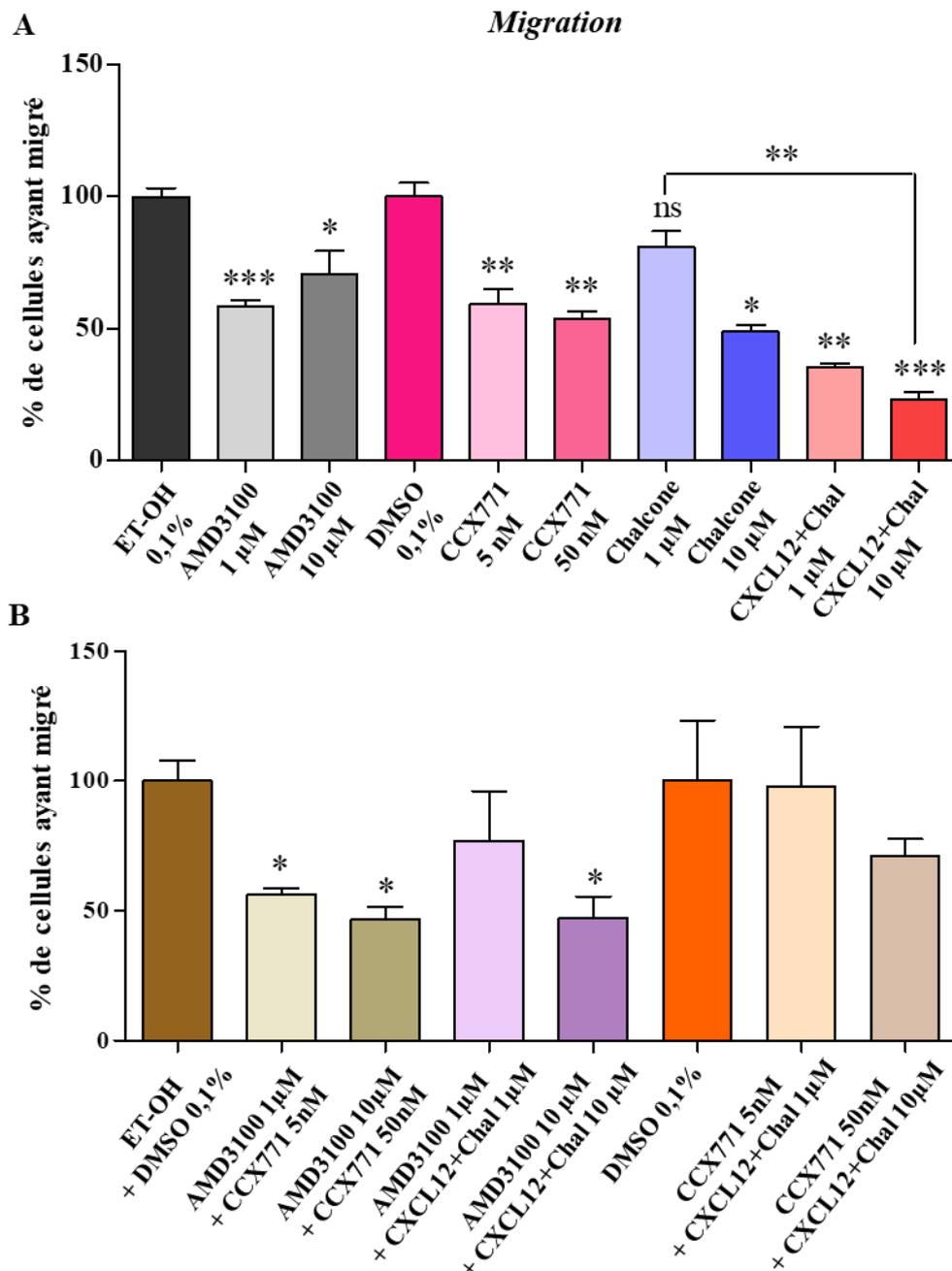


Figure 35. Effets d'inhibiteurs de CXCR4, CXCR7 et CXCL12 sur la migration cellulaire.

Les cellules SW480 WT sont traitées avec les concentrations croissantes d'antagonistes de CXCR4 (AMD3100) à 1 et 10 µM, de CXCR7 (CCX771) à 5 et 50 nM et d'un neutralisant de CXCL12 (chalcone 4) à 1 et 10 µM seuls (A) ou en combinaison (B) pendant 24 h puis migrent en présence de 10 ng/ml de CXCL12-β pendant 24 h. Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules migrantes par rapport aux cellules des groupes contrôles Et-OH et/ou DMSO à 0,1% respectivement. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de 3 à 6 expériences (A) et 3 expériences (B). CXCL12+Chal : Traitement de la chalcone 4 combinée avec 10 ng/ml de CXCL12-β. *p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001; ns : non significatif.

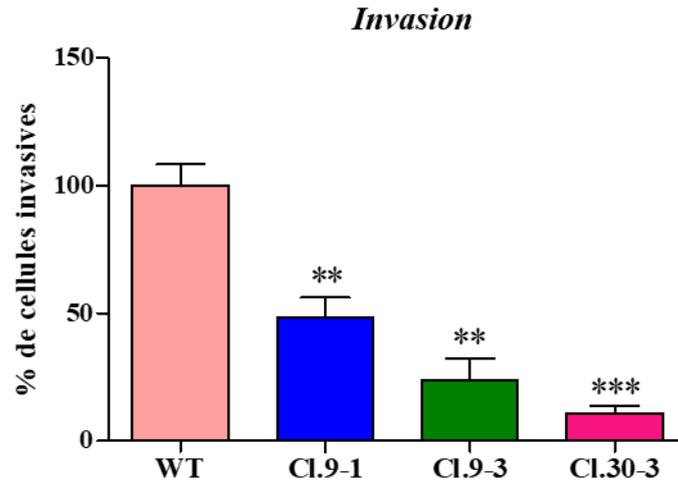


Figure 36. Invasion cellulaire dans les chambres de Boyden.

Les cellules SW480 WT et les Clone 9-1, Clone 9-3, Clone 30-3 migrent dans les puits tapissés de Matrigel en présence de 10 ng/ml de CXCL12- β pendant 48 h. Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules invasives par rapport aux cellules SW480 WT. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

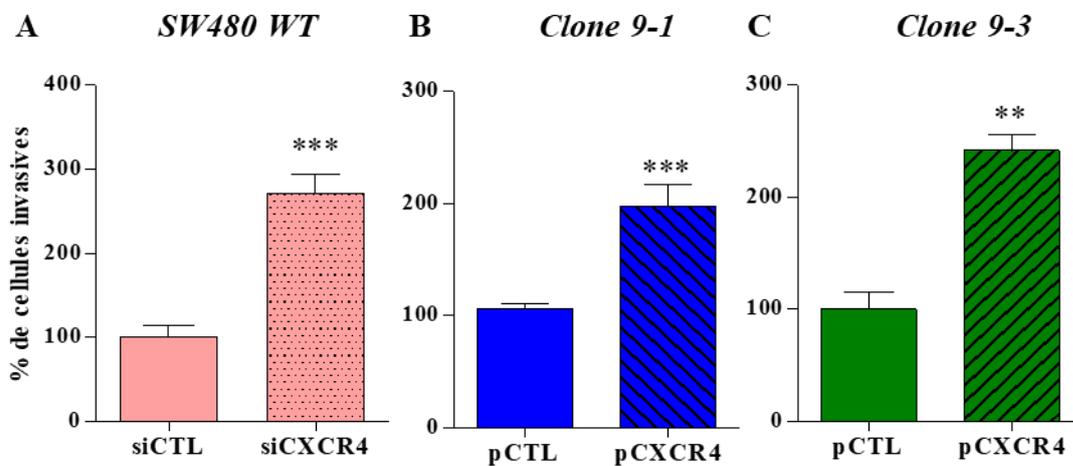


Figure 37. Validation de l'implication de CXCR4 dans l'invasion cellulaire.

Les cellules SW480 WT transfectées avec les siCXCR4 (A) et les Clone 9-1 (B) et Clone 9-3 (C) transfectés avec le plasmide pCXCR4 ayant migré dans les puits tapissés de Matrigel en présence de 10 ng/ml de CXCL12- β pendant 48 h. Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules invasives par rapport aux cellules des groupes contrôles siCTL ou pCTL respectivement. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

une baisse de la migration de manière dose-dépendante quel que soit la combinaison utilisée, avec 47% d'inhibition en combinant l'AMD3100 et CCX771 et 53% en combinant l'AMD3100 avec la chalcone 4 à forte concentration (**Figure 35B**). Par contre, l'inhibition est plus faible (29%) pour la combinaison de CCX771 et la chalcone 4 à forte concentration et les concentrations faibles sont sans effet (**Figure 35B**).

Ces données apportent des confirmations de l'implication de CXCR4 dans la migration des cellules tumorales et montrent que CXCR7 participe également à ce processus. Cependant, la combinaison des antagonistes ne produit pas d'effet additif ou synergique pour inhiber la migration et le ciblage seul de CXCL12 est plus efficace pour réduire cette migration.

3.3. Étude de l'invasion cellulaire

3.3.1. Impact de la perte d'expression de CXCR4 sur l'invasion

L'impact de la perte/diminution d'expression de CXCR4 a été évalué sur l'invasion des cellules également en chambre de Boyden. L'invasion des cellules est mesurée par leur capacité à traverser une matrice extracellulaire artificielle mimée par le matrigel. Les résultats montrent qu'en absence de CXCR4, l'invasion cellulaire est réduite de 52% dans le Clone 9-1, 76% dans le Clone 9-3 et de 89% dans le Clone 30-3 présentant un niveau réduit de CXCR4 (**Figure 36**), suggérant que CXCR4 est impliqué également dans l'invasion tumorale.

La confirmation de son implication dans le caractère invasif des cellules est évaluée par les mêmes approches de perte et de gain de fonction comme pour la migration. L'efficacité des transfections a été également validée (**résultats non montrés**). À noter que l'inhibition ou la surexpression de l'expression de CXCR4 n'affecte pas l'expression protéique de CXCR7 mais entraîne une baisse de 68% de son niveau transcriptionnel avec les siRNA (**résultats non montrés**).

De façon étonnante, lorsque les cellules SW480 sauvages sont transfectées avec les siCXCR4, l'invasion plutôt que d'être diminuée, est augmentée de 2,7 fois (**Figure 37A**). Par contre, les capacités invasives des Clone 9-1 et Clone 9-3 transfectés avec le plasmide d'expression sont fortement augmentées (de 1,9 et 2,4 respectivement), comme pour les expériences de migration (**Figure 37B à C**).

L'ensemble de ces résultats montrent que CXCR4 est bien impliqué dans l'invasion tumorale bien que les effets favorisant cette invasion avec les siRNA ne soient pas cohérents avec l'ensemble des données.

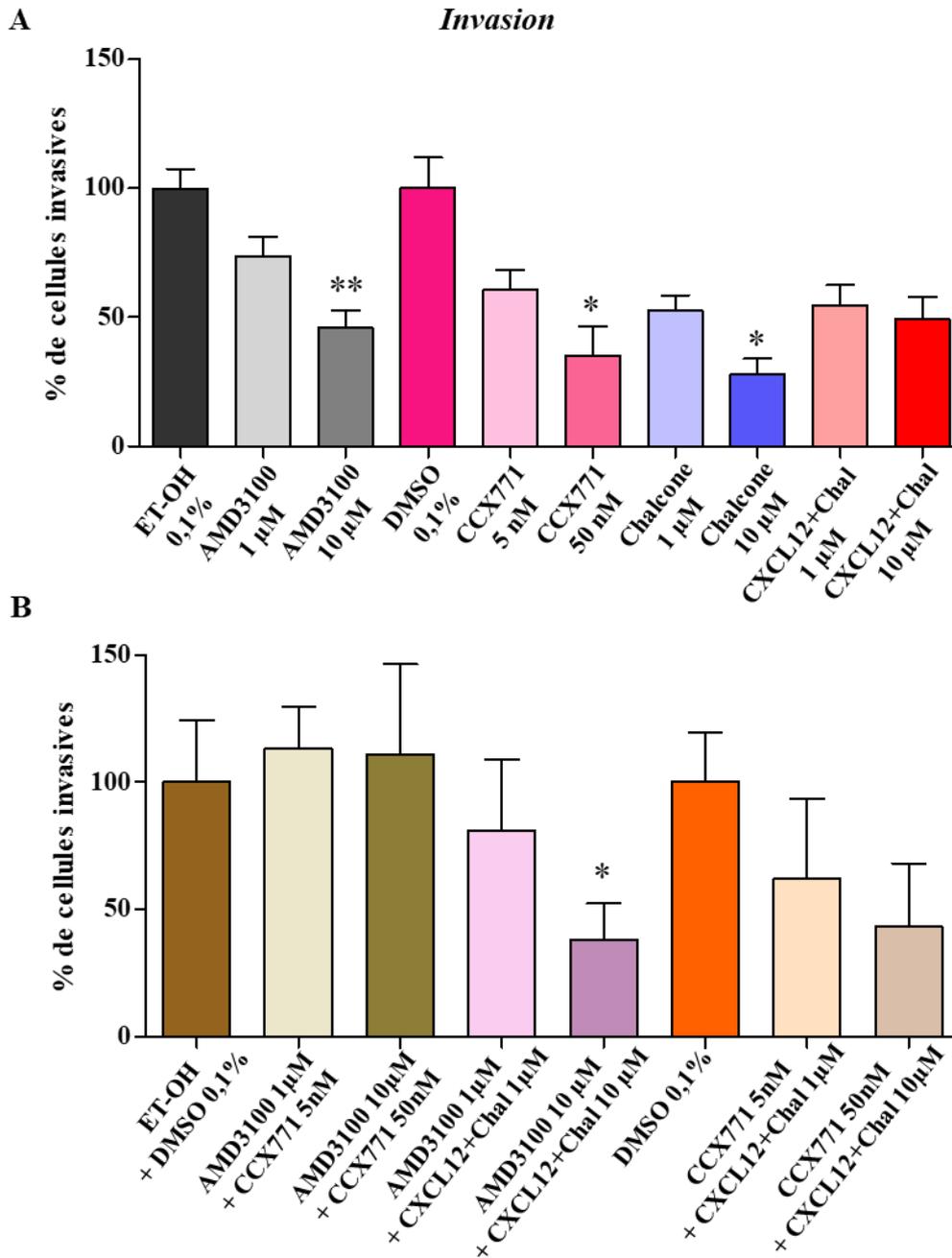


Figure 38. Effets d'inhibiteurs de CXCR4, CXCR7 et CXCL12 sur l'invasion cellulaire.

Les cellules SW480 WT sont traitées avec les concentrations croissantes d'antagonistes de CXCR4 (AMD3100) à 1 et 10 µM, de CXCR7 (CCX771) à 5 et 50 nM et d'un neutralisant de CXCL12 (chalcone 4) à 1 et 10 µM seuls (A) ou en combinaison (B) pendant 24 h puis migrent dans les puits tapissés de Matrigel en présence de 10 ng/ml de CXCL12-β pendant 24 h. Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules invasives par rapport aux cellules des groupes contrôles Et-OH et/ou DMSO à 0,1% respectivement. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de 3 à 6 expériences (A) et 3 expériences (B). CXCL12+Chal : Traitement de la chalcone 4 combinée avec 10 ng/ml de CXCL12-β. *p<0,05; **p<0,01.

3.3.2. Impact du ciblage de l'axe CXCL12 et ses deux récepteurs sur l'invasion

Nous avons de nouveau utilisé les antagonistes de CXCR4, CXCR7 et du neutralisant de CXCL12, seuls ou combinés pour évaluer leurs effets dans l'invasion des cellules SW480 sauvages.

Les résultats montrent que la capacité invasive des cellules est diminuée de manière dose-dépendante avec tous les traitements (**Figure 38A**). En effet, la baisse est de 26% et 54% respectivement avec les concentrations 1 et 10 μM de l'AMD3100, de 39% et 65% respectivement avec les concentrations 5 et 50 nM de l'antagoniste de CXCR7, CCX771 (**Figure 38A**). Avec la chalcone 4, l'invasion est diminuée de 47% et 72% respectivement pour les concentrations de 1 et 10 μM (**Figure 38A**). En revanche, la combinaison de la chalcone 4 avec CXCL12 est moins efficace pour diminuer le potentiel invasif des cellules (46% et 51% respectivement avec 1 et 10 μM) (**Figure 38A**) contrairement à ce qui avait été observé pour la migration.

Concernant les traitements combinés, l'AMD3100 et le CCX771 ensemble n'ont pas d'effets sur l'invasion des cellules (**Figure 38B**). Toutefois, la chalcone 4 combinée à chacun des antagonistes de CXCR4 ou CXCR7, entraîne une baisse dose-dépendante du pourcentage de cellules invasives (**Figure 38B**) ; et l'inhibition est de 62% et de 57% pour les concentrations élevées des molécules respectivement même si les différences ne sont pas significatives (**Figure 38B**).

Ces données apportent des confirmations sur l'implication de CXCR4 dans l'invasion des cellules tumorales mais suggèrent également une implication de CXCR7 dans ce processus. Les effets inhibiteurs de la chalcone 4 affirment que les récepteurs sont impliqués dans l'invasion après activation par le ligand CXCL12. Cependant, combiner les antagonistes des récepteurs n'entraîne pas d'effet synergique ou additif pour inhiber l'invasion cellulaire.

3.4. Étude de la migration trans-endothéliale

Nous nous sommes également intéressés à la migration trans-endothéliale, qui est également importante durant la propagation de la tumeur. L'étude de ce type de migration *in vitro* repose sur la capacité des cellules tumorales à traverser des cellules endothéliales, les cellules HUVEC dans notre cas,ensemencées dans les chambres de Boyden préalablement recouvert de Matrigel. Ce système de co-culture mime l'orientation des cellules endothéliales et tumorales durant le processus d'extravasation *in vivo*.

L'analyse des effets de la perte d'expression de CXCR4 évaluée sur le potentiel de migration

Migration trans-endothéliale

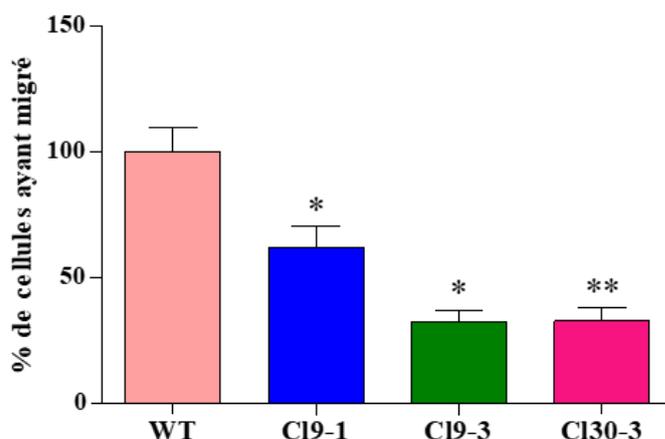


Figure 39. Migration trans-endothéliale dans les chambres de Boyden.

Les cellules SW480 WT et les Clone 9-1, Clone 9-3, Clone 30-3 sont marqués au colorant vital Vybrant DiI puis migrent dans les puits tapissés de Matrigel et de cellules endothéliales HUVEC en présence de 10 ng/ml de CXCL12- β pendant 48 h. Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules migrantes par rapport aux cellules SW480 WT. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 7 à 8 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

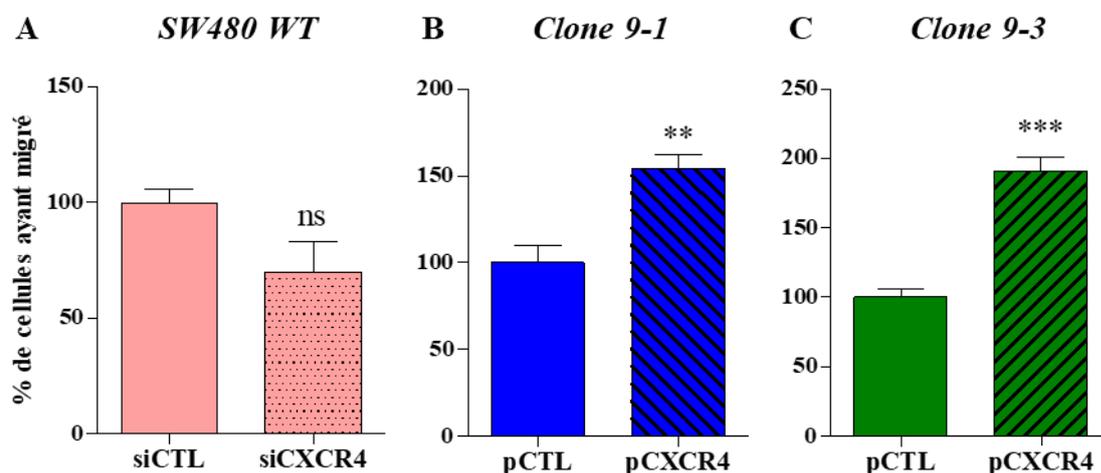


Figure 40. Validation de l'implication de CXCR4 dans la migration trans-endothéliale dans les chambres de Boyden.

