



UNIVERSITÉ de NICE SOPHIA-ANTIPOLIS,
UFR SCIENCES
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED85)

THÈSE

**Étude des couples Chimiokines/Récepteurs
comme nouvelles cibles thérapeutiques
des cancers colorectaux métastasés : études précliniques**

Présentée pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

par

Elodie GUILLEMOT

Soutenue le 2 Décembre 2013,
À la faculté de médecine de Nice devant le jury composé de:

Monsieur le Pr Jean-François MICHIELS
Monsieur le Dr Michel AURRAND-LIONS
Monsieur le Dr Christophe COMBADIÈRE
Monsieur le Dr Babou KARIMDJEE-SOILIH
Madame le Dr. Annie SCHMID-ALLIANA

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Membre invité
Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur **Jean-François Michiels** de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie les Docteurs **Christophe Combadière** et **Michel Aurrand-Lions** d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs.

Je remercie également le Docteur **Babou Karimdjee-Soilihi** d'être membre de mon jury de thèse. Sans vous les expériences animales essentielles au projet 'fractalkine' n'auraient pas pu être possibles.

Annie, je te remercie de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma thèse sur une thématique qui m'a stimulée, motivée et permis d'apprendre ce qu'est la recherche. Les quatre années passées ensemble ont défilé à une allure folle, je te souhaite la sérénité à laquelle vous aspirez pour les prochaines années !

Heidy, je te remercie pour ton aide et ta pédagogie durant ces derniers mois. Après les péripéties de ces dernières années, je crois que le ciel s'éclaircit enfin, et cela me réjouit pour vous !

Marie-Ange, tu m'as accueilli avec générosité pour mon stage de master 2, finalement je suis encore là quatre ans plus tard. Durant toute ma thèse, j'ai toujours pu compter sur toi pour m'épauler dans mes expériences. Merci beaucoup pour ta disponibilité ! Toujours d'humeur égale, ton sourire quotidien fût fort agréable !

Jean-Claude, Nathalie, Patricia, Florian, David, Ivana, vous nous avez accueillis avec énormément de gentillesse, mais aussi d'efficacité lorsque nous sommes arrivées à la faculté de médecine. Je tiens TOUS à vous remercier pour votre disponibilité, pour le temps que vous m'avez accordée chacun à votre tour. Je souhaite à l'équipe beaucoup de bonnes choses pour vos projets futurs et beaucoup d'épanouissement à tous. Florian, je tiens à te remercier plus particulièrement car tes conseils et tes remarques m'ont permis de ne pas perdre confiance en moi au moment où j'étais en perte de repères. Je te souhaite le meilleur pour la suite...

Véronique, peut être sera-tu étonnée de te trouver ici, mais ta personnalité a marqué mon apprentissage de la recherche. Si je devais maintenant faire un souhait pour ma future carrière, cela serait de travailler avec des personnes ayant tes compétences, mais aussi ta franchise. Merci pour ta générosité et ta spontanéité !

Valérie, Mathilde, Akila, Meri, Mathieu, Claudine, Abdel, je suis très émue d'écrire ces quelques mots à votre attention car j'avoue que j'aurais bien prolongé mon séjour avec vous tous. Vous avez fait partie de mon quotidien pendant 2 ans et l'avez rendu fort agréable. Plus que cela, vous avez TOUS su me faire une place, m'accueillir avec beaucoup de chaleur au moment où l'étiquette de « doctorante sans laboratoire fixe » me collait au train. J'en aurais presque oublié parfois que mon bureau n'était plus avec vous. Plus que des collègues, je continue ma route avec des amis...

Anne, tu fais partie des personnes que le destin a mis sur ma route, nous étions faites pour nous rencontrer. Nos chemins ne se sont croisés qu'une seule fois et pourtant on a créé un lien particulier. On aura beaucoup rit de nos déboires, ce qui m'a permis de me sentir moins seule dans cette « traversée du désert », autant de sentiments qui m'ont réchauffée le cœur plus d'une fois. Nos fous rires dans les restaurants (qui nous ont faits « l'honneur » de nous recevoir) me resteront encore longtemps !! Surtout garde ton sourire communicatif. Je te souhaite vraiment beaucoup de bonheur et de réussite à venir...

Émilie, je ne sais pas combien te remercier tant ton aide et ton soutien ont été importants pour moi. Lectrice des premières heures, il faut avouer que mon mémoire aurait été « françaisement » parlant drôlement moins bien sans toi. Cette écriture est une spéciale dédicace, les détails sont toujours importants ! J'en profite pour te dire que tu as un cœur en or mais aussi un bon grain de folie que j'adore; on ne peut pas passer une journée avec toi sans rigoler, c'est juste IMPOSSIBLE ! Enfin bref, une collègue, une amie, géniale ! Juste fais attention, je crois que la sagesse te guette ! ;)

Frédéric, cher Frédéric. A l'heure de faire les comptes, je dois te dire que je te dois beaucoup. Tu m'as scientifiquement appris beaucoup de choses, la cytométrie d'accord, mais pas seulement. C'est avec toi, au cours de ces 4 années, que j'ai trouvé mes cellules de plus en plus louches, et il faut bien le dire, elles n'étaient pas trop logiques. Tant pis après tout, ce n'était que du cul !! Tu m'as donc apportée ton savoir, mais je crois qu'aujourd'hui, il faut le reconnaître, tu m'as parfois dit tout et son contraire !! Oui ! Oui ! Et je me rappelle avoir parfois ri un peu jaune d'ailleurs ! Tu m'as également appris le pessimisme en toute circonstance, et puis contre toute attente, tu as été optimiste pour deux lorsque j'avais enfin appris la leçon. Étonnamment, la cohabitation (lorsque tu as bien voulu m'accueillir sous ta hotte) n'a pas été explosive, et au contraire malheur à moi si j'allais voir chez les voisins ! Enfin voilà, je tiens aujourd'hui à te remercier du fond du cœur car sans toi ma thèse aurait été bien pâle, bien triste... Tu me l'as dit, la recherche est faite de gens qui passent, où chacun doit continuer son chemin. J'espère que le tien sera le plus vert possible et que tu trouveras l'épanouissement dont tu as besoin pour développer tout ton talent... Je ne te dis pas au revoir mais seulement à bientôt...

Chère Maman, Cher Papa chéris, tout le chemin parcouru n'aurait pas été possible sans vous. Vous m'avez fait confiance dans mes choix, et bien que le cœur gros, vous m'avez laissé partir tenter ma chance à l'autre bout de la France. Vous m'avez inculqué des valeurs humaines qui ont fait ma force durant cette thèse. Je vous remercie pour tout cela. La fierté que je peux lire dans vos yeux récompense aujourd'hui tous mes efforts. Je vous aime énormément !

Adrien, petit à petit tu m'as donné les armes nécessaires pour franchir les barrières psychologiques auxquelles je me suis confrontée pendant ces quatre années. Tous les jours tu m'encourages à identifier mes intérêts et à me dépasser pour les atteindre. Merci d'être là, merci d'être toi.

A mon guerrier pacifique... beaucoup beaucoup !

« Certains pensent que, en s'accrochant, on devient fort. Quelque fois c'est en lâchant prise »

Sylvia Robinson

RÉSUMÉ

Titre : Étude des couples Chimiokines/Récepteurs comme nouvelles cibles thérapeutiques des cancers colorectaux métastasés : études précliniques

Avec 42 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2012, le cancer colorectal (CCR) représente en France le troisième cancer en termes d'incidence. Les métastases en constituent la principale cause de décès (90% des cas). Les patients atteints d'un CCR développent principalement des métastases au niveau du foie (50% des patients) et dans une moindre mesure au niveau des poumons (15% des patients). Malgré les progrès récents, notamment de la chimiothérapie et des agents ciblés, le taux de survie à 5 ans des patients présentant un CCR métastasé reste faible. Aujourd'hui, la résection chirurgicale est le seul traitement curatif, cependant moins de 20% des patients porteurs de métastases sont opérables. Il existe donc un grand nombre de patients présentant un CCR métastasé pour lequel aucun traitement curatif ne peut être proposé.

La formation des métastases à partir d'une tumeur primaire résulte d'une longue série d'étapes séquentielles liées les unes aux autres. L'issue de ce processus dépend à la fois des propriétés intrinsèques des cellules tumorales et de la réponse de l'hôte. Il a été récemment montré que les couples chimiokines/récepteurs (initialement décrits pour réguler la migration des leucocytes) interviennent dans le contrôle des différentes étapes de la progression tumorale.

Le projet de recherche développé au cours de mon travail de thèse avait pour objectif d'utiliser les chimiokines et leurs récepteurs dans de nouvelles stratégies thérapeutiques pour bloquer et / ou éradiquer les métastases hépatiques et pulmonaires des CCRs. Le travail s'est articulé selon deux axes dans lesquels nous avons montré d'une part que, le blocage du récepteur de chimiokines CXCR7 permet de limiter les métastases pulmonaires de CCRs et d'autre part que, le délivrage du gène codant pour CX3CL1 au niveau du foie entraîne une réponse anti-tumorale efficace dans les métastases hépatiques de CCRs.

Mots clés : cancer colorectal, métastases, chimiokines/récepteurs, études précliniques

Laboratoire d'accueil : **Laboratoire de Physiomédecine Moléculaire (LP2M), CNRS FRE3472**

Équipe Bio-Ingénierie et Physiopathologie Ostéo-Articulaire (BIPOA)

Faculté de médecine

28 avenue de Valombrose

06107 NICE Cedex 2

ABSTRACT

Title: The chemokines-chemokine receptors pairs as new therapeutic targets for the metastatic colorectal carcinoma: preclinical studies

With 42 000 newly-diagnosed patients in 2012, the colorectal cancer (CRC) represents the third type of cancer in terms of incidence in France. The leading cause of death from CRC is the development of metastases (90% of the patients) and these metastases will occur mostly within the liver (50% of the patients) and, to a lesser extent, within the lungs (15% of the patients). Despite recent progress, notably in the chemotherapies now used and the targeted agents, the rate of 5-years survival for late stage CRC remains low. Nowadays, the surgical resection is the only curative treatment proposed to patients with metastatic CRC, however less than 20% of them have an operable tumour. There is therefore a high number of patients for whom no cure is currently available.

A primary tumour's dissemination to a second organ is the result of a long process made of numerous cross-linked steps. The final outcome of this process depends on the intrinsic properties of tumour cells as well as the host response. Recently, it has been shown that the chemokine-chemokine receptor pairs (initially described as regulating the leukocyte migration) play crucial roles in the various stages involved in tumour progression.

The aim of the research project developed during my PhD was to assess the use of the chemokines and their receptors in new therapeutic strategies to block and / or eradicate the hepatic and pulmonary metastases of CRC. Our work has been organized along two main lines of approach. We have shown that the blockage of the CXCR7 chemokine receptor enables the limitation of the CRC metastases within the lungs and that the CX3CL1 gene transfer into the hepatocytes leads to an efficient anti-tumor response in the CRC metastases within the liver.

Key words: colorectal cancer, metastases, chemokines/chemokine receptors,
preclinical studies

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
PRÉAMBULE	13
INTRODUCTION.....	14
I. Le cancer colorectal.....	15
A. Histologie du gros intestin	15
B. Développement du cancer colorectal	17
i. Les altérations génétiques.....	17
1. L'instabilité génomique.....	17
2. Les mutations ponctuelles	19
3. Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur du cancer colorectal	21
4. Les voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale	23
ii. Les formes héréditaires.....	25
iii. L'angiogénèse tumorale.....	27
iv. Les métastases	29
v. Le microenvironnement tumoral	31
1. Les fibroblastes associés aux tumeurs.....	33
2. Les cellules du système immunitaire.....	33
C. Epidémiologie et facteurs de risques du cancer colorectal	35
D. Les traitements du cancer colorectal.....	36
II. Les chimiokines et les récepteurs de chimiokines.....	39
A. Généralités sur les chimiokines/récepteurs	39
i. Les chimiokines.....	39
ii. Les récepteurs de chimiokines.....	42

iii. Spécificité d'interaction.....	43
B. Fonctions des chimiokines et de leurs récepteurs dans la biologie du cancer.....	44
i. Les couples chimiokines/récepteurs et le recrutement leucocytaire.....	44
1. Le chimiotactisme et le recrutement tissulaire.....	44
2. Les leucocytes associés aux tumeurs.....	46
Les macrophages.....	47
Les neutrophiles.....	49
Les lymphocytes T.....	51
ii. Les couples chimiokines/récepteurs dans l'angiogénèse tumorale.....	54
1. Les chimiokines CXC.....	55
2. Les chimiokines CC.....	58
3. La chimiokine CX3CL1.....	58
4. Le recrutement des leucocytes dans l'angiogénèse tumorale.....	59
iii. Les couples chimiokines/récepteurs : acteurs de la prolifération et de la migration tumorales.....	60
1. Rôle dans la dissémination métastatique.....	60
2. Rôle dans la survie et la prolifération des cellules tumorales.....	63
iv. Les couples chimiokines/récepteurs et les fibroblastes associés aux tumeurs.....	65
III. Les chimiokines et leurs récepteurs comme cibles thérapeutiques des cancers.....	70
A. Le blocage des chimiokines/récepteurs utilisé comme stratégie anticancéreuse.....	70
B. Utilisation des chimiokines comme 'médicaments' anticancéreux.....	73
RÉSULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	76
I. Les chimiokines et leurs récepteurs, des acteurs pro-tumoraux : implication du récepteur de chimiokines CXCR7 dans le processus métastatique.....	77
A. Présentation du sujet.....	77
B. Résumé des résultats obtenus.....	78
Article I.....	80
C. Complément de discussion et conclusions de la partie I.....	91

II. Les chimiokines et leurs récepteurs, des acteurs anti-tumoraux : étude préclinique d'immunothérapie génique des métastases hépatiques du cancer colorectal par CX3CL1	96
A. Introduction.....	96
B. Présentation des modèles d'études.....	99
Article II	100
C. Discussion et conclusions de la partie II	102
III. Conclusions et perspectives générales	105
ANNEXES	108
Article III	109
Article IV	116
BIBLIOGRAPHIE	125

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma simplifié du tube digestif.....	15
Figure 2 : La muqueuse colique	16
Figure 3 : Carte à deux dimensions des gènes mutés dans les cancers colorectaux	19
Figure 4 : Modèle de la voie de signalisation Wnt dépendante de la β -caténine	22
Figure 5 : Les voies de signalisation impliquées dans les cellules cancéreuses et les processus cellulaires qu'elles régulent.....	23
Figure 6 : Modèle des voies de signalisation impliquées dans le cancer colorectal	24
Figure 7 : Mécanismes impliqués dans l'angiogénèse tumorale.....	28
Figure 8 : La cascade métastatique.....	29
Figure 9 : Le microenvironnement tumoral	34
Figure 10 : Représentation schématique des 4 sous-familles de chimiokines	40
Figure 11 : Représentation schématique des spécificités d'interaction entre les récepteurs de chimiokines et leurs ligands	42
Figure 12 : Recrutement des cellules circulantes (exemple des leucocytes).....	45
Figure 13 : Marqueurs de surface des monocytes	47
Figure 14 : Chimiokines et macrophages associés aux tumeurs	48
Figure 15 : Schéma simplifié de la polarisation des neutrophiles N1/N2.....	50
Figure 16 : Différenciation des lymphocytes T $CD4^+$, effets sur la progression tumorale	52
Figure 17 : Rôles des chimiokines dans l'angiogénèse.....	56
Figure 18 : Les interactions bidirectionnelles entre les CAFs et la tumeur conduisent à la libération de chimiokines pro-tumorales.....	67
Figure 19 : Schéma illustrant le rôle pro-tumoral des chimiokines au cours des différentes étapes du cancer	68
Figure 20 : Représentation schématique des interactions au sein du trio de récepteurs CXCR3, CXCR4 et CXCR7	69

Figure 21 : Schéma de la structure de CX3CL1	98
Figure 22 : Représentation schématique de la protéine CX3CL1-Ig.....	99
Tableau 1 : Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer colorectal ...	20
Tableau 2 : Exemples de cellules du microenvironnement jouant un rôle dans la progression tumorale et métastatique.....	32
Tableau 3 : Classification TNM/AJCC 7 ^{ème} édition du cancer colorectal	37
Tableau 4 : Stratégies thérapeutiques préconisées pour le cancer colorectal par la Haute Autorité de Santé, France	37
Tableau 5 : Molécules chimiothérapeutiques et agents ciblés préconisés dans les traitements des cancers colorectaux par la Haute Autorité de Santé, France.....	38
Tableau 6 : Nomenclature et classification des chimiokines	41
Tableau 7 : Principaux couples chimiokines/récepteurs impliqués dans le recrutement des leucocytes au sein des tumeurs.....	46
Tableau 8 : Exemples d'études précliniques – Inhibition de la voie de signalisation CXCL12	62
Tableau 9 : Exemples d'études précliniques – Inhibition des voies de signalisation chimiokines/récepteurs.....	71
Tableau 10 : Données cliniques et précliniques sur l'implication de CXCL12 dans la résistance aux traitements anticancéreux	73
Tableau 11 : Exemples d'études précliniques de transfert de gène – Administration de chimiokines comme 'médicament' anticancéreux	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide RiboNucléique
CAF	Carcinoma-Associated Fibroblast
CCR	Cancer ColoRectal
DARC	Duffy Antigen Receptor Chemokine
DC	Dendritic Cell
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FGF	Fibroblast Growth Factor
GGL	Ganglion lymphatique
IFN	Interféron
IL	Interleukine
LT	Lymphocyte T
KO	Knockout
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMP	Métalloprotéinase
MMR	MisMatch Repair
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MSI	MicroSatellite Instability
NK	Natural Killer
PDGF	Platelet-derived growth factor
TAM	Tumor-Associated Macrophage
TAN	Tumor-Associated Neutrophil
TGF	Tumor Growth Factor
Th	T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	T régulateur
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

PRÉAMBULE

Mon travail de thèse a été réalisé dans l'équipe du Dr Heidy Schmid-Antomarchi intitulée 'rôles des chimiokines dans les pathologies tumorales et métastatiques' (unité INSERM U576 dirigée par le Pr Alain Bernard) puis dans l'équipe 'Bio-Ingénierie et Physiopathologie Ostéo-Articulaire' (BIPOA) du Dr Jean-Claude Scimeca (unité CNRS FRE3472 dirigée par le Dr Jacques Barhanin). L'équipe a pour objectif de déterminer si certains couples de chimiokines/récepteurs peuvent constituer des cibles pertinentes dans des stratégies thérapeutiques anticancéreuses. Lors de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée au cancer colorectal (CCR) et à ses métastases hépatiques et pulmonaires. Les chimiokines et leurs récepteurs forment un réseau complexe d'interactions moléculaires et interviennent dans de nombreux processus biologiques et pathologiques. Au cours du développement tumoral, les chimiokines portent une double casquette pro-tumorale et anti-tumorale qui est définie en fonction (i) des chimiokines mises en jeu, (ii) du processus biologique considéré mais aussi (iii) du microenvironnement dans lequel celui-ci se déroule. Les projets développés au cours de ma thèse avaient pour objectif de définir de nouvelles stratégies anticancéreuses basées sur l'utilisation des propriétés anti-tumorales de certaines chimiokines ou au contraire sur le blocage des effets pro-tumoraux de ces molécules. Nous nous sommes ainsi intéressées d'une part, aux effets du blocage du récepteur de chimiokines CXCR7 (effet pro-tumoral des chimiokines) dans les traitements des métastases hépatiques et pulmonaires des CCRs et d'autre part, aux effets de l'administration du gène codant la chimiokine CX3CL1 (effet anti-tumoral des chimiokines) dans les traitements des métastases hépatiques des CCRs.

L'introduction de ce mémoire présentera dans un premier temps les événements génétiques impliqués dans le développement du cancer colorectal ainsi que les processus biologiques et les acteurs mis en jeu lors de ce développement. La deuxième partie de cette introduction présentera les chimiokines et leurs récepteurs, ainsi que leurs fonctions dans la biologie du cancer. Cette deuxième partie sera également l'occasion de détailler l'implication de certains leucocytes dans la progression tumorale. Enfin dans une troisième partie, les éléments en faveur de l'utilisation des chimiokines et de leurs récepteurs dans les stratégies thérapeutiques anticancéreuses seront mis en lumière. Je présenterai ensuite successivement les résultats obtenus dans deux études précliniques (« CXCR7 » et « CX3CL1 ») et terminerai enfin par les conclusions et les perspectives générales de mon travail de thèse.

INTRODUCTION

I. Le cancer colorectal

A. Histologie du gros intestin

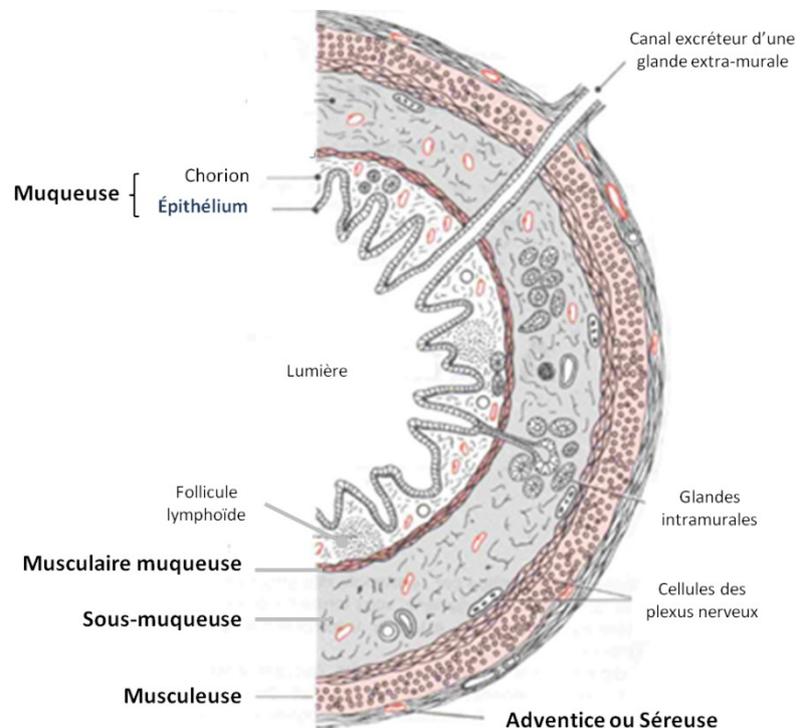
Le gros intestin, constitué du côlon et du rectum, est le dernier segment du tube digestif. Ses fonctions principales sont l'absorption de l'eau et des électrolytes issus du bol alimentaire ainsi que l'élimination des déchets.

Comme l'ensemble du tube digestif, le tissu colique se divise en une muqueuse, une sous-muqueuse, une musculaire et une séreuse (**Figure 1**).

Figure 1 : Schéma simplifié du tube digestif

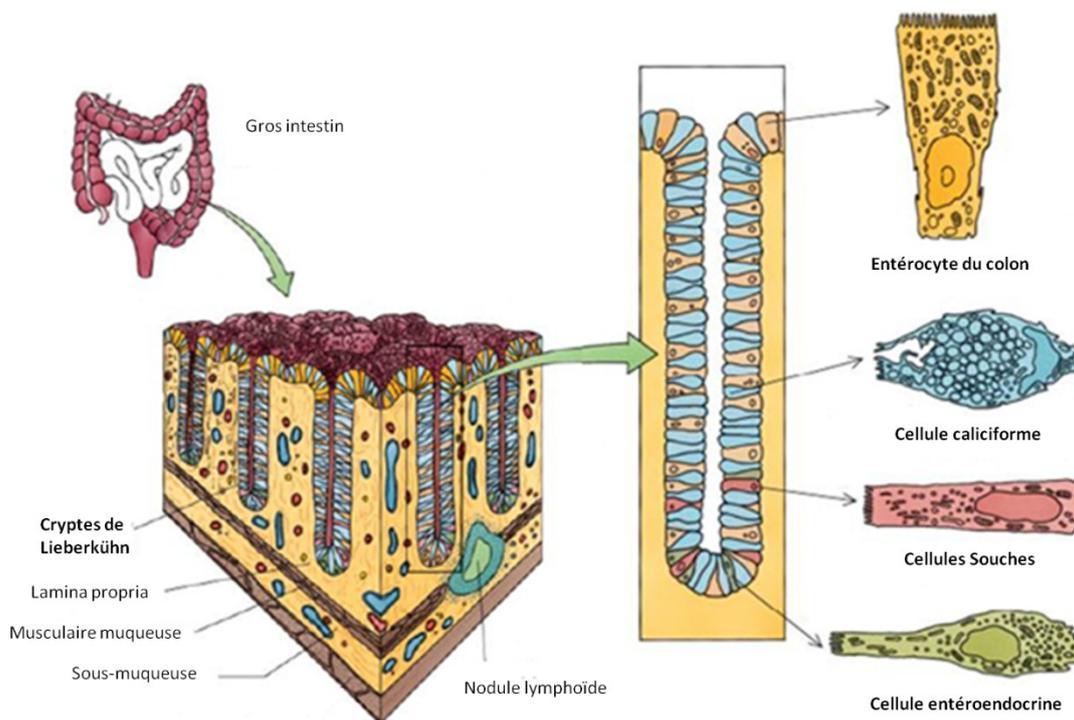
La muqueuse du tube digestif est composée d'un épithélium et d'un tissu conjonctif (appelé chorion), tous deux séparés par une lame basale.

D'après le cours PC2 « Le tube digestif » du Dr Ladoire S, (Dijon, octobre 2011)



La muqueuse colique présente des glandes tubuleuses droites serrées, appelées cryptes de Lieberkühn, invaginées en forme de doigts vers la paroi musculaire. Le côlon, contrairement à l'intestin grêle ne présente pas de villosités. La muqueuse colique comporte un épithélium prismatique simple contenant des cellules caliciformes (cellules à mucus ou cellules de gobelet), des entérocytes (ou colonocytes), des cellules entéroendocrines et des cellules souches (**Figure 2**). La muqueuse du rectum est similaire à celle du côlon, avec une abondance plus prononcée des cellules à mucus (Todaro et al., 2010).

Les cellules souches permettent un renouvellement rapide de l'épithélium intestinal ; avec un renouvellement cellulaire en 3 à 5 jours. Les cellules souches, localisées au fond des cryptes, sont capables de s'auto-renouveler (division symétrique produisant deux cellules filles identiques) ce qui leur permet de maintenir leur pool constant. Les cellules souches sont également des cellules multipotentes ; leur division asymétrique conduit à la production de cellules filles capables de générer tous les types cellulaires de l'intestin. Ces cellules filles sont des cellules immatures dites « de transit » capables de se diviser, et qui se différencient en migrant vers le haut de la glande jusqu'à leur exfoliation dans la lumière intestinale (Todaro et al., 2010). Le maintien de l'homéostasie de ce tissu repose sur un équilibre dynamique entre les différents processus cellulaires (prolifération, différenciation, migration, apoptose...) et requiert des mécanismes de contrôle précis (van der Flier and Clevers, 2009).



D'après le cours PC2 « Le tube digestif » du Dr Ladoire S, (Dijon, octobre 2011)

Figure 2 : La muqueuse colique

B. Développement du cancer colorectal

Les cancers colorectaux (CCRs) regroupent les cancers du côlon et les cancers du rectum. Ils surviennent dans l'extrême majorité des cas (96%) au niveau des glandes de la muqueuse intestinale ; ce sont des cancers glandulaires ou dits « adénocarcinomes ».

Dans 80% des cas, les CCRs se développent à partir de polypes adénomateux préexistants. Les polypes sont des tumeurs bénignes qui, progressivement, peuvent évoluer vers une tumeur maligne (~5% des polypes) en suivant la séquence adénome-carcinome (Midgley and Kerr, 1999). Un adénome est considéré comme malin lorsque les cellules épithéliales néoplasiques franchissent la lame basale de la muqueuse et infiltrent la sous-muqueuse. Bien que les CCRs surviennent fréquemment à partir de polypes, tous ne vont pas se transformer en tumeur maligne. On ne peut également pas exclure l'apparition de cancer *de novo* sur une muqueuse intestinale saine (Ponz de Leon and Di Gregorio, 2001).

i. Les altérations génétiques

Les adénocarcinomes coliques résultent d'altérations génétiques irréversibles dans les cellules de l'épithélium colique. Lors de la transformation maligne, les cellules vont subir une accumulation séquentielle d'altérations génétiques qui vont dépasser les mécanismes de contrôle de la cellule lui apportant des avantages de prolifération et de survie supérieurs aux cellules épithéliales normales (Hanahan and Weinberg, 2000). Les cellules tumorales se caractérisent par des mutations ponctuelles au sein de leurs gènes, ainsi que par une instabilité génomique importante ; toutes deux conduisant à l'altération de l'expression de certains gènes.

Parmi les CCRs, on distingue les formes sporadiques (fortement majoritaires) des formes familiales (ou héréditaires) qui surviennent chez les individus porteurs de prédispositions génétiques. Dans les CCRs sporadiques, on relève les altérations génétiques uniquement dans les cellules somatiques. En revanche, dans les formes héréditaires, on retrouve des altérations dans les cellules germinales, les cellules tumorales présentant ces mêmes altérations accompagnées de nombreuses autres modifications *de novo*.

1. L'instabilité génomique

L'instabilité génomique dans le cancer colorectal peut être due à trois mécanismes majeurs que sont l'instabilité chromosomique, l'instabilité microsatellitaire et le phénotype hyperméthylé des îlots CpG. Ces trois voies ne sont pas mutuellement exclusives, et l'on peut

observer dans une tumeur colique plusieurs de ces phénotypes.

L'instabilité chromosomique (chromosomal instability ou CIN) se traduit par des gains ou des pertes de chromosomes dans leur entier ou de larges fractions de chromosomes. La CIN a notamment pour conséquences un déséquilibre du nombre de chromosomes (aneuploïdie) et une fréquente perte d'hétérozygotie (Loss of Heterozygosity ou LOH) (Pino and Chung, 2010). La CIN est l'instabilité génomique la plus fréquemment observée dans les CCRs ; avec une CIN dans 65 à 70% des CCRs sporadiques (Lengauer et al., 1998). Ainsi, le gain des chromosomes 7p, 7q, 8q, 13q, 20p et 20q, et la perte des chromosomes 8p, 18p et 18q - dans les CCRs - influencent l'expression des gènes localisés sur ces chromosomes (Habermann et al., 2007).