Les cellules SW480 WT transfectées avec les siCXCR4 (A) et les Clone 9-1 (B) et Clone 9-3 (C) transfectées avec le plasmide pCXCR4 ayant migré à travers les cellules HUVEC dans les puits tapissés de matrigel sous l'action de 10 ng/ml de CXCL12- β pendant 48 h. Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules migrantes par rapport aux cellules des groupes contrôles siCTL ou pCTL respectivement. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM d'expériences indépendantes (n=3 pour A, n=4 pour B et C). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns : non significatif.

des cellules à travers les cellules endothéliales, montre une réduction de 41% et 61% des cellules des Clone 9-1 et Clone 9-3 (KO CXCR4) qui migrent et une baisse de 70% pour le Clone 30-3, diminué pour l'expression du récepteur (**Figure 39**). Ces données suggèrent également une participation de CXCR4 dans la régulation du processus d'extravasation *in vitro*. Comme pour les précédents processus fonctionnels, dans le but de valider ces observations, nous avons de nouveau utilisé les mêmes approches et l'efficacité des transfections est similaire comme dans les études de migration et d'invasion (**résultats non montrés**).

De ce fait, la réduction de l'expression de CXCR4 dans les cellules SW480 sauvages par siCXCR4, diminue de manière non significative, la capacité de migration trans-endothéliale des cellules de ~30% comparées aux cellules en présence du siCTL (**Figure 40A**). Similairement à la migration et l'invasion, en présence de plasmide d'expression de CXCR4, la migration à travers les cellules HUVEC des cellules KO CXCR4 du Clone 9-1 et Clone 9-3 augmente de 1,5 et 1,9 fois respectivement par rapport aux cellules contrôles (**Figure 40B,C**).

Ces résultats confirment l'intervention de CXCR4 dans la régulation de la migration trans-endothéliale, même si la baisse de ce processus lorsque CXCR4 est ciblé par siRNA est moins importante.

3.5. Étude des mécanismes impliqués dans les étapes du processus métastatique

Les résultats précédents montrent que CXCR4 participe aux premières étapes de la dissémination tumorale en contrôlant la migration, l'invasion et la migration trans-endothéliale des cellules.

Pour étudier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les processus migratoires et invasifs, l'impact de la perte/diminution d'expression de CXCR4 a été étudié sur des fonctions cellulaires décrites pour favoriser la dissémination.

3.5.1. La transition épithélio-mésenchymateuse

Nous avons regardé l'effet de l'absence/baisse d'expression de CXCR4 sur l'expression de marqueurs moléculaires favorisant l'EMT, mécanisme par lequel les cellules épithéliales polarisées se transforment en cellules mésenchymateuses mobiles, permettant l'évasion des cellules tumorales de leur localisation primaire et pour atteindre les organes de métastases (Kalluri and Weinberg, 2009; Lambert et al., 2017). Parmi ces marqueurs, nous avons analysé l'expression transcriptionnelle de la E-cadhérine, un marqueur du phénotype épithélial et son expression est diminuée de 32% et 73% dans les Clone 9-1 et Clone 30-3 respectivement mais seulement de 28% dans le Clone 9-3 par rapport aux cellules SW480 sauvages (**Figure 41A**).

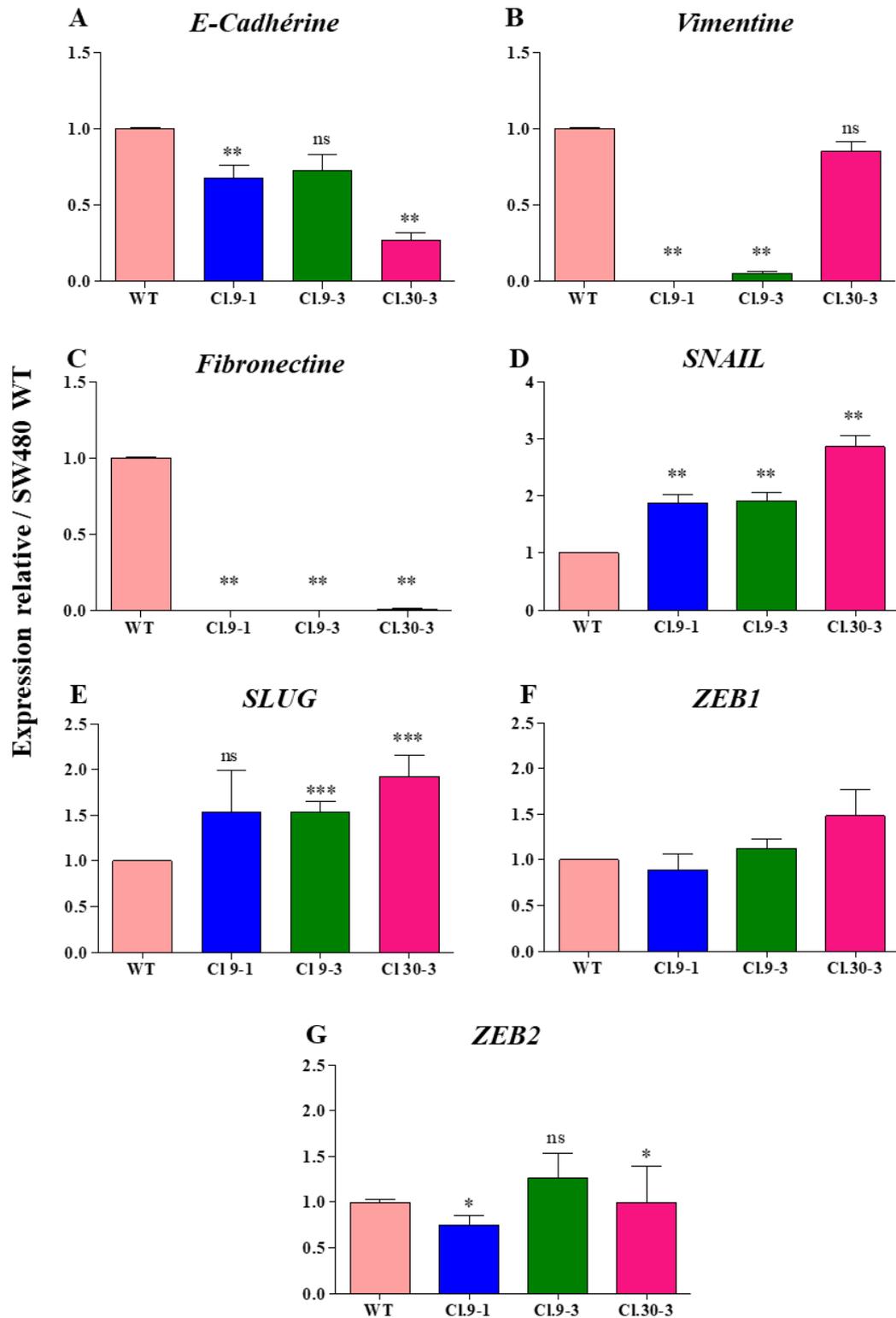


Figure 41. Expression transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'EMT par RT-qPCR. Expression relative des ARNm codant pour la E-cadhérine (A), la vimentine (B), la fibronectine (C), Snail (D), Slug (E), Zeb1 (F) et Zeb2 (G) dans les cellules des Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 par rapport aux cellules SW480 WT. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ns: non significatif.

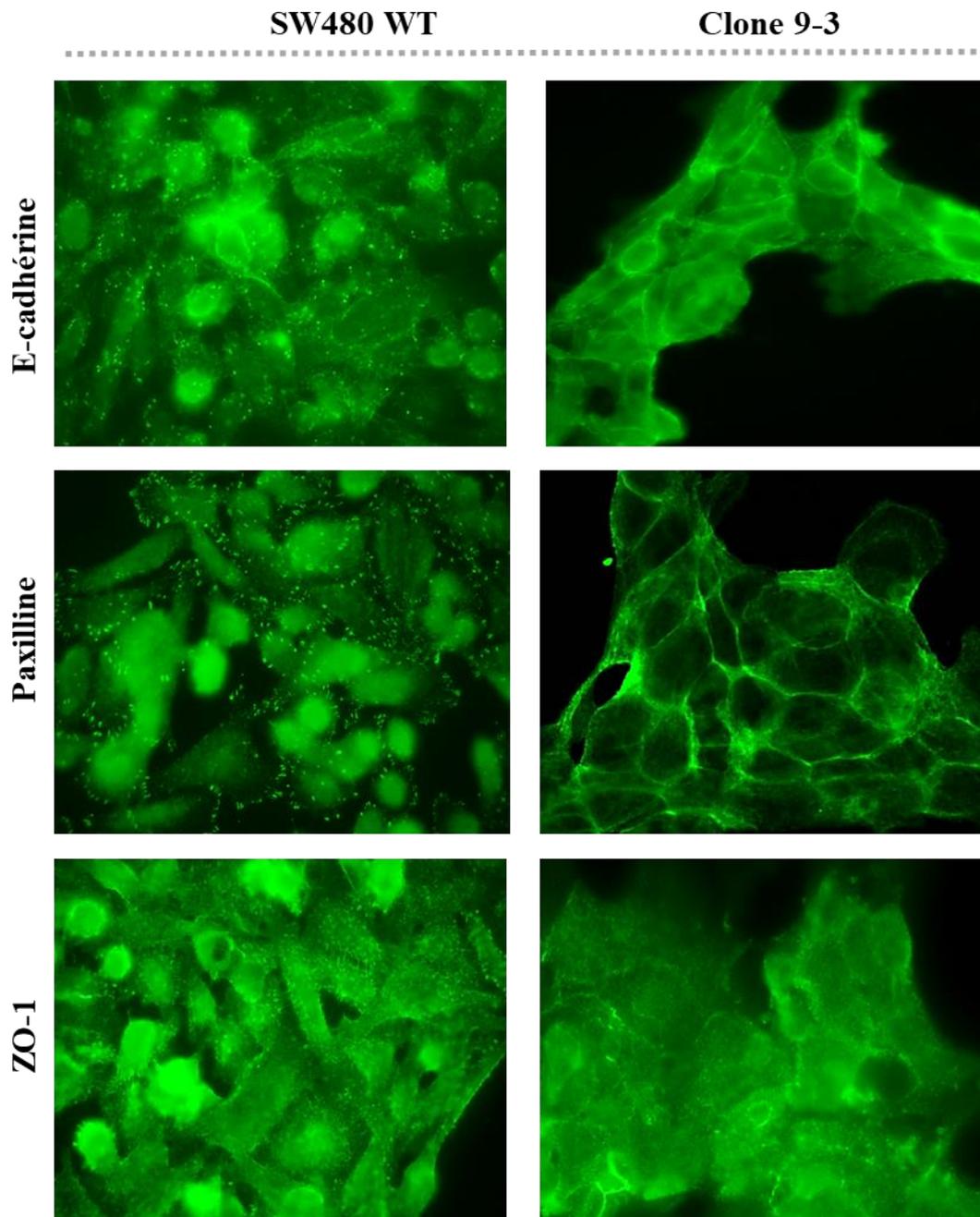


Figure 42. Localisation des protéines d'adhérence par immunofluorescence.
 Marquage membranaire de la E-cadhérine, paxilline phosphorylée et ZO-1 dans les cellules SW480 WT et le Clone 9-3. Grossissement x63.

De manière intéressante, cette baisse n'est pas associée à une augmentation de deux marqueurs mésenchymateux, la vimentine (**Figure 41B**) et la fibronectine (**Figure 41C**). Au contraire, il n'y a aucune expression des ARNm dans les trois clones, à l'exception de la vimentine dans le Clone 30-3, dont l'expression est comparable à celle des cellules SW480 sauvages. Par ailleurs, les niveaux d'expression des facteurs de transcription Snail et Slug associés au phénotype mésenchymateux, sont élevés dans les trois clones (**Figure 41D,E**). Par contre, la perte d'expression de CXCR4 est sans effet sur l'expression de Zeb1 quel que soit le clone, même si une augmentation non significative est retrouvée dans le Clone 30-3 (**Figure 41F**) et celle de Zeb2 est diminuée de 25% que dans le Clone 9-1, les augmentations dans les Clone 9-3 et Clone 30-3 n'étant pas significatives (**Figure 41G**).

Ces analyses suggèrent que la perte/diminution d'expression de CXCR4 dans les cellules confère un phénotype intermédiaire entre le phénotype épithélial et mésenchymateux, avec une baisse d'expression du marqueur épithélial E-cadhérine associée à une augmentation de l'expression de Snail et Slug, des facteurs de transcriptions caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Ces résultats ne sont pas en adéquation avec la baisse des capacités migratoires et invasives des cellules en l'absence de CXCR4.

3.5.2. Étude des protéines d'interactions cellulaires

Pour évaluer si les effets observés en invasion et migration sont associés à une perturbation de l'interaction entre les cellules, nous avons analysé par immunofluorescence, la localisation des protéines d'interactions cellulaires comme la E-cadhérine dans les jonctions adhérentes, la paxilline dans les adhésions focales et ZO-1 (*Zona occludens 1*) dans les jonctions serrées. En effet, une dérégulation de l'expression de ces protéines conduit à une perte de la polarité, facilitant la motilité des cellules (Cornillon et al., 2003).

Nous observons que l'expression de la E-cadhérine est ponctiforme dans les cellules SW480 sauvages, alors que dans le Clone 9-3, elle est localisée au niveau de la membrane avec un marquage continu (**Figure 42**). Pour la paxilline phosphorylée et ZO-1, une expression ponctiforme est également observée dans des structures de type invadopodes dans les cellules SW480 sauvages (**Figure 42**). Ce marquage devient homogène à la membrane dans le Clone 9-3 (**Figure 42**). Des profils similaires d'expression et de localisation de ces protéines sont retrouvés dans le Clone 9-1 et le Clone 30-3 (**résultats non montrés**). Pour le Clone 30-3, on a noté que le marquage de la E-cadhérine combine une localisation membranaire comme pour les deux autres clones, mais également un marquage ponctiforme, comme pour les cellules SW480 sauvages.

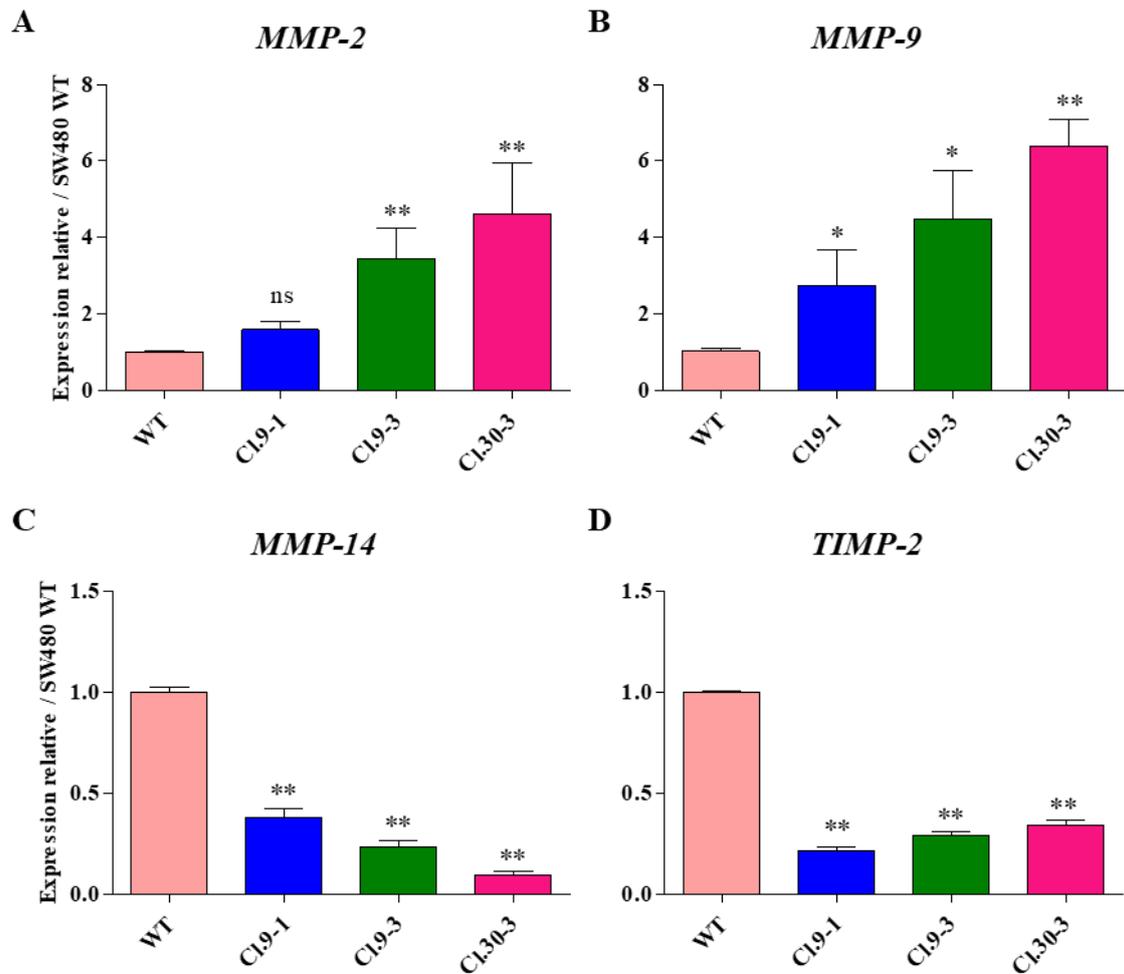


Figure 43. Expression transcriptionnelle de métalloprotéases et d'inhibiteur de métalloprotéases par RT-qPCR.

Expression relative des ARNm codant pour les métalloprotéases MMP-2 (A), MMP-9 (B), MT1-MMP ou MMP-14 (C) et l'inhibiteur TIMP-2 (D) dans les cellules des Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 par rapport aux cellules SW480 WT. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns: non significatif.

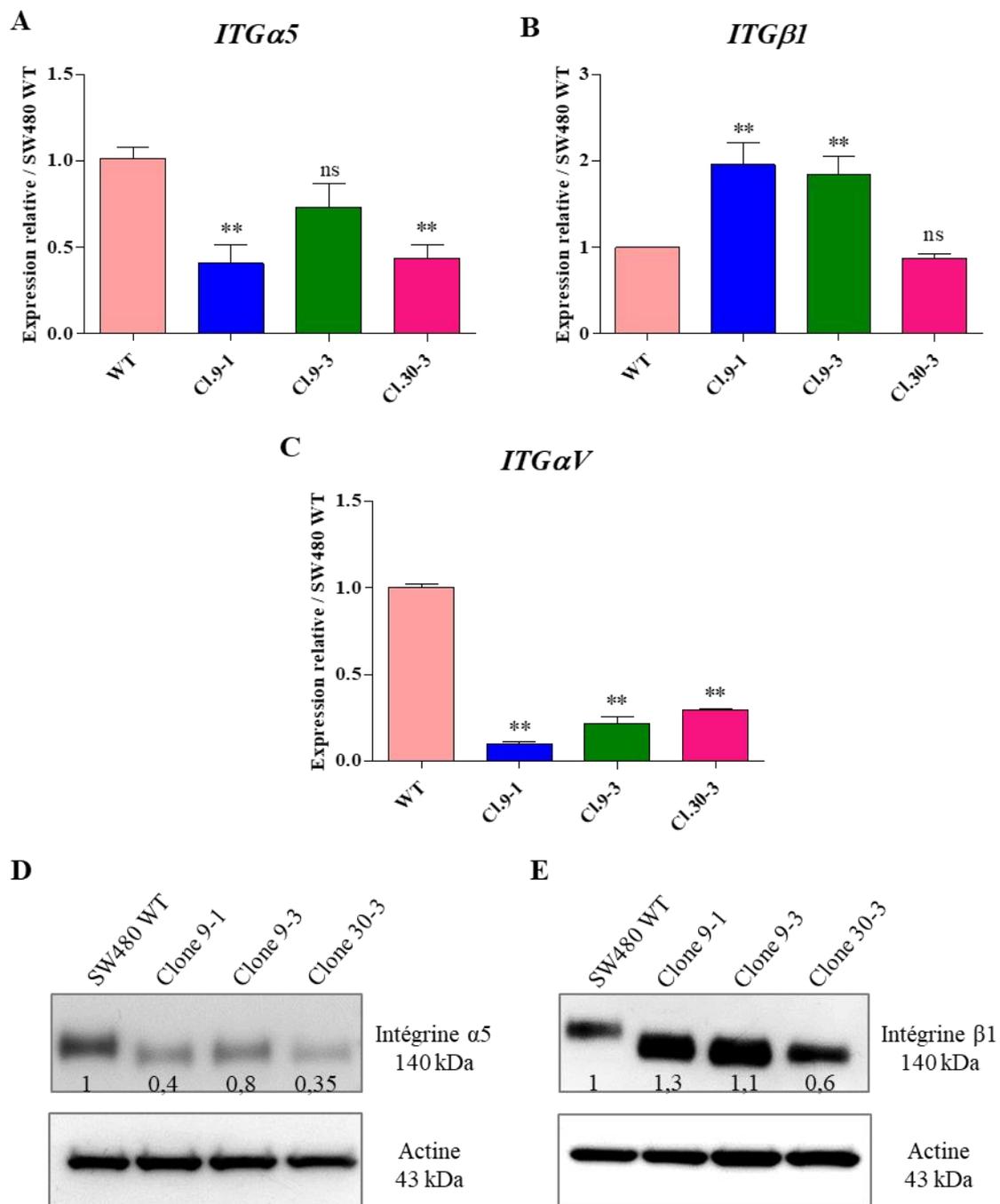


Figure 44. Expression transcriptionnelle et protéique des intégrines.

Expression relative des ARNm codant pour l'intégrine $\alpha 5$ (A), l'intégrine $\beta 1$ (B) et de l'intégrine αV (C) par RT-qPCR. Expression relative protéique de l'intégrine $\alpha 5$ (D) et de l'intégrine $\beta 1$ (E) par western blot des Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 par rapport aux cellules SW480 WT. La quantification de l'intensité des bandes correspondantes est normalisée avec l'actine et rapportée aux cellules SW480 WT pour l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ (D) et de l'intégrine $\beta 1$ (E). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 4 (A, B et C) et 3 (D et E) expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns: non significatif.

Ces résultats montrent que la perte d'expression de CXCR4 induit une relocalisation membranaire de la E-cadhérine, de ZO-1 et la paxilline, localisation caractéristique de cellules non migrantes et donc en accord avec la perte de motilité des cellules.

3.5.3. Expression de métalloprotéases et d'un inhibiteur de métalloprotéase

Nous nous sommes également intéressés aux MMP décrites dans la littérature pour leur rôle majeur dans la dégradation des constituants de la MEC (Herszényi et al., 2012; Liotta and Stetler-Stevenson, 1991). Cette dégradation favorise l'invasion des cellules tumorales et leur permet de franchir la barrière endothéliale pour rejoindre la circulation sanguine (Lambert et al., 2017). Nous avons analysé l'expression de MMP-2, MMP-9, MMP-14 (MT1-MMP) et celle de TIMP-2, un inhibiteur de MMP en particulier, qui ont été décrits pour faciliter la progression du CCR (Herszényi et al., 2012).

Les analyses par RT-qPCR montrent que l'expression transcriptionnelle de MMP-2 et MMP-9 augmente de plus de deux fois dans les trois clones en comparaison aux cellules SW480 sauvages (**Figure 43A,B**), sauf une augmentation non significative de MMP-2 dans le Clone 9-1. Ces augmentations sont inversement associées à une forte baisse (plus de 63%) d'expression de MMP-14 et TIMP-2 (**Figure 43C,D**). De manière étonnante, les effets sont plus prononcés dans le Clone 30-3, dont les cellules n'ont qu'une perte partielle de l'expression de CXCR4.

L'ensemble de ces résultats montre que l'inhibition des capacités invasives de cellules qui n'expriment plus CXCR4 ne corrèle pas avec l'expression élevée de MMP-2 et MMP-9 et à une diminution de celle de TIMP-2, qui sont des caractéristiques de cellules invasives. Par ailleurs, cette inhibition correspond à la baisse d'expression de MMP-14.

3.5.4. Expression des intégrines

Dans les clones, l'absence d'expression de la fibronectine interroge sur le niveau d'expression des intégrines, auxquelles elle peut se lier. En effet, les intégrines sont des molécules importantes dans l'adhésion des cellules à la MEC lors de leur migration dans la circulation sanguine et leur implantation dans les organes cibles (Hamidi and Ivaska, 2018).

Ainsi, l'expression transcriptionnelle et protéique de l'intégrine $\alpha 5$ est significativement diminuée de près de 60% dans les Clone 9-1 et Clone 30-3 mais de manière non significative dans le Clone 9-3 (**Figure 44A,D**). À l'opposé, l'expression de l'intégrine $\beta 1$ est deux fois plus importante dans les Clone 9-1 et Clone 9-3 alors que son expression dans le Clone 30-3 est similaire à celle des cellules SW480 sauvages (**Figure 44B**). Ces niveaux d'expression sont confirmés au niveau protéique par western blot (**Figure 44D,E**). En revanche, les trois clones

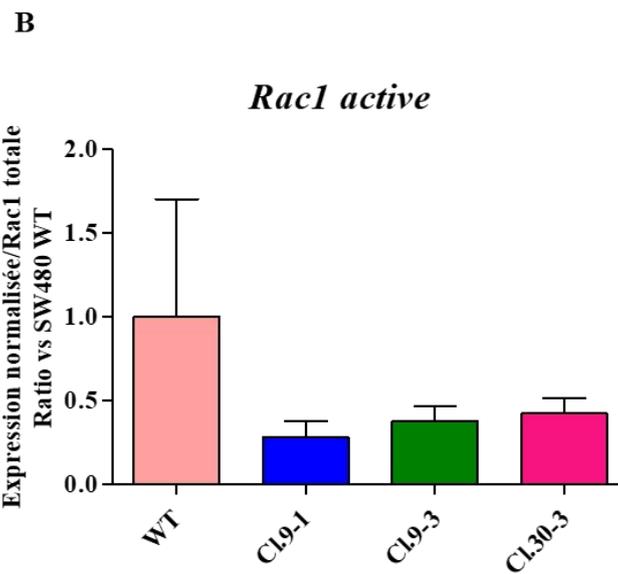
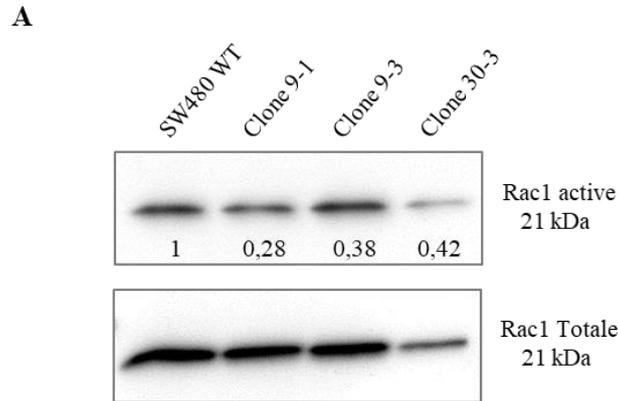


Figure 45. Expression de Rac1 active par western blot.

Expression relative de Rac1 active ou Rac1-GTP (A) dans les Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 par rapport aux cellules SW480 WT. La quantification de l'intensité des bandes correspondantes est normalisée avec la Rac1 totale et rapportée aux cellules SW480 WT (B). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes.

présentent une diminution de 90%, 78% et 70% de l'expression des ARNm de l'intégrine αV pour le Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 respectivement (**Figure 44C**). À noter que le poids moléculaire des intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans les trois clones est inférieur à celui des intégrines dans les cellules SW480 sauvages.

Ces données suggèrent que la réduction du potentiel invasif des cellules est médiée par la diminution d'expression des intégrines $\alpha 5$ et αV mais pas celle de l'intégrine $\beta 1$.

3.5.5. Activation de la Rac1

Les mécanismes qui régulent la motilité et l'invasion cellulaires font intervenir des petites protéines GTPases, dont Rac1, à travers la réorganisation du cytosquelette et la modification de la polarisation des cellules (Kotelevets and Chastre, 2020).

Pour déterminer si l'activation de Rac1 est affectée par la diminution des capacités migratoires des cellules KO CXCR4, la quantification de Rac1 activée, donc liée au GTP a été déterminée par western blot. Par comparaison avec les cellules SW480 WT, une baisse de plus de 50% de la Rac1-GTP est observée dans les cellules des trois clones (**Figure 45A,B**).

Par conséquent, sans expression de CXCR4, la diminution de la migration des cellules est associée à une baisse de l'activation de Rac1.

3.5.6. Voies de signalisation Akt et Erk

Généralement, les signalisations induites par l'activation du récepteur CXCR4 sont associées aux voies des kinases PI3K/Akt et MAPK/Erk1/2, impliquées dans la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaires (Brand et al., 2005; Duda et al., 2011).

Pour évaluer si l'activation de ces protéines est impactée par la perte/diminution d'expression de CXCR4, leur niveau de phosphorylation a été mesuré par western blot en stimulant les cellules avec 10 ng/ml de CXCL12- β pendant 15 min.

La phosphorylation de Akt diminue drastiquement de ~99% et 80% respectivement dans les cellules des Clone 9-1 et Clone 9-3 invalidées pour CXCR4 alors que seule une baisse de 30% est observée dans les cellules du Clone 30-3, qui expriment faiblement CXCR4 par rapport aux cellules SW480 sauvages (**Figure 46A,C**). De manière similaire, le niveau de phosphorylation de Erk1/2 est diminué de 40% dans les cellules du Clone 9-1, sans changement dans les cellules du Clone 9-3 (**Figure 46B,D**). À l'opposé, les cellules du Clone 30-3 présentent une faible expression (~30%) par rapport aux cellules SW480 WT (**Figure 46B,D**).

Ensemble, ces données suggèrent que la perte d'expression CXCR4 est associée à un défaut d'activation de la signalisation de la voie Akt mais très peu dépendante de celle d'Erk1/2.

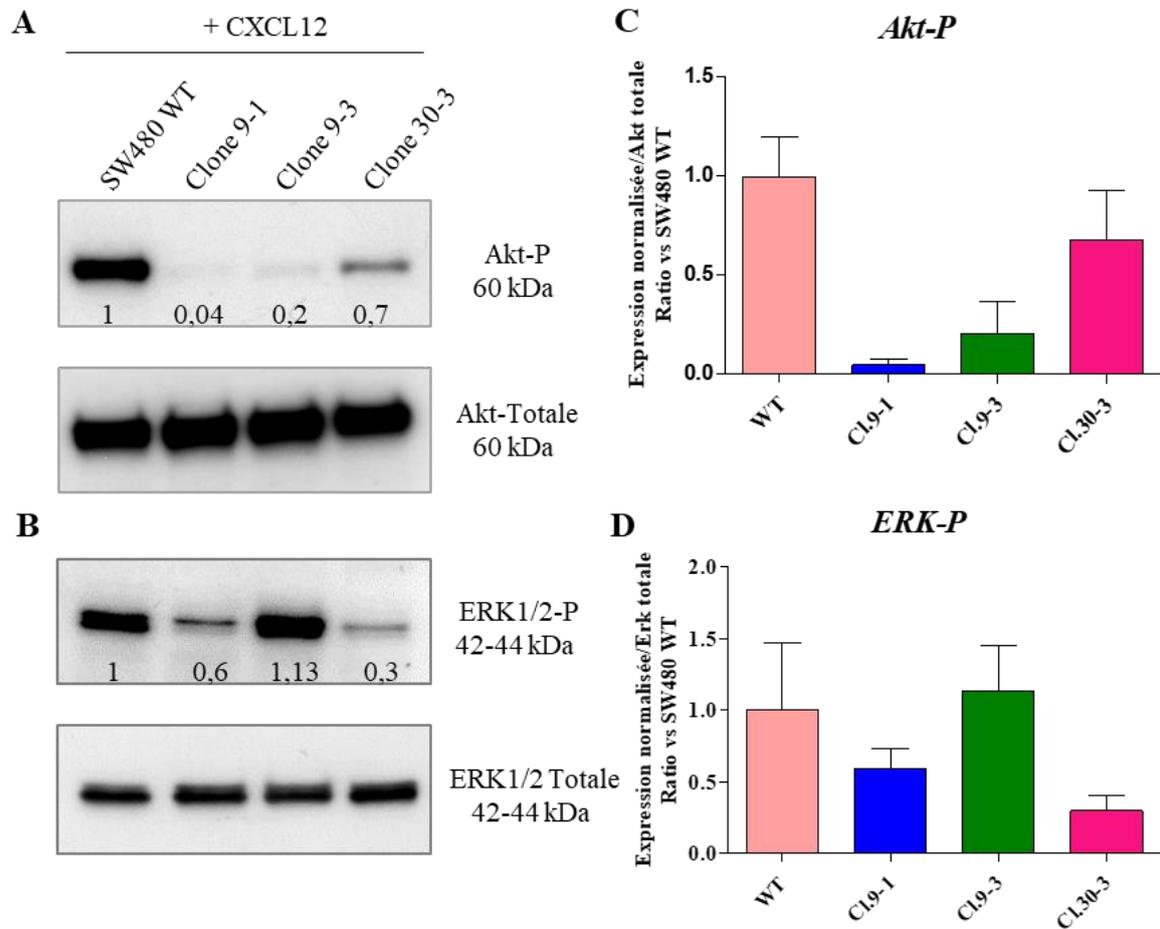


Figure 46. Activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2 par western blot.

Niveau de phosphorylation de Akt (A,C) et ERK1/2 (B,D) dans les cellules SW480 WT et des Clone 9-1, Clone 9-3 et Clone 30-3 traités avec 10 ng/ml de CXCL12- β pendant 15 min. La quantification de l'intensité des bandes correspondantes est normalisée avec Akt totale et ERK1/2 totale et rapportée aux cellules SW480 WT pour l'expression de Akt (A) et ERK1/2 phosphorylées respectivement. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes.

4. Discussion

Le récepteur CXCR4 est l'un des récepteurs le plus étudié dans plusieurs types de cancers. Dans ces cancers, son implication dans la dissémination des cellules dans les organes à distance a été beaucoup discutée et sa fonction peut être liée à son effet sur la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires (Chatterjee et al., 2014; Domanska et al., 2013; Peled et al., 2018). Dans notre étude, la perte d'expression de CXCR4 n'a pas d'impact sur la prolifération des clones délétés, témoignant que CXCR4 n'intervient pas dans la régulation de la prolifération. Ces résultats sont en accord avec des travaux qui montrent que la répression de l'expression de CXCR4 par shRNA, siRNA ou en le ciblant avec un anticorps n'entraîne pas de diminution de la prolifération de cellules coliques *in vitro* (Rubie et al., 2011; Song et al., 2015). À l'opposé, d'autres études rapportent que CXCR4 participe au processus prolifératif puisque l'inhibition de son activation par l'antagoniste AMD3100 ou de son expression par shRNA, réduit la prolifération cellulaire dans le cancer colique (Hu et al., 2014; Li et al., 2008).

D'autre part, le potentiel migratoire, invasif et migratoire trans-endothélial des cellules est fortement diminué avec la perte d'expression de CXCR4 dans les trois clones. D'autres facteurs pourraient être impliqués dans l'inhibition de ces processus, cependant nos expériences dans lesquelles l'expression de CXCR4 est éteinte par des siRNA dans les cellules SW480 sauvages ou restaurée avec un plasmide d'expression dans les clones invalidés, valident l'implication de CXCR4. D'autre part, nous avons remarqué que la réexpression de CXCR4 augmente plus la capacité de migration et d'invasion du Clone 9-3 *versus* le Clone 9-1. Ces résultats étant en accord avec l'efficacité de la transfection sur les niveaux transcriptionnels respectifs du récepteur dans ces clones, confirmant l'implication de CXCR4 dans ces processus. En outre, nos résultats montrent également que la baisse de ces processus invasifs n'est pas une conséquence d'une inhibition de la prolifération cellulaire puisque les cellules invalidées pour l'expression de CXCR4 présentent une prolifération identique à celle des cellules SW480 WT. Le maintien d'une certaine capacité migratoire et invasive dans les cellules invalidées pour CXCR4 suggère l'implication potentielle de CXCR7, le second récepteur de CXCL12 dans la régulation de ces processus. En effet, l'expression protéique de CXCR7 est significativement plus élevée dans les Clone 9-1 et Clone 9-3 (3,6 et 2,8 fois respectivement) par rapport aux cellules SW480 sauvages. Il est donc possible d'envisager que dans ces cellules, la perte d'expression de CXCR4 est compensée par l'augmentation de l'expression de CXCR7, mais sans permettre un processus migratoire et invasif normal. Si tel est le cas, le récepteur CXCR7 serait moins impliqué que CXCR4 dans le caractère agressif des cellules tumorales.

Cette hypothèse est en accord avec le fait que dans le Clone 30-3, dans lequel la perte d'expression de CXCR4 est partielle mais avec un niveau de CXCR7 inférieur à celui des Clone 9-1 et Clone 9-3, nous observons une plus forte inhibition du potentiel de migration, d'invasion et de migration trans-endothéliale. Par conséquent, le récepteur CXCR4 serait prépondérant pour contrôler les processus migratoire et invasif mais CXCR7 pourrait compenser partiellement l'absence de CXCR4.

D'autre part, nous avons observé que pour la migration trans-endothéliale, l'inhibition est moins importante dans tous les clones aux effets d'inhibition observés sur la migration et l'invasion, puisque l'effet maximal ne dépasse pas 50% d'inhibition dans le Clone 9-1. Ces effets observés *in vitro* sont en accord avec des travaux de la littérature qui montrent que bloquer l'interaction CXCL12/CXCR4 avec un anticorps anti-CXCR4 réduit fortement l'extravasation des cellules tumorales coliques dans le parenchyme hépatique (Gassmann et al., 2009). De plus, Zabel et al., ont rapporté que CXCR7 peut moduler la migration trans-endothéliale médiée par CXCR4 (Zabel et al., 2009, 2011) .

Dans la validation de l'implication de CXCR4 dans l'invasion cellulaire, de manière surprenante, la répression de l'expression de CXCR4 par siRNA dans les cellules SW480 WT sauvages a augmenté le nombre de cellules invasives. Cette augmentation pourrait être un effet non spécifique lié à la séquence des siRNA ou à la composition du matrigel. Cependant, l'utilisation d'autres siRNA ou encore d'un autre matrigel ont produit exactement les mêmes effets. Par conséquent, on peut imaginer que l'inactivation de CXCR4 par les siRNA, pourrait induire des gènes qui seraient favorisant pour l'invasion cellulaire.

De multiples études précliniques convergent vers la conclusion que cibler CXCL12, CXCR4 ou CXCR7 peut retarder de manière significative la croissance des tumeurs primaires et des métastases dans le CCR (Guillemot et al., 2012; Huynh et al., 2020; Zboralski et al., 2017).

Dans les cellules SW480 sauvages, nous avons montré que la migration et l'invasion sont inhibées avec l'AMD3100, un antagoniste de CXCR4, avec CCX771, un antagoniste de CXCR7 et avec la chalcone 4, un neutralisant dirigé contre CXCL12. Cependant, le ciblage de CXCL12 seul inhibe plus efficacement ces processus que la combinaison des antagonistes. Ce résultat est cohérent avec le mode d'action de la chalcone 4, qui neutralise CXCL12 pour empêcher son interaction sur ces deux récepteurs ; ce qui entraîne une inhibition des voies de signalisation associées à chaque récepteur. Ces effets inhibiteurs montrent l'intérêt d'un ciblage de l'axe CXCL12/CXCR4/CXCR7 pour contrer le processus de migration et d'invasion.

Depuis longtemps, il a été rapporté que le potentiel invasif des cellules tumorales entraîne un changement de phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux (Kalluri and Weinberg, 2009; Lambert et al., 2017). Cependant, ce concept a évolué puisqu'à l'heure actuelle, des études montrent que certaines cellules tumorales dont les cellules du CCR, peuvent exprimer simultanément des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux (Lai et al., 2020).

Dans nos expériences, les cellules SW480 sauvages ont plutôt un phénotype mésenchymateux puisque l'expression de la vimentine est plus élevée que celle de la E-cadhérine. L'absence d'expression de CXCR4 dans les Clone 9-1 et Clone 9-3 est associée à une baisse d'expression de la E-cadhérine, à une augmentation de l'expression de Snail et Slug mais à une perte de celle de la vimentine, ces trois marqueurs étant caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux. Par conséquent, ces deux clones auraient un phénotype intermédiaire avec une perte partielle du phénotype mésenchymateux puisque la vimentine n'est plus exprimée, et un phénotype pas totalement épithélial puisque la E-cadhérine est plus faiblement exprimée que dans les cellules sauvages.