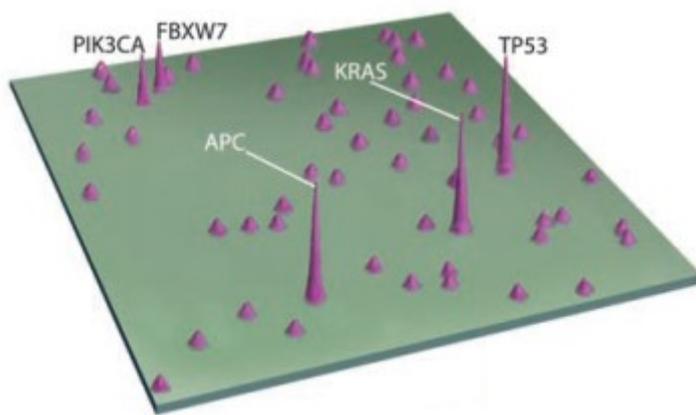
L'instabilité microsatellitaire (microsatellite instability ou MSI) se caractérise par un nombre important de mutations dans les séquences des microsatellites (séquences d'ADN formées par la répétition continue de 1 à 4 nucléotides). La MSI est observée dans environ 15% des CCRs ; avec 3% des MSI associées au syndrome de Lynch (*cf. §I.B.ii*) et 12% retrouvées dans les cancers sporadiques. La MSI est due à un déficit dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN (DNA mismatch repair system ou MMR system). Le système MMR est constitué d'une famille d'enzymes qui détectent et réparent les erreurs de réplication de l'ADN en phase S. Ainsi la mutation des gènes MMR que sont *msh2*, *mlh1*, *pms1*, *pms2* et *gtb/msh6* conduit à un phénotype MSI (opposé au phénotype MSS ou microsatellite stable). On note par exemple que la perte de la protéine MLH1 conduit à la perte totale de l'activité MMR (Boland and Goel, 2010). L'inactivation du système MMR empêche donc la correction des erreurs lors de la réplication de l'ADN, ce qui est à l'origine d'un phénotype mutateur (favorisant la survenue d'éléments oncologiques ultérieurs).

Le phénotype méthylateur des îlots CpG (CpG Island Methylator Phenotype ou CIMP) consiste en l'hyperméthylation des îlots CpG de certains promoteurs entraînant l'extinction des gènes régulés par ces promoteurs. Cette altération épigénétique est notamment à l'origine du phénotype MSI dans les CCRs sporadiques avec l'hyperméthylation du promoteur du gène *mlh1* (Boland and Goel, 2010).

Cette instabilité génomique des cellules tumorales est rendue possible par un défaut de réponse aux dommages à l'ADN. En effet, dans une cellule normale, lors de l'apparition d'altérations génétiques irréversibles, des mécanismes de contrôle font entrer la cellule en sénescence ou en apoptose. Pour exemple, le facteur de transcription TP53, qui contrôle l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, a directement été impliqué dans cet échappement avec une perte de fonction de TP53 dans 50 à 75% des CCRs (Leslie et al., 2002).

2. Les mutations ponctuelles

Dans leurs travaux publiés en 2007, le groupe de Vogelstein a montré qu'une tumeur colique présentait environ 80 mutations différentes (mutations ponctuelles non synonymes, CCRs avec microsatellites stables). Certains gènes mutés sont communément partagés par les tumeurs analysées dans cette étude (*apc*, *kras*, *tp53*, *pik3ca*, *fbxw7*, ...). En revanche, la majorité des gènes relevés sont mutés chez moins de 5% des individus. Les auteurs en concluent que le paysage du génome du cancer se caractérise par quelques « montagnes » de gènes très souvent mutés et un nombre beaucoup plus grand de « collines » de gènes plus rarement mutés (Wood et al., 2007) (**Figure 3**). Autrement dit, seules quelques mutations sont communes à la majorité des CCRs, et chaque tumeur présente une combinaison unique d'altérations génétiques.



D'après Wood LD et al, Science (2007) 318(5853):1108-13

Figure 3 : Carte à deux dimensions des gènes mutés dans les cancers colorectaux

Le paysage du génome du cancer se caractérise par quelques « montagnes » de gènes mutés dans la majorité des tumeurs et par de très nombreuses « collines » de gènes peu fréquemment mutés.

Il est à noter que parmi ces mutations, on distingue des mutations « **conductrices** » qui apportent, directement ou indirectement, un avantage sélectif de croissance à la cellule et des mutations « **passagères** » qui sont sans effet sur le processus néoplasique (Vogelstein et al., 2013).

Dans une étude récente, le nombre de mutations dans certaines tumeurs de tissus à renouvellement rapide (tel que le côlon) a été directement corrélé à l'âge du patient. Cette corrélation implique, selon les auteurs, que plus de la moitié des mutations identifiées dans ces tumeurs surviennent dans la phase pré-néoplasique. Ces mutations pré-néoplasiques seraient des mutations « passagères », expliquant le fait qu'un patient âgé de 90 ans présente deux fois plus de mutations qu'un patient de 45 ans atteint d'une tumeur colorectale morphologiquement identique (Tomasetti et al., 2013).

	Gènes	Type de mutations	Voie de signalisation
ONCOGENES	<i>braf</i>	mutations ponctuelles (activent une activité kinase)	RAS
	<i>ccne1</i> (Cycline E)	amplification génique	Wnt/APC/ β -caténine
	<i>cdk8</i>	amplification génique	Wnt/APC/ β -caténine
	<i>cmyc</i>	amplification génique (8q24)	Wnt/APC/ β -caténine
	<i>ctnnb1</i> (β caténine)	mutations ponctuelles et délétion en phase	Wnt/APC/ β -caténine
	<i>egfr</i>	amplification génique	PI3K, RAS
	<i>erbb2</i>	amplification génique (17q21.1)	PI3K, RAS
	<i>igf2</i>	amplification génique (11p15.5)	PI3K
	<i>kit</i> (<i>c-kit</i>)	mutations ponctuelles	PI3K, RAS, STAT
	<i>kras</i>	mutations ponctuelles	RAS
	<i>nras</i>	mutations ponctuelles	RAS
	<i>pdgfr</i>	mutations ponctuelles	PI3K, RAS
	<i>pik3ca</i>	mutations ponctuelles (activent une activité kinase)	PI3K
GENES SUPPRESSEURS DE TUMEUR	<i>apc</i>	décalage de phase (frameshift), mutations ponctuelles, délétions ou perte allélique, mutation germinale dans FAP	Wnt/APC/ β -caténine
	<i>atm</i>	mutations ponctuelle (kinase qui active et phosphoryle tp53)	Contrôle des dommages à l'ADN
	<i>fbxw7</i>	mutations non sens, mutations faux sens ou délétions	Wnt/APC/ β -caténine
	<i>mlh1</i>	mutations ponctuelles ou hyperméthylation du promoteur (CCR sporadique), mutation germinale dans HNPCC	Contrôle des dommages à l'ADN
	<i>msh2</i>	mutations ponctuelles, mutation germinale dans HNPCC	Contrôle des dommages à l'ADN
	<i>pten</i>	délétions ou mutations non-sens	PI3K
	<i>smad2</i>	mutations non-sens, délétions ou perte allélique	TGF β
	<i>smad3</i>	mutations non-sens, délétions	TGF β
	<i>smad4</i>	mutations non-sens, mutations faux-sens ou perte allélique (18q)	TGF β
	<i>tcf7l1</i> (TCF3)	translocation chromosomique avec fusion à <i>nav2</i>	Wnt/APC/ β -caténine
	<i>tcf7l2</i> (TCF4)	décalage de phase (frameshift) ou délétion locale avec fusion à <i>vtila</i>	Wnt/APC/ β -caténine
	<i>tgfbr2</i>	décalage de phase (frameshift) ou mutations non-sens	TGF β
	<i>tp53</i>	mutations ponctuelles ou deletion du chromosome 17p (perte allélique)	Contrôle des dommages à l'ADN
	<i>vhl</i>	mutations ponctuelles	PI3K, RAS, STAT

D'après :

Fearon ER, Annu Rev Pathol. (2011) 6:479-507

Cancer Genome Atlas Network (2012) 487(7407):330-7

et

Vogelstein B et al, Science (2013) 339(6127):1546-58

Tableau 1 : Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer colorectal

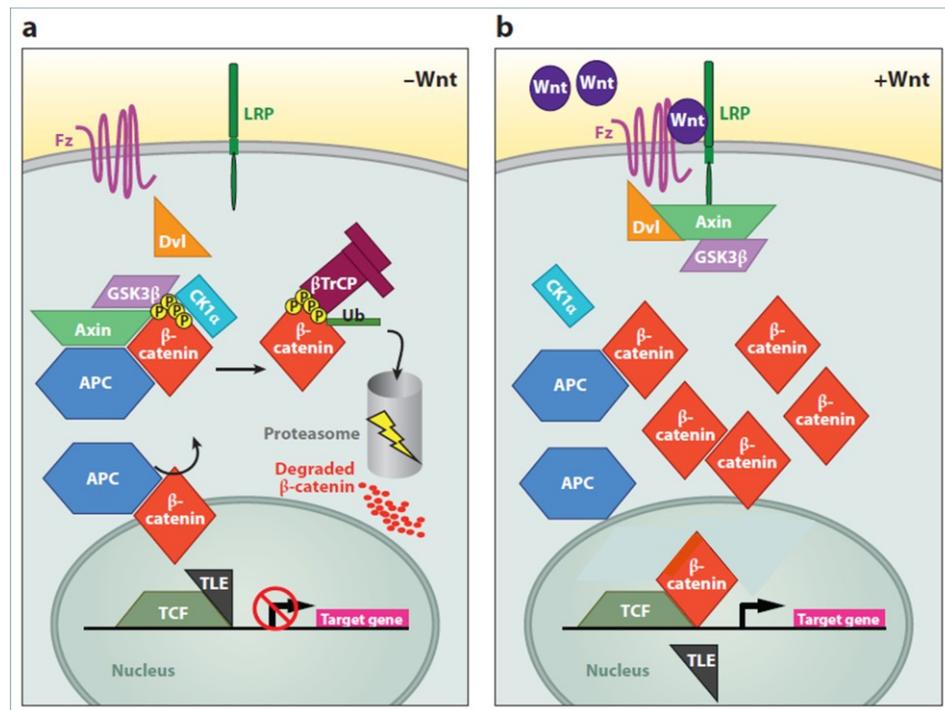
Liste non exhaustive des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs décrits dans le cancer colorectal. Ces gènes sont altérés par des mutations ponctuelles (non-sens ou faux-sens), des délétions (alléliques ou chromosomiques), des amplifications, etc... Tous ces gènes sont impliqués dans les voies de signalisation telles que les voies Wnt/APC, TGF β , RAS et PI3K. Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) ; Polypose Adénomateuse Familiale (FAP)

3. Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur du cancer colorectal

L'ensemble des altérations génomiques (mutations ponctuelles, altérations du nombre de copies de gènes, translocations, modifications épigénétiques) conduit le processus de tumorigenèse en modifiant des gènes qualifiés de proto-oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs ; les altérations génétiques entraînent l'activation des proto-oncogènes (devenus oncogènes), et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. On définit les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs comme des gènes dont les mutations « conductrices » apportent un avantage sélectif de croissance aux cellules tumorales. Ainsi, dans le cancer colorectal de nombreux gènes ont été identifiés pour être soit des oncogènes, soit des gènes suppresseurs de tumeurs (**Tableau 1**) (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Fearon, 2011; Vogelstein et al., 2013).

Les oncogènes peuvent coder pour des facteurs de croissance ou leurs récepteurs, des molécules de signalisation, des modulateurs du cycle cellulaire, et autres facteurs qui régulent la prolifération et la survie des cellules. Les gènes suppresseurs de tumeurs quant à eux maîtrisent la prolifération et la croissance cellulaire, les points de contrôle du cycle cellulaire, la mobilité, l'invasion, ou autres fonctions liées à la différenciation cellulaire normale (Boland and Goel, 2010).

Du fait de son implication majeure dans la polypose adénomateuse familiale (§I.B.ii), le gène suppresseur de tumeur le plus étudié dans le cancer colorectal est le gène *apc* (Adenomatous Polyposis Coli). La mutation du gène *apc* semblerait être un événement précoce du développement des adénomes. Contrairement à d'autres gènes mutés dans le cancer colorectal, la fréquence de mutation du gène *apc* est la même dans les petits adénomes que dans les adénomes avancés et les carcinomes. Les mutations du gène *apc* sont retrouvées dans les lésions précoces incluant les adénomes microscopiques. Parmi les adénomes et les carcinomes colorectaux sporadiques, 70 à 80% présentent des mutations somatiques du gène *apc* qui l'inactivent (les deux allèles du gène *apc* sont inactivés) (Fearon, 2011). La protéine APC est un partenaire de liaison et un régulateur de la β -caténine dans la voie de signalisation Wnt dépendante de la β -caténine (**Figure 4**). Dans approximativement 80% des CCRs dans lesquels les deux allèles du gène *apc* sont inactivés, la phosphorylation coordonnée et la dégradation de la β -caténine sont perturbées. En l'absence de la protéine APC, la β -caténine est stabilisée et les gènes cibles de la voie Wnt sont activés. La voie de signalisation Wnt est un élément clef de l'homéostasie intestinale et est essentielle pour une prolifération efficace dans les cryptes intestinales (Fevr et al., 2007). Parmi



D'après Fearon ER, Annu Rev Pathol. (2011) 6:479-507

Figure 4 : Modèle de la voie de signalisation Wnt dépendante de la β -caténine

a) La protéine APC, ainsi que la GSK3 β , l'Axin, et la CK1a, forment une partie d'un complexe dit de destruction. Ce complexe phosphoryle la β -caténine en N-terminal au niveau de résidus sérine et thréonine conservés. Cette phosphorylation crée un motif de reconnaissance pour la protéine β TrCP ; membre d'un complexe ubiquitin ligase. Ce dernier induit la polyubiquitination de la β -caténine, conduisant à la dégradation de celle-ci par le protéasome. Ainsi, dans la plupart des cellules, les niveaux de β -caténine libre sont finement régulés. La transcription de gènes cibles régulés par le TCF est réprimée par l'interaction entre le TCF et les protéines répressives de la famille TLE.

b) Lors de la liaison des ligands Wnt à un complexe récepteur constitué d'un membre de la famille Frizzled (Fz) et d'un membre de la famille LPR, le complexe de destruction est inhibé en partie par le recrutement de l'Axin au récepteur LPR, et en partie par l'action de Dvl sur la GSK3 β . Similaire à l'action des ligands Wnt, les mutations inhibitrices des protéines APC ou Axin, ou bien les mutations des sites conservés de phosphorylation de la β -caténine peuvent mener à l'accumulation de β -caténine libre. Lorsque les niveaux de β -caténine libre sont élevés, la β -caténine peut entrer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles régulés par le TCF tel que le proto-oncogène c-myc.

Abréviations : glycogen synthase kinase (GSK3 β) ; casein kinase 1 a (CK1a) ; β -transducin repeat-containing protein (β TrCP) ; T cell factor (TCF) ; transducin-like enhancer of split (TLE) ; low-density lipoprotein receptor-related protein (LPR) ; didheveled (Dvl).

les gènes activés de la voie Wnt, le gène le plus crucial est probablement le proto-oncogène *c-myc*. Le facteur de transcription *c-myc* régule l'expression de gènes cibles impliqués dans divers processus cellulaires tels que l'apoptose, la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire et la réplication de l'ADN (Dang et al., 2006; Pelengaris et al., 2002). Au travers des gènes qu'elle régule, la protéine *c-myc* participe à la progression tumorale des CCRs (Myant and Sansom, 2011). Par ailleurs, l'altération de la protéine APC, en plus des modifications transcriptionnelles qu'elle entraîne dans la voie Wnt/ β -caténine, engendre des modifications à la périphérie des cellules tumorales, notamment dans les processus d'adhésion cellule-cellule et de migration cellulaire (Burgess et al., 2011).

4. Les voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale

L'ensemble des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs identifiés dans les cancers participe à des voies de signalisation qui sont perturbées lors du processus tumoral. Plus précisément, une analyse des mutations « conductrices » dans plusieurs types de tumeurs (côlon, poumons, mélanome, pancréas, sein, leucémie, etc...) a montré que toutes ces mutations survenaient dans des gènes impliqués dans un nombre restreint de voies de signalisation bien connues. Les gènes mutés sont ainsi impliqués dans une ou plusieurs des 12 voies de signalisation répertoriées dans la **Figure 5**. Dans le cancer colorectal, les voies de signalisation Wnt/APC, PI3K, MAPK-RAS et TGF β (Tumor Growth Factor) sont particulièrement concernées et nombre de leurs acteurs présentent des altérations génétiques (**Tableau 1, Figure 6**). De plus, les 12 voies de signalisation mises en évidence peuvent elles-mêmes être associées à trois catégories d'avantages apportés à la cellule tumorale : - le destin cellulaire (« cell fate »), - la survie et - le maintien du génome (**Figure 5**) (Vogelstein et al., 2013).

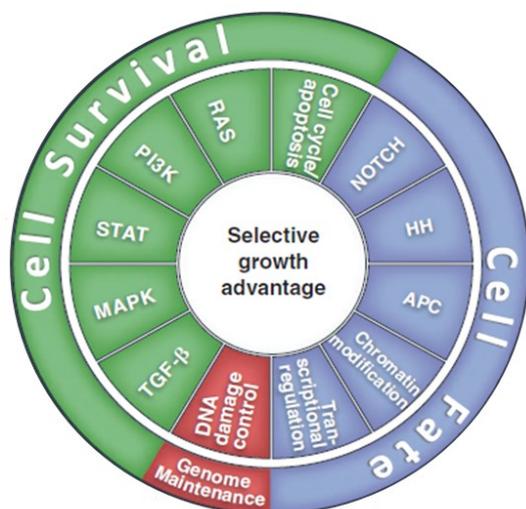
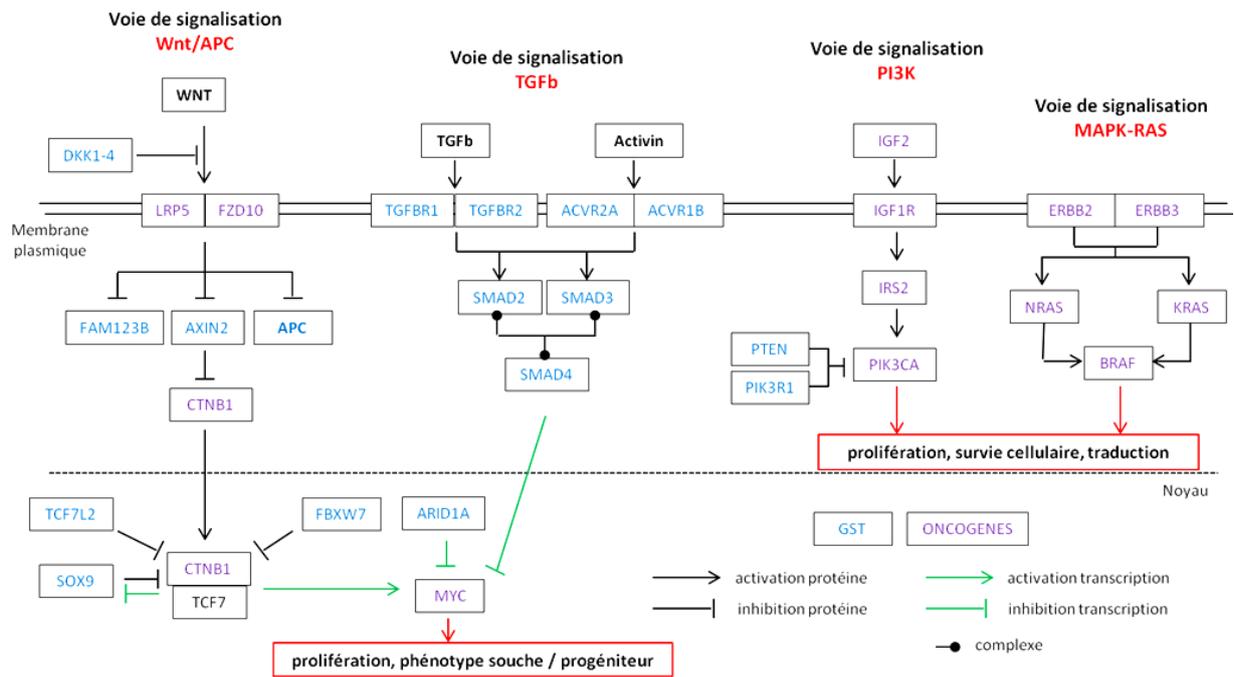


Figure 5 : Les voies de signalisation impliquées dans les cellules cancéreuses et les processus cellulaires qu'elles régulent

Toutes les mutations conductrices mises en évidence dans l'étude de Vogelstein peuvent être répertoriées dans une ou plusieurs des 12 voies de signalisation placées dans le cercle du milieu. Ces mutations confèrent aux cellules tumorales un avantage sélectif de croissance. Les 12 voies de signalisation peuvent elles-mêmes être organisées en trois processus cellulaires, représentés dans le cercle extérieur.

D'après Vogelstein B et al, Science (2013) 339(6127):1546-58



D'après Cancer Genome Atlas Network, Nature (2012) 487(7407):330-7

Figure 6 : Modèle des voies de signalisation impliquées dans le cancer colorectal

Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs exercent leurs fonctions au sein d'un nombre restreint de voies de signalisation. Dans le cancer colorectal, les principales voies de signalisation altérées sont les voies Wnt/APC, TGF β , PI3K et MAPK-RAS. Tous les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs de ce modèle ne sont pas dérégulés dans une même tumeur mais ils ont tous été montrés pour l'être dans une proportion non négligeable de CCRs.

1) Le destin cellulaire

Le devenir d'une cellule est déterminé par la balance entre « division » et « différenciation ». Dans le cancer, de nombreuses altérations génétiques perturbent l'équilibre entre ces deux processus cellulaires en faveur de la division cellulaire ; les cellules différenciées étant plus susceptibles de mourir ou de devenir quiescentes. La voie de signalisation Wnt / APC, largement altérée dans le cancer colorectal, participe notamment au changement de destin de la cellule tumorale.

2) La survie

Les modifications génétiques introduites dans les cellules tumorales leur permettent de proliférer dans des conditions de concentrations faibles en nutriments (mutations des gènes *egfr*, *erbb2*, *pdgfr*, *tgf β r2*, *kit*, *ras*, *raf*, *pik3ca* et *pten*), et dans des conditions de concentrations en glucose plus faibles que celles nécessaires aux cellules normales (mutations des gènes *kras* ou

braf). La progression dans le cycle cellulaire, et donc l'entrée en apoptose sont altérées par la mutation de gènes tels que *c-myc*. Enfin, la survie cellulaire est augmentée par la stimulation de l'angiogénèse suite à des mutations dans le gène *vhl* (entraînant la sécrétion de facteurs de croissance endothéliaux vasculaires).

3) Le maintien du génome

Comme énoncé précédemment, dans des conditions saines, les cellules ayant subi des altérations génomiques sont éliminées de l'organisme grâce à des points de contrôle lors du cycle cellulaire. Dans les cellules tumorales, les mutations des gènes *tp53* et *atm* abrogent ces points de contrôle. De plus, les altérations des gènes *mlh1* et *msh2* (système MMR) entraînent une augmentation du taux de mutations ponctuelles dans la cellule tumorale. L'accélération de l'acquisition de mutations est en faveur de la cellule tumorale en orientant son destin et en lui apportant un gain de survie.

ii. Les formes héréditaires

Bien que les formes sporadiques soient majoritaires, 2 à 5% des cancers colorectaux surviennent dans le cadre de syndromes héréditaires bien définis, avec la transmission à la descendance de mutations dans les cellules germinales. Ces syndromes sont associés à des risques élevés de CCRs. La Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) et le syndrome de Lynch représentent les deux syndromes les plus fréquents.

1) La polypose adénomateuse familiale

La Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) est le syndrome le plus connu de prédisposition héréditaire au cancer colorectal, elle représente ~0,5% de l'ensemble des CCRs (Fearon, 2011). La PAF se définit par une polypose (présence de 100 à 1000 polypes) au niveau du côlon chez au moins un membre de la famille. En l'absence de traitement chirurgical des polypes, tous les patients ayant une PAF classique développeront inéluctablement un cancer colorectal (Galiatsatos and Foulkes, 2006). Ce syndrome est dû à une mutation germinale sur le gène suppresseur de tumeur *apc* (Jasperson et al., 2010). Il se transmet à la descendance sur un mode autosomal dominant, cependant jusqu'à 25% des cas de PAF sont dus à des mutations *de novo* dans les cellules germinales et ne sont donc pas hérités (Galiatsatos and Foulkes, 2006). Par ailleurs, il existe également des formes atténuées de la PAF, avec un nombre variable de polypes adénomateux inférieur à 100. La localisation des mutations sur le gène *apc* a alors été corrélée au degré de sévérité de la polypose colique et au risque de développer un CCR (Nieuwenhuis and Vasen, 2007).

2) Le syndrome de Lynch

Le cancer colorectal héréditaire non polyposique (ou Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC), encore appelé syndrome de Lynch, est la forme la plus fréquente de prédisposition héréditaire au cancer colorectal ; les HNPCC représentant 2 à 4% de tous les CCRs (Hampel et al., 2008). Ce syndrome HNPCC initialement décrit en 1913 par Warthin, puis complété par Lynch en 1966 (Lynch et al., 1966) correspond aux critères d'Amsterdam rapportés par le consortium international sur le syndrome HNPCC en 1990 (Vasen et al., 1991). Ces critères ont été modifiés en 1998 (Vasen et al., 1999) afin d'intégrer le spectre tumoral du syndrome HNPCC.

Critères d'Amsterdam :

- Au moins trois sujets atteints de cancers appartenant au spectre étroit du syndrome HNPCC (cancer colorectal, endomètre, intestin grêle, voies urinaires, estomac, ovaire, voies biliaires) et histologiquement prouvé ;
- Unis deux à deux par un lien de parenté au premier degré sur deux générations ;
- Un des cancers au moins s'étant déclaré avant l'âge de 50 ans.

Les individus atteints du syndrome de Lynch présentent un risque compris entre 50 et 80% de développer un cancer colorectal au cours de leur vie. Il s'agit d'un syndrome autosomal dominant dû à la mutation des gènes MMR dans les cellules germinales (Jasperson et al., 2010) ; ces mutations se traduisant par un phénotype MSI. Les mutations des gènes *msh2* et *mlh1* rassemblent ainsi 70% des mutations connues dans le syndrome HNPCC (Fearon, 2011). Enfin, bien que le syndrome HNPCC ne soit pas associé à une polypose, ces cancers colorectaux résultent également de la dégénérescence de polypes adénomateux.

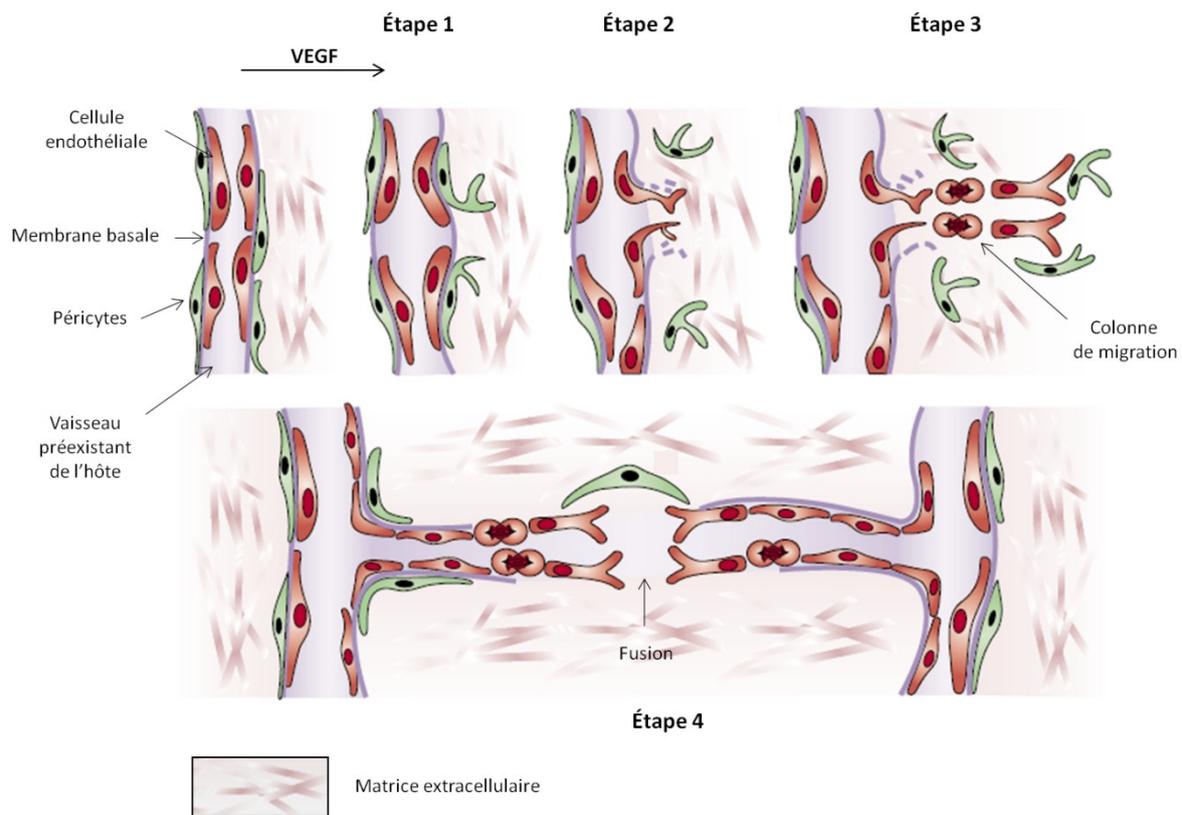
Les altérations génétiques décrites précédemment mènent à la transformation des cellules normales en cellules néoplasiques. Les mécanismes de contrôle des cellules sont alors dépassés, les cellules tumorales prolifèrent de façon anarchique et forment une masse tumorale au niveau de la muqueuse colique. Cette masse tumorale va ensuite tendre à se développer, les cellules tumorales vont envahir les tissus voisins, voire se propager dans l'organisme pour former une métastase. Cependant, le succès de cette progression tumorale dépend du succès de nombreux autres processus cellulaires indispensables au développement tumoral. Les cellules cancéreuses vont notamment devoir se fournir en nutriments, survivre à l'hypoxie, se mouvoir dans les tissus

et la circulation sanguine et déjouer le système immunitaire de l'hôte. L'avancement des connaissances ces vingt dernières années a été conséquent pour la compréhension de tous ces processus. Il est maintenant évident qu'ils dépendent tous, à la fois des propriétés intrinsèques des cellules tumorales, et à la fois d'interactions étroites et complexes entre les cellules tumorales et le reste des cellules de l'organisme. Parmi toutes les étapes du développement tumoral, les parties suivantes s'intéresseront uniquement à deux processus clés que sont l'angiogénèse et la formation des métastases.

iii. L'angiogénèse tumorale

Au début de la progression tumorale, que ce soit dans une tumeur solide primaire ou secondaire, la masse cellulaire formée est avasculaire. De façon similaire aux tissus sains, la vascularisation du tissu tumoral est nécessaire à son oxygénation, à son approvisionnement en nutriments et à l'élimination des déchets cellulaires produits par la tumeur (Papetti and Herman, 2002). Les cellules cancéreuses survivent donc initialement en profitant de la vascularisation existante dans son environnement proche (Holash et al., 1999). Cependant, lorsque le centre de la tumeur est trop éloigné des vaisseaux sanguins préexistants, les cellules cancéreuses en hypoxie vont induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des capillaires préexistants. Le processus cellulaire mis en œuvre mime l'angiogénèse des tissus sains (**Figure 7**) (Bergers and Benjamin, 2003; Nussenbaum and Herman, 2010; Papetti and Herman, 2002). L'angiogénèse est un processus hautement régulé par l'équilibre entre des molécules proangiogéniques et des molécules anti-angiogéniques (ou angiostatiques). Dans la tumeur, la balance entre ces deux types de molécules est fortement déséquilibrée en faveur des molécules angiogéniques, ce qui aboutit à un « switch angiogénique ». La tumeur ne synthétisera ses propres capillaires qu'après la survenue de ce switch (Bergers and Benjamin, 2003; Carmeliet and Jain, 2000; Hanahan and Folkman, 1996). Alors que dans des conditions physiologiques normales, l'angiogénèse est suivie d'une phase de stabilisation, l'angiogénèse tumorale est quant à elle continue aboutissant, à un réseau vasculaire anormal (Owen and Mohamadzadeh, 2013).