La littérature décrit un phénotype intermédiaire ou hybride qui serait favorable à une migration collective puisque les cellules ont un phénotype épithélial qui favorise l'adhésion et un phénotype mésenchymateux qui permet leur migration collective (Jolly et al., 2015) ; cependant cela n'est pas le cas pour les cellules des clones. En effet, les marquages d'immunofluorescence montrent une expression membranaire de la E-cadhérine favorable à la cohésion cellulaire. Par contre dans ces clones, les profils d'expression de la paxilline phosphorylée (protéine d'adhésion focale) ou de ZO-1 (protéine des jonctions serrées) qui passent d'un marquage punctiforme dans les protrusions cellulaires à un marquage homogène membranaire, indiquent plutôt une perte du potentiel migratoire. Nous serions donc dans un phénotype intermédiaire encore différent de celui décrit par Jolly et al., (Jolly et al., 2015). Par ailleurs, la perte d'expression de la vimentine et de la fibronectine pourrait probablement justifier le caractère moins invasif des cellules en absence de CXCR4.

Il faut noter que dans le Clone 30-3, qui a perdu partiellement l'expression de CXCR4, le profil des marqueurs phénotypiques est différent. En effet, dans ce clone, la diminution de la E-cadhérine et l'augmentation de la vimentine, de Snail et de Slug est plus importante que dans les Clone 9-1 et Clone 9-3. Ce profil est plus proche d'un phénotype mésenchymateux et pourtant ce sont des cellules dont la capacité de migration et d'invasion est la plus faible. Ces résultats sont complexes à interpréter puisque certains paramètres sont en faveur d'un phénotype de cellules non migrantes et peu invasives et d'autres en faveur d'un phénotype

plutôt agressif. Cependant, le niveau d'expression de CXCR7 pourrait rendre compte de cette difficulté d'interpréter les données. En effet, dans une étude sur le cancer pulmonaire, ce serait plutôt CXCR7 qui favoriserait l'EMT (Wu et al., 2016). Effectivement, les auteurs ont montré que la répression de l'expression de CXCR7 mais pas de CXCR4 réduit la migration et l'EMT induites par le TGF- β 1. Par ailleurs, il serait important d'évaluer les conséquences des niveaux d'expression transcriptionnelle de ces gènes sur leur expression protéique.

D'autres mécanismes peuvent participer à la réduction de la migration et de l'invasion cellulaires observées dans les clones ; ces mécanismes peuvent faire intervenir des métalloprotéases telles que la MMP-2 et MMP-9 et des inhibiteurs des MMPs comme TIMP-2. Dans nos expériences, l'expression des MMP-2 et MMP-9 est augmentée alors que celle de TIMP-2 est diminuée. Ces profils d'expression ne correspondent pas à celui de cellules ayant perdu leur capacité migratoire et invasive. En effet dans le CCR, un niveau élevé de MMP-2, MMP-9 et MMP-14 (MT1-MMP) est décrit pour être de mauvais pronostic ou associé à une survie sans progression et une latence de rechute plus courte (Herszényi et al., 2014; Yu et al., 2021). Cependant, concernant MMP-14, son profil d'expression est caractéristique de cellules non agressives puisqu'elle est diminuée dans les trois clones et de plus, cette diminution est plus importante dans le Clone 30-3, clone qui migre le moins.

Un mécanisme de régulation de la MMP-2 a été décrit à la surface cellulaire dans une lignée de fibroblastes et d'un fibrosarcome. Dans ce mécanisme, la forme inactive de MMP-2 peut se lier à MT1-MMP à la membrane plasmique, en recrutant TIMP-2 pour former un complexe trimoléculaire pro-MMP2-MT1-MMP-TIMP-2. La formation de ce complexe permet à une seconde molécule de MT1-MMP de couper le peptide N-terminal de la pro-MMP-2 et d'activer sa fonction protéasique. Dans ce cas, TIMP-2 joue un rôle d'activateur et non d'inhibiteur en agissant comme une molécule adaptatrice (Itoh et al., 2001).

D'autre part dans une cohorte de CCR, Wang et al., rapportent qu'un niveau bas de TIMP-2 et/ou élevé de MMP-9 est associé à des facteurs clinico-pathologiques défavorables et à un mauvais pronostic (Wang et al., 2019). Ces auteurs ont également montré *in vitro* et *in vivo*, que la surexpression de TIMP-2 peut inhiber l'invasion et la migration cellulaires et la formation de métastases en diminuant l'expression de MMP-9. De manière intéressante, l'augmentation d'expression de MMP-2 et MMP-9 est comparable à l'augmentation de Snail, ce qui permet de proposer un mécanisme de modulation/régulation entre ces protéines, puisque Snail a été décrit comme un activateur de l'expression de certaines métalloprotéases (Lamouille et al., 2014).

Il a été établi que la promotion de la migration tumorale médiée par CXCR4 implique également la régulation de l'expression des intégrines (Burger et al., 2003). En général, les cellules tumorales expriment un niveau élevé de nombreuses intégrines, leur permettant d'adhérer spécifiquement à de nombreuses molécules de la MEC, pour favoriser leur invasion et leur implantation dans les organes de métastases.

Dans le cancer gastrique, l'activation de la voie CXCL12/CXCR4 par les fibroblastes associés aux cancers (CAF) favorise l'agrégation de molécules d'intégrine $\beta 1$ à la membrane et leur liaison avec la lamine au cours de l'invasion cellulaire (Izumi et al., 2016). Par contre, dans le mélanome, c'est plutôt l'adhésion aux cellules endothéliales qui est dépendante de l'interaction de CXCR4 avec l'intégrine $\beta 1$ (Cardones et al., 2003). Dans le CCR, l'expression abondante des intégrines αv , $\alpha 2$ et $\alpha 6$ permet l'adhésion des cellules coliques à la fibronectine (Gassmann et al., 2009) de même que la surexpression des sous-unités $\alpha v\beta 6$ favorise la migration directionnelle suite à l'interaction CXCL12/CXCR4 (Wang et al., 2014).

Nous avons montré que la perte d'expression de CXCR4 dans les trois clones s'accompagne d'une baisse de l'expression des intégrines $\alpha 5$ et αv et d'une augmentation de celle de l'intégrine $\beta 1$. On pourrait imaginer que l'absence de la fibronectine, qui est le ligand des intégrines $\alpha 5$ et αv , induise une diminution de leur expression. Concernant la sous-unité $\beta 1$, une augmentation d'expression pourrait provenir de son association avec des sous-unités α autres que $\alpha 5$ et αv (Hamidi and Ivaska, 2018). Cependant, une autre hypothèse serait qu'en présence de la perte de la sous-unité $\alpha 5$, la sous-unité $\beta 1$ ne serait plus maturée, et justifierait également la diminution du poids moléculaire observée dans les résultats de western blot. Ces données suggèrent que la réduction du potentiel migratoire et invasif des cellules en absence de CXCR4 est associée à une diminution d'expression des sous-unités $\alpha 5$ et αv .

Par ailleurs, parmi d'autres mécanismes moléculaires possibles, nous avons remarqué que la perte d'expression de CXCR4 entraîne une baisse importante de l'activation de la GTPase Rac1. Cette baisse de l'activité de la Rac1 serait en accord avec son implication dans la mobilité des cellules médiée par la formation de lamellipodes *via* l'interaction de CXCL12 et CXCR4 (Gassmann et al., 2009). Cependant, la baisse de l'expression de Rac1 active est inversement corrélée à l'inhibition de la migration et suggère que d'autres GTPases puissent être impliquées. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer le niveau de la protéine RhoA, qui serait activée lors de l'interaction de CXCL12/CXCR4 et favoriserait le développement tumoral induit par l'inflammation chez la souris (Yu et al., 2019).

Dans le but d'identifier les voies de signalisations qui seraient impactées par la perte d'expression de CXCR4, la phosphorylation des kinases Akt et Erk1/2 a été évaluée. Dans les clones KO CXCR4, la stimulation par CXCL12 entraîne un défaut de phosphorylation et donc d'activation d'Akt sans vraiment affecter la voie Erk1/2. Cette observation est cohérente avec des données d'autres études qui montrent que la phosphorylation de Erk1/2 est induite par l'activation de CXCR7 *via* les β -arrestines (Li et al., 2014; Proost et al., 2007; Romain et al., 2014). À l'opposé, le profil d'expression de l'intégrine $\alpha 5$ très similaire à celui de Erk1/2 phosphorylée dans le Clone 30-3 suggèrerait que la forte inhibition de la migration/invasion de ces cellules ayant perdu partiellement l'expression de CXCR4 implique l'activation de Erk1/2 et dépend de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. Cependant, il faudrait réaliser des expériences de modulation de l'expression d'un des facteurs en mesurant l'impact sur l'expression de l'autre facteur, pour valider cette hypothèse.

Ces résultats suggèrent qu'il existerait deux mécanismes différents selon que l'expression de CXCR4 soit partiellement ou totalement perdue puisque l'inhibition de la migration/invasion induite par la perte complète de CXCR4 entraîne un défaut de l'activation de la voie Akt alors que la perte partielle est associée à celui de la voie Erk1/2.

5. Conclusion et perspectives

Ces travaux ont permis de montrer que dans les cellules coliques SW480, la perte d'expression de CXCR4 n'affecte pas la prolifération cellulaire. Par contre, nous avons montré que ce récepteur active le processus de migration, d'invasion cellulaires et de migration trans-endothéliale puisque ces trois fonctions sont inhibées dans les clones cellulaires dans lesquels l'expression de CXCR4 est diminuée ou éteinte. Cette activation impliquerait une relocalisation de certaines protéines d'interactions cellulaires, de la métalloprotéase MMP-14, l'intégrine $\alpha 5$ et l'intégrine αv ainsi que l'activation de Rac1.

Par ailleurs, tous ces mécanismes conduisent essentiellement à l'activation de la signalisation Akt, la voie Erk1/2 étant plus modérément impliquée après stimulation avec le ligand CXCL12. D'autre part, le rôle de CXCR4 mais également de CXCR7, a été conforté dans des expériences utilisant un neutralisant de CXCL12 ou un antagoniste de l'un ou l'autre récepteur dans les cellules SW480 sauvages puisque ces traitements réduisent efficacement le potentiel agressif des cellules et montre l'intérêt d'étendre le ciblage de l'axe CXCL12/CXCR4/CXCR7 à des modèles *in vivo*.

Dans la mesure où la chalcone 4 est aussi efficace que la combinaison d'un antagoniste de CXCR4 ou de CXCR7, il serait intéressant d'évaluer *in vivo* chez la souris, ses capacités à

bloquer la formation de métastases et d'évaluer les effets en association avec un traitement chimio-thérapeutique de référence et/ou d'immunothérapie. Un essai clinique de phase I/II est en cours pour évaluer les effets de la molécule NOX-A12, qui cible également CXCL12 (Olaptesed pegol, un pegol olapté ; NOXXON Pharma AG), seule ou associée à un anti-PD1 pour le traitement du CCR et du cancer pancréatique métastatiques (Pembrolizumab ; immunothérapie) (OPERA trial, NCT03168139).

PARTIE III

Détermination du rôle respectif de CXCR4 et de CXCR7 dans la dissémination métastatique du cancer colique *in vivo*

1. Préambule

Dans plusieurs cancers, la contribution de l'axe CXCL12/CXCR4 dans la progression tumorale a été documentée où il est rapporté qu'une expression forte de CXCR4 est associée à l'agressivité de la tumeur et à une baisse de la survie (Kim et al., 2006; Müller et al., 2001; Zhao et al., 2015). De plus, dans le CCR, des résultats de notre équipe ont montré que l'expression de CXCR4 augmente avec les stades cliniques de la maladie suggérant un rôle dans le développement de métastases (Romain et al., 2014).

Les résultats présentés dans la partie II ont montré qu'*in vitro*, le récepteur CXCR4 régule les premières étapes de la dissémination des cellules tumorales. Pour corroborer ces résultats et valider le rôle de CXCR4 dans la formation de métastases *in vivo*, nous avons évalué les conséquences de la perte de son expression dans la formation de métastases dans deux modèles de xénogreffes chez des souris immunodéprimées. Ces modèles sont des xénogreffes orthotopiques de cellules tumorales implantées dans la muqueuse du caecum et l'injection des cellules dans la veine de la queue.

Le modèle orthotopique permet d'évaluer la capacité des cellules à former une tumeur primaire dans le côlon et les deux modèles orthotopique et intraveineux permettent d'évaluer la capacité de ces cellules à former des métastases dans le foie et les poumons.

2. Matériels et méthodes

2.1. Xénogreffes des cellules tumorales dans des souris immunodéficientes

Des souris immunodéficientes NSG (*Nod Scid Gamma*) (Charles River Laboraties) mâles et femelles, âgées de 6 à 18 semaines ont été hébergées dans un environnement dépourvu d'agents pathogènes selon les procédures approuvées par le comité d'éthique français (Creneas, N°AL/85/92/02/13) dans une animalerie agréée (Agrément N°E67-482-21).

Toutes les chirurgies ont été pratiquées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Les souris ont été aléatoirement divisées en groupes de 8 à 13 souris puis injectées soit avec les cellules SW480 WT, du Clone 9-1, Clone 9-3 ou Clone 30-3. Comme contrôles négatifs, un groupe de souris est injecté avec le milieu de suspension des cellules (DMEM, contrôle milieu)

et un autre groupe de souris sur lesquelles les mêmes gestes chirurgicaux sont réalisés (ouvertes-refermées) sans injection de cellules ou de milieu (contrôle chirurgie).

2.1.1. Xénogreffes orthotopiques dans la muqueuse du caecum

Les cellules tumorales sont récoltées à une densité de 5.10^6 cellules dans 100 μ l de milieu de xénogreffes et sont maintenues dans la glace. Les souris âgées de 6 à 7 semaines sont anesthésiées par inhalation à l'isoflurane. Un analgésique (métacam 2 μ l/g; Boehringer Ingelheim) est injecté en intrapéritonéale puis la région d'intérêt de l'abdomen est rasée à la tondeuse électrique et désinfectée avec du sérum physiologique. Une petite incision de la peau de 2-3 cm est réalisée et le caecum est extériorisé sur la gaze stérile et maintenu humide avec du sérum physiologique.

L'injection des cellules est réalisée avec une aiguille de 26 gauge (Agani, #AN2613R1) dans la paroi du caecum, en y faisant des petites blessures par des mouvements légers de va-et-vient avec l'aiguille pour permettre une meilleure implantation des cellules. Après injection, les cellules qui seraient restées en surface sont absorbées avec la gaze et le caecum est remis en place, la zone d'incision refermée et désinfectée. Les souris reçoivent une autre dose de métacam (2 μ l/g) après l'opération et leur état au réveil est contrôlé. L'analgésique est à nouveau injecté 24 h après l'intervention chirurgicale et un suivi post-opératoire est régulièrement réalisé avec une pesée une fois par semaine. Seize semaines (~113 jours) après les greffes, la mise à mort des souris est effectuée par dislocation cervicale. Chez les souris pour lesquelles la présence d'une tumeur caecale ou de métastases hépatiques et/ou pulmonaires sont visibles macroscopiquement, les organes sont prélevés et fixés pour être inclus en paraffine pour l'immunohistochimie.

Pour les souris chez lesquelles une tumeur ou des métastases ne sont pas visibles, les différents organes (caecum, poumons et foie) sont prélevés et congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant l'extraction de l'ADN pour quantifier les séquences Alu par qPCR. Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

2.1.2. Xénogreffes intraveineuses caudales

L'injection des cellules se fait chez des souris vigiles et maintenues dans un tube de contention avec une façade perforée pour la respiration et une longueur réglable. Comme dans le modèle orthotopique, 5.10^6 cellules/100 μ l de milieu sont injectées dans la veine de la queue chez des souris âgées de 6 à 18 semaines. Sept semaines (~50 jours) après les injections, les souris sont mises à mort et les organes prélevés selon le protocole décrit précédemment. Deux expériences

Séquences Alu	Séquences (5'-3')
Amorces sens	CACCTGTAATCCCAGCACTTT
Amorces anti-sens	CCCAGGCTGGAGTGCAGT

Tableau 8. Séquences des amorces des séquences Alu.

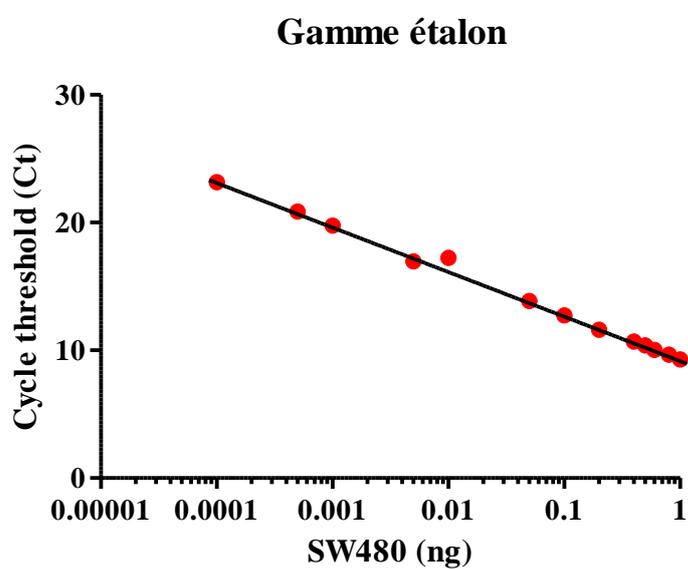


Figure 47. Courbe étalon pour la quantification des séquences Alu.
Amplification par qPCR avec des concentrations de 0,00001 ng à 1 ng d'ADN génomique extrait des cellules SW480 sauvages.

indépendantes ont été réalisées.

Milieu pour les xénogreffes : DMEM, 200 UI/ml de pénicilline/streptomycine, 80 µg/ml de gentamycine, 5 µg/ml de fungizone.

2.2. Analyse des séquences Alu

2.2.1. Extraction de l'ADN génomique des tissus

Les organes conservés à -80°C sont repris dans du tampon de lyse ATL (Kit Qiagen) pour un volume de 2 ml pour le caecum et le poumon et 5 ml pour le foie, puis broyés au Polytron jusqu'à dissociation du fragment. 900 µl de lysat sont prélevés auxquels sont ajoutés 100 µl de protéinase K (Qiagen). Le mélange est vortexé et incubé à 56°C sous agitation pendant la nuit jusqu'à la lyse complète des tissus. Après une centrifugation rapide, l'extraction est effectuée en ajoutant 500 µl de phénol saturé (Interchim) et 500 µl de chloroforme, puis le mélange est agité par retournements successifs. Après une centrifugation à 800 g pendant 10 min à 20°C, la phase aqueuse supérieure (~500 µl) est récupérée et un volume de 500 µl de phénol/chloroforme est ajouté. Le mélange est agité énergiquement à la main et la phase aqueuse est récupérée après une nouvelle centrifugation comme précédemment. À cette phase est ajouté le même volume de chloroforme, puis les solutions sont mélangées et centrifugées à la même vitesse pendant 10 min à 20°C. L'ADN contenu dans le surnageant est précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu et 134 mM d'acétate d'ammonium et incubé 30 min à -80°C. Après une centrifugation à 1 000 g pendant 30 min à 4°C, l'ADN est lavé à l'éthanol 70% glacé puis centrifugé de nouveau pendant 30 min à 1 000 g à 4°C. Le culot est dissout à 37°C pendant la nuit dans du tampon Tris-EDTA (TE 1X) dans un volume de 500 µl pour le caecum et les poumons et 1 500 µl pour le foie. La concentration de l'ADN des échantillons est déterminée par un dosage au nanodrop avant de réaliser la qPCR.

2.2.2. PCR quantitative (qPCR) pour la détection des séquences Alu

Les séquences Alu sont des séquences d'ADN répétées d'environ 280 paires de bases dont la présence est restreinte au génome humain et des primates (Mighell et al., 1997). La quantification de ces séquences est réalisée par qPCR en utilisant 2 µl d'ADN génomique à 1 ng, 1 µM d'amorces spécifiques de séquences Alu (**Tableau 8**) et du *Master Mix QuantiTect SYBR Green PCR 1X* (Qiagen) pour un volume réactionnel de 20 µl. Les réactions sont réalisées avec le programme décrit dans la « **Partie I - qPCR pour l'expression des transcrits** ». En parallèle, une gamme étalon (0,00001 ng à 1 ng) est réalisée avec de l'ADN génomique extrait de cellules SW480 WT (**Figure 47**). Cette gamme est utilisée pour quantifier l'ADN humain

présent dans les tissus murins, qui traduit la présence de cellules tumorales d'origine humaine. L'ADN des souris des groupes contrôles a permis de fixer un seuil de détection de 0,01 pg d'ADN humain. En-deçà de ce seuil, le signal est non spécifique.