Par ailleurs, il est à noter que la formation de ces nouveaux vaisseaux sanguins est également un moyen pour les cellules tumorales de s'échapper de la tumeur primaire et d'entrer dans la circulation sanguine ; la dissémination hématogène permettant la formation des tumeurs secondaires.



D'après Bergers G, Benjamin LE, Nat Rev Cancer (2003) 3(6) :401-10

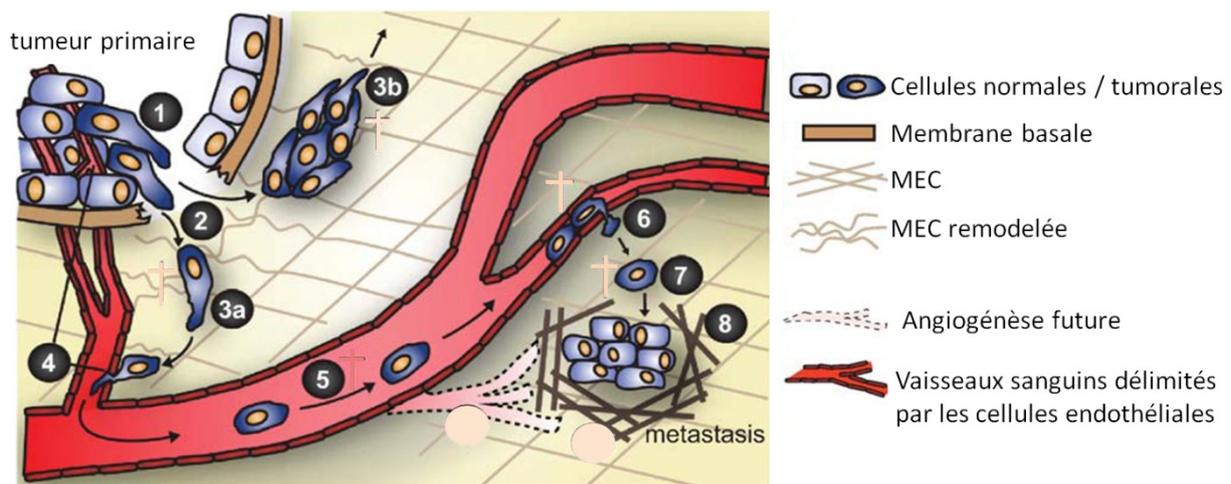
Figure 7 : Mécanismes impliqués dans l'angiogénèse tumorale

L'angiogénèse tumorale consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants de l'hôte. Tout d'abord, sous l'action du VEGF (et autres facteurs angiostatiques), les cellules murales qui recouvrent la paroi externe de l'endothélium (péricytes) se détachent des vaisseaux préexistants qui se dilatent, contribuant ainsi à l'augmentation de la perméabilité des capillaires (**étape 1**). S'ensuit une dégradation locale de la membrane basale de l'endothélium et de la matrice extracellulaire. Des protéines plasmatiques sont libérées et induisent la formation d'une matrice provisoire sur laquelle les cellules endothéliales peuvent se mouvoir (**étape 2**). Les cellules endothéliales, en réponse à des agents chémo-attractants, migrent alors dans l'espace périvasculaire où elles prolifèrent et forment deux colonnes parallèles de migration (**étape 3**). La fusion des deux tubes distincts va refermer le circuit vasculaire et conduit à la formation d'un microvaisseau instable. Enfin, des cellules mésenchymateuses sont recrutées sur le néovaisseau où elles se différencient en péricytes. Le contact entre les péricytes et les cellules endothéliales stabilisent le nouveau vaisseau (**étape 4**). L'angiogénèse tumorale aboutit à la formation de lits capillaires fonctionnels dans lesquels le sang peut circuler.

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

iv. Les métastases

Une des caractéristiques majeures du cancer est sa capacité à se propager dans l'organisme. Certaines cellules tumorales vont quitter leur site d'origine (la tumeur primaire) pour se loger dans un autre organe et former une métastase (tumeur secondaire). Le cancer ne doit donc pas être considéré comme spécifique d'un organe mais plutôt comme une maladie systémique. Alors que les tumeurs primaires, notamment dans le cancer colorectal, sont traitées avec succès, les métastases sont responsables de 90% des décès liés au cancer (métastases synchrones à la tumeur primaire lors du diagnostic ou récidives avec métastases à distance). La compréhension des lois qui gouvernent le développement métastatique est donc un véritable challenge pour permettre la mise en place de traitements plus efficaces contre ces tumeurs secondaires.



D'après Geiger TR and Peeper D., Biochimica et Biophysica Acta (2009) 1796:293–308

Figure 8 : La cascade métastatique

La formation des métastases est un processus multi-étapes qui comprend 1) La perte d'adhérence des cellules cancéreuses de la tumeur primaire et leur acquisition de propriétés invasives. 2) La dégradation de la membrane basale et le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) par des protéases facilitant l'invasion des cellules tumorales. 3) L'envahissement des tissus voisins de manière isolée (3a) ou en groupe (3b). 4) L'intravasation des cellules cancéreuses dans des vaisseaux sanguins néoformés dans, ou proches, de la tumeur. 5) Le transport des cellules tumorales dans la circulation sanguine et leur arrêt dans les lits capillaires où 6) elles sortent des vaisseaux (extravasation). 7) Une fois sorties des vaisseaux, les cellules cancéreuses peuvent rester dormantes plusieurs années. 8) Éventuellement, certaines cellules disséminées prolifèrent et forment une métastase nécessitant le remodelage de la MEC et l'angiogénèse.

La formation des métastases est un processus multi-étapes où chacune d'entre elles doit être accomplie avec succès pour aboutir à la formation d'une métastase (**Figure 8**). Ainsi, les cellules de la tumeur primaire vont successivement :

- se détacher du support original et de leurs cellules voisines en perdant leurs propriétés d'adhérence;
- franchir la lame basale qui délimite l'épithélium en digérant les protéines qui la constituent à l'aide de protéases ;
- envahir les tissus voisins ;
- entrer dans la circulation lymphatique ou dans la circulation sanguine (intravasation) ;
- survivre lors du transit dans la circulation sanguine (résister aux forces physiques du flux sanguin et échapper aux cellules circulantes chargées de la surveillance immunitaire) ;
- s'arrêter sur la paroi des vaisseaux sanguins (arrêt initial) ;
- traverser l'endothélium (extravasation) pour gagner l'organe où elles s'implanteront ;
- retrouver des propriétés d'adhérence sur un support afin de permettre l'ancrage d'une nouvelle tumeur dans le site secondaire (domiciliation initiale) ;
- survivre et proliférer dans le tissu cible afin de former une micrométastase et
- induire une néoangiogénèse pour se développer (macrométastase).

(Geiger and Peeper, 2009; Labelle and Hynes, 2012; Robert, 2013)

Le développement des métastases dans des organes secondaires n'est pas un phénomène aléatoire ; les cellules cancéreuses d'un type de cancer donné sélectionnent des organes cibles bien déterminés pour former leurs tumeurs secondaires. Alors que les cancers du sein développent des métastases dans l'os, le foie, les poumons ou le cerveau, les cancers colorectaux quant à eux forment préférentiellement des métastases au niveau du foie et des poumons (Hess et al., 2006). Au moment du diagnostic, 15 à 25% des patients atteints de CCRs présentent des métastases hépatiques (métastases synchrones) et entre 25 à 50% des patients sans métastases hépatiques préalables en développeront par la suite (Rocha and D'Angelica, 2010).

Il est clairement établi depuis de nombreuses années que les cellules cancéreuses possèdent un tropisme pour des organes cibles en particulier et que ce tropisme est spécifique à la fois de la tumeur primaire et des organes secondaires (Chambers et al., 2002). La détermination des organes cibles trouve son explication dans deux théories non exclusives.

Dans un premier temps, il a été mis en évidence que les cellules cancéreuses forment des métastases dans les organes secondaires en suivant la circulation sanguine. Par exemple, le sang quittant les lits capillaires du côlon entre dans le système porte-hépatique et rejoint les lits capillaires du foie. Il passe ensuite dans le système veineux jusqu'au cœur puis dans les lits

capillaires pulmonaires. Les cellules cancéreuses sont arrêtées dans les lits capillaires qu'elles rencontrent par une restriction de taille ; les cellules cancéreuses étant généralement plus grosses que le diamètre des petits capillaires (Chambers et al., 2002). Ainsi, dans le cancer colorectal, les cellules métastatiques se logeront principalement au niveau du foie.

Cependant, des études démontrent que certains organes développent des métastases dans des proportions supérieures ou inférieures à celles attendues si l'on tient compte uniquement de ce facteur structurel, suggérant l'existence d'autres paramètres régulant la spécificité tissulaire métastatique (Weiss, 1992; Weiss et al., 1986).

La deuxième explication à la spécificité des métastases a été énoncée dès 1889 par Stephen Paget, qui émet pour la première fois l'hypothèse que l'établissement de la tumeur secondaire dans un organe n'est pas dû au hasard mais dépend à la fois de la cellule cancéreuse (la semence ou « the seed ») et à la fois de l'organe cible (le sol ou « the soil »). Plus précisément, une cellule cancéreuse ne peut donner naissance à une métastase que si, et seulement si, l'environnement où elle se trouve lui est suffisamment favorable (Paget, 1889). Depuis, la théorie « seed and soil » a été étoffée. Le microenvironnement sur le site métastatique exprime des molécules d'adhésion, des molécules chémoattractantes, des protéases, des facteurs de survie et des facteurs de prolifération particuliers qui sont nécessaires à la formation des métastases dans l'organe où la cellule cancéreuse s'est arrêtée (Geiger and Peeper, 2009; Joyce and Pollard, 2009; Mendoza and Khanna, 2009).

En somme, la distribution et l'arrêt des cellules cancéreuses dans les lits capillaires qu'elles rencontrent dépendent de mécanismes physiques. En revanche, le développement d'une métastase au niveau du site d'extravasation dépend des capacités de la cellule cancéreuse (« the seed ») à se multiplier dans un site favorable (« the soil ») (Chambers et al., 2002). Toutefois, les modalités dans lesquelles ces deux éléments (« the seed » et « the soil ») deviennent compatibles restent matière à discussion : comment la cellule tumorale devient-elle métastatique ? Le microenvironnement tumoral sur le site métastatique est-il éduqué par la tumeur primaire ? Comment ? Etc (Geiger and Peeper, 2009; Joyce and Pollard, 2009; Mendoza and Khanna, 2009). Les interactions moléculaires entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement apportent des éléments de réponses à ces questions et nous en ferons l'exemple avec l'étude des couples chimiokines/récepteurs dans la deuxième partie de cette introduction.

v. Le microenvironnement tumoral

Si l'étude des cellules cancéreuses (altérations génétiques, protéiques, etc.) a fait l'objet

des premières recherches sur le cancer, les tumeurs sont maintenant appréhendées comme des tissus à part entière, complexes et multicellulaires. Les cellules cancéreuses (sur le site primaire ou dans un organe secondaire) attirent vers elles les cellules du stroma qui les entourent, voire des cellules à distance (cellules immunitaires) pour former un microenvironnement tumoral. Les cellules du stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, leucocytes infiltrants et autres cellules) (**Figure 9**) sont aujourd'hui clairement impliquées dans toutes les étapes de la progression tumorale. Plusieurs cellules stromales vont non seulement augmenter la croissance de la tumeur primaire mais également faciliter la progression métastatique dans les organes à distance (**Tableau 2**) (Joyce and Pollard, 2009). Le microenvironnement tumoral représente un système complexe d'échanges dynamiques entre les cellules cancéreuses et le reste des cellules de l'organisme, chacune influençant le devenir de l'autre.

Types cellulaires	Fonctions au sein du microenvironnement tumoral	Références
Les péricytes	Les péricytes sont des cellules murales qui fournissent un support et des facteurs de survie aux vaisseaux sanguins. Ils peuvent également bloquer la formation métastatique en maintenant l'intégrité des vaisseaux.	(Gerhardt and Semb, 2008)
Les plaquettes	Les plaquettes participent à la progression métastatique hématogène en complétant les propriétés adhésives des cellules tumorales (étape d'extravasation) et en protégeant les cellules cancéreuses dans la circulation sanguine de l'activité cytotoxique des cellules NK.	(Gay and Felding-Habermann, 2011; Labelle and Hynes, 2012)
Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs)	Les MDSCs inhibent les réponses immunitaires anti-tumorales médiées par les lymphocytes T. Elles sont également décrites pour augmenter la néoangiogénèse et donc stimuler la croissance tumorale et la formation des métastases.	(Umansky and Sevko, 2013)
Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs)	Les CSMs augmentent la dissémination des cellules cancéreuses via un mécanisme dépendant des macrophages. Elles sont également immunosuppressives en inhibant notamment la prolifération des lymphocytes T.	(Ren et al., 2012; Spaeth et al., 2008; Uccelli et al., 2008)
Les cellules NK (Natural Killer)	Les cellules NK sont des lymphocytes effecteurs du système immunitaire inné. Ils présentent une activité cytotoxique pour les cellules cancéreuses via l'excrétion de perforines-granzymes.	(Waldhauer and Steinle, 2008)

Tableau 2 : Exemples de cellules du microenvironnement jouant un rôle dans la progression tumorale et métastatique

1. Les fibroblastes associés aux tumeurs

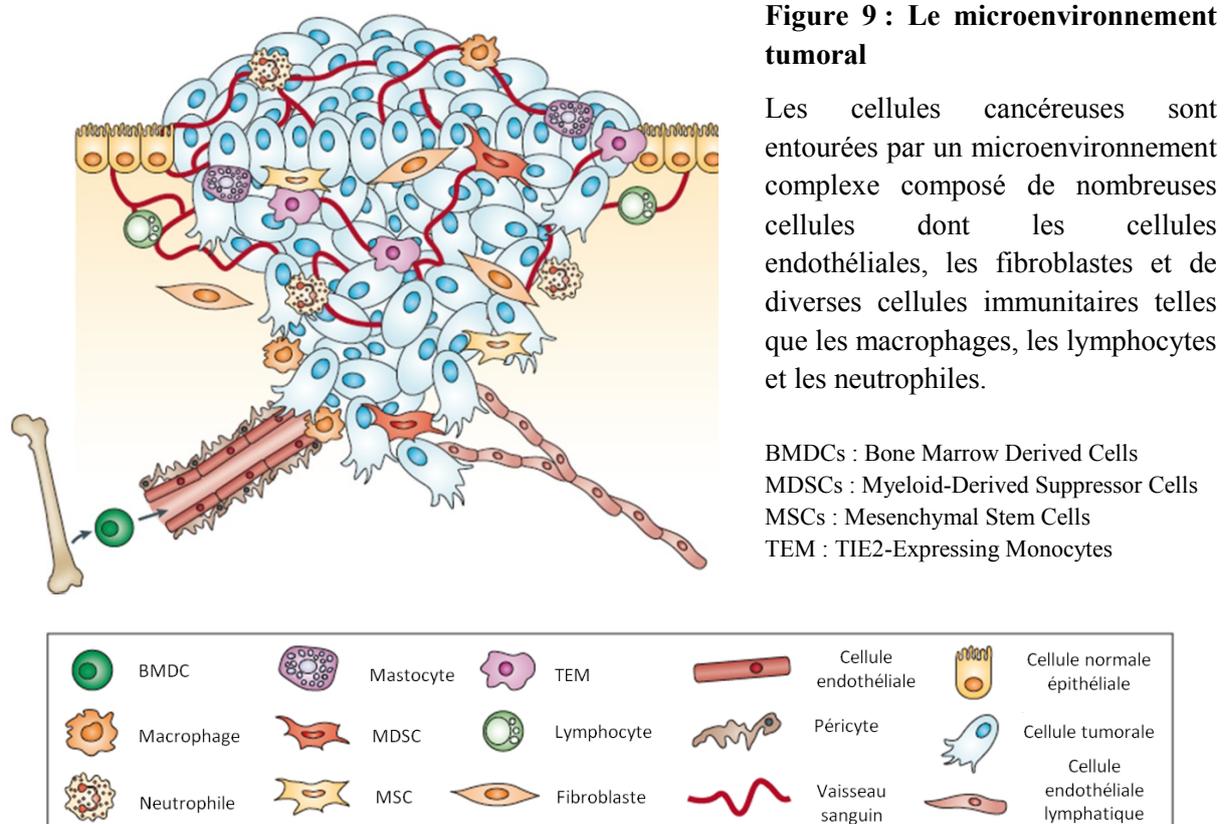
Parmi les cellules qui composent le stroma, les fibroblastes sont les cellules les plus représentées. Les fibroblastes présents dans le microenvironnement tumoral, nommés Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs), sont soit des fibroblastes résidents dans le tissu avant le développement tumoral, soit des fibroblastes issus de la différenciation de différents types cellulaires tels que les cellules souches mésenchymateuses (Paunescu et al., 2011; Polanska and Orimo, 2013; Quante et al., 2011). Durant le développement tumoral, les progéniteurs des CAFs sont recrutés sur le site tumoral où ils interagissent avec les cellules cancéreuses et acquièrent un phénotype pro-tumoral (Polanska and Orimo, 2013; Smith and Kang, 2013), on parle d'activation des fibroblastes. Les CAFs semblent être impliqués dans de nombreux processus tumoraux (prolifération, survie, néoangiogénèse, immunosuppression, etc.) (Polanska and Orimo, 2013; Shimoda et al., 2010; Smith and Kang, 2013). Dans le cancer colorectal, les fibroblastes ont été clairement identifiés comme participant à la promotion de l'invasion tumorale (De Wever et al., 2004) et à la dissémination métastatique via la voie de signalisation du TGF β dans les CAFs (Calon et al., 2012).

Par ailleurs, les fibroblastes constituent la principale source des composants de la matrice extracellulaire (MEC) qui soutient l'ensemble des cellules et dans laquelle ces dernières doivent se déplacer. La MEC est également un acteur important du développement tumoral. Elle joue le rôle d'échafaudage physique et facilite les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement. Bien plus encore, l'interaction entre les molécules d'adhérence des cellules cancéreuses (telles que les intégrines) et les protéines de la MEC vont réguler la migration, la prolifération et la survie des cellules tumorales (Lee and Juliano, 2004). Par ailleurs, lors de l'envahissement des tissus par les cellules cancéreuses, la MEC subit un remodelage qui entraîne la libération de facteurs de croissance et de facteurs proangiogéniques séquestrés dans celle-ci. Ainsi, les clivages des composants de la MEC tels que la laminine-5 et le collagène de type IV peuvent stimuler respectivement la migration cellulaire (Giannelli et al., 1997) et l'angiogénèse (Xu et al., 2001).

2. Les cellules du système immunitaire

Dès l'apparition des premières cellules cancéreuses dans l'organisme, des cellules du système immunitaire sont recrutées sur le site tumoral, induisant une réponse immunitaire capable d'aboutir à l'élimination de la tumeur ; c'est la surveillance immunitaire. Cependant, dans certaines conditions les cellules cancéreuses peuvent échapper à cette réponse immunitaire anti-

tumorale ; c'est l'immunoediting (Dunn et al., 2002, 2004; Vesely et al., 2011). L'immunoediting peut être le résultat soit de la modification du profil d'expression protéique des cellules cancéreuses (les rendant insensibles à la réponse immunitaire) (Browning et al., 1996; Tirapu et al., 2006; Vesely et al., 2011), soit d'une modulation de la réponse immunitaire elle-même. Dans ce dernier cas, l'immunoediting n'est pas seulement le fruit de l'absence d'une immunité anti-tumorale, mais aussi le résultat d'un ensemble de mécanismes bloque les réponses innées et adaptatives anti-tumorales et qui engendre des conditions pro-tumorales favorables aux cellules cancéreuses (promotion de l'invasion cellulaire ou bien encore de l'angiogénèse) (Murdoch et al., 2008; Ostrand-Rosenberg, 2008; Smith and Kang, 2013). De nombreuses cellules immunitaires sont mises en jeu dans ces processus anti- tumoraux et pro-tumoraux, telles que les lymphocytes, les macrophages, les neutrophiles, les cellules NK et les cellules dendritiques (**Figure 9, Tableau 2**) (Joyce and Pollard, 2009; Murdoch et al., 2008; Ostrand-Rosenberg, 2008). Ces cellules immunitaires - présentes dans la circulation sanguine - vont être attirées vers la tumeur par différents signaux moléculaires. Parmi ceux-ci, les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle primordial que nous aborderons dans la deuxième partie de cette introduction. Les leucocytes se localisent autour de la tumeur mais également au sein de celle-ci où ils peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse tumorale (Mukaida and Baba, 2012).



D'après Joyce JA and Pollard JW, Nature Reviews Cancer (2009) 9(4) :239-52

C. Epidémiologie et facteurs de risques du cancer colorectal

En 2011 en France, le cancer colorectal se plaçait, tout sexe confondu, au 3^{ème} rang des cancers en termes d'incidence et au 2^{ème} rang en termes de mortalité. Le CCR reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique avec, en 2012, 42 152 nouveaux cas (projection d'incidence) et 17 722 décès (www.lesdonnees.e-cancer.fr, fiche indicateur 45).

Classement des trois premiers cancers en termes d'incidence et de mortalité en France, 2011

	FEMMES		HOMMES	
	Incidence	Mortalité	Incidence	Mortalité
Prostate			1	3
Sein	1	1		
Côlon-Rectum	2	2	3	2
Poumon	3	3	2	1

©La situation du cancer en France en 2012

À l'échelle mondiale, le cancer colorectal est le 3^{ème} cancer en termes d'incidence et le 4^{ème} en termes de mortalité (Ferlay et al., 2010). Les taux d'incidence les plus élevés sont retrouvés en Australie, en Nouvelle-Zélande, au Canada, aux États-Unis et dans plusieurs pays européens dont la France. Les pays avec les taux d'incidence les plus faibles sont la Chine, l'Inde et une partie de l'Afrique et de l'Amérique du Sud (Boyle and Langman, 2000). En Europe du Nord et de l'Ouest, l'incidence des CCRs est stabilisée et semble même diminuer aux États-Unis (Siegel et al., 2012). Cette diminution a largement été attribuée aux programmes de dépistage qui ont amélioré la détection des polypes précancéreux.

Outre les facteurs héréditaires, les principaux facteurs de risques associés au développement d'un cancer colorectal sont :

- l'âge, avec une moyenne de détection en France de 70 ans pour les hommes et de 73 ans pour les femmes en 2012 (www.lesdonnees.e-cancer.fr, fiche indicateur 98),
- les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) (Itzkowitz and Yio, 2004) et
- le mode de vie (l'alimentation, la sédentarité). Le cancer colorectal est fortement associé à un mode de vie occidental. La consommation de viande rouge et d'alcool, le tabagisme et le surpoids sont des facteurs de risques du CCR. En revanche, l'activité physique présente un rôle protecteur avéré. Les fibres, l'ail, le lait et le calcium sembleraient également avoir un effet protecteur (Chan and Giovannucci, 2010) (© 2007 World Cancer Research Fund International).

D. Les traitements du cancer colorectal

Les traitements du cancer colorectal ont pour objectifs de ralentir (voire d'éradiquer) la tumeur primaire et ses métastases, et de réduire les récives. Le pronostic du cancer colorectal est étroitement lié au stade de développement de la tumeur au moment du diagnostic. En effet, le CCR est un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce avec une survie relative à 5 ans de 90,0 % pour les stades localisés. En revanche, celle-ci est de 69,2 % pour les stades avec envahissement régional (envahissement ganglionnaire) et chute à 11,5 % dans les cas de tumeurs métastasées (Howlader N et coll, 2010). Bien que le taux de mortalité par cancer colorectal ait diminué ces 20 dernières années (grâce aux progrès réalisés en matière de dépistage et de traitements) le cancer colorectal est responsable de 17 722 décès en France en 2012 ; le traitement des métastases représente donc un enjeu majeur.

Les stratégies thérapeutiques des cancers colorectaux sont définies pour chaque patient en fonction de la localisation et du stade TNM de la tumeur (**Tableau 3**). Lorsque le cancer colorectal est diagnostiqué à un stade précoce, c'est-à-dire lorsque la tumeur est localisée, celle-ci peut être réséquée par chirurgie. L'ablation chirurgicale constitue un traitement curatif pour la majorité des patients. En revanche, dès lors que les cellules tumorales ont quitté le site tumoral primaire, une chimiothérapie et/ou des thérapies ciblées sont proposées (**Tableaux 4 et 5**). La chimiothérapie a pour objectif de réduire les récives (stades II et III), ou encore de rendre résécables les tumeurs qui ne le sont pas d'emblée (stade IV). Pour les patients atteints de CCRs métastasés, au nombre de 25% lors du diagnostic, le caractère résécable ou non résécable des métastases est un critère déterminant dans la stratégie thérapeutique proposée aux patients. Dans le cas des métastases hépatiques de cancers colorectaux, seuls 10 à 15% des patients présentent des lésions résécables d'emblée (Rees et al., 1997). La proportion des lésions rendues résécables grâce aux chimiothérapies est de 10 à 20% des lésions qui ne l'étaient pas initialement (Adam et al., 2004). L'apport des thérapies ciblées, avec l'arrivée en 2004 des anticorps (Ac) monoclonaux anti-VEGF (Bevacizumab) et anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Cetuximab) (**Tableau 5**), est non négligeable. Aujourd'hui le Bevacizumab en combinaison avec une chimiothérapie, est indiqué en traitement de première ligne du cancer colorectal métastatique (Hurwitz et al., 2004). En cas de cancer colorectal métastatique surexprimant l'EGFR et après échec d'une chimiothérapie comportant un inhibiteur de topoisomérase I (l'Irinotecan), le Cetuximab est indiqué en deuxième ou troisième ligne de traitement (Cunningham et al., 2004; Rodríguez et al., 2010). Ces Ac monoclonaux ont augmenté significativement le taux de réponse globale, la survie sans progression de la tumeur et la survie globale des patients (Winder and Lenz, 2010).

T Tumeur primitive	
Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signes de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculuse
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péricoliques et péirectaux non péritonéalisés
T4a	Tumeur perforant le péritoine viscéral
T4b	Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures
N Adénopathies régionales	
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1a	Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional
N1ab	Métastases dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N1c	Nodule(s) tumoraux, c-à-d satellite(s) dans la sous-séreuse, ou dans les tissus non péritonéalisés péricoliques ou péirectaux sans métastase ganglionnaire régionale
N2a	Métastases dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux
N2b	Métastases dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
M Métastases à distance	
M0	Pas de métastases à distance
M1a	Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s), autre que régional)
M1b	Métastases dans plusieurs organes ou péritonéales

Stades	T	N	M
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
Stade IIC	T4b	N0	M0
Stade III	Tous T	N1, N2	M0
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stade IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
Stade IIIC	T4b	N1, N2	M0
	Tous T	Tous N	M1a
Stade IVB	Tous T	Tous N	M1b

Colon and rectum. In: Edge SB, Byrd SR, Compton CC, et al, eds. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010:143e164.