2.3. Histologie et immunohistochimie

2.3.1. Inclusion des tissus en paraffine

Lors du prélèvement des organes, les tissus sont fixés dans la PFA 4% diluée dans du tampon phosphate pendant 2 h ou plus, selon la taille du fragment. Les tissus sont ensuite rincés 3 fois au PBS 1X pendant 5 min à température ambiante, puis gardés dans l'éthanol 75% pendant la nuit à 4°C ou directement déshydratés dans un bain croissant d'éthanol dans un automate de déshydratation (Myr STP120) (2x5 min dans l'éthanol 75%, 3x10 min dans l'éthanol 95%, 3x15 min dans l'éthanol 100%), puis dans du toluène (2x15 min) et dans la paraffine chaude (2x30 min à 62°C). Des coupes de 5 µm réalisées au microtome sont déposées sur des lames de verre et séchées à 37°C et stockées à 4°C.

Tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 : 3,2g de NaH₂PO₄, 10,9 g de Na₂HPO₄, H₂O qsp 1 000 ml.

2.3.2. Histologie

Pour évaluer la qualité histologique des tissus, une coloration hématoxyline-éosine (H&E) est réalisée après déparaffinage des coupes dans un bain de toluène 2x15 min, réhydratation dans des bains d'alcool décroissant (1 passage rapide dans l'alcool 100%, 3 min dans l'alcool 100%, 3 min dans l'alcool 95% puis 3 min dans l'alcool 70%) et 3 min dans l'eau courante. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline de Harris pendant 5 min et rincées à l'eau courante pendant 5 min, puis plongées 5 à 10 sec dans 1/1 000 de HCl dans l'éthanol 96% et rincées à l'eau courante pendant 20 min. La coloration éosine-érythrosine se fait pendant 15 secondes suivi d'un rinçage à l'eau courante. Une fois les lames séchées, elles sont montées sous lamelle avec la résine eukitt pour l'observation au microscope optique.

2.3.3. Immunohistochimie

Pour les marquages immunohistochimiques, les lames sont déparaffinées et réhydratées comme précédemment, avant de démasquer les sites antigéniques au micro-onde à 750 W dans du tampon de citrate pendant 10 min. Une fois refroidies, les lames sont rincées au PBS 1X pendant 10 min et après 3 lavages de 5 min au PBS 1X-Triton 0,1% (tampon de lavage) sous agitation, saturées en présence de NGS ou NDS et incubées avec les anticorps primaires (**Tableau 9**) comme décrit dans la « **Partie II - Immunofluorescence** ». Les lames rincées par 3 lavages de

Anticorps	Dilution	Références
Souris anti-CXCL12	1/100	R&D, # MAB350
Rat anti-CXCR4	1/200	Invitrogen, #14-9991-82
Lapin anti-CXCR7	1/200	Thermo Fisher, # PA1-29377
Lapin anti-CDX2	1/1 000	Abcam, #76541
Souris anti- β -Caténine	1/500	BD, #610154
Chèvre anti-lapin biotinylé	1/200	Vector, #BA-1000-1.5
Chèvre anti-rat biotinylé	1/200	Vector, #BA-9401-.5

Tableau 9. Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie.

5 min au PBS 1X sous agitation, sont incubées avec les anticorps secondaires biotinylés (**Tableau 9**) pendant 1 h puis lavées 3 fois 5 min et séchées. La peroxydase endogène est bloquée avec 0,5% de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans du méthanol pendant 30 min dans une chambre humide. Les coupes, incubées 1 h avec le complexe avidine-biotine (ABC) (VecTastain ABC kit, #PK-4000) lui-même préalablement incubé pendant 30 min à température ambiante, sont lavées 3 fois 5 min et l'activité de la peroxydase est révélée en présence de 0,3 mg/ml de diaminobenzidine (DAB) pendant 10 min à l'abri de la lumière. Les lames sont lavées à l'eau courante puis à l'eau distillée avant de les contre-colorer à l'hématoxyline pendant 5 s. Elles sont montées sous lamelle avec la colle de montage eukitt et observées au microscope optique.

Tampon citrate 10 mM pH 6 : 0,4 g d'acide citrique et 2,44 g de Na citrate, H₂O qsp 2 000 ml.

2.4. Analyses statistiques

Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne) et la détermination des p-values a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 5. Les comparaisons statistiques de deux groupes sont réalisées par le test non paramétrique de Mann-Whitney U.

3. Résultats

3.1. Quantification de tumeurs caecales, de métastases pulmonaires et hépatiques par analyse des séquences Alu

3.1.1. Xénogreffes dans la muqueuse caecale

Dans le but d'évaluer l'impact fonctionnel de la perte/baisse d'expression de CXCR4 *in vivo*, les cellules SW480 sauvages et des différents clones invalidés pour CXCR4 ont été injectées dans la muqueuse du caecum chez des souris immunodéprimées NSG. Les résultats présentés ne concernent que les xénogreffes réalisées avec les cellules SW480 WT et le Clone 9-3. Les raisons de ce choix seront développées dans la discussion.

Seize semaines après les implantations, le potentiel tumoral des cellules est constaté par la présence d'une tumeur dans le caecum et/ou de métastases hépatiques et/ou pulmonaires macroscopiquement par la présence de taches blanches sur les organes, taches qui sont des signes de nécrose (**résultats non montrés**). Les tumeurs et les micrométastases non visibles macroscopiquement, sont recherchées par quantification des séquences Alu, qui témoignent de la présence de cellules d'origine humaine et donc de cellules tumorales.

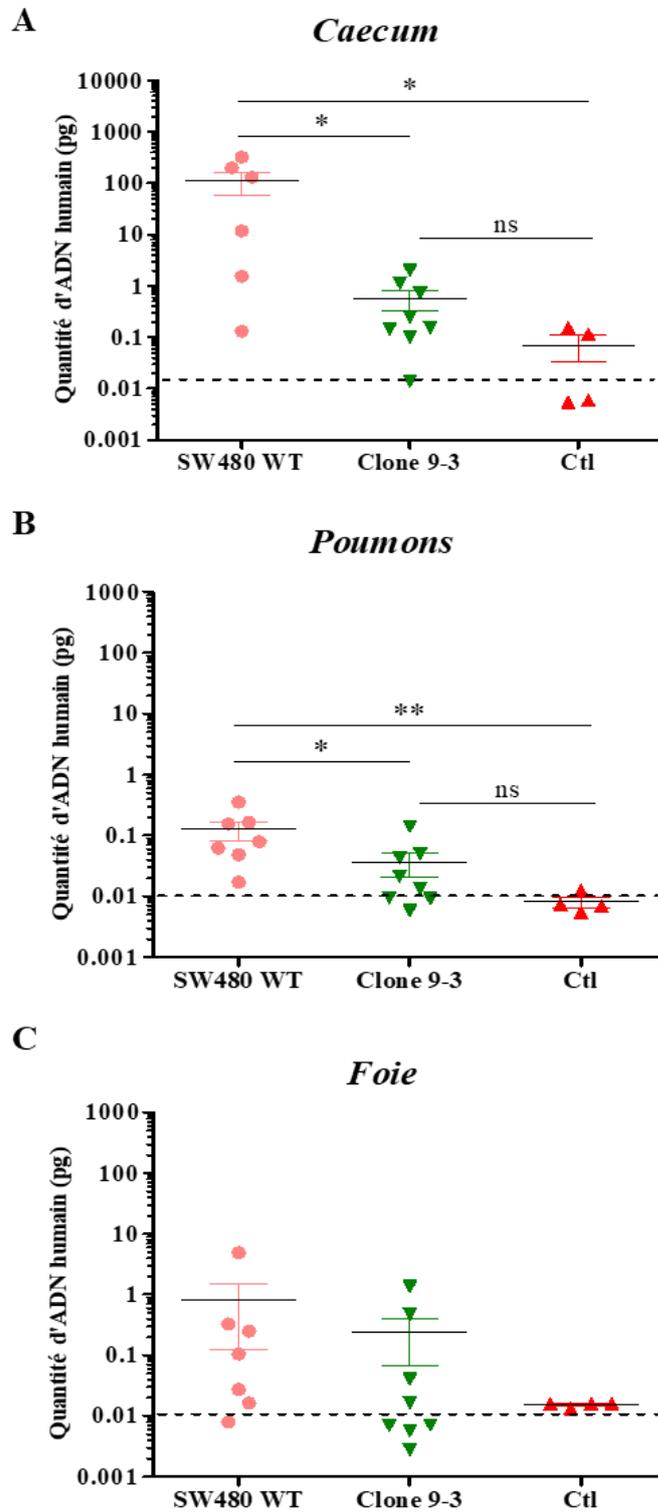


Figure 48. Détection d'ADN tumoral humain dans les xénogreffes orthopédiques chez la souris. Quantification de l'ADN tumoral des tumeurs caecales (**A**) et les métastases pulmonaires (**B**) et hépatiques (**C**) chez des souris NSG injectées dans la muqueuse du caecum avec les cellules SW480 WT (n=6 et 7) et le Clone 9-3 (n=8). Ctl : souris avec injection de milieu (n=2) et souris ouvertes-fermées (n=2). *p<0,05; **p<0,01; ns: non significatif.

Les résultats montrent que dans le caecum des souris injectées avec le Clone 9-3, la charge tumorale est inférieure (0,56 pg d'ADN humain en moyenne) à celle des souris greffées avec les cellules SW480 sauvages (111,5 pg d'ADN humain en moyenne) (**Figure 48A**). Pour les métastases, des foyers se développent préférentiellement dans le foie plutôt que dans les poumons, puisque la quantité moyenne d'ADN détectée est 5 à 6 fois plus importante, quelles que soient les cellules injectées. Par ailleurs, la quantité de séquences Alu pulmonaires est fortement réduite dans les souris greffées avec les cellules invalidées pour CXCR4 (moyenne de 0,037 pg d'ADN humain) *versus* les souris implantées avec les cellules SW480 sauvages (moyenne de 0,125 pg d'ADN humain) (**Figure 48B**). Des résultats similaires sont retrouvés pour les métastases hépatiques avec une moyenne de 0,201 pg d'ADN humain détecté chez les souris implantées avec le Clone 9-3 contre 0,799 pg pour les souris implantées avec les cellules SW480 sauvages, même si cette différence n'est pas significative (**Figure 48C**).

Dans tous les cas, la concentration des séquences Alu dans les organes (caecum, poumons, foie) est toujours supérieure à celle trouvée chez les souris contrôles (contrôle milieu et chirurgie ; 0,01 pg d'ADN humain en moyenne) (**Figure 48A à C**).

Ces résultats montrent que la perte d'expression de CXCR4 dans des cellules injectées dans la muqueuse caecale, réduit la formation de tumeurs primaires et de métastases pulmonaires et hépatiques.

3.1.2. Xénogreffes dans la veine de la queue

Nous avons réalisé des xénogreffes par injection des cellules SW480 sauvages et du Clone 9-3 directement dans la veine de la queue des souris. Sept semaines après les injections, la quantification des séquences Alu montre une diminution du nombre de cellules humaines et donc de métastases dans les poumons avec le Clone 9-3 (1,40 pg d'ADN humain en moyenne) par rapport à 33,55 pg d'ADN humain détecté chez les souris injectées avec les cellules SW480 sauvages. Cette quantité est supérieure à celle trouvée chez les souris contrôles (0,01 pg d'ADN) (**Figure 49**). Contrairement au modèle orthotopique, ni les cellules SW480 sauvages, ni celles du Clone 9-3 ne migrent dans le foie puisque la quantité d'ADN tumoral est au même niveau que celui des souris contrôles (0,01 pg d'ADN) (**Figure 49**), à l'exception de 2/8 des souris injectées avec le Clone 9-3 qui ont une quantité d'ADN tumorale supérieure au seuil de détection de 0,01 pg.

En conclusion, l'injection des cellules tumorales n'exprimant plus CXCR4, directement dans la circulation sanguine, réduit la formation de métastases dans les poumons.

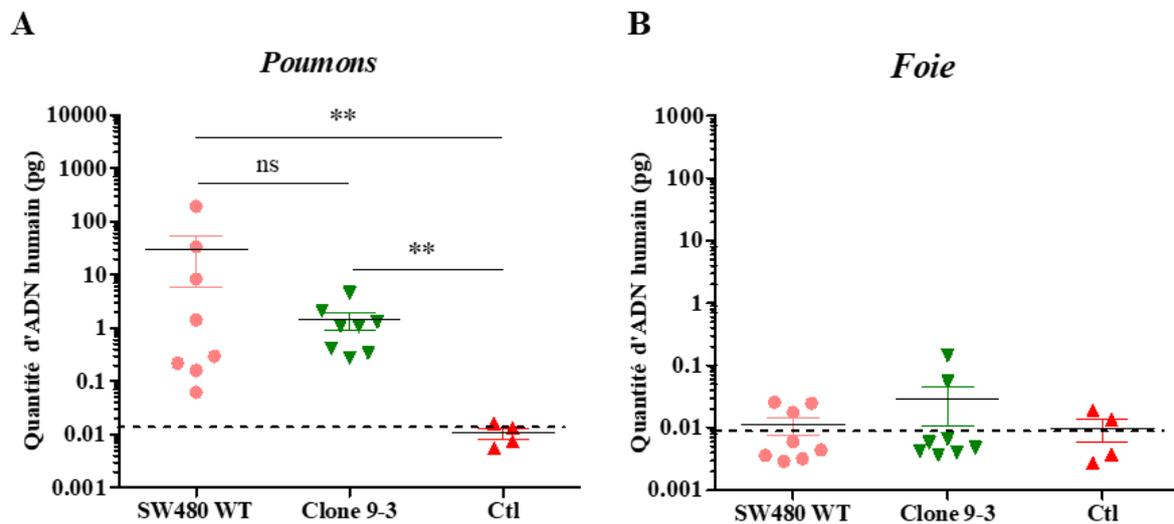


Figure 49. Détection d'ADN tumoral humain dans les xénogreffes intraveineuses chez des souris. Quantification de l'ADN tumoral dans les métastases pulmonaires (A) et hépatiques (B) chez des souris NSG injectées dans la veine de la queue avec les cellules SW480 WT (n=8) et le Clone 9-3 (n=8). Ctl : souris avec injection de milieu (n=2) et souris ouvertes-fermées (n=2). **p<0,01; ns: non significatif.

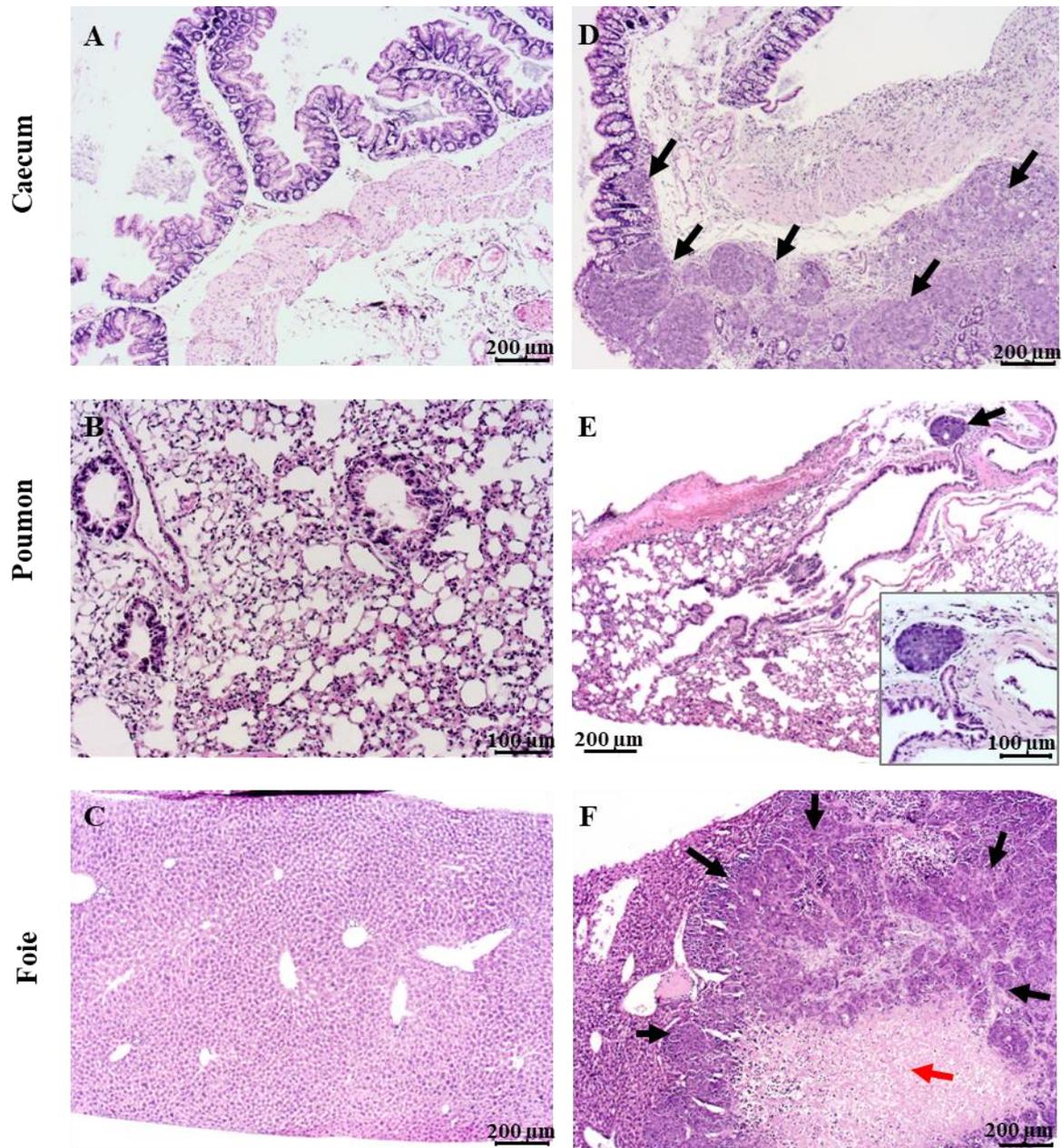


Figure 50. Histologie du caecum, poumon et foie par coloration hématoxyline-éosine (H&E). Tissus sains d'une souris contrôle (injectée avec le milieu) (A-C) et détection de cellules tumorales chez une souris injectée avec les cellules tumorales SW480 WT (D-F). Agrandissement de la métastase pulmonaire (encart) (E). Les flèches noires indiquent les cellules tumorales dans le caecum, le poumon et le foie (D-F) et la flèche rouge indique une zone de nécrose dans le foie (F).

3.2. Détection des tumeurs caecales, de métastases pulmonaires et hépatiques par histologie et immunohistochimie

Pour analyser la structure histologique des tissus et confirmer la présence de tumeurs et de métastases, des coupes de caecum, poumon et foie ont été colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E). Les résultats présentés pour une souris sont représentatifs de l'ensemble des souris. Le caecum des souris contrôles (contrôle milieu ou chirurgical) présente une muqueuse avec des cryptes d'architecture normale (**Figure 50A**) et sans anomalie cellulaire visible dans les poumons et le foie (**Figure 50B,C**). Par contre, après implantation de cellules SW480 sauvages, la muqueuse caecale est déstructurée avec la disparition des cryptes et un empilement de couches de cellules; ces éléments témoignent la présence d'une tumeur (**Figure 50D**). Par ailleurs, dans le poumon, une micrométastase est visible et se caractérise par la présence d'un amas compact de cellules avec une coloration plus intense que celle des cellules saines (**Figure 50E**). Dans le foie, les cellules des métastases forment une masse dense avec une large zone de nécrose en son centre (**Figure 50F**).

Pour confirmer la présence de cellules épithéliales tumorales dans le caecum, deux marquages sont réalisés à savoir l'expression de CXCL12, qui n'est plus exprimée dans les cellules SW480 sauvages et l'expression de la β -caténine dont l'expression membranaire dans les cellules saines, devient nucléaire dans les cellules tumorales. En effet, CXCL12 est exprimée dans les cryptes saines alors que son expression est perdue dans les cryptes déstructurées (**Figure 51A, flèches**). À noter la persistance de quelques cellules normales en bordure de la tumeur qui continuent d'exprimer CXCL12. Le marquage de la β -caténine est membranaire dans les cryptes ayant une architecture de cryptes saines (**Figure 51B, flèches**) alors qu'il devient nucléaire dans une zone à l'aspect plus déstructuré (**Figure 51B, têtes de flèche**); ce marquage nucléaire est caractéristique de cellules tumorales coliques et valide la présence de cellules tumorales dans la muqueuse. L'expression de CDX2, facteur de transcription spécifique des cellules intestinales, permet de détecter des cellules tumorales dans des organes autres que l'intestin. En effet, l'expression de CDX2 dans le foie et les poumons (**Figure 51C,D**) témoigne de la présence de métastases formées à partir de cellules coliques.