Tableau 3 : Classification TNM/AJCC 7^{ème} édition du cancer colorectal

AJCC : American Joint Committee on Cancer

Cancers du côlon ou du tiers supérieur (intrapéritonéal) du rectum			
Stade 0	Tis-T1sml	Chirurgie: traitement endoscopique	
Stade I	T1-T2 N0 M0	Chirurgie	
Stade II	T3-T4 N0 M0	Chirurgie +	Chimiothérapie adjuvante possible en cas de facteurs de risques de récidence
Stade III	tous T N1-N2 M0	Chirurgie +	Chimiothérapie adjuvante
Stade IV	M1a ou M1b	Chirurgie* + Chimiothérapie adjuvante	
Cancers des 2/3 inférieurs (souspéritonéaux) du rectum			
Stade 0	Tis-T1sml	Chirurgie (voire sous en endoscopie si possible)	
Stade I	T1-T2 N0 M0	Chirurgie	
Stade II	T3 N0 M0 résécables	Radio-chimiothérapie <u>suivie</u> d'une chirurgie	
Stade III	T1 à T3N+ résécables		
Stade II	T4 M0 avec résection	Radio-chimiothérapie <u>préopératoire</u> puis réévaluation des possibilités de résections	
Stade III	R0 incertaine		
Stade IV	M1a ou M1b	Chirurgie* + Chimiothérapie adjuvante	

Tableau 4 : Stratégies thérapeutiques préconisées pour le cancer colorectal par la Haute Autorité de Santé, France

Les stratégies thérapeutiques sont définies pour chaque patient en fonction de la localisation (côlon ou rectum) et du stade TNM de la tumeur.

* La prise en charge des patients est discutée au cas par cas, en réunion de concertation pluridisciplinaire qui prendra en compte le caractère symptomatique ou non de la tumeur primitive, ainsi que le caractère résécable ou non résécable des métastases. En l'absence de contre-indication, la plupart des patients se voit proposer une chimiothérapie. L'efficacité de la chimiothérapie doit être évaluée tant sur le plan clinique qu'en imagerie, tous les 2 à 3 mois. En cas de réponse, la chirurgie doit être rediscutée.

D'après le Guide - affection de longue durée n°30 © Haute Autorité de Santé – 2012

Molécules	Descriptions
5 fluoro-uracile (5-FU)	Agent antimétabolite, Antipyrimidique. Inhibition de la synthèse ADN et provoque des erreurs dans la traduction des ARNs
Oxaliplatine	Agent alkylant. Dérivé platine. Inhibition de la synthèse et de la réplification de l'ADN en formant des ponts intra et inter-brins
Irinotecan ou CPT-11	Analogue de la Camptothécine. Inhibiteur de la topoisomérase I (essentielle à réplification, transcription, séparation des chromosomes, etc)
Capécitabine	Agent antimétabolite. Antipyrimidique. Inhibition de la synthèse ADN
Leucovorine (acide folinique)	Utilisé en synergie avec le 5-FU pour augmenter l'effet cytotoxique du 5-FU. Inhibition de la thymidylate synthase
Mitomycine C	Antibiotique. Son mécanisme d'action repose, chez la bactérie, sur l'inhibition sélective de la synthèse d'ADN, des mécanismes de recombinaison, l'échange de chromatines soeurs et la réparation d'ADN.
Raltitrexed*	Agent antimétabolite. Antifolique. Analogue de l'acide folique, il inhibe directement la thymidylate synthase (fragmentation de l'ADN et mort cellulaire)
Uracile-tégafur*	Le tégafur est un anti-pyrimidique métabolisé par l'organisme en 5-FU. L'uracile est un inhibiteur compétitif de la dégradation du 5-FU
Cétuximab*# ou Erbitux TM	Anticorps monoclonaux anti-EGFR. Inhibition de la prolifération tumorale
Panitumumab*# ou Vectibix TM	Anticorps monoclonaux IgG2 anti-EGFR. Inhibition du développement cellulaire, induction d'une apoptose
Bévacizumab* ou Avastin TM	Anticorps monoclonaux IgG1 anti-VEGF, inhibe la liaison du VEGF aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Agent anti-angiogénique

Tableau 5 : Molécules chimiothérapeutiques et agents ciblés préconisés dans les traitements des cancers colorectaux par la Haute Autorité de Santé, France

Les molécules chimiothérapeutiques sont administrées en combinaison les unes avec les autres selon des schémas tels que :

FOLFOX = 5-FU + Oxaliplatine + Leucovorine,

FOLFIRI = 5-FU + Irinotecan + Leucovorine et

FOLFOXIRI = 5-FU + Oxaliplatine + Leucovorine + Irinotecan

Le Cétuximab, le Panitumumab et le Bévacizumab ne sont pas des molécules chimiothérapeutiques mais font partie des thérapies ciblées.

* Molécules préconisées uniquement dans les cancers colorectaux métastasés.

Thérapies ciblées indiquées uniquement en cas d'absence de mutation du gène KRAS

D'après Le guide - affection de longue durée n°30 © Haute Autorité de Santé – 2012 et www.vidal.fr

Malgré les progrès de la chimiothérapie et l'avènement récent d'agents ciblés, la résection chirurgicale des métastases est encore aujourd'hui la seule stratégie capable d'offrir une possibilité de guérison aux patients atteints d'un cancer colorectal. Un grand nombre d'entre eux présenteront des métastases hépatiques pour lesquelles aucun traitement curatif ne pourra être proposé. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques vise donc à réduire le développement de ces métastases, mais également à les rendre résécables lorsque cela n'est pas le cas initialement. Mon travail de thèse avait pour objectif d'évaluer deux stratégies thérapeutiques distinctes basées sur l'utilisation des chimiokines et de leurs récepteurs. La partie suivante s'intéressera donc à la biologie des chimiokines dans le cancer.

II. Les chimiokines et les récepteurs de chimiokines

A. Généralités sur les chimiokines/récepteurs

i. Les chimiokines

Les chimiokines représentent une vaste famille de petites cytokines d'environ 8 à 14 kDa dotées de pouvoir chémoattractant (Chemokines ou Chemo-attractant Cytokines). Leur classification en 4 sous-familles (CC, CXC, CX3C et C) est basée sur le nombre et la position de 4 résidus cystéines conservés dans la partie aminoterminal des protéines. On définit alors la famille des chimiokines CXC pour lesquelles les deux cystéines conservées les plus proches de l'extrémité N-terminale sont séparées par un seul résidu (acide aminé X quelconque). En revanche, pour les chimiokines de la famille CC, ces deux cystéines sont adjacentes (elles ne sont séparées par aucun autre résidu aminé) (**Figure 10**). Par ailleurs, on divise encore la sous-famille des chimiokines CXC en deux sous-groupes, selon la présence ou l'absence d'un motif particulier de 3 acides aminés que sont l'acide glutamique, la leucine et l'arginine (motif ELR) situé en amont des cystéines conservées. On définit ainsi les chimiokines CXC ELR⁺ et les chimiokines CXC ELR⁻. Les sous-familles CC et CXC comprennent la majorité des chimiokines. S'ajoutent à celles-ci, la sous-famille CX3C pour laquelle les 2 cystéines sont séparées par 3 acides aminés quelconques et la sous-famille C où un seul de ces deux résidus cystéine est retrouvé en N-terminal. Ces deux dernières sous-familles ne contiennent respectivement qu'un et deux membres (Zlotnik and Yoshie, 2000). A ce jour, au moins 48 chimiokines humaines ont été identifiées, faisant d'elles les membres de la plus grande famille de cytokines (**Tableau 6**).

Indépendamment de cette classification, les chimiokines sont ordonnées selon des critères fonctionnels ; les chimiokines peuvent être homéostatiques, inflammatoires ou les deux à la fois. Les chimiokines homéostatiques sont exprimées constitutivement par certains types cellulaires et dans certains tissus dans les conditions physiologiques, sans aucun stimulus activateur apparent. En revanche, les chimiokines inflammatoires ne sont pas exprimées constitutivement mais sont induites par des stimuli inflammatoires. Elles sont ainsi produites uniquement dans un contexte inflammatoire, infectieux ou tumoral par le tissu lui-même ou par les leucocytes infiltrants les tissus. La majorité des chimiokines fait partie de cette dernière catégorie (Rossi and Zlotnik, 2000) (**Tableau 6**).

Les chimiokines sont de petites molécules solubles qui présentent dans leur partie N-terminale un peptide signal qui permet leur sécrétion dans le milieu extracellulaire. Cependant, on

distingue deux chimiokines « non conventionnelles » - CXCL16 et CX3CL1 - qui possèdent (contrairement aux autres chimiokines) un domaine mucine, un segment transmembranaire et un domaine intracellulaire (Bazan et al., 1997; Matloubian et al., 2000). Les chimiokines CXCL16 et CX3CL1 sont produites sous forme de protéines membranaires de haut poids moléculaire et jouent le rôle de molécules d'adhésion entre les cellules qui les expriment et les cellules qui expriment leurs récepteurs. Ces deux chimiokines peuvent également être clivées et libérées dans le milieu extracellulaire où elles agissent comme chémoattractants de façon similaire aux chimiokines « traditionnelles » (Gough et al., 2004; Hundhausen et al., 2003; Imai et al., 1997).

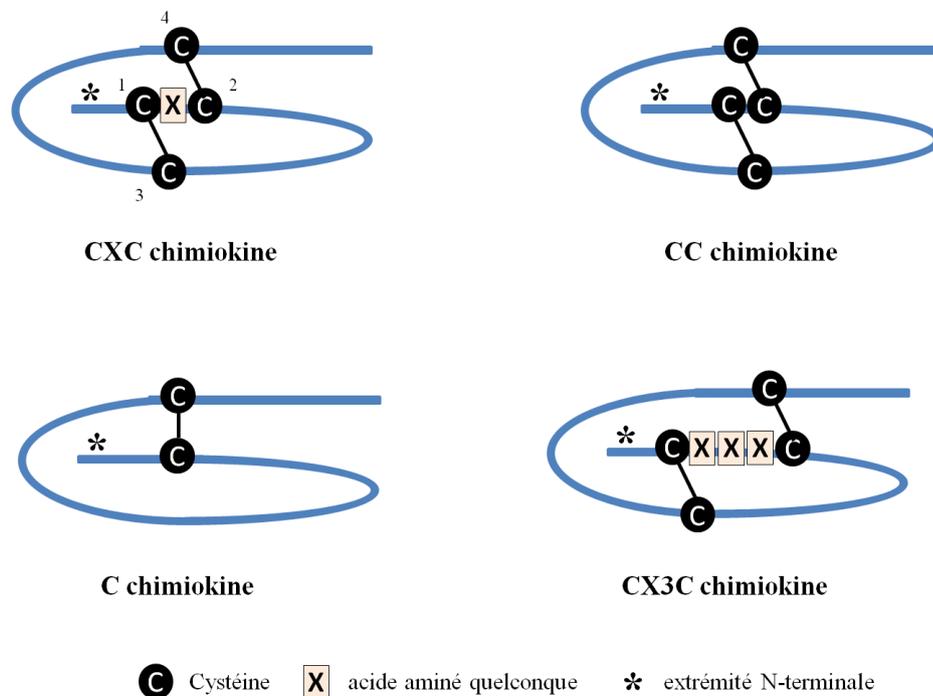


Figure 10 : Représentation schématique des 4 sous-familles de chimiokines

Les différentes sous-familles de chimiokines sont définies selon l'espacement entre les résidus de cystéine conservés dans l'extrémité N-terminale des protéines. Majoritairement au nombre de 4, les cystéines conservées forment des ponts disulfures entre les cystéines 1 et 3 et les cystéines 2 et 4. Les chimiokines de la famille « C » ne possèdent que 2 cystéines conservées.

Nomenclature	Autres noms humains / murins	Catégorie	Symboles des gènes		Récepteurs	
			Humain	Souris	Agonistes	Antagonistes
CCL1	I-309, TCA-3	I	CCL1	Ccl1	CCR8	
CCL2	MCP-1, JE	I	CCL2	Ccl2	CCR2	
CCL3	MIP-1 α	I	CCL3	Ccl3	CCR1, CCR5	
CCL3L1	LD78 β	I	CCL3L1	-	CCR1, CCR3, CCR5	
CCL3L3	LD78 β	I	CCL3L3	-		
CCL4	MIP-1 β	I	CCL4	Ccl4	CCR5	
CCL4L1	AT744.2	I	CCL4L1	-		
CCL4L2		I	CCL4L2	-		
CCL5	RANTES	I	CCL5	Ccl5	CCR1, CCR3, CCR5	
CCL7	MCP-3, MARC	I	CCL7	Ccl7	CCR1, CCR2, CCR3	CCR5
CCL8	MCP-2	I	CCL8		CCR1, CCR2, CCR5	
		I		Ccl8	CCR8 (souris)	
CCL11	Eotaxin	D	CCL11	Ccl11	CCR3, CCR5	CCR2, CXCR3
CCL12	MCP-5	I	-	Ccl12		
CCL13	MCP-4	I	CCL13	-	CCR2, CCR3	
CCL14	HCC-1	I	CCL14	-	CCR1, CCR3, CCR5	
CCL15	HCC-2, CCF18, MIP-1 γ	I	CCL15	Ccl19	CCR1, CCR3	
CCL16	HCC-4	H	CCL16	-	CCR1, 2, 5, 8 et H4*	
CCL17	TARC, ABCD-2	D	CCL17	Ccl17	CCR4	
CCL18	DC-CK1, PARC	H	CCL18	-	GPER-1*	CCR3
CCL19	MIP-3 β , ECL, exodus-3	H	CCL19	Ccl19	CCR7	
CCL20	MIP-3 α , LARC, exodus-1	D	CCL20	Ccl20	CCR6	
CCL21	SLC, exodus-2	H	CCL21	Ccl21a	CCR7, CXCR3 (souris)	
		H	-	Ccl21b	CCR7	
		H	-	Ccl21c	CCR7	
CCL22	MDC, ABCD-1	D	CCL22	Ccl22	CCR4	
CCL23	MPIF-1, C10	I	CCL23	Ccl6	CCR1, FPRL-1*	
CCL24	MIPF-2, eotaxin-2	H	CCL24	Ccl24	CCR3	
CCL25	TECK	H	CCL25	Ccl25	CCR9	
CCL26	eotaxin-3	I	CCL26	Ccl26#	CCR3, CX3CR1	CCR1, CCR2, CCR5
CCL27	CTACK, ILC	H	CCL27	Ccl27a	CCR10	
		H	-	Ccl27b		
CCL28	MEC	H	CCL28	Ccl28	CCR3, CCR10	
CXCL1	GRO- α , Gro/KC, GRO-1	I, ELR ⁺	CXCL1	Cxcl3	CXCR2	
CXCL2	GRO- β , MIP-2, GRO-2	I, ELR ⁺	CXCL2	Cxcl2	CXCR2	
CXCL3	GRO- γ , Dcipl, GRO-3	I, ELR ⁺	CXCL3	Cxcl1	CXCR2	
CXCL4	Platelet factor-4 (PF-4)	I, ELR ⁺	PF4	-	CXCR3-B	
CXCL4L1	PF4V1	I, ELR ⁺	PF4V1	Pf4	CXCR3-B	
CXCL5	ENA-78	I, ELR ⁺	CXCL5	-	CXCR2	
CXCL6	GCP-2, LIX	I, ELR ⁺	CXCL6	Cxcl5	CXCR1, CXCR2	
CXCL7	NAP-2, Ppbp	I, ELR ⁺	PPBP	Ppbp	CXCR1, CXCR2	
CXCL8	IL-8	I, ELR ⁺	IL-8	-	CXCR1, CXCR2	
CXCL9	MIG	I, ELR ⁺	CXCL9	Cxcl9	CXCR3	CCR3
CXCL10	IP-10	I, ELR ⁺	CXCL10	Cxcl10	CXCR3	CCR3
CXCL11	I-TAC, H174	I, ELR ⁺	CXCL11	Cxcl11	CXCR3, CXCR7	CCR3, CCR5
CXCL12	SDF-1	H, ELR ⁺	CXCL12	Cxcl12	CXCR4, CXCR7	
CXCL13	BLC, BCA-1	H, ELR ⁺	CXCL13	Cxcl13	CXCR3, CXCR5	
CXCL14	BRAK, Bolekine	H, ELR ⁺	CXCL14	Cxcl14	inconnu	
CXCL15	Lungkine	I, ELR ⁺	-	Cxcl15	inconnu	
CXCL16	Small inductible cytokine B6	I, ELR ⁺	CXCL16	Cxcl16	CXCR6	
CXCL17	DMC	H, ELR ⁺	CXCL17	Cxcl17	inconnu	
XCL1	Lymphotactine	D	XCL1	Xcl1	XCR1	
XCL2		D	XCL2	-	XCR1	
CX3CL1	Fractalkine, Neurotactin	D	CX3CL1	Cx3cl1	CX3CR1	

D'après Zlotnik and Yoshie, *Immunity* (2012) 36 :705-716

Tableau 6 : Nomenclature et classification des chimiokines

Chaque chimiokine est nommée en fonction de son appartenance à l'une des 4 sous-familles (CC, CXC, C ou CX3C). Le L figurant dans leur nom signifie ligand par opposition au R figurant dans le nom des récepteurs.

Les chimiokines sont décrites comme homéostatique (H), inflammatoire (I) ou les deux (D).

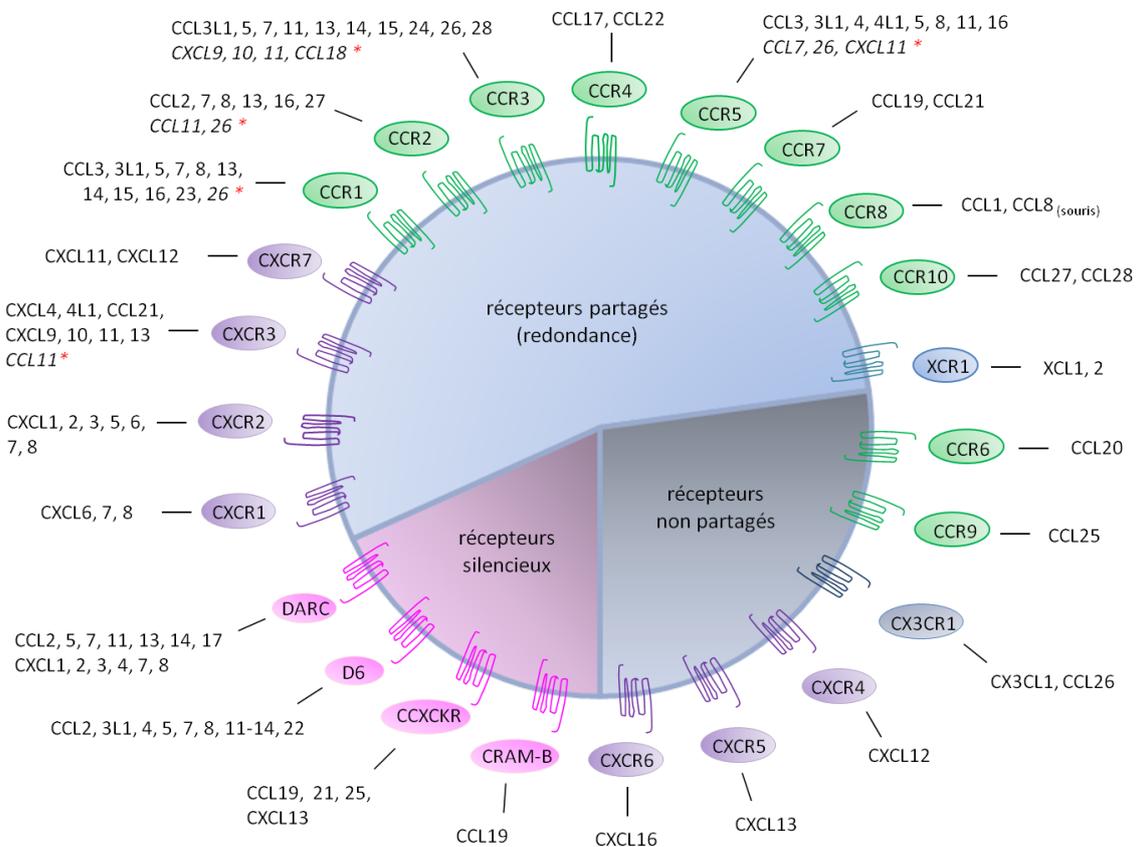
Certaines chimiokines existent uniquement chez l'Homme et d'autres uniquement chez la Souris. Les gènes codant les chimiokines humaines sont écrits en majuscules et les gènes murins sont écrits en minuscules.

Gène non exprimé

* H4 (histamine receptor 4), GPER-1 (G protein-coupled estrogen receptor 1) et FPRL-1 (formyl peptide receptor like-1) ne font pas partie de la famille des récepteurs de chimiokines mais sont capables de lier CCL16, CCL18 et CCL23 respectivement.

ii. Les récepteurs de chimiokines

Pour exercer leurs actions, les chimiokines se lient à des récepteurs spécifiques appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (Murphy, 1994). La classification de ces récepteurs suit celle des ligands qu'ils reconnaissent et sont ainsi divisés en 4 sous-familles : les récepteurs CCRs, CXCRs, XCR et CX3CR (Murphy et al., 2000). Alors qu'il n'existe qu'un récepteur dans les deux dernières familles (XCR1 et CX3CR1), on dénombre 10 récepteurs CCRs (CCR1 à CCR10) et 7 récepteurs CXCRs (CXCR1 à CXCR7).



*D'après Balkwill F, Journal of Pathology (2012) 226 :148-157
et Zlotnik and Yoshie, Immunity (2012) 36 :705-716*

Figure 11 : Représentation schématique des spécificités d'interaction entre les récepteurs de chimiokines et leurs ligands

* chimiokines antagonistes du récepteur

Les chimiokines sont également capables de se lier avec une haute affinité à quatre autres récepteurs qualifiés de récepteurs 'leurres' ou de récepteurs 'silencieux'. Ces quatre récepteurs sont les récepteurs **D6** (Nibbs et al., 1997), **DARC** (Duffy Antigen Receptor Chemokine) (Peiper et al., 1995), **CCX-CKR** (ChemoCentryX ChemoKine Receptor) (Gosling et al., 2000) et **CRAM-B** (Chemokine Receptor on Activated Macrophages ou CCR11) (Leick et al., 2010). La liaison d'une chimiokine à ces récepteurs leurres n'induit aucun signal intracellulaire par la suite. Ces récepteurs sont spécialisés dans la séquestration des chimiokines et permettent une régulation de la biodisponibilité de celles-ci (Comerford and Nibbs, 2005; Mantovani et al., 2006).

iii. Spécificité d'interaction

Alors que certains récepteurs de chimiokines ne reconnaissent qu'une seule chimiokine de manière très spécifique, d'autres en revanche sont clairement 'polygames' en se liant à de nombreux ligands. De même, certaines chimiokines sont capables d'activer plusieurs récepteurs alors que d'autres sont au contraire spécifiques d'un seul récepteur. Ces spécificités d'interactions entre chimiokines - récepteurs sont représentées schématiquement dans la **Figure 11**. Cette apparente redondance explique pourquoi l'absence ou la non-fonctionnalité de certains gènes codant pour des chimiokines ou des récepteurs de chimiokines n'induisent pas nécessairement d'anomalités majeures (avec l'exemple du récepteur CCR5 (Liu et al., 1996)). Cependant, ce n'est pas le cas pour toutes les chimiokines et pour tous les récepteurs ; le knockout (KO) du récepteur CXCR4 est létal chez la souris (Ma et al., 1998). De plus, plusieurs observations chez la souris indiquent que la redondance entre chimiokines et entre récepteurs n'est qu'apparente : le caractère indispensable d'un récepteur ou d'une chimiokine peut être méconnu et se révéler uniquement dans des circonstances particulières.

Par ailleurs, comme énoncé précédemment, la classification des récepteurs dépend des chimiokines qu'ils reconnaissent. On sous-entend donc que les chimiokines d'une sous-famille ne se lient qu'aux récepteurs de la même sous-famille. Des exceptions sont faites, notamment pour les récepteurs leurres DARC et CCX-CKR qui peuvent lier à la fois des chimiokines CC et CXC (Comerford and Nibbs, 2005). Par ailleurs, certaines chimiokines peuvent se comporter comme des antagonistes naturels pour d'autres paires ligand-récepteur. Pour exemples, les ligands de CCR3 et de CXCR3 sont des antagonistes réciproques naturels. Ainsi, les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 sont antagonistes du récepteur CCR3 alors que CCL11 est antagoniste du récepteur CXCR3 (Loetscher et al., 2001; Xanthou et al., 2003) (**Figure 11**).

B. Fonctions des chimiokines et de leurs récepteurs dans la biologie du cancer

Les chimiokines et leurs récepteurs ont tout d'abord été décrits pour leur rôle dans le chimiotactisme des leucocytes. Ils sont en effet capables de réguler la migration des leucocytes dans l'organisme vers les sites inflammatoires ou infectieux (Taub, 1996). Par la suite, il a été montré qu'ils étaient également impliqués dans de nombreux autres processus biologiques. En plus de leur implication dans les mécanismes de défense de l'hôte (Rot and von Andrian, 2004; Sallusto et al., 2000), les chimiokines jouent un rôle important dans l'**embryogénèse** (Raman et al., 2011), l'**hématopoïèse** (Broxmeyer, 2008; Youn et al., 2000), la **cicatrisation cutanée** (Zaja-Milatovic and Richmond, 2008) ou encore l'**angiogénèse** (Kiefer and Siekmann, 2011). Outre leur rôle dans de nombreux processus biologiques, les couples chimiokines/récepteurs ont été impliqués dans diverses pathologies telles que l'**asthme** et l'**allergie** (Pease, 2006), les **maladies auto-immunes** (Godessart and Kunkel, 2001), l'**athérosclérose** (Poupel and Combadière, 2010; Wan and Murphy, 2013), l'**infection par le VIH** (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Evans et al., 2012; Lusso, 2006), la **douleur** (Gao and Ji, 2010) ou bien encore le **développement tumoral**. Dans la partie suivante nous nous intéresserons uniquement à leurs fonctions dans la biologie du cancer.

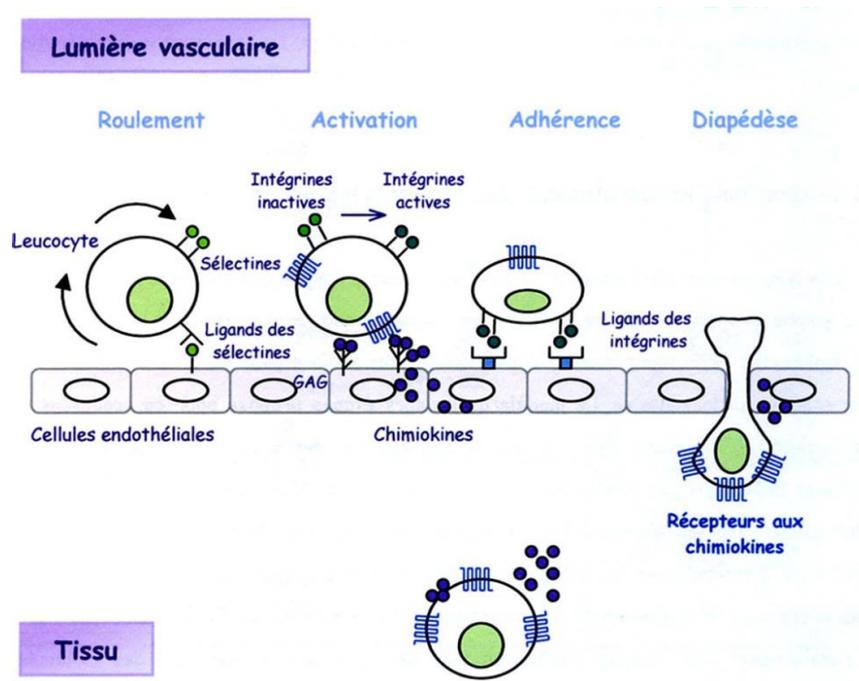
Dans nombre de tumeurs solides, le microenvironnement tumoral est riche en chimiokines. Celles-ci sont sécrétées par les cellules tumorales elles-mêmes ou par les cellules du stroma tumoral telles que les leucocytes infiltrants, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Lazennec and Richmond, 2010). Nous verrons que les chimiokines peuvent engendrer aussi bien des effets anti-tumoraux que pro-tumoraux. Nous développerons l'implication des interactions chimiokines/récepteurs dans le recrutement leucocytaire sur le site tumoral, dans l'angiogénèse tumorale, dans la dissémination métastatique, la prolifération et la survie tumorales et enfin dans la communication entre les cellules tumorales et les fibroblastes associés aux tumeurs.

i. Les couples chimiokines/récepteurs et le recrutement leucocytaire

1. Le chimiotactisme et le recrutement tissulaire

La chimiotaxie est le phénomène par lequel les cellules se déplacent dans une direction donnée sous l'action d'un gradient extracellulaire de molécules chimiques. Ce processus est indispensable à la migration des leucocytes au sein de l'organisme et à leur recrutement sur les sites infectieux afin de lutter contre les pathogènes. Il est également primordial pour la migration des cellules neurales lors du développement du système nerveux. Cependant, une migration

inappropriée des cellules dans l'organisme peut conduire à certaines pathologies telles que les maladies inflammatoires ou les métastases. Chez les mammifères, les chimiokines sont les principaux signaux extracellulaires qui guident la migration cellulaire. En effet, les cellules présentes dans la circulation sont portées par le flux sanguin ('roulement') puis sont ensuite guidées par les gradients de chimiokines formés à la surface des parois vasculaires. La liaison d'une chimiokine à son récepteur active alors une cascade de signalisation intracellulaire (via les protéines G hétérotrimériques couplées au récepteur) qui aboutit à la migration de la cellule exprimant ledit récepteur (O'Hayre et al., 2008). Les gradients de concentration de ces molécules se forment grâce à la liaison des chimiokines (lors de leur sécrétion) aux glycosaminoglycanes (GAGs) présents dans la matrice extracellulaire et à la surface des cellules endothéliales localisées à proximité des cellules qui secrètent ces cytokines (Handel et al., 2005; Laguri et al., 2008; Proudfoot et al., 2003). Lors du recrutement des cellules à l'intérieur des tissus par les chimiokines, les cellules en migration adhèrent aux cellules endothéliales puis traversent la barrière endothéliale pour rejoindre les tissus (c'est la diapédèse ou extravasation) (**Figure 12**) (Schaerli and Moser, 2005). L'ensemble de ces étapes implique alors une série d'interactions coordonnées entre les cellules en migration et les cellules endothéliales. Le recrutement tissulaire nécessite également une régulation fine des nombreuses molécules telles que les intégrines, les sélectines, les JAMs (Junctional Adhesion Molecules), etc (Alon and Shulman, 2011; Arcangeli et al., 2013; Ley et al., 2007; McEver and Zhu, 2010; Schmidt and Friedl, 2010).



D'après Foussat A et al, médecine/sciences (2000) 16 :757-766

Figure 12 : Recrutement des cellules circulantes (exemple des leucocytes)

2. Les leucocytes associés aux tumeurs

Lors du développement tumoral, les cellules du système immunitaire sont recrutées par chimiotactisme dans les tissus tumoraux et, ce, en fonction des récepteurs de chimiokines qu'elles expriment à leur surface mais également des chimiokines produites dans le tissu tumoral (par les cellules cancéreuses, les cellules du stroma et les leucocytes déjà présents au sein de la tumeur). La composition de l'infiltrat leucocytaire dépend donc à la fois de la nature de la tumeur et de son environnement tissulaire. Les principaux couples chimiokines/récepteurs identifiés à ce jour dans la migration des leucocytes au sein des tumeurs sont répertoriés dans le **tableau 7**.

Types cellulaires	Chimiokines	Récepteurs	Références
Les lymphocytes T CD4 ⁺	T helper 1	CCL5 CXCL9, CXCL10, CXCL11 CX3CL1	CCR5 CXCR3 CX3CR1 (Sallusto et al., 1998, 2000) (Fraciacelli et al., 2001)
	T helper 2	CCL17, CCL22, CCL1 (CCL11)	CCR4, CCR8 (CCR3) (Sallusto et al., 1998, 2000)
	T helper 17	CCL2, CCL5	(CCR2, CCR4-7) (Su et al., 2010)
	T régulateurs	CCL22 CCL28	CCR4 CCR10 (Curiel et al., 2004a; Facciabene et al., 2011; Ishida et al., 2006)
Les Lymphocytes T CD8 ⁺	CCL3, CCL5 CXCL9, CXCL10, CXCL11 CX3CL1	(CCR1,3,5) CXCR3 CX3CR1 (Maric and Liu, 1999; Mulé et al., 1996; Nishimura et al., 2002; Vicari and Caux, 2002)	
Les monocytes / macrophages	CCL2 CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8 CX3CL1	CCR2 CCR1, CCR5 CX3CR1 (Lee et al., 2013) (Murdoch et al., 2008) (Lee et al., 2013)	
Les neutrophiles	CCL2 CXCL8, CXCL6 CXCL5, CXCL8	CCR2 CXCR1 CXCR2 (Arenberg et al., 1997; Belloq et al., 1998; Gijbers et al., 2005; Gupta et al., 1996; Lee et al., 2000)	
Les MDSCs	CCL2 CXCL5 CXCL12	CCR2 CXCR2 CXCR4 (Movahedi et al., 2008; Sawanobori et al., 2008; Yang et al., 2008)	
Les cellules dendritiques	CCL5 CCL20 CXCL8 CXCL12	(CCR1,3,5) CCR6 CXCR1, CXCR2 CXCR4 (Allavena et al., 2000; Curiel et al., 2004b; Feijóo et al., 2005; Vicari and Caux, 2002)	
Les cellules NK	CCL2, 7, 8, 13 CCL3, 5, 8, 11 CXCL9, CXCL10 CX3CL1	CCR2 CCR5 CXCR3 CX3CR1 (Bernardini et al., 2012; Vicari and Caux, 2002; Walzer and Vivier, 2011)	

Tableau 7 : Principaux couples chimiokines/récepteurs impliqués dans le recrutement des leucocytes au sein des tumeurs

En recrutant les leucocytes dans les tumeurs, les chimiokines/récepteurs vont influencer la progression tumorale. Nous développerons plus particulièrement le recrutement des macrophages, des neutrophiles puis des lymphocytes T ainsi que l'implication de ces leucocytes dans le développement tumoral.

Les macrophages

Les macrophages sont des éléments clés du système immunitaire inné et de l'homéostasie tissulaire, pour lesquels ils phagocytent pathogènes et cellules mortes (Mosser and Edwards, 2008). Cependant, il est maintenant clairement établi que les macrophages font partie intégrante du microenvironnement tumoral et constituent d'ailleurs la population leucocytaire majoritaire parmi les leucocytes infiltrants. Les macrophages sont impliqués dans l'angiogénèse tumorale (Owen and Mohamadzadeh, 2013), le remodelage de la matrice extracellulaire, l'invasion des cellules cancéreuses et les métastases (Joyce and Pollard, 2009); ce qui leur vaut d'être considérés comme les leucocytes régulateurs les plus importants de la progression tumorale (Hao et al., 2012b; Mantovani and Sica, 2010; Qian and Pollard, 2010). Les macrophages associés aux tumeurs (ou Tumor-Associated Macrophages, TAMs) sont issus du recrutement des monocytes circulants qui traversent la paroi des vaisseaux sanguins et se différencient ensuite en macrophages dans la tumeur. Les monocytes circulants sont divisés en deux sous-populations (monocytes 'classiques' et monocytes 'non classiques') en fonction de leurs profils d'expression (**Figure 13**) (Lee et al., 2013).

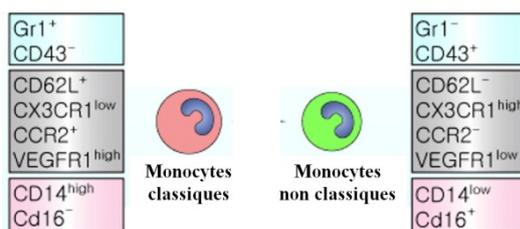
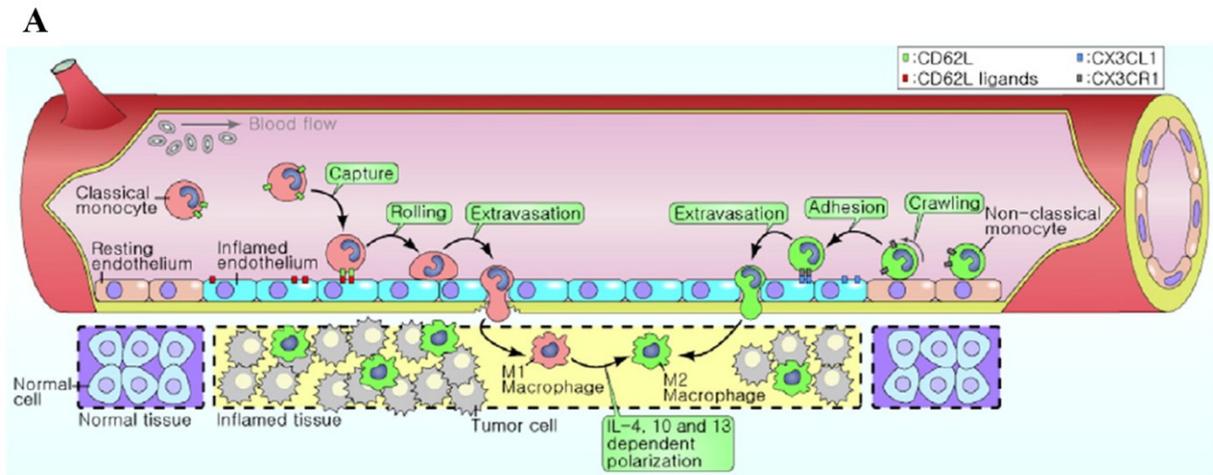


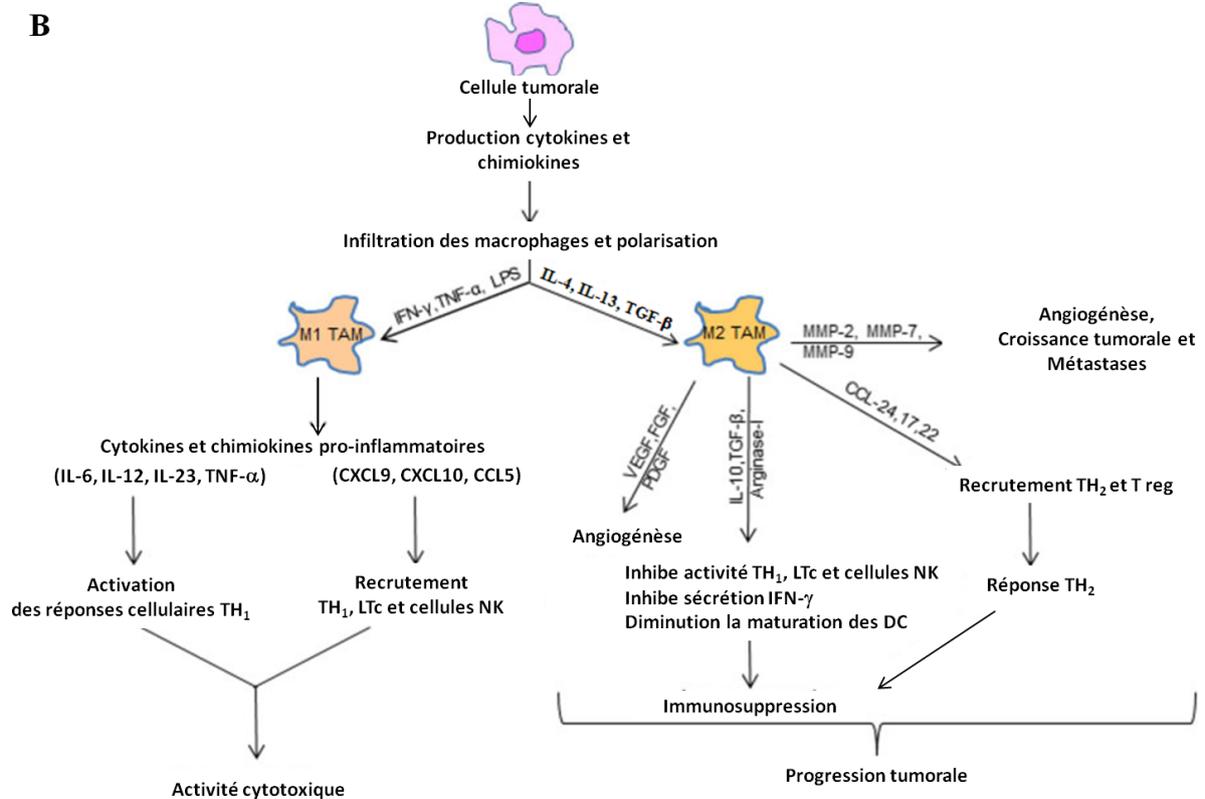
Figure 13 : Marqueurs de surface des monocytes

D'après Lee HW et al. Biochim. Biophys. Acta (2013) 1835 :170–179

Leur recrutement au sein de la tumeur est régulé par différents couples ligands/récepteurs (**Tableau 7**). Les principaux couples impliqués dans ce processus sont CCL2/CCR2 (Deshmane et al., 2009), CX3CL1/CX3CR1 mais aussi VEGF/VEGFR et CD62L ligands/CD62L (sélectine L) (**Figure 14A**) (Lee et al., 2013). Une fois dans le tissu, les macrophages se polarisent en différents phénotypes fonctionnels selon les stimuli auxquels ils sont exposés dans le microenvironnement tumoral (**Figure 14A**). On distingue ainsi les macrophages M1 dit 'pro-inflammatoires' et les macrophages M2 dit 'anti-inflammatoires'.



D'après Lee HW et al. *Biochim. Biophys. Acta* (2013) 1835 :170–179



D'après Lakshmi Narendra B et al. *Inflamm. Res.* (2013) 62:823–834

Figure 14 : Chimiokines et macrophages associés aux tumeurs

A. Recrutement des monocytes et polarisation des macrophages. Les cellules tumorales et les cellules du stroma sécrètent des cytokines et des chimiokines qui recrutent les monocytes ‘classiques’ et ‘non classiques’ au niveau de la tumeur. Ces monocytes périphériques se différencient ensuite en macrophages M1 ou M2 selon les stimuli présents dans le microenvironnement tumoral. **B.** Les TAMs M1/M2 expriment ensuite des cytokines, chimiokines différentes et exercent des fonctions différentes au sein de la tumeur.

IFN = Interféron, IL = Interleukine, LPS = Lipopolysaccharide, PDGF = Platelet-derived growth factor, TNF = Tumor Necrosis Factor

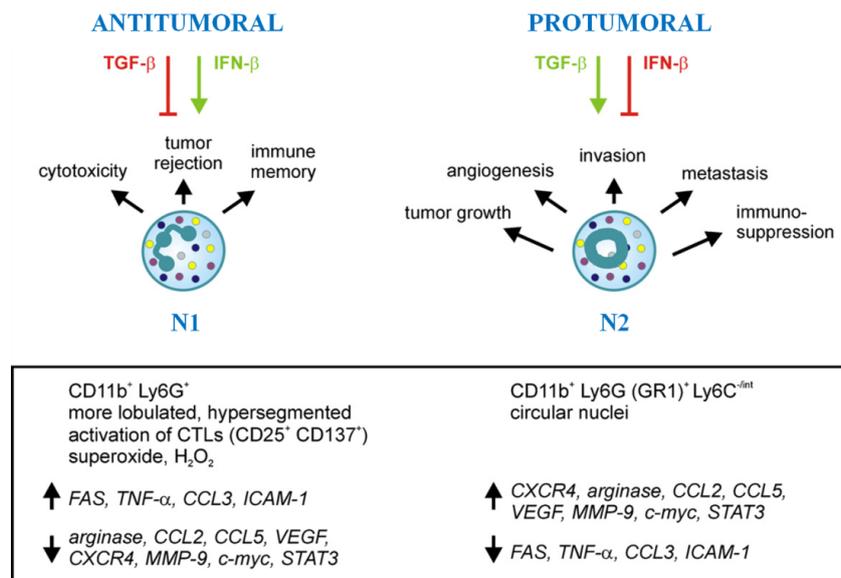
Ces deux phénotypes alternatifs présentent dans la tumeur des effets opposés ; alors que les TAMs M1 possèdent des propriétés anti-tumorales, les TAMs M2 favorisent la tumeur et sont pro-tumoraux (**Figure 14B**) (Hao et al., 2012b; Lakshmi Narendra et al., 2013). Le rôle des TAMs dans le développement tumoral reste controversé. Alors que dans le cancer colorectal il a été rapporté que les TAMs sont pro-inflammatoires et sont associés à de bons pronostics pour les patients (Algars et al., 2012; Forssell et al., 2007; Funada et al., 2003; Lackner et al., 2004), dans la majorité des cancers (sein, prostate, ovaires, poumons et mélanome) les TAMs sont considérés comme anti-inflammatoires et corrélerent avec un mauvais pronostic pour les patients (Koukourakis et al., 1998; Leek et al., 1996; Lissbrant et al., 2000; Salvesen and Akslen, 1999; Zhu et al., 2008). La polarisation des TAMs en M1/M2 en fonction du stade de la tumeur pourrait être une des explications à ces divergences de pronostics (Biswas and Mantovani, 2010; Biswas et al., 2008).

Les neutrophiles

Les neutrophiles, acteurs de l'immunité innée, phagocytent et éliminent les microorganismes étrangers à l'hôte. Bien que les neutrophiles soient principalement connus pour leur fonction antibactérienne, il est aujourd'hui clairement établi que ces cellules immunitaires jouent un rôle significatif dans la biologie du cancer (Piccard et al., 2012). Malgré le fait qu'ils possèdent une demi-vie de seulement quelques heures, les neutrophiles représentent la population leucocytaire la plus importante dans la circulation sanguine. Leur recrutement au sein des tumeurs est principalement dirigé par les chimiokines qui se lient aux récepteurs CXCR1 et CXCR2 exprimés par les neutrophiles (**Tableau 7**) (Tazzyman et al., 2013). Chez l'Homme, dans le cancer des poumons une corrélation positive entre le niveau de CXCL8 et le nombre de neutrophiles infiltrants a été observée (Bellocq et al., 1998). Bien que faibles en nombre, les études cliniques faisant état des neutrophiles au sein des tumeurs ont démontré que leur présence était associée à un mauvais pronostic, notamment dans les mélanomes, les cancers colorectaux, les cancers du rein, du nasopharynx ou des poumons (Atzpodien and Reitz, 2008; Bellocq et al., 1998; He et al., 2012; Jensen et al., 2009; Michael et al., 2006; Wislez et al., 2003). Néanmoins, dans le cancer colorectal, deux études récentes se contredisent. Alors que Absenger *et al.* impliquent les neutrophiles dans de mauvais pronostics (Absenger et al., 2013), Droeser *et al.* montrent que la présence de cellules fortement positives pour la myéloperoxydase (enzyme produite par les neutrophiles) représente un facteur indépendant de bon pronostic pour les patients (Droeser et al., 2013). Pour essayer d'expliquer ces apparentes divergences, l'étude des différents phénotypes des neutrophiles semble pertinente.

Les premiers travaux sur le rôle des neutrophiles dans la biologie du cancer consistaient en

des expériences de transfert *in vivo* de ces cellules dans des modèles murins de tumeurs, et ont démontré un effet anti-tumoral des neutrophiles (Pekarek et al., 1995; Souto et al., 2011). Par la suite, d'autres travaux ont mis en évidence un effet pro-tumoral des neutrophiles de par leur sécrétion en facteurs de croissance, en protéases (permettant de dégrader la MEC) ou bien encore en molécules proangiogéniques (Piccard et al., 2012). Très récemment, les travaux de Fridlender *et al.* ont apporté un nouvel éclairage sur le rôle des neutrophiles associés aux tumeurs (Tumor-Associated Neutrophils ou TANs) (Fridlender et al., 2009). Les auteurs suggèrent que les TANs pourraient se différencier en deux phénotypes différents (N1 et N2) de façon similaire aux macrophages (M1/M2), où les N1 seraient anti-tumoraux et les N2 pro-tumoraux. Il est aujourd'hui proposé que, contrairement aux macrophages M1/M2 qui expriment différentes molécules selon leur phénotype, les neutrophiles N1/N2 produiraient plus probablement les mêmes substances, mais en quantités plus ou moins importantes selon leur état d'activation ; cette hypothèse reste cependant à confirmer (Fridlender and Albelda, 2012; Gregory and Houghton, 2011; Houghton, 2010). La polarisation des neutrophiles est schématisée dans la **figure 15**.



D'après Piccard H *et al.* *Critical Reviews in Oncology/hematology* (2012) 82 :296-309

Figure 15 : Schéma simplifié de la polarisation des neutrophiles N1/N2

Les neutrophiles associés aux tumeurs (TANs) exercent des fonctions à la fois anti- et pro-tumorales. Ce phénomène appelé 'polarisation des neutrophiles', est sous contrôle des cytokines TGFβ (Fridlender et al., 2009) et IFNβ (Jablonska et al., 2010). Les TANs N1 sont des cellules effectrices aux propriétés anti-tumorales qui sécrètent des molécules cytotoxiques et qui peuvent induire le rejet des tumeurs ainsi qu'une réponse immunitaire anti-tumorale. A l'inverse, les TANs N2 supportent la progression tumorale en favorisant l'angiogénèse, l'invasion tumorale, les métastases et l'immunosuppression (Piccard et al., 2012). Les différentes caractéristiques de ces deux populations sont résumées dans le panneau en dessous de la figure. Selon la présence de TGFβ ou d'IFNβ dans le microenvironnement tumoral, la polarisation des TANs est stimulée (flèches vertes) ou inhibée (traits rouges).

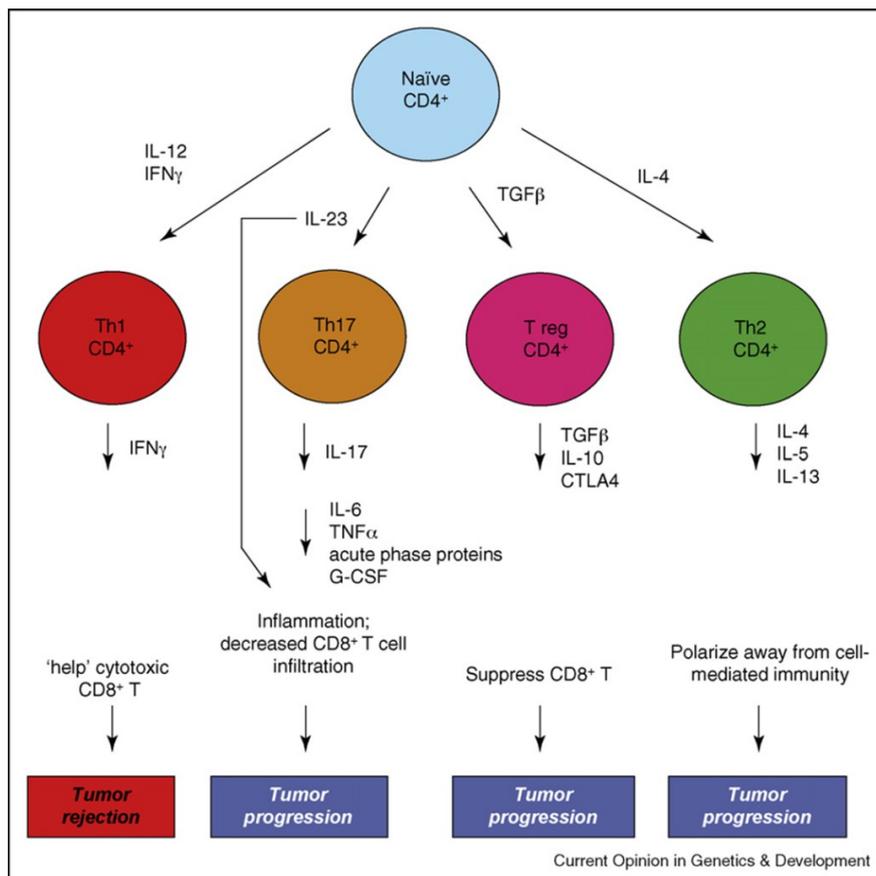
CTLs = Lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, Ly6 = Lymphocyte antigène 6, MMP-9 = Métalloprotéinase 9

Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LTs) font partie de l'immunité adaptative et assurent l'élimination spécifique des pathogènes, en reconnaissant les peptides antigéniques présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules. Les LTs naïfs circulent en continu à travers le sang et les tissus. Ils sont activés lorsqu'ils reconnaissent (dans les tissus lymphoïdes secondaires) le complexe CMH-peptide spécifique de leur TCR (T cell receptor) à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Suite à leur activation, les LTs prolifèrent et se différencient, soit en LTs mémoires, soit en LTs effecteurs. Ces derniers rejoignent ensuite les tissus lésés et y assurent la réponse immunitaire spécifique. Parmi les LTs, on distingue 2 populations : les $CD4^+$ et les $CD8^+$. Les lymphocytes T effecteurs $CD8^+$ (ou cellules T cytotoxiques) sont les principales cellules effectrices de la réponse immunitaire adaptative, capables de lyser les cellules infectées par un pathogène. Ils sont soutenus par l'action des LTs effecteurs $CD4^+$ appelés LT auxiliaires (ou T helper, Th). Ces LTs $CD4^+$ peuvent se différencier en Th1, Th2, Th17 ou encore en LTs régulateurs (Treg), et ce, en fonction des stimuli présents lors de leur activation par les CPA. Ces populations lymphocytaires T auxiliaires se distinguent par leurs profils de sécrétion cytokinique responsables de leurs fonctions spécifiques au sein de la réponse immunitaire (**Figure 16**) (Hemdan et al., 2012; Powrie and Coffman, 1993; Zhu and Paul, 2010). Les LTs mémoires quant à eux sont responsables de la mise en place d'une mémoire immunitaire qui permettra une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une nouvelle infection par le même pathogène.

Dans le contexte tumoral, les lymphocytes T sont ainsi capables de développer une réponse immunitaire anti-tumorale en reconnaissant des antigènes tumoraux à la surface des CPA. Ces antigènes tumoraux correspondent à des antigènes spécifiques de certaines tumeurs (exprimés uniquement par les cellules tumorales) ou à des antigènes associés aux tumeurs (exprimés différemment dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales) (Boon et al., 1997; Tougeron et al., 2013). Les LTs $CD8^+$ activés peuvent alors reconnaître spécifiquement sur les cellules tumorales leur complexe CMH-peptide, et induire une lyse de ces cellules grâce au système perforine/granzyme ou en engageant les récepteurs de mort (tels que le récepteur Fas) (Weigelin et al., 2011). Les LTs $CD4^+$ Th1 facilitent la destruction du tissu et le rejet de la tumeur en apportant leur soutien aux LTs $CD8^+$ cytotoxiques (Knutson and Disis, 2005). Les LTs $CD4^+$ Th2 quant à eux favorisent une réponse humorale ; ils sont principalement considérés comme délétères pour la réponse anti-tumorale (Ellyard et al., 2007) (**Figure 16**). Les LTs Th17, récemment identifiés, sont des LTs aux propriétés inflammatoires dont le rôle dans la progression tumorale reste pour le moment controversé. Si les premières études les ont présentés comme des

cellules immunitaires pro-tumorales (induction d'une tolérance immunitaire et de l'angiogénèse tumorale), des travaux plus récents montrent au contraire que les LTs Th17 peuvent exercer des effets anti-tumoraux (promotion des activités cytotoxiques) (Hemdan, 2013). Enfin, les lymphocytes Treg sont des cellules immunosuppressives du système immunitaire et peuvent favoriser le développement tumoral en limitant l'immunité anti-tumorale et en favorisant l'angiogénèse au sein des tumeurs (Facciabene et al., 2012; Nishikawa and Sakaguchi, 2010).



D'après Ostrand-Rosenberg S, *Curr. Opin. Genet. Dev.* (2008) 18:11-18

Figure 16 : Différenciation des lymphocytes T CD4 $^+$, effets sur la progression tumorale

La différenciation des LTs CD4 $^+$ vers un phénotype donné est définie par les cytokines présentes dans leur environnement. Les LT différenciés produisent à leur tour des cytokines qui stimulent la progression tumorale ou bien entraînent l'élimination de la tumeur. Ainsi, les lymphocytes Th1 sont induits par l'IL-2 et l'IFN γ , puis produisent eux aussi en retour de l'IFN γ . Ce dernier stimule la différenciation et la prolifération des LTs CD8 $^+$ qui sont cytotoxiques pour les cellules tumorales. A l'inverse, l'IL-4 polarise les LTs CD4 $^+$ vers le phénotype Th2 et la production d'IL-4, IL-5 et IL-13. Ces cytokines favorisent la production d'Ac par les lymphocytes B, et détournent ainsi l'immunité des réponses Th1 anti-tumorales. Sous l'influence du TGF β , les LTc CD4 $^+$ se différencient en lymphocytes Treg qui bloquent activement l'immunité anti-tumorale en supprimant les LT CD8 $^+$ tumoricides. Récemment identifiés, les LT Th17 sont induits par l'IL-23 et produisent de l'IL-17. En retour, l'IL-17 induit la production de cytokines et de chimiokines qui stimulent l'inflammation. Les médiateurs inflammatoires résultants peuvent contribuer à la progression tumorale en régulant positivement les cellules immunosuppressives.

Alors qu'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace (notamment par l'action des CD8⁺ cytotoxiques et des CD4⁺ Th1) peut conduire à l'élimination des tumeurs, un déséquilibre vers une inhibition de l'immunité anti-tumorale peut permettre aux tumeurs d'échapper au système immunitaire (Quezada et al., 2011).

Pour exercer leurs fonctions, les LTs activés doivent quitter les ganglions lymphatiques et migrer vers le site tumoral, dans lequel ils engageront physiquement les cellules exprimant le complexe CMH-peptide spécifique de leur TCR. Lors de l'activation des LTs naïfs et de la différenciation des LTs effecteurs, un remaniement de l'expression des récepteurs de chimiokines à leur surface est observé ; chaque population lymphocytaire exprime alors un profil d'expression des récepteurs de chimiokines différent (Sallusto et al., 2000) (**Tableau 7**). Les chimiokines exprimées par la tumeur et son microenvironnement vont ainsi contrôler le recrutement des populations de LTs, et donc le développement, ou non, d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Alors que CX3CL1 et les ligands de CXCR3 sont décrits pour recruter les LTs Th1 et les LTs cytotoxiques, CCL22 attire préférentiellement les LTs Th2 et les Treg (Curiel et al., 2004a; Fraticelli et al., 2001; Nishimura et al., 2002; Vicari and Caux, 2002).

De nombreuses études chez l'animal, dans lesquelles les chimiokines sont exprimées par les cellules tumorales ou apportées au niveau du site tumoral par diverses technologies, ont mis en évidence le rôle des chimiokines dans l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi, en 1993, Luster *et al.* furent parmi les premiers à mettre en évidence l'impact de l'expression de CXCL10 par les cellules tumorales dans des modèles de tumeurs mammaires sous-cutanées. Dans cette étude, CXCL10 exerce un effet anti-tumoral qui dépend de la présence de lymphocytes T (Luster and Leder, 1993). Par la suite, des travaux ont mis en évidence que le recrutement des lymphocytes T CXCR3⁺, par CXCL10, peut promouvoir la régression spontanée des mélanomes (Wenzel et al., 2005) mais aussi, que CXCL11 augmente la présence des lymphocytes infiltrant la tumeur et inhibe la croissance tumorale dans les cancers du sein et les lymphomes T (Chu et al., 2007; Hensbergen et al., 2005). Des exemples supplémentaires similaires seront apportés dans la partie *III.B* de ce manuscrit qui traite de l'utilisation des chimiokines comme 'médicaments' anticancéreux.