Enfin, il était nécessaire de vérifier le maintien de la perte d'expression de CXCR4 dans les tumeurs caecales et les métastases après implantation des cellules chez les souris. Si l'expression membranaire de CXCR4 est bien maintenue dans les tumeurs issues des cellules SW480 sauvages, elle disparaît dans les tumeurs formées par le Clone 9-3 invalidé pour CXCR4 (**Figure 51E,F**). De même, nous avons remarqué une persistance de l'expression de CXCR4

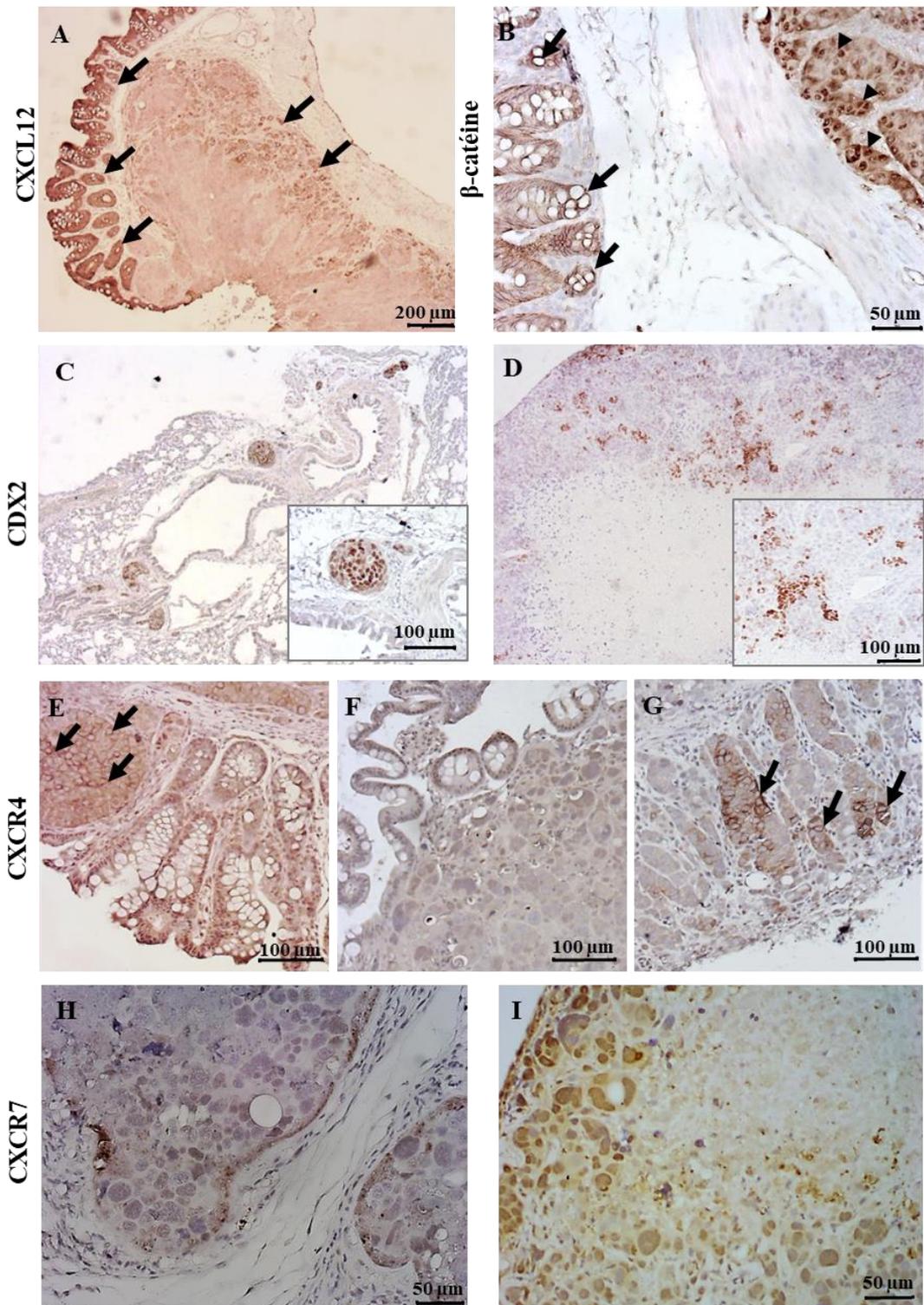


Figure 51. Expression protéique de CXCL12, β -caténine, CDX2, CXCR4 et CXCR7 par immunohistochimie.

Expression de CXCL12 par les cellules de la muqueuse saine et certaines cellules en bordure de la tumeur (flèches) (A). Expression de la β -caténine avec un marquage membranaire dans les cellules de la muqueuse saine caecale (flèche) et nucléaire dans les cellules tumorales (têtes de flèche) (B). Expression nucléaire de CDX2 dans les zones métastatiques pulmonaires (C) et hépatiques (D). Expression membranaire de CXCR4 (flèches) (E-G) et de CXCR7 (H-I) dans le caecum d'une souris injectée avec les cellules SW480 WT (E,H), le Clone 9-3 (F,I) et le Clone 30-3 (G).

dans certaines cellules de la tumeur caecale formée après injection du Clone 30-3 (**Figure 51G, flèches**). Cette persistance est en accord avec les données d'expression protéique *in vitro* (cytométrie en flux, western blot et d'immunofluorescence – Partie I), qui ont montré que l'expression de CXCR4 dans le Clone 30-3 n'est que partiellement perdue. Dans les métastases pulmonaires et hépatiques le marquage de CXCR4 est comparable à celui du caecum (**résultats non montrés**).

Concernant l'expression de CXCR7, le marquage est plutôt ponctiforme dans les tumeurs des cellules SW480 sauvages et assez homogène pour celles du Clone 9-3 (**Figure 51H,I**). Cependant la qualité du marquage, sans doute due à l'anticorps, permet difficilement de tirer des conclusions sur la localisation et l'intensité du marquage. Il aurait été possible de réaliser une immunofluorescence mais dans ce cas, il n'est pas possible de bien identifier les structures tissulaires, à savoir les zones tumorales, les zones saines ou stromales.

4. Discussion

Dans le domaine de l'oncologie, le développement de modèles d'étude a été nécessaire pour comprendre les mécanismes de formation de métastases et ces modèles sont également d'une importance majeure afin d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements.

Pour étudier le rôle de CXCR4 dans la dissémination métastatique du CCR, nous avons utilisé des xénogreffes orthotopiques dans le caecum et des xénogreffes par injection des cellules directement dans la circulation sanguine.

Nos résultats montrent que la perte d'expression de CXCR4 n'empêche pas la formation d'une tumeur primaire avec les xénogreffes orthotopiques. Par contre, si la migration des cellules dans les organes à distance persiste, elle est fortement réduite avec les deux modes d'injection des cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Zeelenberg et al., qui décrit l'implication de CXCR4 dans l'expansion des micrométastases hépatiques de CCR plutôt que dans l'invasion elle-même (Zeelenberg et al., 2003). En effet, ces auteurs montrent qu'en bloquant l'adressage de CXCR4 à la membrane, les cellules arrivent à coloniser le foie et les poumons après injection intraveineuse caudale mais elles ne prolifèrent pas. En parallèle, les auteurs ont montré que l'injection de cellules n'exprimant pas CXCR4, permet la formation de micrométastases qui évoluent en macrométastases, cette expansion étant causée par l'augmentation de l'expression de CXCR4 induite par le microenvironnement métastatique.

Il a également été montré qu'une expression élevée de CXCR4 par des cellules tumorales coliques dans le microenvironnement hépatique, active les cellules stellaires hépatiques (*Hepatic Stellate Cells ou HSC*) pour libérer CXCL12, qui elle-même va stimuler la sécrétion

du TGF- β 1 par les cellules tumorales pour induire la différenciation des HSC en CAF et favoriser la formation des métastases (Tan et al., 2020).

Dans le modèle orthotopique, les cellules sauvages et invalidées pour CXCR4 colonisent préférentiellement le foie, organe principalement touché dans le CCR chez l'Homme (Hess et al., 2006), alors que dans le modèle intraveineux, les métastases ne se développent que dans les poumons. Le site d'implantation des cellules peut expliquer le développement préférentiel dans les poumons pour l'injection dans la veine caudale. En effet, la circulation sanguine dans la queue oriente plus rapidement les cellules vers les poumons alors que dans le modèle orthotopique, les cellules se rejoignent dans le système porte hépatique qui détourne la quasi-totalité du sang veineux provenant de la rate et des organes du système digestif vers le foie, facilitant l'entrée des cellules tumorales dans cet organe.

Mais on peut également proposer que la migration directionnelle poumon-spécifique dans le modèle intraveineux pourrait être dirigée par le récepteur CXCR7. En effet, il est décrit que CXCR7 favorise la dissémination tumorale des cellules injectées dans la veine de la queue vers les poumons uniquement puisque des antagonistes dirigés contre CXCR7 inhibent la formation de métastases pulmonaires sans impacter celles formées dans le foie (Guillemot et al., 2012).

En général, les modèles orthotopiques sont des modèles qui miment la maladie humaine avec une assez bonne fidélité puisqu'ils permettent le développement de la tumeur dans sa localisation naturelle, même si la contribution du système immunitaire est absente. L'implantation des cellules dans la muqueuse du caecum a été décrite par Tseng et al., en 2007 (Tseng et al., 2007) et la méthode a été développée au laboratoire par des anciens doctorants (Reita et al., 2019). D'après ces expériences, le temps nécessaire pour le développement d'une tumeur était de 7 semaines (~50 jours) et une palpation était suffisante pour détecter la tumeur caecale. Dans notre projet, les premières xénogreffes avaient été effectuées avec les Clone 9-1 et Clone 30-3. Malheureusement, elles ont été réalisées dans les semaines précédant le début du premier confinement de la pandémie du Covid 19 et au bout de 7 semaines, aucune tumeur n'était palpable. Nous avons donc prolongé la procédure à 11 semaines. Après cette prolongation et en l'absence de tumeur visible dans le caecum, les organes n'ont été prélevés que chez les souris chez lesquelles une tumeur/métastase était macroscopiquement visible (3 souris pour les cellules SW480 sauvages, 3 souris pour le Clone 9-1 et 1 souris pour le Clone 30-3). Ce nombre insuffisant d'échantillons n'a pas permis de faire une analyse statistique et en raison du nombre trop faible de souris ayant développé une tumeur et des métastases, les expériences suivantes ont été prolongées au-delà de 11 semaines, jusqu'à 16 semaines. Les

différences entre les expériences passées et nos expériences pourraient être dues au nombre plus important de repiquages des cellules, ayant entraîné une perte de la capacité de celles-ci à former des tumeurs et des métastases *in vivo*.

Pour le modèle intraveineux, modèle moins contraignant sur le plan chirurgical et le plus couramment utilisé, il a fallu définir le temps nécessaire pour obtenir des métastases à partir des données de la littérature. Nous avons mené une étude pilote avec un arrêt de la procédure après 4, 7 et 10 semaines. À l'issue de cette étude, nous avons constaté que 4 semaines étaient insuffisantes pour former des métastases, et qu'après 10 semaines, la charge tumorale était similaire qu'après 7 semaines. Il faut noter que pour ce modèle, il était difficile d'envisager de garder les souris au-delà de 10 semaines, car elles développent très rapidement (au bout de deux semaines pour certaines) des tumeurs locales non loin de la zone d'injection des cellules (jonction de la queue à l'abdomen, au niveau dorsal, cuisse) et elles peuvent atteindre le point limite de 1 000 mm³ à 10 semaines.

L'histologie a montré qu'une tumeur se développe dans la muqueuse caecale chez la grande majorité des souris pour les xénogreffes orthotopiques. Nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques avec des marqueurs dont l'expression ou la localisation cellulaire dépend du statut normal ou tumoral des cellules, comme pour CXCL12 et la β -caténine, ou un marqueur spécifique des cellules épithéliales coliques, comme le facteur de transcription CDX2 (Saad et al., 2011). Nous observons bien que l'expression membranaire et nucléaire de la β -caténine identifie respectivement les cellules normales et les cellules tumorales dans le caecum. Le rôle oncogénique de la β -caténine est bien décrit et son expression nucléaire chez plusieurs patients atteints de CCR est un indicateur de mauvais pronostic (Elzagheid et al., 2008). De plus, sa délocalisation vers le noyau corrèle avec la transition progressive de l'état bénin vers un état malin (Bhattacharya et al., 2019).

Pour CXCL12, des travaux du laboratoire ont montré une expression suivant un gradient de concentration de la base vers la surface des cryptes (Romain et al., 2017) qui permet la migration directionnelle des cellules lors du renouvellement constant de l'épithélium (Smith et al., 2005). Les mêmes travaux ont montré une perte d'expression dans les CCR humains et dans les cellules SW480 sauvages (Romain et al., 2017). Dans nos expériences, CXCL12 reste exprimé dans les cellules épithéliales saines mais disparaît dans les cellules des tumeurs caecales. Cette absence d'expression dans les tumeurs formées est cohérente avec la lignée SW480 qui n'exprime pas CXCL12.

Dans la progression tumorale, le microenvironnement tumoral est le siège de multiples échanges de signaux favorisant l'implantation des cellules tumorales dans un organe à distance (Joyce and Pollard, 2009). De ce fait, nous avons confirmé que l'implantation des cellules chez des souris n'affecte pas l'expression des récepteurs des différents clones injectés, puisque la perte d'expression de CXCR4 est maintenue dans les tumeurs formées par les cellules invalidées pour CXCR4, et d'un autre côté, le récepteur reste exprimé que dans certaines cellules des tumeurs issues du clone dépourvu partiellement de son expression.

L'ensemble de ces données suggère que l'expression de CXCR4 n'est pas nécessaire pour l'implantation des cellules tumorales dans le caecum, le foie et les poumons mais qu'elle pourrait potentialiser les effets de CXCR7 dans la formation de tumeurs primaires coliques et de métastases hépatiques et pulmonaires.

5. Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons montré que le récepteur CXCR4 est impliqué dans la régulation de la formation de tumeurs primaires et métastases coliques. Nous avons également trouvé que dans le modèle orthotopique, dans lequel les cellules sont implantées dans la muqueuse caecale des souris, les cellules migrent préférentiellement dans le foie, alors que lorsque les cellules sont injectées dans la veine de la queue, les métastases ne se développent que dans les poumons. Le fait que l'absence d'expression de CXCR4 n'empêche pas la dissémination suggère une implication de CXCR7. Il serait intéressant de réaliser des xéno greffes intra-caecales et intraveineuses avec les cellules SW480 WT pour évaluer les effets d'antagonistes de CXCR4 et CXCR7 sur le potentiel tumoral et métastatique des cellules.

**CONCLUSION
GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES**

Le but de ces travaux a été d'étudier l'implication de l'axe de la chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans la formation de métastases du cancer colique.

Pour déterminer le rôle respectif de chacun des récepteurs, nous avons utilisé la technique CRISPR-Cas9 dans la lignée colique SW480 dans le but de générer des cellules invalidées pour l'un et/ou les deux récepteurs. Nous avons obtenu des clones ayant perdu l'expression de CXCR4, par contre, aucun clone n'a été invalidé pour CXCR7 ou les deux récepteurs. Cette perte d'expression étant probablement causée par une perte allélique d'un fragment du chromosome sur lequel est localisé le gène de CXCR4, un séquençage du génome de chaque clone permettrait de rechercher des événements génomiques qui expliqueraient une perte totale dans un clone et partielle dans un autre.

Par ailleurs, nous avons montré que la perte d'expression de CXCR4 n'affecte pas la prolifération cellulaire, mais elle diminue fortement la capacité de migration, d'invasion et de migration trans-endothéliale des cellules *in vitro*. Suite à la perte d'expression de CXCR4, certains changements cellulaires et moléculaires comme la relocalisation de protéines d'interactions cellulaires, la diminution de l'expression de certaines métalloprotéases, des intégrines $\alpha 5$ et αv et de l'activation de Rac1, pourraient conduire à inhiber la migration et l'invasion. De plus, la perte de CXCR4 entraîne un défaut d'activation de la signalisation Akt, alors que la voie Erk1/2 est modérément affectée après stimulation avec le ligand CXCL12. D'autre part, certaines altérations n'étaient pas cohérentes avec l'inhibition de la capacité des cellules à disséminer. Dans le but d'apporter la lumière sur ces différences moléculaires, il serait nécessaire de réaliser un RNAseq, pour analyser les gènes différentiellement exprimés dans les clones dépourvus de l'expression de CXCR4 *versus* les cellules sauvages et identifier les gènes altérés associés à des voies de signalisation spécifiques en faveur d'une dissémination tumorale. De l'autre côté, les conséquences fonctionnelles *in vivo* de la perte de CXCR4 dans des xénogreffes orthotopiques sont une forte diminution de la formation de tumeur primaire caecale et de métastases pulmonaires et hépatiques. De même l'injection par voie intraveineuse de cellules dépourvues de CXCR4, inhibe spécifiquement la formation de métastases pulmonaires. L'ensemble de ces travaux a permis de montrer que le récepteur CXCR4 est impliqué dans la régulation de la dissémination métastatique des cellules tumorales coliques. Cependant, en l'absence de perte d'expression de CXCR7, il n'a pas été possible de bien dissocier les effets spécifiques à chaque récepteur. Néanmoins, le rôle de CXCR7 a été conforté dans des expériences utilisant un neutralisant de CXCL12 ou un antagoniste du récepteur puisque le

traitement avec ces molécules réduit efficacement le potentiel invasif (migratoire et invasif) des cellules.

Sur le plan fonctionnel, pour mieux étudier le rôle des deux récepteurs, le modèle idéal serait un modèle de développement spontané de tumeurs intestinales et de formation de métastases. Dans ce but, la génération des souris issues de croisement de souris portant une invalidation conditionnelle des gènes des récepteurs spécifiquement dans les cellules intestinales (souris KO CXCR4 et/ou CXCR7/Villine/CreERT2) (Zimmerman et al., 2011) avec des souris NICD/TP53^{-/-} (Chanrion et al., 2014) devra être réalisée.

En outre, ces données devraient ouvrir la possibilité à de nouvelles perspectives quant au ciblage thérapeutique de l'interaction de CXCL12 avec ses deux récepteurs dans la thérapie anti-cancéreuse. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer les effets de la chalcone 4 sur des xénogreffes *in vivo* et ensuite, sur de longs termes, de tester cette molécule combinée à des thérapies déjà en cours (chimiothérapie conventionnelle et/ou immunothérapie) dans le cadre d'une thérapie ciblée chez des patients présentant des métastases pour améliorer l'efficacité des traitements.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Aghagolzadeh, P., and Radpour, R. (2016). New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 5678–5693. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i25.5678>.
- Agle, K.A., Vongsa, R.A., and Dwinell, M.B. (2011). Chemokine stimulation promotes enterocyte migration through laminin-specific integrins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G968-980. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00208.2011>.
- Ahmed, F.E. (2004). Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 22, 91–147. <https://doi.org/10.1081/LESC-200038263>.
- Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185, 111–120. <https://doi.org/10.1084/jem.185.1.111>.
- Arnold, C.N., Goel, A., Niedzwiecki, D., Dowell, J.M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R.J., Bertagnoli, M.M., and Boland, C.R. (2004). APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. *Cancer Biol Ther* 3, 960–964. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.10.1113>.
- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66, 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
- Asquith, D.L., Bryce, S.A., and Nibbs, R.J.B. (2015). Targeting cell migration in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 27, 204–211. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000150>.
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J.L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., et al. (2005). WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 105, 2449–2457. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2289>.
- Baldus, S.E., Mönig, S.P., Huxel, S., Landsberg, S., Hanisch, F.-G., Engelmann, K., Schneider, P.M., Thiele, J., Hölscher, A.H., and Dienes, H.P. (2004). MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin Cancer Res* 10, 2790–2796. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0163>.
- Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540–550. <https://doi.org/10.1038/nrc1388>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/srep44384>.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.

- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638–642. <https://doi.org/10.1038/382638a0>.
- Bhattacharya, I., Barman, N., Maiti, M., and Sarkar, R. (2019). Assessment of beta-catenin expression by immunohistochemistry in colorectal neoplasms and its role as an additional prognostic marker in colorectal adenocarcinoma. *Med Pharm Rep* 92, 246–252. <https://doi.org/10.15386/mpr-1218>.
- Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., and Springer, T.A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101–1109. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.1101>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.006>.
- Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet* 383, 1490–1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9).
- Bryant, V.L., and Slade, C.A. (2015). Chemokines, their receptors and human disease: the good, the bad and the itchy. *Immunol Cell Biol* 93, 364–371. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.23>.
- Burger, J.A., and Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761–1767. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3182>.
- Burger, M., Glodek, A., Hartmann, T., Schmitt-Gräff, A., Silberstein, L.E., Fujii, N., Kipps, T.J., and Burger, J.A. (2003). Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 22, 8093–8101. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207097>.
- 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. <https://doi.org/10.1084/jem.20052144>.
- Burt, R.W. (2000). Colon cancer screening. *Gastroenterology* 119, 837–853. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.16508>.
- Byrne, R.M., and Tsikitis, V.L. (2018). Colorectal polyposis and inherited colorectal cancer syndromes. *Ann Gastroenterol* 31, 24–34. <https://doi.org/10.20524/aog.2017.0218>.
- Cardones, A.R., Murakami, T., and Hwang, S.T. (2003). CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin. *Cancer Res* 63, 6751–6757. .
- Cathomas, G. (2014). PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 4, 35. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00035>.
- Chalabi, M., Fanchi, L.F., Dijkstra, K.K., Van den Berg, J.G., Aalbers, A.G., Sikorska, K., Lopez-Yurda, M., Grootsholten, C., Beets, G.L., Snaebjornsson, P., et al. (2020). Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-

- deficient early-stage colon cancers. *Nat Med* 26, 566–576. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0805-8>.
- Chanrion, M., Kuperstein, I., Barrière, C., El Marjou, F., Cohen, D., Vignjevic, D., Stimmer, L., Paul-Gilloteaux, P., Bièche, I., Tavares, S.D.R., et al. (2014). Concomitant Notch activation and p53 deletion trigger epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in mouse gut. *Nat Commun* 5, 5005. <https://doi.org/10.1038/ncomms6005>.
- Chatterjee, S., Behnam Azad, B., and Nimmagadda, S. (2014). The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv. Cancer Res.* 124, 31–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1>.
- Chen, J., Röcken, C., Lofton-Day, C., Schulz, H.-U., Müller, O., Kutzner, N., Malfertheiner, P., and Ebert, M.P.A. (2005). Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis* 26, 37–43. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh280>.
- Chen, K., Bao, Z., Tang, P., Gong, W., Yoshimura, T., and Wang, J.M. (2018). Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell Mol Immunol* 15, 324–334. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.134>.
- Choi, Y.H., Burdick, M.D., Strieter, B.A., Mehrad, B., and Strieter, R.M. (2014). CXCR4, but not CXCR7, discriminates metastatic behavior in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* 12, 38–47. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0334>.
- Chow, M.T., and Luster, A.D. (2014). Chemokines in Cancer. *Cancer Immunol Res* 2, 1125–1131. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0160>.
- Chung, E.J. and D.C. (2010). Hereditary Colon Cancer: Lynch Syndrome. 4, 151–160. <https://doi.org/10.5009/gnl.2010.4.2.151>.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>.
- Cohen, S.J., Cohen, R.B., and Meropol, N.J. (2016). Targeting Signal Transduction Pathways in Colorectal Cancer—More Than Skin Deep. *Journal of Clinical Oncology* <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.194>.
- Cornillon, J., Campos, L., and Guyotat, D. (2003). Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *Med Sci (Paris)* 19, 743–752. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031967743>.
- Cottrell, S., Bicknell, D., Kaklamanis, L., and Bodmer, W.F. (1992). Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 340, 626–630. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92169-g](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92169-g).
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.-J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B., and Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet* 375, 1030–1047. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60353-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60353-4).

- De Palma, F.D.E., D'Argenio, V., Pol, J., Kroemer, G., Maiuri, M.C., and Salvatore, F. (2019). The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* *11*, E1017. <https://doi.org/10.3390/cancers11071017>.
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277038>.
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S., et al. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* *26*, 5705–5712. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.0786>.
- Dillon, M., Lopez, A., Lin, E., Sales, D., Perets, R., and Jain, P. (2021). Progress on Ras/MAPK Signaling Research and Targeting in Blood and Solid Cancers. *Cancers* *13*, 5059. <https://doi.org/10.3390/cancers13205059>.
- Domanska, U.M., Kruizinga, R.C., Nagengast, W.B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., de Vries, E.G.E., and Walenkamp, A.M.E. (2013). A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur. J. Cancer* *49*, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.005>.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* *346*, 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
- Duda, D.G., Kozin, S.V., Kirkpatrick, N.D., Xu, L., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin. Cancer Res.* *17*, 2074–2080. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2636>.
- Dukes, C.E. (1932). The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology* *35*, 323–332. <https://doi.org/10.1002/path.1700350303>.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., and Adami, H.O. (1990). Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* *323*, 1228–1233. <https://doi.org/10.1056/NEJM199011013231802>.
- Elzagheid, A., Buhmeida, A., Korkeila, E., Collan, Y., Syrjänen, K., and Pyrhönen, S. (2008). Nuclear β -catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* *14*, 3866–3871. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.3866>.
- Eshleman, J.R., and Markowitz, S.D. (1996). Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Hum Mol Genet* *5 Spec No*, 1489–1494. https://doi.org/10.1093/hmg/5.supplement_1.1489.
- Fan, H., Wang, W., Yan, J., Xiao, L., and Yang, L. (2018). Prognostic significance of CXCR7 in cancer patients: a meta-analysis. *Cancer Cell Int* *18*, 212. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0702-0>.
- Fearnhead, N.S., Wilding, J.L., and Bodmer, W.F. (2002). Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull* *64*, 27–43. <https://doi.org/10.1093/bmb/64.1.27>.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I).

- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>.
- Franke, A.J., Skelton, W.P., Starr, J.S., Parekh, H., Lee, J.J., Overman, M.J., Allegra, C., and George, T.J. (2019). Immunotherapy for Colorectal Cancer: A Review of Current and Novel Therapeutic Approaches. *J Natl Cancer Inst* 111, 1131–1141. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz093>.
- Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>.
- Galiatsatos, P., and Foulkes, W.D. (2006). Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101, 385–398. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00375.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.001>.
- García-Cuesta, E.M., Santiago, C.A., Vallejo-Díaz, J., Juarranz, Y., Rodríguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2019). The Role of the CXCL12/CXCR4/ACKR3 Axis in Autoimmune Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10, 585. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00585>.
- Gassmann, P., Haier, J., Schlüter, K., Domikowsky, B., Wendel, C., Wiesner, U., Kubitza, R., Engers, R., Schneider, S.W., Homey, B., et al. (2009). CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. *Neoplasia* 11, 651–661. .
- 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. *Genesis* 46, 235–245. <https://doi.org/10.1002/dvg.20387>.
- Gibson, J.A., and Odze, R.D. (2016). Pathology of premalignant colorectal neoplasia. *Dig Endosc* 28, 312–323. <https://doi.org/10.1111/den.12633>.
- Goïta, A.A., and Guenot, D. (2022). Colorectal Cancer: The Contribution of CXCL12 and Its Receptors CXCR4 and CXCR7. *Cancers (Basel)* 14, 1810. <https://doi.org/10.3390/cancers14071810>.
- Gómez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B., and Brunton, V.G. (2017). Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech* 10, 1061–1074. <https://doi.org/10.1242/dmm.030403>.
- Grady, W.M., and Pritchard, C.C. (2014). Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol* 42, 124–139. <https://doi.org/10.1177/0192623313505155>.
- 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. .
- 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* 452, 535–544. <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0578-9>.
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., and Robertson, M. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589–600. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90021-0).
- Guillemot, E., Karimjee-Soilihi, B., Pradelli, E., Benchetrit, M., Goguet-Surmenian, E., Millet, M.-A., Larbret, F., Michiels, J.-F., Birnbaum, D., Alemanno, P., et al. (2012). CXCR7 receptors facilitate the progression of colon carcinoma within lung not within liver. *Br. J. Cancer* 107, 1944–1949. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.503>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.
- Gungor, M.Z., Uysal, M., and Senturk, S. (2022). The Bright and the Dark Side of TGF- β Signaling in Hepatocellular Carcinoma: Mechanisms, Dysregulation, and Therapeutic Implications. *Cancers* 14, 940. <https://doi.org/10.3390/cancers14040940>.
- Gupta, R.M., and Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Invest.* 124, 4154–4161. <https://doi.org/10.1172/JCI72992>.
- Hamidi, H., and Ivaska, J. (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 18, 533–548. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>.
- Harada, S., and Morlote, D. (2020). Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol* 27, 20–26. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000247>.
- Hattermann, K., Held-Feindt, J., Lucius, R., Mürköster, S.S., Penfold, M.E.T., Schall, T.J., and Mentlein, R. (2010). The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res.* 70, 3299–3308. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3642>.
- 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 Research* 13, R128. <https://doi.org/10.1186/bcr3074>.
- Hernandez, P.A., Gorlin, R.J., Lukens, J.N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., Klotman, M.E., and Diaz, G.A. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 34, 70–74. <https://doi.org/10.1038/ng1149>.
- Hernández Borrero, L.J., and El-Deiry, W.S. (2021). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1876, 188556. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>.

- Herszényi, L., Hritz, I., Lakatos, G., Varga, M.Z., and Tulassay, Z. (2012). The Behavior of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* *13*, 13240–13263. <https://doi.org/10.3390/ijms131013240>.
- Herszényi, L., Barabás, L., Hritz, I., István, G., and Tulassay, Z. (2014). Impact of proteolytic enzymes in colorectal cancer development and progression. *World J Gastroenterol* *20*, 13246–13257. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i37.13246>.
- Hess, K.R., Varadhachary, G.R., Taylor, S.H., Wei, W., Raber, M.N., Lenzi, R., and Abbruzzese, J.L. (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* *106*, 1624–1633. <https://doi.org/10.1002/cncr.21778>.
- Holch, J.W., Ricard, I., Stintzing, S., Modest, D.P., and Heinemann, V. (2017). The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer* *70*, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.007>.
- Hollander, M.C., Blumenthal, G.M., and Dennis, P.A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* *11*, 289–301. <https://doi.org/10.1038/nrc3037>.
- Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* *327*, 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/srep15577>.
- Hu, T., Yao, Y., Yu, S., Han, L., Wang, W., Guo, H., Tian, T., Ruan, Z., Kang, X., Wang, J., et al. (2014). SDF-1/CXCR4 promotes epithelial–mesenchymal transition and progression of colorectal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Letters* *354*, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.012>.
- Huang, Y., Liu, N., Liu, J., Liu, Y., Zhang, C., Long, S., Luo, G., Zhang, L., and Zhang, Y. (2019). Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle* *18*, 3442–3455. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1688951>.
- Hughes, C.E., and Nibbs, R.J.B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J* *285*, 2944–2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* *350*, 2335–2342. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691>.
- Huynh, C., Dingemans, J., Meyer Zu Schwabedissen, H.E., and Sidharta, P.N. (2020). Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. *Pharmacol Res* *161*, 105092. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105092>.
- Iacopetta, B. (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* *21*, 271–276. <https://doi.org/10.1002/humu.10175>.

- Itatani, Y., Kawada, K., Inamoto, S., Yamamoto, T., Ogawa, R., Taketo, M.M., and Sakai, Y. (2016). The Role of Chemokines in Promoting Colorectal Cancer Invasion/Metastasis. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17050643>.
- Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T., and Seiki, M. (2001). Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 20, 4782–4793. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4782>.
- Itzkowitz, S.H., and Harpaz, N. (2004). Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 126, 1634–1648. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.025>.
- IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature (2003). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 21, 48–49. [https://doi.org/10.1016/s1043-4666\(02\)00493-3](https://doi.org/10.1016/s1043-4666(02)00493-3).
- Izumi, D., Ishimoto, T., Miyake, K., Sugihara, H., Eto, K., Sawayama, H., Yasuda, T., Kiyozumi, Y., Kaida, T., Kurashige, J., et al. (2016). CXCL12/CXCR4 activation by cancer-associated fibroblasts promotes integrin β 1 clustering and invasiveness in gastric cancer. *Int. J. Cancer* 138, 1207–1219. <https://doi.org/10.1002/ijc.29864>.
- Janssens, R., Struyf, S., and Proost, P. (2018). Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev* 44, 51–68. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.10.004>.
- Jass, J.R. (2007a). Molecular heterogeneity of colorectal cancer: Implications for cancer control. *Surg Oncol* 16 *Suppl* 1, S7-9. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2007.10.039>.
- Jass, J.R. (2007b). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>.
- Jolly, M.K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Ben-Jacob, E., Onuchic, J.N., and Levine, H. (2015). Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol* 5, 155. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00155>.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer* 9, 239–252. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>.
- Jung, B., Staudacher, J.J., and Beauchamp, D. (2017). Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 152, 36–52. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.015>.
- Juo, Y.Y., Johnston, F.M., Zhang, D.Y., Juo, H.H., Wang, H., Pappou, E.P., Yu, T., Easwaran, H., Baylin, S., van Engeland, M., et al. (2014). Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 25, 2314–2327. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu149>.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* *502*, 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>.
- Kerkhoff, E., and Rapp, U.R. (1998). Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* *17*, 1457–1462. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202185>.
- Keum, N., and Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *16*, 713–732. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>.
- Kim, J., Mori, T., Chen, S.L., Amersi, F.F., Martinez, S.R., Kuo, C., Turner, R.R., Ye, X., Bilchik, A.J., Morton, D.L., et al. (2006). Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann Surg* *244*, 113–120. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000217690.65909.9c>.
- Kim, N., Ryu, H., Kim, S., Joo, M., Jeon, H.J., Lee, M.-W., Song, I.-C., Kim, M.-N., Kim, J.-M., and Lee, H.J. (2019). CXCR7 promotes migration and invasion in head and neck squamous cell carcinoma by upregulating TGF- β 1/Smad2/3 signaling. *Sci Rep* *9*, 18100. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54705-x>.
- Kotelevets, L., and Chastre, E. (2020). Rac1 Signaling: From Intestinal Homeostasis to Colorectal Cancer Metastasis. *Cancers (Basel)* *12*, E665. <https://doi.org/10.3390/cancers12030665>.
- Koveitypour, Z., Panahi, F., Vakilian, M., Peymani, M., Seyed Forootan, F., Nasr Esfahani, M.H., and Ghaedi, K. (2019). Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci* *9*, 97. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>.
- Krasinskas, A.M. (2011). EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Patholog Res Int* *2011*, 932932. <https://doi.org/10.4061/2011/932932>.
- Kruse, J.-P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell* *137*, 609–622. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.050>.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* *387*, 299–303. <https://doi.org/10.1038/387299a0>.
- Kwak, H.D., and Ju, J.K. (2019). Immunological Differences Between Right-Sided and Left-Sided Colorectal Cancers: A Comparison of Embryologic Midgut and Hindgut. *Ann Coloproctol* *35*, 342–346. <https://doi.org/10.3393/ac.2019.03.17.1>.
- Lai, X., Li, Q., Wu, F., Lin, J., Chen, J., Zheng, H., and Guo, L. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition and Metabolic Switching in Cancer: Lessons From Somatic Cell Reprogramming. *Front Cell Dev Biol* *8*, 760. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00760>.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* *168*, 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.
- Lao, V.V., and Grady, W.M. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *8*, 686–700. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173>.

- Lapteva, N., Yang, A.-G., Sanders, D.E., Strube, R.W., and Chen, S.-Y. (2005). CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth *in vivo*. *Cancer Gene Therapy* 12, 84–89. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700770>.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>.
- Lewellis, S.W., and Knaut, H. (2012). Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations. *Semin Cell Dev Biol* 23, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.009>.
- Li, J.-K., Yu, L., Shen, Y., Zhou, L.-S., Wang, Y.-C., and Zhang, J.-H. (2008). Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 14, 2308–2313. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.2308>.
- Li, X.-L., Zhou, J., Chen, Z.-R., and Chng, W.-J. (2015). P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol.* 21, 84–93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>.
- Li, X.-X., Zheng, H.-T., Huang, L.-Y., Shi, D.-B., Peng, J.-J., Liang, L., and Cai, S.-J. (2014). Silencing of CXCR7 gene represses growth and invasion and induces apoptosis in colorectal cancer through ERK and β -arrestin pathways. *Int J Oncol* 45, 1649–1657. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2547>.
- Liang, J.J., Bissett, I., Kalady, M., Bennet, A., and Church, J.M. (2013). Importance of serrated polyps in colorectal carcinogenesis. *ANZ Journal of Surgery* 83, 325–330. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.2012.06269.x>.
- Lieberman, J., Sartelet, H., Flahaut, M., Mühlethaler-Mottet, A., Coulon, A., Nyalendo, C., Vassal, G., Joseph, J.-M., and Gross, N. (2012). Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 Axis in the Malignant Progression of Human Neuroblastoma. *PLOS ONE* 7, e43665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043665>.
- Liotta, L.A., and Stetler-Stevenson, W.G. (1991). Tumor Invasion and Metastasis: An Imbalance of Positive and Negative Regulation1. *Cancer Research* 51, 5054s–5059s. .
- Lukas, M. (2010). Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis* 28, 619–624. <https://doi.org/10.1159/000320276>.
- Luker, K.E., Steele, J.M., Mihalko, L.A., Ray, P., and Luker, G.D. (2010). Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene* 29, 4599–4610. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.212>.
- Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348, 919–932. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012242>.
- Lynch, H.T., and Smyrk, T. (1996). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer* 78, 1149–1167. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960915\)78:6<1149::AID-CNCR1>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960915)78:6<1149::AID-CNCR1>3.0.CO;2-5).
- Lynch, H.T., Watson, P., Smyrk, T.C., Lanspa, S.J., Boman, B.M., Boland, C.R., Lynch, J.F., Cavalieri, R.J., Leppert, M., and White, R. (1992). Colon cancer genetics. *Cancer* 70, 1300–

1312. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920901\)70:3+<1300::aid-cncr2820701517>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920901)70:3+<1300::aid-cncr2820701517>3.0.co;2-o).
- Ma, D.-M., Luo, D.-X., and Zhang, J. (2016). SDF-1/CXCR7 axis regulates the proliferation, invasion, adhesion, and angiogenesis of gastric cancer cells. *World J Surg Oncol* *14*, 256. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-1009-z>.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Haft, D.H., et al. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- Mantovani, A., Bonecchi, R., and Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* *6*, 907–918. <https://doi.org/10.1038/nri1964>.
- Marei, H.E., Althani, A., Afifi, N., Hasan, A., Caceci, T., Pozzoli, G., Morrione, A., Giordano, A., and Cenciarelli, C. (2021). p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell International* *21*, 703. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>.
- Markowitz, S.D., and Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* *361*, 2449–2460. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588>.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A.P., Cerrada, E., and Yoldi, M.J.R. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences* *18*, undefined-undefined. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.
- Martínez-Muñoz, L., Barroso, R., Dyrhaug, S.Y., Navarro, G., Lucas, P., Soriano, S.F., Vega, B., Costas, C., Muñoz-Fernández, M.Á., Santiago, C., et al. (2014). CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120IIIB binding to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E1960-1969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322887111>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>.
- McDermott, D.H., Pastrana, D.V., Calvo, K.R., Pittaluga, S., Velez, D., Cho, E., Liu, Q., Trout, H.H., Neves, J.F., Gardner, P.J., et al. (2019). Plerixafor for the Treatment of WHIM Syndrome. *N Engl J Med* *380*, 163–170. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1808575>.
- Meadows, G.G., and Zhang, H. (2015). Effects of Alcohol on Tumor Growth, Metastasis, Immune Response, and Host Survival. *Alcohol Res* *37*, 311–322. .
- Melcher, R., Steinlein, C., Feichtinger, W., Müller, C.R., Menzel, T., Lührs, H., Scheppach, W., and Schmid, M. (2000). Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet. Cell Genet.* *88*, 145–152. <https://doi.org/10.1159/000015508>.
- Melo, R. de C.C., Longhini, A.L., Bigarella, C.L., Baratti, M.O., Traina, F., Favaro, P., de Melo Campos, P., and Saad, S.T.O. (2014). CXCR7 is highly expressed in acute lymphoblastic

- leukemia and potentiates CXCR4 response to CXCL12. *PLoS One* 9, e85926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085926>.
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610444104>.
- Mighell, A.J., Markham, A.F., and Robinson, P.A. (1997). Alu sequences. *FEBS Letters* 417, 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01259-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01259-3).
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., and Coppedè, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011, 792362. <https://doi.org/10.1155/2011/792362>.
- Möhle, R., Failenschmid, C., Bautz, F., and Kanz, L. (1999). Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 13, 1954–1959. .
- Mollica Poeta, V., Massara, M., Capucetti, A., and Bonecchi, R. (2019). Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 10, 379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00379>.
- Moser, B., and Willimann, K. (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2, ii84–ii89. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.028316>.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50–56. <https://doi.org/10.1038/35065016>.
- Murphy, P.M. (1996). Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 47–64. [https://doi.org/10.1016/1359-6101\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/1359-6101(96)00009-3).
- Murphy, P.M. (2007). CXC Chemokine Receptors. In *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S.J. Enna, and D.B. Bylund, eds. (New York: Elsevier), pp. 1–3.
- 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. <https://doi.org/10.1038/382635a0>.
- Nakayama, M., and Oshima, M. (2019). Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol* 11, 267–276. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>.
- Nguyen, H.T., and Duong, H.-Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncology Letters* 16, 9–18. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>.
- Nuako, K.W., Ahlquist, D.A., Mahoney, D.W., Schaid, D.J., Siems, D.M., and Lindor, N.M. (1998). Familial predisposition for colorectal cancer in chronic ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology* 115, 1079–1083. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70077-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70077-0).

- Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985–999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>.
- 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. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh275>.
- 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. <https://doi.org/10.1042/BJ20071493>.
- Oono, Y., Fu, K., Nakamura, H., Iriguchi, Y., Yamamura, A., Tomino, Y., Oda, J., Mizutani, M., Takayanagi, S., Kishi, D., et al. (2009). Progression of a sessile serrated adenoma to an early invasive cancer within 8 months. *Dig Dis Sci* 54, 906–909. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0407-7>.
- Pawlik, T.M., Raut, C.P., and Rodriguez-Bigas, M.A. (2004). Colorectal Carcinogenesis: MSI-H Versus MSI-L. *Disease Markers* 20, 199–206. <https://doi.org/10.1155/2004/368680>.
- Payne, A.S., and Cornelius, L.A. (2002). The Role of Chemokines in Melanoma Tumor Growth and Metastasis. *Journal of Investigative Dermatology* 118, 915–922. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01725.x>.
- Peled, A., Klein, S., Beider, K., Burger, J.A., and Abraham, M. (2018). Role of CXCL12 and CXCR4 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cytokine* 109, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.02.020>.
- Petit, I., Jin, D., and Rafii, S. (2007). The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 28, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.05.007>.
- Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* 23, 609–618. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.086>.
- Proost, P., Mortier, A., Loos, T., Vandercappellen, J., Gouwy, M., Ronsse, I., Schutyser, E., Put, W., Parmentier, M., Struyf, S., et al. (2007). Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood* 110, 37–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-049072>.
- Puddinu, V., Casella, S., Radice, E., Thelen, S., Dirnhofer, S., Bertoni, F., and Thelen, M. (2017). ACKR3 expression on diffuse large B cell lymphoma is required for tumor spreading and tissue infiltration. *Oncotarget* 8, 85068–85084. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18844>.
- Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C.M., Gerard, N.P., Gerard, C., and Lefkowitz, R.J. (2010). Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 628–632. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912852107>.
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., and Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res* 317, 575–589. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.01.005>.

- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- Reita, D., Bour, C., Benbrika, R., Groh, A., Pencreach, E., Guérin, E., and Guenot, D. (2019). Synergistic Anti-Tumor Effect of mTOR Inhibitors with Irinotecan on Colon Cancer Cells. *Cancers* 11, 1581. <https://doi.org/10.3390/cancers11101581>.
- 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* 126, 359–370. <https://doi.org/10.1111/apm.12818>.
- Rodrigues, N.R., Rowan, A., Smith, M.E., Kerr, I.B., Bodmer, W.F., Gannon, J.V., and Lane, D.P. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7555–7559. .
- Rodriguez-Salas, N., Dominguez, G., Barderas, R., Mendiola, M., García-Albéniz, X., Maurel, J., and Batlle, J.F. (2017). Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 109, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.11.007>.
- Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909–928. .
- 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. *Molecular Cancer* 13, 58. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-58>.
- 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. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16323>.
- Roy, I., Zimmerman, N.P., Mackinnon, A.C., Tsai, S., Evans, D.B., and Dwinell, M.B. (2014). CXCL12 chemokine expression suppresses human pancreatic cancer growth and metastasis. *PLoS ONE* 9, e90400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090400>.
- Rubie, C., Frick, V.O., Ghadjar, P., Wagner, M., Justinger, C., Faust, S.K., Vicinus, B., Gräber, S., Kollmar, O., and Schilling, M.K. (2011). CXC receptor-4 mRNA silencing abrogates CXCL12-induced migration of colorectal cancer cells. *J Transl Med* 9, 22. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-22>.
- Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., and Gebbia, N. (2005). The TP53 Colorectal Cancer International Collaborative Study on the Prognostic and Predictive Significance of p53 Mutation: Influence of Tumor Site, Type of Mutation, and Adjuvant Treatment. *JCO* 23, 7518–7528. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.00.471>.
- Saad, R.S., Ghorab, Z., Khalifa, M.A., and Xu, M. (2011). CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations. *World J Gastrointest Surg* 3, 159–166. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v3.i11.159>.
- Sameer, A.S. (2013). Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Front Oncol* 3, 114. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00114>.

- 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. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.020>.
- Samson, M., Aubry, F., and Parmentier, M. (1999). Que sont les chimiokines ? What are chemokines? <https://doi.org/10.4267/10608/1466>.
- Sánchez-Pernaute, A., Pérez-Aguirre, E., Cerdán, F.J., Iniesta, P., Díez Valladares, L., de Juan, C., Morán, A., García-Botella, A., García Aranda, C., Benito, M., et al. (2005). Overexpression of c-myc and loss of heterozygosity on 2p, 3p, 5q, 17p and 18q in sporadic colorectal carcinoma. *Rev Esp Enferm Dig* *97*, 169–178. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082005000300005>.
- de Santa Barbara, P., van den Brink, G.R., and Roberts, D.J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* *60*, 1322–1332. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2289-3>.
- Santagata, S., Ieranò, C., Trotta, A.M., Capiluongo, A., Auletta, F., Guardascione, G., and Scala, S. (2021). CXCR4 and CXCR7 Signaling Pathways: A Focus on the Cross-Talk Between Cancer Cells and Tumor Microenvironment. *Front Oncol* *11*, 591386. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.591386>.
- Sarris, M., Masson, J.-B., Maurin, D., Van der Aa, L.M., Boudinot, P., Lortat-Jacob, H., and Herbomel, P. (2012). Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr Biol* *22*, 2375–2382. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.018>.
- Schrag, D., Weng, S., Brooks, G., Meyerhardt, J.A., and Venook, A.P. (2016). The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer. *JCO* *34*, 3505–3505. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3505.
- Shi, Y., Riese, D.J., and Shen, J. (2020). The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front Pharmacol* *11*, 574667. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.574667>.
- Shima, K., Morikawa, T., Yamauchi, M., Kuchiba, A., Imamura, Y., Liao, X., Meyerhardt, J.A., Fuchs, C.S., and Ogino, S. (2011). TGFBR2 and BAX Mononucleotide Tract Mutations, Microsatellite Instability, and Prognosis in 1072 Colorectal Cancers. *PLOS ONE* *6*, e25062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025062>.
- Shimizu, N., Soda, Y., Kanbe, K., Liu, H.Y., Mukai, R., Kitamura, T., and Hoshino, H. (2000). A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* *74*, 619–626. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.2.619-626.2000>.
- Siekmann, A.F., Standley, C., Fogarty, K.E., Wolfe, S.A., and Lawson, N.D. (2009). Chemokine signaling guides regional patterning of the first embryonic artery. *Genes Dev* *23*, 2272–2277. <https://doi.org/10.1101/gad.1813509>.
- 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. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00208.2004>.

- 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. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1844>.
- Song, Z.-Y., Gao, Z.-H., Chu, J.-H., Han, X.-Z., and Qu, X.-J. (2015). Downregulation of the CXCR4/CXCL12 axis blocks the activation of the Wnt/ β -catenin pathway in human colon cancer cells. *Biomed Pharmacother* *71*, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.01.020>.
- Souglakos, J. (2007). Genetic Alterations in Sporadic and Hereditary Colorectal Cancer: Implementations for Screening and Follow-Up. *DDI* *25*, 9–19. <https://doi.org/10.1159/000099166>.
- Soussi, T., and Bérout, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* *1*, 233–240. <https://doi.org/10.1038/35106009>.
- Starr, A.E., Dufour, A., Maier, J., and Overall, C.M. (2012). Biochemical analysis of matrix metalloproteinase activation of chemokines CCL15 and CCL23 and increased glycosaminoglycan binding of CCL16. *J Biol Chem* *287*, 5848–5860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314609>.
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27348>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9256-x>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* *71*, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/31261>.
- Takagi, Y., Koumura, H., Futamura, M., Aoki, S., Ymaguchi, K., Kida, H., Tanemura, H., Shimokawa, K., and Saji, S. (1998). Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer* *78*, 1152–1155. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.645>.
- Tan, H.-X., Gong, W.-Z., Zhou, K., Xiao, Z.-G., Hou, F.-T., Huang, T., Zhang, L., Dong, H.-Y., Zhang, W.-L., Liu, Y., et al. (2020). CXCR4/TGF- β 1 mediated hepatic stellate cells differentiation into carcinoma-associated fibroblasts and promoted liver metastasis of colon cancer. *Cancer Biol Ther* *21*, 258–268. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1685157>.
- Tauriello, D.V.F., Calon, A., Lonardo, E., and Batlle, E. (2017). Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Mol Oncol* *11*, 97–119. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12018>.

- Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* 16, 2927–2931. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2329>.
- Teixidó, J., Martínez-Moreno, M., Díaz-Martínez, M., and Sevilla-Movilla, S. (2018). The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 95, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.018>.
- Tejpar, S., Stintzing, S., Ciardiello, F., Tabernero, J., Van Cutsem, E., Beier, F., Esser, R., Lenz, H.-J., and Heinemann, V. (2017). Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials. *JAMA Oncol* 3, 194–201. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3797>.
- The Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>.
- Thiel, A., and Ristimäki, A. (2013). Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. *Front Oncol* 3, 281. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00281>.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8681–8686. .
- Tremblay, J.P. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l’expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Med Sci (Paris)* 31, 1014–1022. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111016>.
- Tseng, W., Leong, X., and Engleman, E. (2007). Orthotopic Mouse Model of Colorectal Cancer. *J Vis Exp* 484. <https://doi.org/10.3791/484>.
- Ulvmar, M.H., Hub, E., and Rot, A. (2011). Atypical chemokine receptors. *Exp Cell Res* 317, 556–568. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.01.012>.
- Van Cutsem, E., Lenz, H.-J., Köhne, C.-H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezínek, I., Beier, F., Stroh, C., Rougier, P., van Krieken, J.H., et al. (2015). Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 33, 692–700. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4812>.
- Wang, B., Wang, W., Niu, W., Liu, E., Liu, X., Wang, J., Peng, C., Liu, S., Xu, L., Wang, L., et al. (2014). SDF-1/CXCR4 axis promotes directional migration of colorectal cancer cells through upregulation of integrin $\alpha\beta6$. *Carcinogenesis* 35, 282–291. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt331>.
- Wang, L., Huang, T., Chen, W., Gao, X., Zhou, T., Wu, Z., and Sun, Y. (2012). Silencing of CXCR4 by RNA interference inhibits cell growth and metastasis in human renal cancer cells. *Oncol Rep* 28, 2043–2048. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2028>.
- Wang, W., Li, D., Xiang, L., Lv, M., Tao, L., Ni, T., Deng, J., Gu, X., Masatara, S., Liu, Y., et al. (2019). TIMP-2 inhibits metastasis and predicts prognosis of colorectal cancer via regulating MMP-9. *Cell Adh Migr* 13, 273–284. <https://doi.org/10.1080/19336918.2019.1639303>.
- Watanabe, T., Kobunai, T., Yamamoto, Y., Matsuda, K., Ishihara, S., Nozawa, K., Yamada, H., Hayama, T., Inoue, E., Tamura, J., et al. (2012). Chromosomal instability (CIN)

- phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* *30*, 2256–2264. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.6490>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/ng1834>.
- Winder, T., and Lenz, H.-J. (2010). Vascular Endothelial Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling Pathways as Therapeutic Targets for Colorectal Cancer. *Gastroenterology* *138*, 2163–2176. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.02.005>.
- Wu, Y.-C., Tang, S.-J., Sun, G.-H., and Sun, K.-H. (2016). CXCR7 mediates TGFβ1-promoted EMT and tumor-initiating features in lung cancer. *Oncogene* *35*, 2123–2132. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.274>.
- Xanthou, G., Duchesnes, C.E., Williams, T.J., and Pease, J.E. (2003). CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *Eur J Immunol* *33*, 2241–2250. <https://doi.org/10.1002/eji.200323787>.
- Xu, Y., and Pasche, B. (2007). TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.* *16 Spec No 1*, R14–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl486>.
- Xu, C., Zhao, H., Chen, H., and Yao, Q. (2015). CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther* *9*, 4953–4964. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S84932>.
- Yahagi, M., Okabayashi, K., Hasegawa, H., Tsuruta, M., and Kitagawa, Y. (2016). The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastrointest Surg* *20*, 648–655. <https://doi.org/10.1007/s11605-015-3026-6>.
- Yamada, S., Yashiro, M., Maeda, K., Nishiguchi, Y., and Hirakawa, K. (2005). A novel high-specificity approach for colorectal neoplasia: Detection of K-ras2 oncogene mutation in normal mucosa. *Int. J. Cancer* *113*, 1015–1021. <https://doi.org/10.1002/ijc.20666>.
- Yamamoto, H., and Imai, K. (2015). Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol* *89*, 899–921. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1474-0>.
- Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y., and Wei, X. (2019). Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer* *18*, 26. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954-x>.
- Yu, J., He, Z., He, X., Luo, Z., Lian, L., Wu, B., Lan, P., and Chen, H. (2021). Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis for MMPs in Human Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology* *11*. .
- Yu, S., Yao, Y., Xiao, H., Li, J., Liu, Q., Yang, Y., Adah, D., Lu, J., Zhao, S., Qin, L., et al. (2018). Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum Gene Ther* *29*, 51–67. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.032>.
- Yu, X., Wang, D., Wang, X., Sun, S., Zhang, Y., Wang, S., Miao, R., Xu, X., and Qu, X. (2019). CXCL12/CXCR4 promotes inflammation-driven colorectal cancer progression through

- activation of RhoA signaling by sponging miR-133a-3p. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38, 32. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-1014-x>.
- 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.* 183, 3204–3211. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900269>.
- Zabel, B.A., Lewén, S., Berahovich, R.D., Jaén, J.C., and Schall, T.J. (2011). The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Mol. Cancer* 10, 73. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-73>.
- Zavadil, J., and Böttinger, E.P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764–5774. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208927>.
- Zboralski, D., Hoehlig, K., Eulberg, D., Frömming, A., and Vater, A. (2017). Increasing Tumor-Infiltrating T Cells through Inhibition of CXCL12 with NOX-A12 Synergizes with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res* 5, 950–956. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0303>.
- 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.
- .
- 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. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3217>.
- 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, 1000–1011. <https://doi.org/10.1002/ibd.20480>.
- Zimmerman, N.P., Vongsa, R.A., Faherty, S.L., Salzman, N.H., and Dwinell, M.B. (2011). Targeted intestinal epithelial deletion of the chemokine receptor CXCR4 reveals important roles for extracellular-regulated kinase-1/2 in restitution. *Lab Invest* 91, 1040–1055. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.77>.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity* 36, 705–716. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.008>.
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., and Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* 11, 597–606. <https://doi.org/10.1038/nri3049>.
- (2000). *Pathology and genetics of tumours of the digestive system* (Lyon : Oxford: IARC Press ; Oxford University Press (distributor,)).

SITES WEB CONSULTÉS

Infocancer France, Février 2022, (<https://arcagy.org/infocancer/localisations/appareil-digestif/cancer-colon-et-rectum.html/>).

American Cancer Society's (ACS), Février 2022 - Cancer Facts & Figures 2022, (<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures2022.html#:~:text=Estimated%20numbers%20of%20new%20cancer,incidence%2C%20mortality%2C%20and%20survival%20statistics>).

PEPROTECH. RUO Cytokines/Chemokines, Mai 2022.
<https://www.peprotech.com/en/chemokines>.

Carnegie science. Mars 2016. <https://carnegiescience.edu/news/some-bacterial-crisprs-can-snip-rna-too>

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1. Publications

Goïta AA, Guenot D. Colorectal Cancer: The Contribution of CXCL12 and Its Receptors CXCR4 and CXCR7. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 2;14(7):1810. doi: 10.3390/cancers14071810. PMID: 35406582; PMCID: PMC8997717.

2. Communications orales

Invalidation des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans une lignée colique humaine. Aïssata Aimée GOÏTA, Dominique GUENOT. 7EMES JOURNÉES SCIENTIFIQUES DE LA FÉDÉRATION DE MÉDECINE TRANSLATIONNELLE DE STRASBOURG (FMTS) – 25 Avril 2019 - Amphithéâtre FRANK – Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg.

Implication de la chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans la formation de métastases du cancer colique. Aïssata Aimée GOÏTA, Dominique GUENOT. Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives (CECED) 2021 - 18-21 Mars 2021 - En ligne.

3. Posters

Implication de l'axe CXCL12/CXCR4/CXCR7 dans la formation de métastases du cancer du côlon. Aïssata Aimée GOÏTA, Damien REÏTA, Isabelle DULUC, Jean-Noël FREUND, Dominique GUENOT. 8EMES JOURNÉES SCIENTIFIQUES DE LA FÉDÉRATION DE MÉDECINE TRANSLATIONNELLE DE STRASBOURG (FMTS) – 22 Avril 2021 - En ligne.

Implication de l'axe CXCL12/CXCR4/CXCR7 dans la dissémination métastatique du cancer colique

Résumé

Bien que des stratégies de dépistages et des nouvelles combinaisons de traitements aient été mises en place, la survie des patients présentant des métastases au diagnostic reste encore faible. La chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 sont décrits pour leur implication dans plusieurs cancers mais le rôle spécifique de chaque récepteur reste encore à préciser.

Pour préciser leur rôle respectif dans la dissémination métastatique du cancer colique, nous avons cherché à invalider les gènes de CXCR4 et/ou CXCR7 par CRISPR-Cas9. Parmi les clones générés, nous avons obtenu des clones ayant perdu totalement ou partiellement l'expression de CXCR4 mais aucun clone invalidé pour CXCR7 ou les deux récepteurs.

En étudiant les conséquences fonctionnelles de cette invalidation, nous avons montré *qu'in vitro*, la perte/baisse de l'expression de CXCR4 n'a pas d'impact sur la prolifération cellulaire, mais elle diminue fortement la migration, l'invasion et la migration trans-endothéliale des cellules. D'autre part, nous avons montré que cette perte/diminution d'expression affecte l'expression de certaines MMP, intégrines, gènes de l'EMT et inhibe l'activation de la Rac1 et de la voie de signalisation associée à Akt et dans une moindre mesure celle associée à Erk1/2. Par ailleurs, *in vivo*, la perte de CXCR4 diminue fortement la formation de tumeurs caecales et de métastases hépatiques et pulmonaires dans des xénogreffes orthotopiques et intraveineuses chez la souris.

Mots clés : CXCL12, CXCR4, CXCR7, tumeurs, métastases, CRISPR-Cas9.

Résumé en anglais

Although screening strategies and new treatment combinations have been developed, the survival of patients with metastatic disease at diagnosis remains poor. The chemokine CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 have been described to be involved in several cancers but the specific role of each receptor remains to be clarified.

To precise their respective roles in the metastatic dissemination of colon cancer, we aimed to invalidate the CXCR4 and/or CXCR7 genes by CRISPR-Cas9. Among the clones generated, we obtained clones that totally or partially lost CXCR4 expression but no clones invalidated for CXCR7 or both receptors.

By studying the functional consequences of this invalidation, we showed that *in vitro*, the loss/decrease of CXCR4 expression does not impact cell proliferation, but it strongly reduces migration, invasion and trans-endothelial migration of cells. Furthermore, we have shown that this loss/decrease of expression affects the expression of certain MMPs, integrins, EMT genes and inhibits the activation of Rac1 and the Akt-associated signaling pathway and to a lesser extent the one related to Erk1/2. Furthermore, *in vivo*, loss of CXCR4 strongly inhibits caecal tumor formation and liver and lung metastasis in orthotopic and intravenous xenografts in mice.