Au cours de ces dernières années, l'impact de l'infiltration lymphocytaire au sein des tumeurs sur le pronostic des patients a été particulièrement étudié, notamment dans le cancer colorectal. Dans les CCRs, les premières études se sont intéressées à démontrer que la présence de lymphocytes infiltrants les tumeurs, indépendamment de leur phénotype, était corrélée au bon pronostic des tumeurs (Ropponen et al., 1997; Svennevig et al., 1984). Par la suite, il a été montré

que les LTs mémoires, ainsi que les LTs cytotoxiques et les LTs Th1, représentent les populations lymphocytaires possédant les meilleurs impacts pronostic en termes de survie des patients et de récurrences (Galon et al., 2006, 2007; Pagès et al., 2009). Par ailleurs, des niveaux élevés de CXCL16 et de CX3CL1 (deux chimiokines décrites pour être actives sur ces sous-populations lymphocytaires) ont été corrélés avec une augmentation de l'infiltration des leucocytes dans les tumeurs, ainsi qu'au bon pronostic de celles-ci (Hojo et al., 2007; Ohta et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés par une étude menée par le Dr Jérôme Galon, dans laquelle une expression élevée de CX3CL1 (ainsi que de CXCL9 et de CXCL10) au niveau des tumeurs primaires coliques a été d'une part associée à une forte infiltration leucocytaire (LTs Th1, LTs cytotoxiques), et d'autre part représenterait un facteur de bon pronostic (Mlecnik et al., 2010). Plus récemment, cette même équipe a montré que l'expression d'un cluster de gènes associé aux réponses Th1 était corrélée positivement à une augmentation de la survie des patients sans récurrence (Tosolini et al., 2011). Par ailleurs, l'infiltration des tumeurs par les Treg a quant à elle généralement été associée à un mauvais pronostic pour les patients. Dans le cancer des ovaires (Curiel et al., 2004a), le cancer du sein (Bates et al., 2006), le lymphome de Hodgkin (Alvaro et al., 2005), l'hépatocarcinome (Gao et al., 2007) et le glioblastome (Wainwright et al., 2013), la présence et la fréquence des Treg au sein des tumeurs corrélaient positivement avec le grade de la tumeur et une survie réduite des patients. Au contraire, dans certains types de cancers, tels que le cancer de la tête et du cou (Badoual et al., 2006), l'accumulation des Treg au sein des tumeurs a été associée à un pronostic favorable. Dans le cancer colorectal, l'infiltration tumorale par les Treg reste polémique. Alors que Suzuki *et al.* indiquent que le ratio LTs CD8⁺/Treg intra-tumoral est positivement corrélé à un bon pronostic (Suzuki et al., 2010), Correale *et al.* montrent une corrélation positive entre la présence des Treg et le pronostic des patients (Correale et al., 2010). L'étude de l'infiltration des tumeurs par les différentes populations lymphocytaires et sa corrélation avec la survie des patients continue actuellement d'évoluer néanmoins, le contexte immunologique des tumeurs apparaît d'ores et déjà comme un outil puissant et prometteur de pronostic (Angell and Galon, 2013; Galon et al., 2012, 2013).

ii. Les couples chimiokines/récepteurs dans l'angiogénèse tumorale

L'activité chémoattractante des chimiokines n'est pas limitée aux leucocytes, et nombre d'entre elles sont connues pour induire la migration des cellules endothéliales. De plus, la fixation des chimiokines à leurs récepteurs spécifiques sur les cellules endothéliales peut également stimuler la prolifération de ces cellules. Ces chimiokines se comportent alors comme des molécules proangiogéniques (stimulant l'angiogénèse) (Strieter et al., 2005). A l'inverse, d'autres

chimiokines fonctionnent comme des facteurs anti-angiogéniques qui inhibent la prolifération des cellules endothéliales. Dans les tumeurs solides, l'action proangiogénique des chimiokines est détournée par les cellules cancéreuses au profit de la croissance tumorale (**Figure 17A**) (Keeley et al., 2011; Kiefer and Siekmann, 2011). Par ailleurs, les tumeurs sécrètent des chimiokines qui vont permettre le recrutement de leucocytes. Une fois recrutés dans la tumeur, ces derniers vont produire des facteurs proangiogéniques (tels que le VEGF) qui vont favoriser la prolifération des cellules endothéliales et par la même la vascularisation de la tumeur (**Figure 17B**) (Kiefer and Siekmann, 2011).

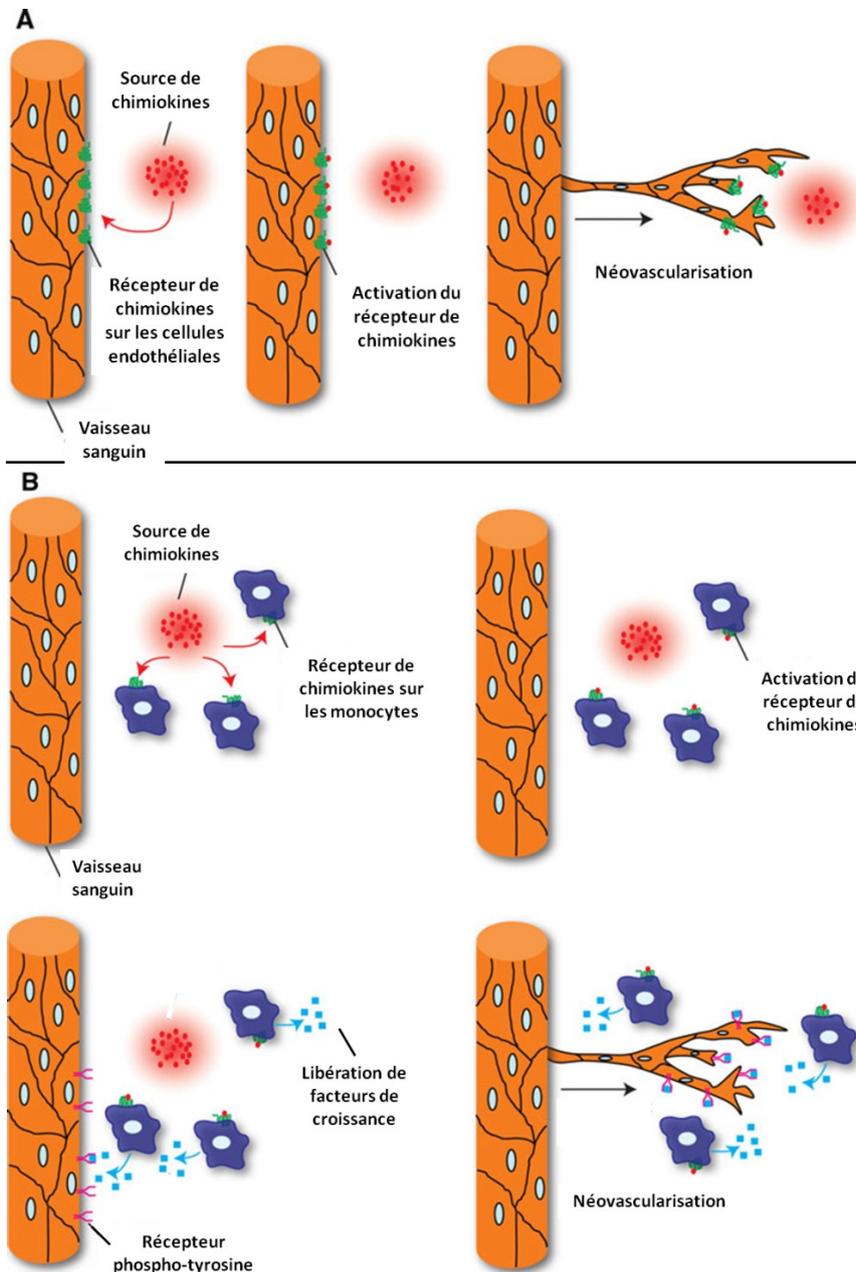
1. Les chimiokines CXC

Les membres de la sous-famille de chimiokines CXC sont décrits comme présentant l'un ou l'autre de ces deux effets contraires : pro- ou anti-angiogéniques. La distinction entre chimiokines ELR⁺ et ELR⁻ trouve ici tout son sens. Alors que les chimiokines ELR⁺ exercent des fonctions proangiogéniques, les chimiokines ELR⁻ exercent quant à elles des fonctions anti-angiogéniques (Strieter et al., 2005).

Les chimiokines ELR⁺ CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8 sont toutes des molécules angiogéniques capables d'induire la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Strieter et al., 1995, 2005). Ces dernières expriment les récepteurs CXCR1 et CXCR2 (Murdoch et al., 1999; Salcedo et al., 2000a) qui ont pour ligands agonistes ces chimiokines ELR⁺. Alors que CXCR2 reconnaît l'ensemble des chimiokines ELR⁺, le récepteur CXCR1 ne reconnaît que CXCL6, CXCL7 et CXCL8. Il est à noter que CXCR1 n'existe pas chez la souris (Addison et al., 2000). Cette observation, ajoutée à de nombreuses études, laisse penser que les chimiokines ELR⁺ exercent leur action angiogénique majoritairement via le récepteur CXCR2 (Kiefer and Siekmann, 2011; Strieter et al., 2005) et ce également dans l'angiogénèse tumorale (Keane et al., 2004; Keeley et al., 2010). Chez l'homme, CXCL8 (première chimiokine ELR⁺ décrite comme molécule proangiogénique) est capable d'induire la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Heidemann et al., 2003; Singh et al., 2011; Strieter et al., 1995) (CXCL8 n'est pas présente chez la souris). Il a ainsi été montré que CXCL8 peut participer à l'angiogénèse tumorale dans les cancers du sein, du pancréas, des ovaires, des poumons, de la prostate, du cerveau et de la tête et du cou (Ben-Baruch, 2012; Keeley et al., 2010).

Par ailleurs, les effets proangiogéniques de ces chimiokines ELR⁺ peuvent être modulés par la présence du **récepteur leurre DARC**. En effet, les ligands de CXCR2 peuvent également se lier à ce récepteur silencieux avec pour conséquences leur séquestration et donc leur

indisponibilité pour exercer leur rôle angiogénique sur les cellules endothéliales (Du et al., 2002). L'expression de DARC sur les cellules cancéreuses pourrait ainsi conduire à un développement moins important des tumeurs, comme cela a été montré dans un modèle murin de tumeur de la prostate (Shen et al., 2006).



D'après Kiefer F, *Cell. Mol. Life Sci* (2011) 68:2811-2830

Figure 17 : Rôles des chimiokines dans l'angiogénèse

A. Les chimiokines agissent directement sur les cellules endothéliales qui expriment des récepteurs de chimiokines en influençant la migration et la prolifération endothéliales et donc l'angiogénèse.

B. Les chimiokines influencent indirectement le comportement des cellules endothéliales en attirant les leucocytes au sein des tumeurs.

Les chimiokines ELR⁻ CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL14 sont des molécules angiostatiques (Keeley et al., 2011). Parmi celles-ci, **CXCL4** a été la première chimiokine décrite pour ses propriétés anti-angiogéniques (Maione et al., 1990). Par la suite, un variant non allélique a été découvert. Nommé **CXCL4L1**, il ne diffère de CXCL4 que par 3 acides aminés et présente une activité angiostatique plus importante que CXCL4 (Struyf et al., 2004). CXCL4L1 inhibe efficacement la chimiotaxie des cellules endothéliales induite par le bFGF (fibroblast growth factor) et par CXCL8, ainsi que l'angiogénèse tumorale dans des modèles murins de mélanome et de cancer pulmonaire (Struyf et al., 2004, 2007; Vandercappellen et al., 2011). Les chimiokines **CXCL9**, **CXCL10** et **CXCL11**, induites par les molécules d'interféron (IFN), inhibent l'angiogénèse stimulée par les chimiokines ERL⁺, le FGF et le VEGF (Arenberg et al., 1997; Soto et al., 1998; Strieter et al., 1995). Le principal récepteur décrit pour reconnaître ces chimiokines ERL⁻ est le récepteur CXCR3, qui existe chez l'homme sous trois formes différentes ; CXCR3A, CXCR3B et CXCR3-alt (variants d'épissage) ; la présence de ces variants chez la souris n'a pas encore été établie. Alors que la forme CXCR3A est impliquée dans le recrutement des leucocytes, la forme CXCR3B est exprimée par les cellules endothéliales (Salcedo et al., 2000a; Soto et al., 1998) et transmet les effets angiostatiques des chimiokines ERL⁻ (Lasagni et al., 2003; Romagnani et al., 2001; Salcedo et al., 2000a). Les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ont ainsi été décrites comme pouvant réduire l'angiogénèse des tumeurs (Strieter et al., 2005). **CXCL14** est la dernière chimiokine ERL⁻ aux propriétés angiostatiques mise en évidence (Shellenberger et al., 2004), mais son récepteur n'a pas encore été identifié. CXCL14 est décrite pour inhiber la chimiotaxie des cellules endothéliales en réponse à CXCL8, au bFGF et au VEGF (Shellenberger et al., 2004). Ainsi, dans un modèle de cancer de la prostate chez la souris, son expression par les cellules cancéreuses semble entraîner une réduction de la croissance tumorale (Schwarze et al., 2005).

La chimiokine CXCL12 possède quant à elle des propriétés proangiogéniques et constitue ainsi l'exception parmi les chimiokines ELR⁻. CXCL12 est reconnue par deux récepteurs : CXCR4 et CXCR7 qui sont tous deux impliqués dans les fonctions angiogéniques de cette chimiokine. Les premiers éléments suggérant que CXCL12, CXCR4 et CXCR7 sont des acteurs essentiels de la vascularisation proviennent des études de KO chez la souris. Dans ces modèles murins, l'absence de l'une de ces trois protéines est létale pour les animaux, et ce notamment en raison d'un défaut de vascularisation (Nagasawa et al., 1996; Sierro et al., 2007; Tachibana et al., 1998). L'implication de CXCR7 dans le processus de néovascularisation a été confirmée par les travaux de Miao *et al.* dans un modèle de zebra fish (poisson zèbre) (Miao et al., 2007). Concrètement, différentes études ont montré que CXCL12 pouvait stimuler directement la formation de nouveaux vaisseaux sanguins soit par son action via CXCR4 sur la migration et

l'activation des cellules endothéliales (Guleng et al., 2005; Salcedo et al., 1999), soit par son action via CXCR4 et CXCR7 sur le recrutement de progéniteurs endothéliaux (Dai et al., 2011; Petit et al., 2007; Yan et al., 2012). Par ailleurs, CXCL12 a été décrite pour stimuler indirectement la néovascularisation en induisant l'expression de facteurs proangiogéniques (tels que le VEGF, CXCL1 et CXCL8) par les leucocytes, les cellules endothéliales ou les cellules tumorales (Brand et al., 2005; Dwinell et al., 1999; Kijowski et al., 2001; Liang et al., 2007; Wang et al., 2008). Bien que deux études distinctes ont montré que le couple CXCL12/CXCR4 n'intervenait pas dans l'angiogénèse tumorale (Müller et al., 2001; Phillips et al., 2003), il est toutefois intéressant de noter qu'une étude clinique a montré que l'expression de CXCL12 et de CXCR4 était associée à la résistance au traitement par le Bevacizumab (anti-VEGF) chez des patients atteints d'un cancer du rectum, suggérant une implication forte de CXCL12 dans l'angiogénèse tumorale (Xu et al., 2009). Tout autrement, il a été montré que CXCR7 est surexprimé dans les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs de différents cancers (Goguet-Surmenian et al., 2013; Guillemot et al., 2012; Miao et al., 2007; Monnier et al., 2012). De ce fait, CXCR7 se voit aujourd'hui proposé comme marqueur de la vascularisation tumorale (Hattermann et al., 2010; Maishi et al., 2012). Ces derniers éléments feront l'objet d'une discussion dans la partie résultats de ce manuscrit.

2. Les chimiokines CCs

Certains membres de la sous-famille des CC chimiokines (CCL2, CCL11, CCL15, CCL16 et CCL23) ont également été identifiés comme promoteurs de l'angiogénèse (Hwang et al., 2004, 2005; Salcedo et al., 2000b, 2001; Strasly et al., 2004). La chimiokine CCL2 a été particulièrement impliquée dans l'angiogénèse tumorale (Keeley et al., 2011) où elle induit la migration des cellules endothéliales et la formation des tubes de migration, suite à l'activation de son récepteur CCR2 (exprimé par les cellules endothéliales) (Salcedo et al., 2000b). Deux études distinctes ont montré que les cellules cancéreuses peuvent produire CCL2 et que l'activation de CCR2 par CCL2 peut impacter directement l'angiogénèse et la croissance tumorales (Salcedo et al., 2000b; Stamatovic et al., 2006).

3. La chimiokine CX3CL1

La chimiokine CX3CL1 peut également réguler l'angiogénèse de manière directe (Imaizumi et al., 2004; Lee et al., 2006; Volin et al., 2001). Cependant son rôle dans l'angiogénèse tumorale semble plutôt indirect via le recrutement des macrophages (Lee et al., 2013).

4. *Le recrutement des leucocytes dans l'angiogénèse tumorale*

Les leucocytes infiltrant les tumeurs peuvent jouer un rôle déterminant dans l'angiogénèse tumorale (Murdoch et al., 2008) comme tel est le cas pour les TAMs et les TANs. Nous avons vu précédemment que leur recrutement dans le microenvironnement tumoral est dicté par diverses interactions moléculaires dont le dialogue entre les chimiokines et leurs récepteurs (**Tableau 7**). Les chimiokines peuvent donc participer indirectement à l'angiogénèse tumorale en recrutant les leucocytes.

Les macrophages associés aux tumeurs, lorsqu'ils se polarisent selon le phénotype M2, sont capables de promouvoir l'angiogénèse tumorale (**Figure 14**) (Murdoch et al., 2008; Owen and Mohamadzadeh, 2013). Parmi les travaux de référence, ceux de Lin *et al.* mettent en évidence que, dans un modèle murin de cancer du sein, la déplétion des macrophages diminue de 50% la densité vasculaire des tumeurs (Lin et al., 2006). Les propriétés angiogéniques des TAMs semblent dues à leur capacité à libérer dans le microenvironnement tumoral des facteurs angiogéniques tels que le VEGF, le PDGF, le TGF β et CXCL8. Les TAMs produisent également des protéases (métalloprotéinase-2 (MMP2), MMP7 et MMP9) (Coffelt et al., 2009; Dirkx et al., 2006; Mantovani and Sica, 2010). Parmi ces protéases, MMP9 a été identifiée comme étant un acteur majeur de la vascularisation des tumeurs (Deryugina and Quigley, 2010). MMP9 peut notamment permettre la libération du VEGF et du bFGF séquestrés sous forme inactive dans la MEC. Par ailleurs, alors qu'il a été montré que les TAMs s'accumulent plus particulièrement dans les zones hypoxiques de différents cancers dont les CCRs (Bailey et al., 2007; Murdoch et al., 2008), le défaut d'oxygène dans le microenvironnement conduit à la rétention des TAMs dans le tissu en diminuant l'expression des récepteurs CCR2 et CCR5 et en augmentant celle de CXCR4 à la surface des TAMs (Bosco et al., 2004; Schioppa et al., 2003; Sica et al., 2000).

Les neutrophiles associés aux tumeurs peuvent également stimuler l'angiogénèse. Les granules des neutrophiles contiennent un large cocktail de facteurs de croissance, de protéases et de chémoattractants, qui une fois libérés dans le microenvironnement ont un impact sur la vascularisation de la tumeur (Tazzyman et al., 2013). Les TANs contiennent notamment des quantités importantes de VEGF qui, lorsqu'il est libéré, peut directement activer les cellules endothéliales (Gaudry et al., 1997; Kusumanto et al., 2003). De façon intéressante, les neutrophiles circulants issus de patients présentant un carcinome spinocellulaire contiennent significativement plus de VEGF que les neutrophiles présents chez les patients contrôles (Jablonska et al., 2005). Les TANs sont également source de chimiokines angiogéniques (CXCL1, CXCL8) (Scapini et al., 2000), mais le lien précis entre les chimiokines produites par les TANs et

l'angiogénèse reste à approfondir. Enfin, les TANs libèrent dans le microenvironnement tumoral la métalloprotéinase MMP9, citée précédemment comme acteur majeur de l'angiogénèse tumorale. Toutefois, les effets proangiogéniques de MMP9 peuvent être contrebalancés par sa capacité à activer par clivage l'angiostatine, molécule angiostatique de référence (Patterson and Sang, 1997; Scapini et al., 2002).

En outre, du fait de la surexpression de nombreux facteurs proangiogéniques dans le microenvironnement tumoral et de l'efficacité des chimiokines à recruter les leucocytes dans les tumeurs, il est difficile de différencier *in vivo* les effets directs des chimiokines sur les cellules endothéliales de l'activité proangiogénique des leucocytes infiltrants.

iii. Les couples chimiokines/récepteurs : acteurs de la prolifération et de la migration tumorales

Les chimiokines peuvent réguler le développement tumoral (positivement ou négativement) de façon plutôt indirecte en dirigeant la migration leucocytaire ou en régulant l'angiogénèse tumorale. Cependant, les chimiokines peuvent également moduler la progression des cancers de manière directe en influençant invasion tumorale et métastases mais aussi survie et prolifération tumorales.

1. Rôle dans la dissémination métastatique

La dissémination des cellules tumorales au sein de l'organisme n'est pas un processus aléatoire mais est au contraire contrôlé par des mécanismes spécifiques de la tumeur d'origine et de l'organe secondaire dans lequel vont se développer les métastases (§I.B.iv). En 2001, Müller *et al.* ont mis en évidence pour la première fois l'implication des chimiokines dans la domiciliation organe-spécifique des cellules cancéreuses mammaires. Ils ont ainsi montré que les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR7 sont surexprimés par les cellules tumorales de cancer du sein (Müller et al., 2001). Les ligands correspondant à ces récepteurs (respectivement CXCL12 et CCL21) sont exprimés de manière constitutive dans les organes cibles des métastases de ces cancers (les ganglions lymphatiques (GGL), les poumons, le cerveau, le foie et la moelle osseuse). Les auteurs ont alors démontré que ces deux récepteurs jouaient un rôle déterminant dans la domiciliation des cellules tumorales mammaires dans les poumons et dans les GGL (Müller et al., 2001). Il est maintenant bien établi que l'expression des récepteurs de chimiokines par les cellules tumorales, associée à la production des ligands correspondants dans les organes, oriente la progression métastatique. Le nombre et la nature des récepteurs de chimiokines impliqués dans ce

processus dépendent à la fois de la tumeur d'origine et de l'organe secondaire concerné. Pour établir les rôles des chimiokines dans le processus métastatique, deux types d'approches ont été utilisées. La première approche consiste à étudier l'effet d'antagonistes de certaines chimiokines ou de leurs récepteurs sur le développement de métastases expérimentales chez l'animal (**Tableau 8**). La deuxième approche consiste à réaliser des études rétrospectives chez les patients atteints de cancer et de rechercher une corrélation entre la progression tumorale et l'expression des récepteurs de chimiokines.

Le récepteur CXCR4 est le récepteur de chimiokines qui a été le plus étudié dans la dissémination des cellules cancéreuses. Il est surexprimé dans plus de 20 cancers différents (Raman et al., 2011; Zlotnik et al., 2011) dont le cancer colorectal (Ottiano et al., 2005). Dans ce dernier, il a été rapporté qu'une forte expression de CXCR4 est associée à la présence de métastases au niveau des GGL (Schimanski et al., 2005) et au niveau du foie (Kim et al., 2006), ainsi qu'à une augmentation de la récurrence tumorale (Kim et al., 2005). Par ailleurs, une expression élevée de CXCR4 dans les CCRs est inversement corrélée à la survie des patients (Kim et al., 2006; Speetjens et al., 2009; Yopp et al., 2012). Dans le CCR, la neutralisation du récepteur CXCR4 dans un modèle de métastases hépatiques et pulmonaires a permis de démontrer que ce récepteur était plus impliqué dans le développement que dans la domiciliation des métastases (Zeelenberg et al., 2003). L'effet prolifératif en réponse à la fixation de CXCL12 à son récepteur a été démontré *in vitro* sur différentes lignées coliques humaines (Ottiano et al., 2005). Les modèles animaux de métastases expérimentales, dans lesquels des bloqueurs de CXCR4 ont été utilisés, ont largement été développés pour différents types de cancers. Ces travaux ont permis de démontrer le rôle crucial de l'axe CXCL12-CXCR4 dans le développement métastatique de nombreux cancers (**Tableau 8**).

La chimiokine CXCL12, ligand de CXCR4, peut également se lier spécifiquement au récepteur CXCR7. De la même manière que pour CXCR4, les modèles animaux ont mis en évidence que CXCR7 participerait au développement des tumeurs (**Tableau 8**). Dans divers cancers, l'altération de l'expression de CXCR7 a été corrélée à l'agressivité des tumeurs et/ou à une faible survie des patients (Bennani-Baiti et al., 2010; D'Alterio et al., 2010; Hao et al., 2012a; Schrevel et al., 2012; Wang et al., 2008, 2012). Cependant, seules trois études ont impliqué ce récepteur dans la mise en place des métastases. Ainsi, Miao *et al.* puis Grymula *et al.* ont respectivement montré que la surexpression de CXCR7 par les cellules tumorales faciliterait la croissance des métastases pulmonaires de cancer du sein (Miao et al., 2007) ainsi que la domiciliation des cellules cancéreuses humaines de rhabdomyosarcome dans la moelle osseuse (Grymula et al., 2010). Plus récemment, il a été montré que l'inhibition de CXCR7 par ARN

interférence dans les cellules de carcinome hépatocellulaire réduisait les métastases pulmonaires de ces cancers (Xue et al., 2012). En revanche, dans un modèle murin de métastases spontanées de cancer du sein, Hernandez *et al.* ont montré que, bien que CXCR7 facilite la croissance des tumeurs primaires, à l'inverse il diminue l'apparition des métastases pulmonaires (Hernandez et al., 2011).

Récepteurs	Modèles tumoraux	Résultats	Références
CXCR4	Cancer du sein et métastases	Inhibition de la croissance tumorale et des métastases pulmonaires	(Smith et al., 2004)
	Métastases pulmonaires, ganglionnaires et osseuses de cancer du sein	Inhibition des métastases	(Liang et al., 2004, 2005; Ma et al., 2009a; Müller et al., 2001; Richert et al., 2009; Tamamura et al., 2003)
	Cancer gastrique	Diminution de la croissance tumorale et de la carcinose péritonéale	(Yasumoto et al., 2006)
	Cancer du cerveau	Inhibition de la croissance tumorale	(Rubin et al., 2003; Yang et al., 2007)
	Cancer du pancréas	Diminution de la croissance tumorale	(Porvasnik et al., 2009)
	Métastases hépatiques et pulmonaires de cancer du pancréas	Inhibition des métastases	(Saur et al., 2005)
	Métastases pulmonaires de mélanome et de cancer des poumons	Diminution du nombre de métastases	(Kim et al., 2008; Takenaga et al., 2004)
	Cancer de la tête et du cou	Inhibe la croissance tumorale et les métastases pulmonaires	(Yoon et al., 2007)
	Cancer de l'ovaire	Diminution de la dissémination des cellules cancéreuses dans la cavité péritonéale	(Kajiyama et al., 2008)
CXCR7	Cancer des poumons	Inhibition de la croissance tumorale	(Burns et al., 2006)
	Lymphome	Augmentation de la survie	
	Cancer du sein et des poumons	Diminution de la croissance tumorale	
	Métastases pulmonaires de cancers du sein	Diminution des métastases	(Miao et al., 2007)
	Hépatocarcinomes	Inhibition de la croissance et de l'angiogénèse tumorales	(Zheng et al., 2010)
	Métastases de rhabdomyosarcome	Diminution des métastases	(Grymula et al., 2010)
	Cancer de la tête et du cou	Inhibition de la croissance et de l'angiogénèse tumorales	(Maussang et al., 2013)

Tableau 8 : Exemples d'études précliniques – Inhibition de la voie de signalisation CXCL12

Le récepteur CXCR3 semble également impliqué dans la dissémination métastatique de différents cancers. Ce récepteur a été montré pour être exprimé à la surface des cellules tumorales mammaires et pour participer activement à la mise en place des métastases de ces cancers dans les poumons (Walser et al., 2006). Ce récepteur a été plus récemment décrit comme étant un facteur de mauvais pronostic pour l'évolution des cancers du sein (Ma et al., 2009b). CXCR3 a été impliqué dans l'adressage des métastases de mélanome et de CCR au niveau des ganglions lymphatiques (Kawada et al., 2004, 2007) et dans l'adressage des métastases de CCR, de cancer du sein et d'ostéosarcome au niveau des poumons (Cambien et al., 2009; Ma et al., 2009b; Pradelli et al., 2009). CXCR3 ne participerait cependant pas à la domiciliation des métastases de CCR dans le foie (Cambien et al., 2009).

D'autres récepteurs de chimiokines ont aussi été identifiés pour leur rôle dans la domiciliation organe-spécifique des métastases. C'est le cas du récepteur CCR7 impliqué dans l'adressage des métastases de divers cancers (dont les CCRs) dans les GGL, ceux-ci exprimant constitutivement la chimiokine correspondante CCL21 (Ding et al., 2003; Günther et al., 2005; López-Giral et al., 2004; Mashino et al., 2002; Takanami, 2003). Le récepteur CCR6 est quant à lui décrit comme étant surexprimé dans les cancers coliques ainsi qu'au niveau des métastases hépatiques de ces cancers (Ghadjar et al., 2006; Rubie et al., 2006). Il est suggéré que CCR6 participerait à la mise en place des métastases au niveau du foie, où son ligand CCL20 est constitutivement exprimé. Un autre exemple remarquable est celui du récepteur CCR9 exprimé par les cellules tumorales de mélanome et qui corrèle avec la dissémination métastatique de ces cellules dans l'intestin grêle. Ce dernier est un organe secondaire rarement ciblé par les métastases mais qui exprime constitutivement CCL25, agoniste de CCR9 (Amersi et al., 2008; Letsch et al., 2004).

2. Rôle dans la survie et la prolifération des cellules tumorales

Les récepteurs de chimiokines à la surface des cellules cancéreuses peuvent transmettre à ces dernières bien plus que des signaux de migration. L'activation de certains récepteurs de chimiokines peut en effet favoriser la survie et la prolifération des cellules tumorales, que ce soit au niveau du site primaire ou au niveau des organes secondaires. La présence de chimiokines dans le microenvironnement des métastases peut donc permettre aux cellules tumorales, exprimant leurs récepteurs, de dépasser les programmes de mort cellulaire fréquemment observés lors de l'arrivée des cellules dans un nouvel organe et d'engager un processus de croissance tumorale (Mukaida and Baba, 2012; Verbeke et al., 2011).

Dans ce contexte, les chimiokines les mieux caractérisées sont les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL3 et CXCL8 qui fonctionnent comme des facteurs autocrines de croissance dans divers cancers (Brew et al., 2000; Dhawan and Richmond, 2002; Kollmar et al., 2007; Miyamoto et al., 1998; Schadendorf et al., 1993). De plus, dans les CCRs, le blocage de CXCR1 et de CXCR2 (récepteurs des chimiokines susdites) inhibe le développement des métastases hépatiques en diminuant la néovascularisation et en augmentant l'apoptose des cellules cancéreuses (Varney et al., 2011). Par ailleurs, l'effet de CXCL8 a été particulièrement étudié et il a été montré que CXCL8 était surexprimée dans les tumeurs coliques (Cui et al., 2009) ainsi que dans leurs métastases hépatiques (Rubie et al., 2007). Dans cette dernière étude l'expression de CXCL8 corrèle positivement avec le grade des tumeurs, suggérant une association étroite entre l'expression de CXCL8 et la progression tumorale et métastatique des CCRs.

Tout autrement, le récepteur CCR10 a été particulièrement impliqué dans la survie des cellules cancéreuses mélanocytaires. Ce récepteur est activé par son ligand CCL27 dont l'expression est restreinte au niveau de la peau. Ainsi, les cellules tumorales mélanocytaires CCR10⁺ résistent *in vitro* à l'apoptose lorsqu'elles sont exposées à CCL27. Un mécanisme similaire intervenant *in vivo* pourrait expliquer comment le traitement des tumeurs par un Ac anti-CCL27 inhibe la croissance des cellules cancéreuses (Murakami et al., 2003). CCL1 (Ruckes et al., 2001; Van Snick et al., 1996), CCL25 (Qiuping et al., 2004), CXCL8 (Francia di Celle et al., 1996) et CXCL12 (Burger et al., 2000) semblent être de la même manière impliquées dans la survie des cellules leucémiques. Le rôle de CXCL12 dans la mort par apoptose reste cependant controversé. Plusieurs études décrivent CXCL12 soit comme un répresseur d'apoptose, soit comme un inducteur d'apoptose (Mukaida and Baba, 2012; Verbeke et al., 2011). Le rôle pro-tumoral de CXCL12 dans divers cancers a toutefois été démontré via le blocage de ses récepteurs dans des études précliniques (**Tableau 8**).

Bien que les ligands de CXCR3 ont été largement décrits pour leurs fonctions angiostatiques, ils ont également été mis en cause dans la croissance, la survie et la migration des cellules cancéreuses (Singh et al., 2013). Il a d'abord été suggéré que la chimiokine CXCL10 pourrait favoriser la croissance tumorale (Suyama et al., 2005), puis il a été montré par la suite que cette chimiokine stimulait la prolifération et l'invasion tumorales (Melillo et al., 2005). Ces apparentes divergences d'actions (pro-tumorales, anti-tumorales) pourraient être liées à l'existence chez l'homme de deux variants de CXCR3, CXCR3-A et CXCR3-B (Strieter et al., 2005). Certains tissus, tels que le cœur, les reins et le foie expriment les deux variants. D'autres tissus, comme le placenta, expriment sélectivement CXCR3-A et les cellules endothéliales micro-vasculaires CXCR3-B. L'engagement de CXCL10 par le récepteur CXCR3-A conduit à la

prolifération cellulaire et à la chimiotaxie (Datta et al., 2006; Kawada et al., 2004; Lo et al., 2010), alors que la liaison de CXCL10 à CXCR3-B semble inhiber la prolifération (Lasagni et al., 2003; Strieter et al., 2005). Ainsi, le profil d'expression des deux variants de CXCR3 peut moduler les effets de leurs ligands sur la croissance tumorale.

iv. Les couples chimiokines/récepteurs et les fibroblastes associés aux tumeurs

Les fibroblastes associés aux tumeurs (CAFs) sont des acteurs importants du microenvironnement tumoral. Les CAFs fournissent à la tumeur des facteurs essentiels à son évolution, entraînant prolifération et invasion tumorales (Shimoda et al., 2010). Les chimiokines, via leurs récepteurs, ne sont pas étrangères aux fonctions qu'exercent les CAFs sur les cellules cancéreuses. Elles sont en effet impliquées d'une part dans l'établissement des CAFs sur le site tumoral et d'autre part dans la communication entre les CAFs et les cellules cancéreuses (Mishra et al., 2011).

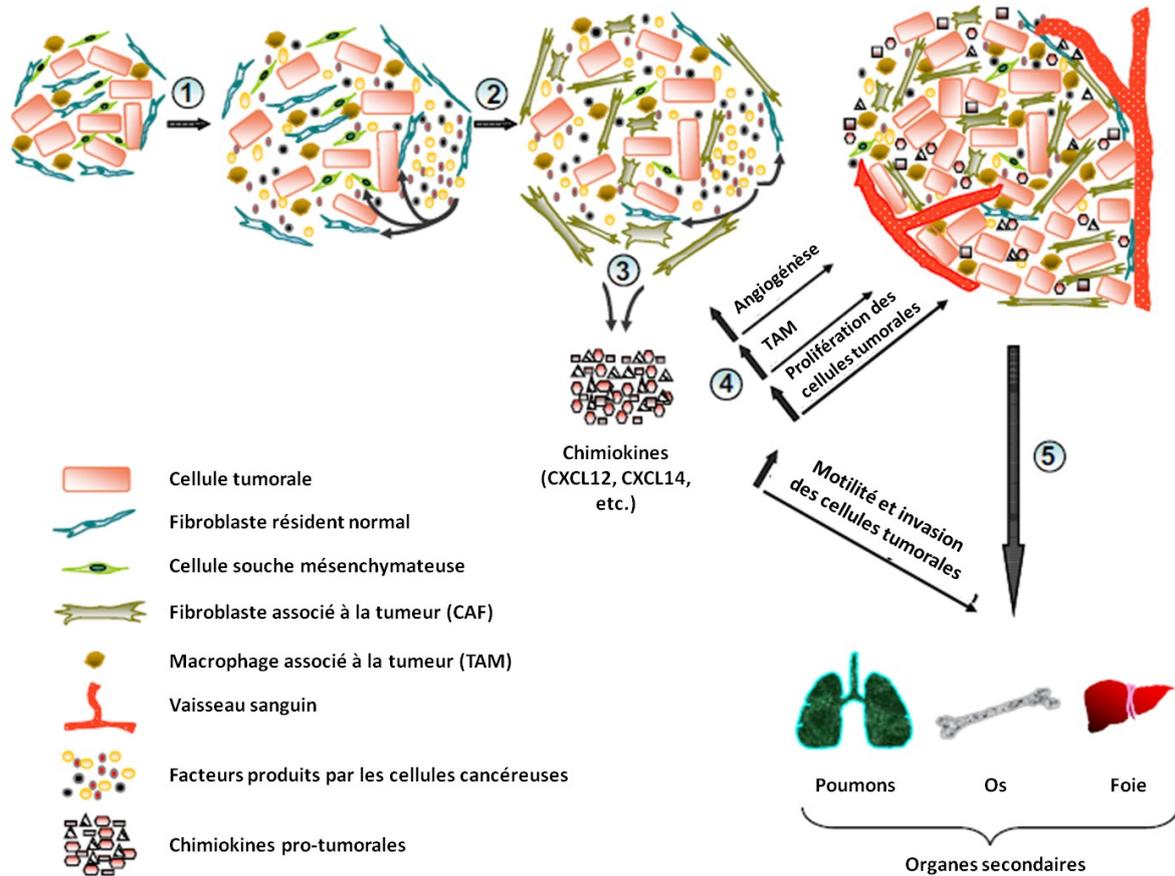
Tout d'abord, il est à noter que les CAFs trouvent en partie leur origine dans le recrutement sur le site tumoral de cellules souches mésenchymateuses (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) associées à la moelle osseuse. Il a été montré dans divers cancers, notamment dans des modèles murins de cancers gastriques, que les MSCs peuvent représenter jusqu'à 20% des CAFs du microenvironnement tumoral (Guo et al., 2008; Quante et al., 2011). Bien que les mécanismes précis ne soient pas encore connus, les chimiokines CXCL12 et CCL2 semblent être impliquées dans la domiciliation tumorale des MSCs (Dwyer et al., 2007). Dans un modèle élégant de tumeur gastrique, les travaux de Michael Quante en 2011 ont montré que l'inhibition de CXCR4 entraîne la diminution du recrutement des MSCs sur le site tumoral, évoquant un rôle significatif de l'axe CXCL12/CXCR4 dans ce processus (Quante et al., 2011).

En outre, les CAFs peuvent également provenir de l'activation des fibroblastes résidents dans le tissu avant la transformation tumorale. Ceci a notamment été démontré dans le cancer du sein où les fibroblastes résidents peuvent co-évoluer avec les cellules cancéreuses en établissant des boucles de signalisation autocrines via le TGF β , mais également via CXCL12 et son récepteur CXCR4 (tous deux exprimés par les CAFs), cette boucle étant nécessaire à l'activation et au maintien des CAFs (Kojima et al., 2010).

Par ailleurs, suite au recrutement des MSCs ou à l'activation des fibroblastes résidents par les cellules cancéreuses, les CAFs sécrètent divers facteurs de croissance et cytokines qui vont stimuler et soutenir les processus tumoraux (néoangiogénèse, prolifération tumorale et métastases) (Polanska and Orimo, 2013). Certaines chimiokines ont particulièrement été mises en évidence

pour leur influence sur les différents processus du cancer. Dans ce contexte, l'axe CXCL12-CXCR4 a été particulièrement étudié et son implication apparaît aujourd'hui comme évidente (Mishra et al., 2011). Pour exemple, l'étude des CAFs associés à des cellules cancéreuses mammaires métastatiques a montré que la production de CXCL12 par les CAFs stimule la prolifération des cellules cancéreuses voisines et stimule également l'angiogénèse en recrutant des progéniteurs endothéliaux sur le site tumoral (Matsusue et al., 2009; Orimo et al., 2005). De façon intéressante, l'étude de l'impact du polymorphisme de la chimiokine CXCL12 sur les propriétés métastatiques des cellules cancéreuses de tumeurs colorectales a montré que la forme CXCL12-G801A pourrait augmenter l'expression au niveau ARN de CXCL12 par les CAFs et que cette expression de CXCL12 serait un marqueur prédictif de la formation des métastases au niveau des ganglions lymphatiques dans les CCRs (Chang et al., 2009). Néanmoins, diverses études ont également mis en avant d'autres chimiokines (telles que CCL2, CCL5, CCL7, CXCL8 et CXCL14) produites par les CAFs et ayant un effet pro-tumoral (Mishra et al., 2011). Ainsi, le groupe d'Arne Ostman (Augsten et al., 2009) a mis en évidence que la molécule CXCL14 sécrétée par les CAFs joue un rôle majeur dans l'évolution du cancer de la prostate. Les auteurs ont montré que les CAFs issus de tissus tumoraux humains de cancer de la prostate surexpriment la chimiokine CXCL14 comparés aux fibroblastes normaux. Cette expression de CXCL14 agit de manière autocrine sur les CAFs en stimulant leur prolifération. La chimiokine CXCL14 stimulerait de plus la prolifération des cellules cancéreuses, le recrutement des macrophages sur le site tumoral et l'angiogénèse tumorale. Par leurs travaux, les auteurs mettent en lumière un rôle pro-tumoral de CXCL14 produit par les CAFs. Ce dernier résultat est surprenant du fait des études citées précédemment sur le rôle de CXCL14 (chimiokine ELR⁻) dans l'angiogénèse tumorale. Il est à rappeler ici que le récepteur de CXCL14 n'est pas encore identifié. Les interprétations des différents travaux sur CXCL14 doivent donc être examinées avec attention.

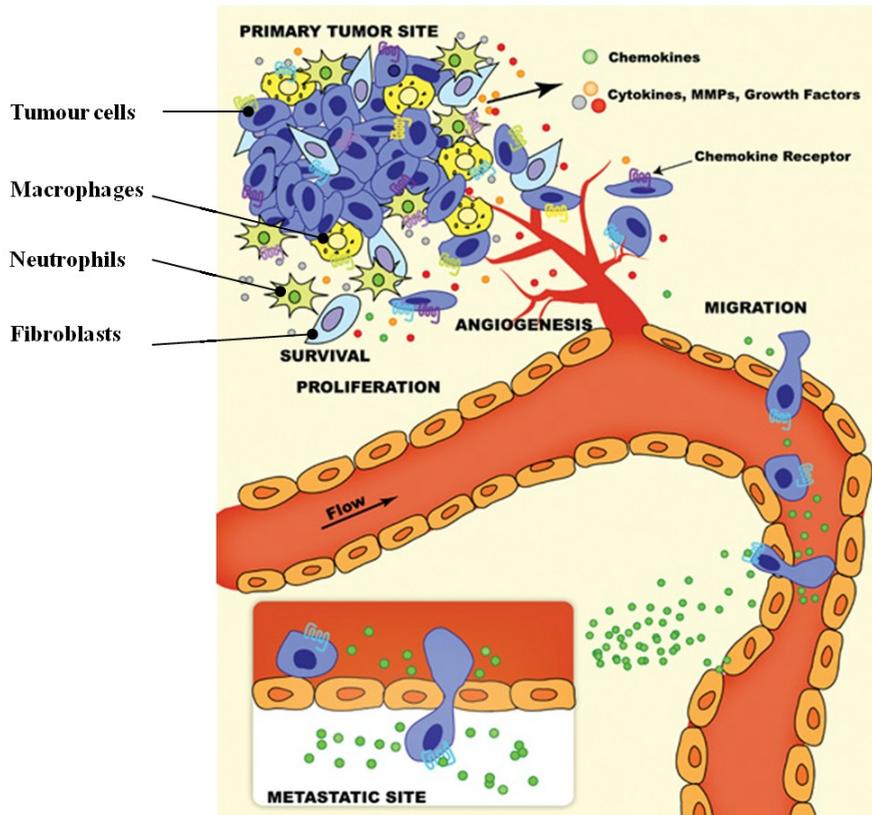
En résumé, comme illustré dans la **figure 18**, lors des premières phases de la progression tumorale, les cellules cancéreuses induisent la différenciation des fibroblastes résidents ou des MSCs en CAFs, donnant lieu à une présence importante des CAFs au niveau du site tumoral (**étapes 1 et 2**). Les CAFs générés libèrent une variété de chimiokines possédant des propriétés pro-tumorales (**étape 3**). Les chimiokines issues des CAFs augmentent ainsi l'angiogénèse et favorisent le recrutement des TAMs sur le site tumoral. Elles agissent également sur les cellules tumorales elles-mêmes en stimulant leur prolifération et leur migration (**étape 4**). L'accumulation des éléments pro-tumoraux propres aux cellules cancéreuses et aux cellules du microenvironnement tumoral, en supplément de l'activité pro-tumorale des différentes chimiokines présentes, aboutit à une prolifération tumorale plus importante et à la formation de métastases dans des organes secondaires tels que les poumons, les os et le foie (**étapes 4 et 5**).



D'après Mishra P, J Leukoc Biol. (2011) 89(1) :31-9

Figure 18 : Les interactions bidirectionnelles entre les CAFs et la tumeur conduisent à la libération de chimiokines pro-tumorales

En conclusion, les rôles des chimiokines et de leurs récepteurs dans la biologie du cancer peuvent se résumer en trois types d'action : (i) fournir des signaux de survie et de croissance, (ii) fournir des signaux directionnels pour la migration (invasion et métastase) et (iii) moduler le microenvironnement tumoral. Ils exercent donc de multiples actions aboutissant soit à des effets anti-tumoraux, soit à des effets pro-tumoraux (**Figure 19**).



D'après O'Hayre M, Biochem. J. (2008) 409 :635–649

Figure 19 : Schéma illustrant le rôle pro-tumoral des chimiokines au cours des différentes étapes du cancer

Au sein de la tumeur, les cellules tumorales produisent des chimiokines qui recrutent les leucocytes. Les cellules tumorales sont ainsi entourées par un microenvironnement cellulaire qui comprend des fibroblastes mais également des macrophages, neutrophiles et autres cellules du système immunitaire. Les chimiokines produites par les cellules tumorales et le microenvironnement servent à recruter les cellules endothéliales et favorisent donc l'angiogénèse. Toutes ces cellules produisent également d'autres cytokines, facteurs de croissances et protéases qui augmentent la croissance, la prolifération et l'angiogénèse tumorales. La dissémination des cellules tumorales est facilitée par la surexpression de récepteurs de chimiokines particuliers (tels que CXCR4) à la surface des cellules tumorales. Ces récepteurs leur permettent de migrer dans des organes secondaires où leurs ligands sont exprimés. De manière similaire au site primaire, les boucles autocrines et paracrines des chimiokines dans le microenvironnement peuvent être particulièrement importantes pour la survie et la croissance des cellules disséminées.

Afin de produire ses effets, un récepteur de chimiokines peut reconnaître de multiples ligands. Une chimiokine quant à elle peut activer plusieurs récepteurs pour obtenir une réponse biologique. De manière plus subtile, un même ligand peut exercer des fonctions antagonistes en fonction du récepteur auquel il se lie et selon la cellule cible exprimant le récepteur. Ceci est particulièrement illustré dans le cas du trio de récepteurs CXCR3, CXCR4 et CXCR7 activés par CXCL11 et/ou CXCL12. Dans cette deuxième partie d'introduction, nous avons vu leurs différents effets sur la prolifération tumorale, le développement des métastases ou bien encore dans l'angiogénèse tumorale. Les relations entre ces trois récepteurs et leurs ligands sont schématisées dans la **figure 20** (Singh et al., 2013) et seront abordées dans la discussion des résultats du projet « CXCR7 ».

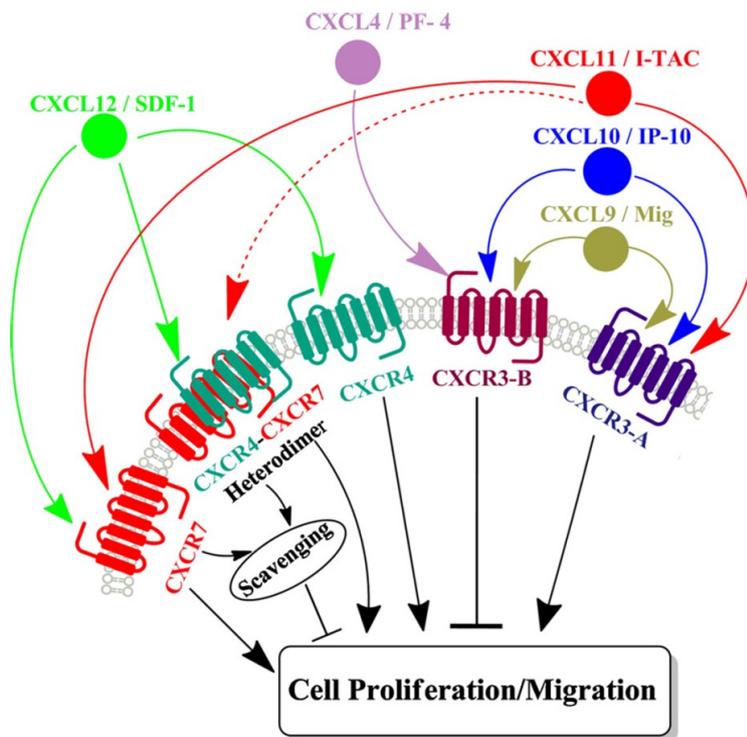


Figure 20 : Représentation schématique des interactions au sein du trio de récepteurs CXCR3, CXCR4 et CXCR7

CXCR4, CXCR7, CXCR3 et leurs ligands CXCL12, CXCL11, CXCL9, CXCL10 et CXCL4 sont exprimés dans le microenvironnement tumoral par les cellules tumorales elles-mêmes, les cellules endothéliales et d'autres cellules. La réponse biologique dépendra de la nature des différentes interactions dans le dialogue entre ces trois récepteurs.

D'après Singh AK, Cytokine Growth factor Reviews (2013) 24 :41-49

III. Les chimiokines et leurs récepteurs comme cibles thérapeutiques des cancers

L'apport des agents ciblés à l'arsenal préexistant des chimiothérapies et des radiothérapies représente une avancée significative dans les traitements de plusieurs cancers. Dans certains types de cancers sans option thérapeutique efficace, ces agents deviennent la première ligne de traitement (exemple du Bevacizumab dans les glioblastomes). Malheureusement, dans certains cas, comme les cancers colorectaux métastasés, les bénéfices en termes de survie restent modestes, incitant alors à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces. Les connaissances sur le rôle des chimiokines et de leurs récepteurs dans les différentes étapes du développement tumoral, font d'eux des molécules cibles de choix dans les traitements anticancéreux.

A. Le blocage des chimiokines/récepteurs utilisé comme stratégie anticancéreuse

Lorsque les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans la survie, la prolifération, l'invasion des cellules cancéreuses, la domiciliation dans les organes secondaires ou encore dans l'angiogénèse tumorale, la rupture de leur voie de signalisation (en bloquant la chimiokine ou le récepteur) apparaît comme une stratégie thérapeutique pertinente. Le ciblage des récepteurs de chimiokines peut notamment prévenir la domiciliation des cellules tumorales dans les niches métastatiques. Les résultats des études précliniques chez l'animal démontrent que les composés ou anticorps qui bloquent certaines chimiokines ou certains récepteurs de chimiokines peuvent être des molécules anticancéreuses efficaces (**Tableau 9**).

Parmi les couples chimiokines/récepteurs ciblés, l'axe CXCL12/CXCR4 a été particulièrement étudié et ce dans différents cancers. Dans ce but, de nombreux agents ont été développés pour cibler la voie de signalisation de CXCL12 (**Tableau 8 §II.B.iii.**) ; que ce soit des Ac neutralisants anti-CXCR4 (Müller et al., 2001), des ARNs interférents dirigés contre CXCR4 (Liang et al., 2005) ou contre CXCR7 (Miao et al., 2007), des petites molécules antagonistes de CXCR4 (De Clercq, 2003, 2005) ou de CXCR7 (Burns et al., 2006) ou bien encore des petits peptides bloquant spécifiquement CXCR4 (Liang et al., 2004; Tamamura et al., 2003). De la même manière, un Ac anti-CXCL12 humanisé a été très récemment développé. Dans des modèles expérimentaux chez l'animal, cet Ac inhibe notamment la croissance tumorale *in vivo* des lymphomes et réduit les métastases pulmonaires de cancer du sein (Zhong et al., 2013).

Chimiokines	Modèles tumoraux	Résultats	Références
CCL2	Cancer de la prostate	Diminution de la croissance et de l'angiogénèse tumorale <i>in vivo</i>	(Zhang et al., 2010)
	Métastases osseuses de cancer de la prostate	Combinaison anti-CCL2 et chimiothérapie (docetaxel)	(Rozel et al., 2009)
	Métastases de cancer du sein	Inhibition des métastases et augmentation de la survie des animaux	(Qian et al., 2011)
CXCL5, CXCL8	Cancer des poumons à non petites cellules	Diminution de la taille des tumeurs et de la densité vasculaire	(Arenberg et al., 1996, 1998)
CXCL8	Mélanome	Inhibition de la croissance, de l'invasion et de l'angiogénèse tumorale	(Huang et al., 2002; Melnikova and Bar-Eli, 2006; Zigler et al., 2008)
	Cancer de la vessie	Diminution de la croissance tumorale <i>in vivo</i>	(Mian et al., 2003)
	Cancer du pancréas	Diminution de la croissance et de l'angiogénèse tumorale <i>in vivo</i>	(Shi et al., 1999)
Récepteurs	Modèles tumoraux	Résultats	Références
CCR1	Myélome multiple	Contrôle du développement tumoral et prévient l'ostéolyse associée au myélome multiple	(Vallet and Anderson, 2011)
CCR1, CCR5	Cancer du sein (Met-CCL5 : antagoniste CCR1 et CCR5)	Inhibition de la croissance tumorale (diminution infiltration des MPs)	(Robinson et al., 2003)
CCR4	Lymphome	Activité anti-tumorale médiée par une ADCC efficace	(Ito et al., 2009)
CXCR1, CXCR2	Mélanome	Diminution de la prolifération tumorale, de l'invasion et de la chimiotaxie <i>in vivo</i>	(Singh et al., 2009)
	Métastases hépatiques CCR	Inhibition des métastases et non de la croissance de la tumeur primaire	(Varney et al., 2011)
CXCR3	Métastases pulmonaires de CCR, de cancer du sein et d'ostéosarcome	Inhibition des métastases	(Cambien et al., 2009; Ma et al., 2009b; Pradelli et al., 2009; Walser et al., 2006)
	Métastases ganglionnaires de mélanome		(Kawada et al., 2004)

Tableau 9 : Exemples d'études précliniques – Inhibition des voies de signalisation chimiokines/récepteurs

ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity, MP = macrophage

Ces travaux chez l'animal ont donné des résultats encourageants. Ainsi, de nombreuses études tendent à montrer que les agents anti-CXCL12 peuvent significativement retarder la croissance de la tumeur primaire et de ses métastases. Bien que les antagonistes de CXCL12 inhibent la croissance tumorale dans certains cas (Porvasnik et al., 2009; Rubin et al., 2003), ils ont été montrés comme inefficaces dans d'autres (Kioi et al., 2010; Kozin et al., 2010; Redjal et al., 2006). Ces travaux suggèrent ainsi que le blocage de la voie de signalisation CXCL12 seule n'est peut-être pas suffisant (excepté pour certaines tumeurs solides) et doit être envisagé en association avec d'autres traitements (Duda et al., 2011).

De plus, des études récentes ont mis en évidence que l'activation de la voie de signalisation CXCL12 peut représenter un mécanisme potentiel de résistance des cellules cancéreuses aux traitements conventionnels et aux thérapies ciblées (Duda et al., 2011). Les données cliniques et précliniques s'accordent pour souligner la nécessité de développer des stratégies thérapeutiques ciblant CXCL12 en combinaison avec les chimiothérapies et thérapies ciblées existantes (**Tableau 10**).

Les agents bloquant la voie CXCL12 incluent l'AMD3100 (Plerixafor), le plus ancien antagoniste de CXCR4, qui est aujourd'hui approuvé dans le cadre d'une utilisation clinique pour la mobilisation des cellules souches chez les patients atteints de leucémies (De Clercq, 2009). Du fait de la découverte relativement récente des chimiokines, seules quelques molécules bloquant les chimiokines ou leurs récepteurs sont actuellement à l'étude dans des essais cliniques en vue de possibles applications anticancéreuses :

- Essais cliniques pour tester un Ac anti-CCL2 dans les tumeurs solides (Sandhu et al., 2013) (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT01204996 et NCT00992186).
- Essais cliniques pour tester un Ac anti-CCR4 (KW-0761) chez des patients atteints de leucémie et de lymphome dans lesquels les lymphocytes sont CCR4 positifs (exemple phase III : ClinicalTrials.gov identifier: NCT01728805) (Ishida et al., 2012; Ito et al., 2009; Tobinai et al., 2012).
- Essais cliniques anti-CXCR4 en cours pour la leucémie myéloïde aigüe, le myélome multiple ainsi que les gliomes (exemple ClinicalTrials.gov identifiers: NCT01339039) (Domanska et al., 2013).

Traitements	Données précliniques	Données cliniques
Radiothérapie	Augmentation de CXCL12 après traitements aux rayons de glioblastomes, de cancers des poumons et du sein ; le blocage de CXCR4 agit en synergie avec la radiothérapie (Kioi et al., 2010; Kozin et al., 2010; Tabatabai et al., 2006).	
Chimiothérapie	Le blocage de CXCR4 agit en synergie avec la chimiothérapie (BCNU) des glioblastomes (Redjal et al., 2006). Augmentation de CXCL12 circulant après traitement au paclitaxel de cancers du sein (Shaked et al., 2008). Le blocage de CXCR4 agit en synergie avec le cyclophosphamide dans le cancer des poumons (Murakami et al., 2009).	BCNU : 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea L'expression de CXCR4 est positivement corrélée au pronostic des patients atteints d'un cancer des poumons traités par chimiothérapie (Holm et al., 2009).
Thérapie anti-angiogénique	Le sunitinib augmente CXCL12 circulant (dans les souris sans tumeur et avec tumeur mammaire) (Ebos et al., 2007) <i>Sunitinib = inhibiteur récepteurs VEGF et PDGF</i>	Augmentation de la production de CXCL12 et de CXCR4 par les cellules cancéreuses après un traitement par le bevacizumab chez des patients atteints de cancers rectaux métastasés (Xu et al., 2009) Après le traitement par le sunitinib d'hépatocarcinomes, augmentation de CXCL12 circulant associé à une survie faible (Zhu et al., 2009) Augmentation de CXCL12 circulant après traitement par le cediranib ou le vatalanib associée à de mauvais pronostics dans les glioblastomes (Batchelor et al., 2010; Gerstner et al., 2011)

D'après Duda DG et al. Clin Cancer Res (2011) 17(8) :2074-2081

Tableau 10 : Données cliniques et précliniques sur l'implication de CXCL12 dans la résistance aux traitements anticancéreux

B. Utilisation des chimiokines comme 'médicaments' anticancéreux

Le pouvoir anti-tumoral du système immunitaire peut constituer une arme puissante dans l'élimination des tumeurs. Les stratégies d'immunothérapie visent alors à recruter et/ou activer les leucocytes sur le site de la tumeur afin de déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Étant données les propriétés chémoattractantes des chimiokines vis à vis les différentes populations leucocytaires, leur utilisation dans les stratégies d'immunothérapie apparaît comme pertinente. Certaines auront également comme avantage de limiter voire d'empêcher l'angiogénèse tumorale (Homey et al., 2002; Lechner et al., 2011).

Une des premières approches à consister à transférer les gènes codant pour certaines chimiokines dans les cellules tumorales, puis à évaluer la capacité de ces chimiokines à modifier le recrutement des leucocytes dans les tumeurs dans des modèles précliniques de cancers chez

l'animal. Ainsi, dans de nombreux modèles expérimentaux de tumeurs induites chez la souris, les cellules tumorales utilisées ont été modifiées génétiquement afin d'exprimer ou de surexprimer des chimiokines dans le but de stimuler le recrutement intra-tumoral des leucocytes et d'amplifier la réponse immune anti-tumorale de l'hôte. Dans ces essais précliniques, une diminution de la tumorigénicité des cellules tumorales a été observée, suite au recrutement et à l'activation des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺, des cellules NK et/ou des cellules dendritiques. Ces résultats ont été observés pour la surexpression de CCL5 ou de CX3CL1 dans les lymphomes (Lavergne et al., 2003, 2004), de CCL7 dans le mélanome (Fioretti et al., 1998; Wetzel et al., 2007), de CCL16 ou CCL19 dans le cancer du sein (Braun et al., 2000; Giovarelli et al., 2000) et de CX3CL1 dans le cancer des poumons, les neuroblastomes et dans l'hépatocarcinome (Guo et al., 2003a, 2003b; Tang et al., 2007; Zeng et al., 2005). Dans le cancer colorectal, des expériences similaires ont été réalisées avec CCL3, CCL20, CCL21 ou CX3CL1 (Crittenden et al., 2003; Vicari et al., 2000; Xin et al., 2005). De façon intéressante, le laboratoire a également montré que la transduction de CX3CL1 par les cellules cancéreuses coliques C26 diminuait le développement tumoral dans un modèle de tumeur sous-cutanée et dans des modèles de métastases expérimentales au niveau du foie et des poumons (Vitale et al., 2007).

Par ailleurs, afin d'envisager une utilisation en clinique des chimiokines dans les thérapies anticancéreuses, l'administration de chimiokines d'intérêt comme 'médicament' anticancéreux a été développée. Une des stratégies privilégiées est celle du transfert de gènes codant pour une chimiokine d'intérêt au niveau de tumeurs préétablies. Quelques exemples d'études chez l'animal sont donnés dans le **tableau 11**. Les effets anti-tumoraux sont concluants et la nature des populations leucocytaires impliquées dépend des chimiokines administrées, mais également du modèle tumoral étudié. En plus de ces essais précliniques, il est intéressant de citer ici une étude chez des patients atteints de neuroblastomes auxquels a été administré un adénovirus codant pour la chimiokine XCL1 et la cytokine IL-2 (Rousseau et al., 2003). Chez tous les patients inclus dans cette étude, un recrutement massif de lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ et de cellules de Langerhans a été observé au niveau du site d'injection. Six patients sur vingt et un ont présenté une augmentation significative de l'activité cytolytique des cellules NK. Deux patients ont été déclarés en rémission complète et un patient a présenté une réponse partielle. Cette combinaison chimiokine/cytokine peut donc induire une réponse immunitaire anti-tumorale efficace et ce, avec une faible toxicité pour l'homme. Ces stratégies d'immunothérapie couplées aux stratégies thérapeutiques existantes offrent des perspectives encourageantes et doivent continuer à être développées (Franciszkiewicz et al., 2012).

Chimiokines	Modèles tumoraux	Technique de libération des chimiokines sur le site tumoral	Leucocytes infiltrants impliqués dans la réponse immunitaire	Résultats	Références
CCL16	Cancer du sein	Adénovirus injecté dans les tumeurs	Lymphocytes T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ et cellules dendritiques	Diminution de la taille des tumeurs et de la formation de métastases spontanées	(Guiducci et al., 2004, 2005)
CCL17	Cancer du côlon	Adénovirus injecté dans les tumeurs	Lymphocytes T CD8 ⁺ et macrophages	Régression tumorale	(Kanagawa et al., 2007)
CCL20	Cancer des poumons, cancer colorectal et mélanome	Adénovirus injecté dans les tumeurs sous-cutanées	Lymphocytes T CD8 ⁺ et cellules dendritiques	Diminution de la taille des tumeurs et augmentation de la survie des animaux	(Fushimi et al., 2000)
CCL22	Cancer des poumons	Adénovirus injecté dans les tumeurs	Lymphocytes T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ et cellules dendritiques	Régression tumorale	(Guo et al., 2002)
CXCL9, CXCL10	Cancer du sein et fibrosarcome	Injection intra-tumorale de 2 adénovirus codant CXCL9 ou CXCL10 et l'IL-12 respectivement	Non décrit	Régression tumorale et augmentation de la survie des animaux	(Palmer et al., 2001)
CXCL10	Hémangiosarcome métastatique	Parvovirus injecté dans les tumeurs ou dans le péritoine	Lymphocytes T cytotoxiques IFN γ ⁺	Inhibition de la progression tumorale	(Giese et al., 2002)
	Cancer colorectal (CCR)	Injection intra-tumorale de 2 adénovirus codant CXCL10 et l'IL-12 respectivement	Lymphocytes T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ et cellules NK	Éradication de 100% des tumeurs	(Narvaiza et al., 2000)
	Myélome	Injection intra-tumorale de 2 adénovirus codant CXCL10 et l'IL-18 respectivement	Lymphocytes T CD4 ⁺ , CD8 ⁺	Régression de tumeurs préétablies	(Liu et al., 2002)
CX3CL1	Métastases pulmonaires de CCR et d'ostéosarcome	Plasmide codant CX3CL1 formulé avec un copolymère à bloc administré par aérosol	Non décrit	Inhibition des métastases pulmonaires	(Richard-Fiardo et al., 2011)
XCL1	Cancer du sein	Injection intra-tumorale d'un adénovirus codant XCL1 et l'IL-2 ou adénovirus codant XCL1 et IL-12	Lymphocytes T CD4 ⁺ , CD8 ⁺	Régression tumorale	(Emtage et al., 1999)

Tableau 11 : Exemples d'études précliniques de transfert de gène – Administration de chimiokines comme 'médicament' anticancéreux

RÉSULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Les chimiokines et leurs récepteurs, des acteurs pro-tumoraux : implication du récepteur de chimiokines CXCR7 dans le processus métastatique

Le récepteur CXCR7 facilite la progression des carcinomes coliques au niveau des poumons et non au niveau du foie

*Cette étude a fait l'objet d'une publication dans British Journal of Cancer en décembre 2012
Guillemot E, et al. Br J Cancer (2012) 107(12):1944-9 (Article I)*

A. Présentation du sujet

Le développement des métastases reste la principale cause de décès due au cancer. Dans le cancer colorectal, les organes privilégiés par les métastases sont majoritairement le foie (50% des patients) et dans une moindre mesure les poumons (15% des patients). La formation des métastases à partir d'une tumeur primaire est l'aboutissement d'une longue série d'étapes séquentielles liées les unes aux autres. La finalité de ce processus relève à la fois des propriétés intrinsèques des cellules tumorales mais également du microenvironnement tumoral. Au cours du processus métastatique, les cellules tumorales doivent être capables de se détacher de la tumeur primaire et d'entrer dans le flux sanguin afin d'atteindre les organes cibles secondaires. Après cette phase d'intravasation, les cellules tumorales s'arrêtent au niveau des parois des vaisseaux sanguins, migrent au travers de l'endothélium et de la membrane basale afin d'envahir le tissu cible. Une fois dans l'organe secondaire, les cellules cancéreuses doivent survivre dans un nouvel environnement et proliférer pour former une masse tumorale (Chambers et al., 2002). Les chimiokines et leurs récepteurs ont récemment été impliqués dans le succès des différentes phases du développement tumoral (Mukaida and Baba, 2012). L'équipe de Zlotnik a été l'une des premières à suggérer que l'implantation des métastases était contrôlée, au moins en partie, par des interactions entre les récepteurs de chimiokines exprimés par les cellules tumorales et les chimiokines homéostatiques produites par les organes cibles en conditions physiologiques normales (Müller et al., 2001).

La chimiokine CXCL12 et son récepteur CXCR4, largement étudiés, ont été clairement impliqués pour leurs effets pro-tumoraux dans plusieurs cancers, et notamment dans le processus

métastatique. Dans le cancer colorectal, CXCR4 est associé à une dissémination des cellules tumorales au niveau du foie et des ganglions lymphatiques (Kim et al., 2006; Schimanski et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que CXCL12 était également reconnu par le récepteur CXCR7 (Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006). Des études récentes mettent en évidence le rôle critique de CXCR7 dans la croissance tumorale *in vivo* de différents cancers (Hou et al., 2010). Nous avons donc décidé de rechercher l'implication de CXCR7 et de ses ligands dans le développement métastatique du cancer colorectal au niveau du foie et des poumons. Dans cette étude, nous nous sommes appuyées sur des biopsies de tissus tumoraux et métastatiques de patients ainsi que sur des modèles de métastases expérimentales de cancer colorectal chez la souris. L'objectif de ce travail visait à déterminer si l'axe CXCR7/ligands pouvait représenter une cible thérapeutique efficace dans le traitement des métastases de cancers colorectaux.

B. Résumé des résultats obtenus

A partir de biopsies humaines de tumeurs coliques primaires, nous avons montré que CXCR7 - ainsi que ses ligands CXCL11 et CXCL12 - étaient surexprimés au niveau ARNm dans les cancers colorectaux (CCRs) comparés aux tissus sains. Une analyse immuno-histochimique de résections chirurgicales de CCRs primaires et métastatiques (foie et poumons), a mis en évidence que la protéine CXCR7 était exprimée dans le cytoplasme des cellules endothéliales associées à la tumeur, mais n'était pas exprimée par les cellules tumorales elles-mêmes. L'expression de la protéine CXCR7 n'a pas été observée dans les tissus sains correspondants. Ces premiers résultats nous ont permis de poser l'hypothèse que l'axe CXCR7/ligands pourrait être impliqué dans le cancer colorectal et ses métastases. Afin d'évaluer le rôle de CXCR7 dans le développement métastatique du CCR, nous avons étudié, dans des modèles murins, l'effet du traitement par des antagonistes de CXCR7 sur des métastases préétablies de CCR au niveau du foie et des poumons. Nous avons ainsi montré que le blocage de CXCR7 diminuait significativement le nombre de nodules pulmonaires et à l'inverse, n'induisait pas de diminution des métastases hépatiques. Pour comprendre cette inhibition organe-spécifique, nous avons comparé, dans nos modèles murins, l'expression des ligands CXCR7 entre ces deux sites métastatiques. Nous avons ainsi mis en évidence par qRT-PCR, une expression plus élevée de CXCL11 et de CXCL12 par les cellules tumorales dans les poumons comparés au foie. Ces résultats suggèrent que les ligands de CXCR7, sécrétés par les cellules tumorales, atteindraient dans les poumons et non dans le foie, des niveaux suffisants pour induire un processus paracrine. Ce dernier pourrait contribuer à la progression des métastases. Notre étude révèle une implication différente des couples CXCR7/ligands entre les métastases hépatiques et pulmonaires de CCR, et suggère que l'activation de CXCR7 sur les

vaisseaux sanguins associés à la tumeur faciliterait la progression du CCR dans les poumons et non dans le foie. Nous mettons ainsi en évidence pour la première fois le fait que le récepteur de chimiokines CXCR7 représente une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement des métastases pulmonaires de cancers colorectaux. Un complément de discussion sera réalisé à la suite de l'article I.



Full Paper

CXCR7 receptors facilitate the progression of colon carcinoma within lung not within liver

E Guillemot^{1,2}, B Karimjee-Soilihi^{1,2,3}, E Pradelli^{1,2}, M Benchetrit^{1,4}, E Goguet-Surmenian^{1,2}, M-A Millet^{1,2}, F Larbret^{1,5}, J-F Michiels^{1,4}, D Birnbaum⁶, P Alemanno³, H Schmid-Antomarchi^{1,2,7} and A Schmid-Alliana^{*,1,2,7}

¹Université de Nice Sophia-Antipolis, UFR Sciences, Nice 06108, France; ²FRE-CNRS 3472, Nice 06202, France; ³Polyclinique St Jean, Cagnes/mer 06800, France; ⁴Laboratoire Central d'Anatomie Pathologique, CHU Pasteur, Nice 06002, France; ⁵EA 6302, CHU Archet I, Nice 06202, France; ⁶INSERM UMR599, Institut Paoli Calmettes, Marseille 13009, France

BACKGROUND: Liver and lung metastases are the predominant cause of colorectal cancer (CRC)-related mortality. Chemokine-receptor pairs have a critical role in determining the metastatic progression of tumours. Our hypothesis was that disruption of CXCR7/CXCR7 ligands axis could lead to a decrease in CRC metastases.

METHODS: Primary tumours and metastatic tissues from patients with CRC were tested for the expression of CXCR7 and its ligands. Relevance of CXCR7/CXCR7 ligands for CRC metastasis was then investigated in mice using small pharmacological CXCR7 antagonists and CRC cell lines of human and murine origins, which – injected into mice – enable the development of lung and liver metastases.

RESULTS: Following injection of CRC cells, mice treated daily with CXCR7 antagonists exhibited a significant reduction in lung metastases. However, CXCR7 antagonists failed to reduce the extent of liver metastasis. Moreover, there were subtle differences in the expression of CXCR7 and its ligands between lung and liver metastases.

CONCLUSION: Our study suggests that the activation of CXCR7 on tumour blood vessels by its ligands may facilitate the progression of CRC within lung but not within liver. Moreover, we provide evidence that targeting the CXCR7 axis may be beneficial to limit metastasis from colon cancer within the lungs.

British Journal of Cancer advance online publication, 20 November 2012; doi:10.1038/bjc.2012.503 www.bjancer.com

© 2012 Cancer Research UK

Keywords: chemokines/receptors; CXCR7 antagonists; colon cancer; metastasis; animal models

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies, and in spite of the conventional treatments, most of the CRC patients die from distant metastases, predominantly in the liver and lungs (Weitz *et al*, 2005). Thus, the control of metastasis represents the greatest clinical challenge in the treatment of colon cancer.

Although vascular drainage patterns may contribute to a mechanical process for distant metastasis, there is growing evidence pointing to a chemokine involvement in this process. To date, several pairs of chemokine/receptor have been identified to have key roles in cancer progression and organ-selective metastasis (Zlotnik *et al*, 2011; Mukaida and Baba, 2012). The best-studied and well-established example is that of the CXCL12 chemokine and its receptor CXCR4. This pair was shown to be involved in almost all malignancies studied, and in most cases, the expression of CXCR4 correlates with the degree of malignancy and metastasis formation (Sun *et al*, 2010). The CXCL12/CXCR4 axis is implicated in several aspects of tumour progression including migration, proliferation and/or survival of tumour and endothelial cells (Kryczek *et al*, 2007; Keeley *et al*, 2011).

In CRC patients, CXCR4 expression by colorectal tumour cells is significantly associated with lymphatic and liver dissemination, with an increased risk for tumour recurrence, as well as a poor prognosis (Verbeke *et al*, 2011). Moreover, it has been shown, in a mouse model of metastatic colon cancer, that blocking of the CXCR4 function on carcinoma cells induced a markedly decreased number of liver and lung metastases. According to the authors, this antitumour effect resulted from the impairment of proliferation rather than from an inhibition of invasion (Zeelenberg *et al*, 2003).

Besides CXCR4, CXCL12 was shown to recognise with high affinity orphan receptor CXCR7/RDC1 (Balabanian *et al*, 2005). Schall's group was the first to demonstrate an implication of CXCR7 in physiological and pathological processes, including cell growth/survival and adhesion, as well as promotion of tumour growth (Burns *et al*, 2006). More recently, numerous studies confirmed the critical role of CXCR7 in promoting the growth of several cancers *in vivo* (Miao *et al*, 2007; Wang *et al*, 2008; Bennani-Baiti *et al*, 2010; Zheng *et al*, 2010; Monnier *et al*, 2012).

Our study aimed precisely at getting new insights into the role played by CXCR7/ligand interactions in the metastatic development of CRC within two major target organs, lungs and liver. Using mouse models of metastatic colon cancer and small pharmacological CXCR7 antagonists, we tested the therapeutic potential of CXCR7-blocking strategy on both types of experimental metastases. Furthermore, in order to establish a link between animal models and human disease, primary malignant

*Correspondence: Dr A. Schmid-Alliana;

E-mail: schmid@unice.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 6 July 2012; revised 10 October 2012; accepted 17 October 2012



and metastatic tissues from human patients were tested for the expression of CXCR7 and its ligands. Together, our results define CXCR7 axis as a key mediator for lung metastasis of colon cancer and identify CXCR7-blocking approaches as promising strategies against lung metastases.

MATERIAL AND METHODS

Animal studies and tumour cell lines

Female BALB/c and SCID mice, 6–8-weeks-old, were purchased from Harlan (Gannat, France). Murine C26 colon carcinoma tumour cells derived from BALB/c mice (Corbett *et al*, 1975) were provided by Dr Mario Colombo (Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milan, Italy), and human HT29 colorectal adenocarcinoma cells were obtained from LGC Promochem (Molsheim, France). Colorectal cancer cell lines were maintained in McCoy's medium (Gibco-BRL Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Gibco-BRL).

Ethics statement

All of the procedures involving animals and their care were conducted in accordance with institutional guidelines (Permit number A06-088-14) and after approval by the local ethics committee: Comité Institutionnel d'Éthique Pour l'Animal de Laboratoire (Permit number NCA 2008-02).

Human tumour tissues used in real-time PCR (RT-PCR) experiments were obtained from the Institut Paoli Calmettes (IPC, Marseille, France) and were collected from patients with invasive colon adenocarcinoma who underwent surgical biopsy or initial surgery at the IPC between 1987 and 2007. Each patient gave written informed consent and the study was approved by the IPC 'Comité d'Orientation Stratégique'.

Human tumour tissues used for immunohistochemistry were obtained from the 'Laboratoire Central d'Anatomie Pathologique' of Pasteur Hospital (Nice, France). All tumour samples were collected at the 'Centre Hospitalier Universitaire' (CHU) of Nice (France) between 2004 and 2009, after obtaining written informed consent according to study approved by the ethics committee of CHU of Nice.

TaqMan RT-PCR experiments

Total RNA, from human and mouse tissues, as well as cell lines, was extracted using RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and transcribed into cDNA using the Superscript III enzyme (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Real-time PCR was performed in an ABI PRISM 7900, as explained in detail in Supplementary Appendix.

Mouse models of pulmonary and liver metastasis

For the induction of metastases, C26 and HT29 cells were delivered, as previously described (Cambien *et al*, 2009), by intravenous injection, respectively, into BALB/c or SCID mice. The treatments were delivered to mice by intraperitoneal injections of 100 mg kg^{-1} of the CCX754/CCX771 compounds (Burns *et al*, 2006), or vehicle, once a day on days +5 to +12 (syngeneic C26 models) or on days +7 to +28 and then, on days +36 to +57 (immunodeficient HT29 models). Fifteen days after the injection of the C26 cells or 9 weeks after the injection of HT29 cells, mice were killed.

Immunohistochemistry

Three-micrometres sections of formalin-fixed, paraffin-embedded primary tumours and metastatic tissues from separate patients

with CRC were subjected to heat-mediated antigen retrieval in citrate buffer (pH 6) before blocking in sequential peroxidase and protein block for 20 min at 20 °C. Samples were incubated with primary mouse anti-CXCR7 monoclonal antibody (IgG1 clone 11G8; R&D Systems Europe, Lille, France) for 45 min at 20 °C and then with a HRP-conjugated rabbit anti-mouse antibody.

Statistical analysis

Statistical comparisons were performed using the non-parametric Man-Whitney *U*-test, and statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

CXCR7 and its ligands are over-expressed in human CRC

To determine whether CXCR7, one of the two specific receptors for CXCL12, was expressed in colon carcinoma, we first analysed by quantitative RT-PCR the mRNA levels for CXCR7 on surgical resection pieces of human primary colorectal tumours ($n = 29$) and on healthy colon ($n = 14$) tissues. Our analysis of this independent set of samples revealed that the CXCR7 receptor was expressed in healthy human colon tissues and significantly more expressed (4.2-fold) in the biopsies of CRC (Figure 1A, Supplementary Table 1). As previously described, CXCR4, the other well-characterised

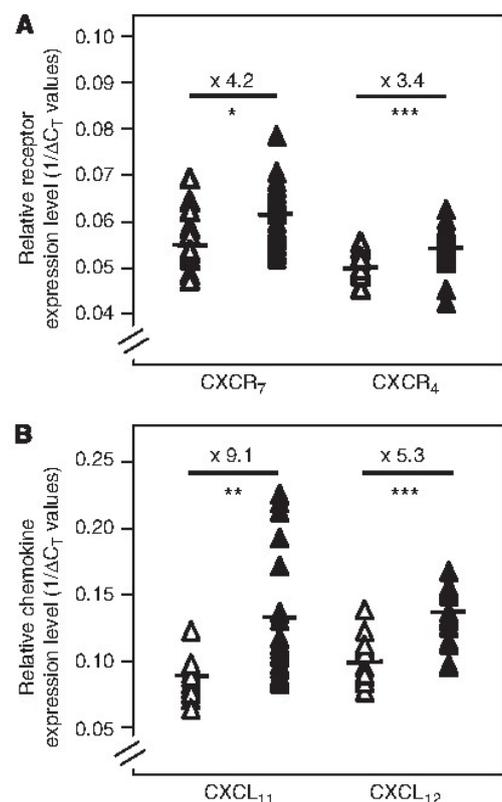


Figure 1 Expression of CXCR7 and its ligands in human primary colon carcinoma. Quantitative RT-PCR analysis of CXCR7 and CXCR4 receptors (A) and CXCL11 and CXCL12 chemokines (B) in surgical resection pieces of human colon carcinoma (filled symbols) compared with healthy colon tissues (open symbols). The horizontal bars indicate the median values of each group. The relative expression level of genes is calculated using human actin and GAPDH as normalising genes and expressed as $1/(\Delta)C_T$. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ and *** $P < 0.0001$.

specific receptor for CXCL12, was significantly more expressed (3.4-fold) in cancer vs healthy samples (Figure 1A, Supplementary Table 1).

We thus evaluated the ability of human primary colorectal tumours to produce the specific CXCR7 ligands. Analysis by quantitative RT-PCR indicated that both CXCL11 and CXCL12 chemokines were significantly more expressed (9.1- and 5.3-fold, respectively) in the biopsies of CRC compared with healthy human colon, suggesting that a potential autocrine/paracrine relationship for the activation of CXCR7 could exist in malignant primary colorectal tumours (Figure 1B, Supplementary Table 1).

In primary colorectal tumours, as well as in lung and liver metastases from patients, CXCR7 receptors are mainly detected in the vicinity of tumour-associated blood vessels

Depending on the origin of cancer, CXCR7 was described to be expressed both by the tumour cells and the stromal cells (Hou *et al*, 2010; Sun *et al*, 2010). Little is known about the protein expression of CXCR7 in CRC. By immunohistochemistry using anti-CXCR7 specific monoclonal antibody (11G8 clone; R&D Systems), we were then intrigued to identify CXCR7-expressing cells in primary colorectal tumours and also in lung and liver metastases.

CXCR7 protein expression was first analysed in human CRC sections from primary tumours ($n=11$), and we observed the presence of CXCR7 in all colorectal tumours tested (Supplementary Table 2). The staining was almost exclusively detected in the cytoplasm of tumour-associated blood vessel cells (Figure 2B) but

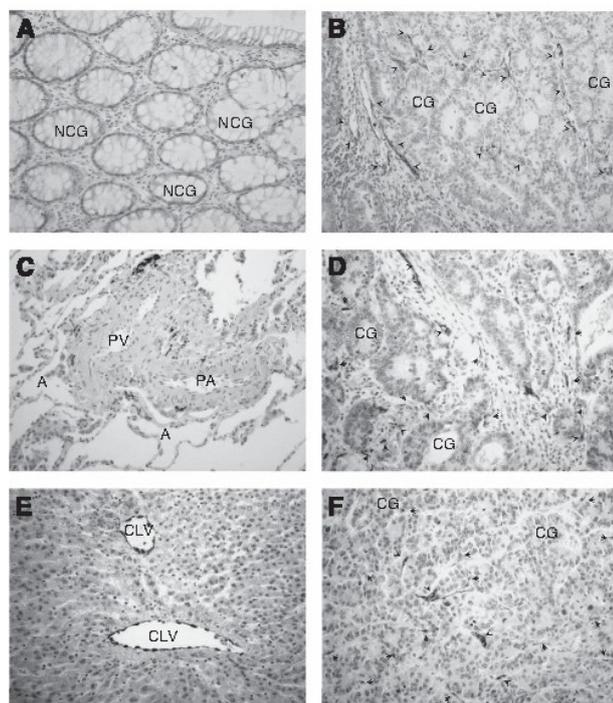


Figure 2 CXCR7 localisation in human colon carcinoma and its metastases. Detection of CXCR7 protein expression in representative specimens of primary colorectal tumour (B), metastatic lung (D) and liver (F) and corresponding non-cancerous neighbour colon (A), lung (C) and liver (E) tissues as assessed by immunohistochemical staining with 11G8 CXCR7-specific antibodies. Original magnification $\times 200$. Abbreviations: A = alveoli; CG = carcinomatous gland; CLV = centrolobular vein; PA = pulmonary artery; PV = pulmonary vein; NCG = non-carcinomatous gland. Arrows indicate the CXCR7 staining of tumour vessels.

never in the colon cancer cells. However, most of the normal colon tissues (Figure 2A) displayed undetectable CXCR7 levels, except in some specimens where a few submucosal vessels were stained positively for CXCR7 (Supplementary Table 2).

In the lung ($n=8$), as well as in the liver ($n=9$), metastases from separate patients with CRC, the expression of CXCR7 was also mostly observed in the tumour-associated blood vessels and undetected in the tumour cells (Figure 2D and F). However, and more strikingly, no positive cells were found in the healthy tissue of the lungs (Figure 2C), whereas in all samples from normal liver, CXCR7 was expressed by most of the normal centrolobular veins (Figure 2E).

Systemic CXCR7 antagonism reduces pre-established lung metastases but not liver metastases from colon cancer

Based on the expression of CXCR7 in the human colon tumours and particularly in metastatic sites, we hypothesised that the blockade of CXCR7 might be an effective treatment against the CRC metastases. We tested this hypothesis by evaluating the effects of the CCX754 and CCX771 compounds, two potent specific CXCR7 antagonists (Burns *et al*, 2006; Zabel *et al*, 2009), on mouse experimental models of metastasis using mouse C26 and human HT29 colon cancer cell lines, previously characterised for their CXCR7 expression (Supplementary Figure 1).

In vivo, the treatment with CXCR7 antagonists was administered to animals (Figure 3A and B) at a stage where the presence of experimental micro metastases had been verified (data not shown). When the lungs were examined at killing, CXCR7 antagonist-treated mice exhibited fewer pulmonary metastases than vehicle-treated mice both in the C26 and HT29 models (Figure 3C and E). Treatment of the mice with CXCR7 antagonists significantly reduced the number of metastases in the lungs of C26-injected mice (by 40%, 77 ± 6 vs 129 ± 5) and in the lungs of HT29-injected mice (by 56%, 2.6 ± 0.8 vs 5.9 ± 1.4). Surprisingly, systemic antagonism with CCX compounds did not lead to any significant decrease in tumour burden in the liver, either in the C26 or HT29 tumour models (Figure 3D and F).

CXCR7 and its ligands are differentially expressed in lung and liver metastases from colon cancer

The CXCR7/CXCR7 ligands axis has been described to be involved in paracrine interactions promoting tumour progression (Duda *et al*, 2011; Verbeke *et al*, 2011). In the light of these observations, and with the objective to understand the ineffectiveness of CXCR7 antagonist treatment on liver metastases compared with the lung's, we have been led to examine and compare the expression levels of CXCR7 and its ligands within both metastatic sites.

Using specific probes directed against human or murine CXCR7 and CXCR7 ligands, the metastatic lungs and livers from immunodeficient mice injected with human HT29 cells were exploited to quantify and to distinguish mRNAs, resulting from human malignant cells themselves from those resulting from murine stromal cells. Important differences were indeed detected in the expression of CXCR7 ligands between colon tumour cells from lung and liver metastases (Figure 4A, Supplementary Table 1). We observed significantly higher expressions of CXCL11 (12-fold increase) and CXCL12 (37-fold increase) by the human tumour cells from lung metastases compared with liver metastases. In contrast, there was no significant difference in the expression of either chemokines between the stromal cells from lung or from liver metastases (Figure 4B). Interestingly, we found that the lung tissues showed a 12-fold increase in the expression levels of murine CXCR7 mRNA compared with liver tissues (Figure 4B, Supplementary Table 1).

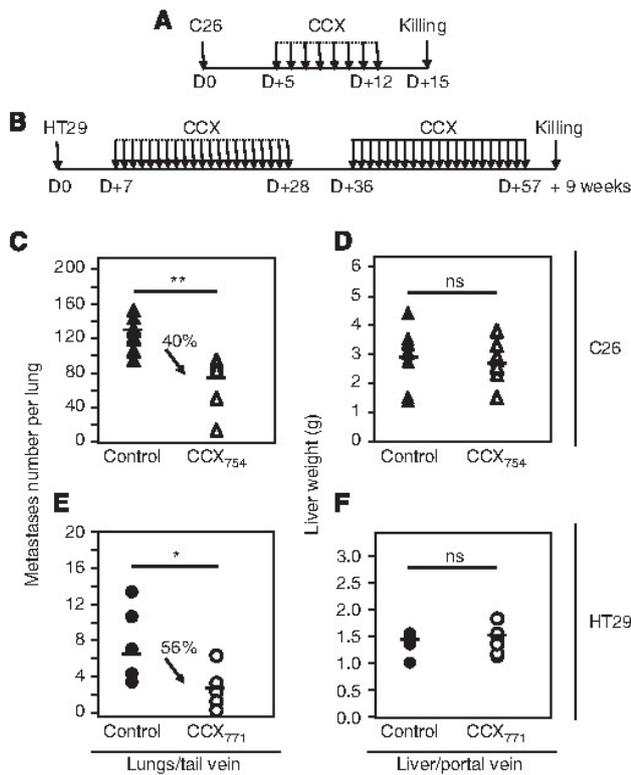


Figure 3 Effect of treatments by CXCR7 antagonists on pre-established colon cancer metastases. (A, B) Schematic representations of treatments by CXCR7 antagonists of experimental metastases from C26/BALB/c (A) and HT29/SCID (B) models. (C–F) Mice were injected with C26 cells (C, D) or with HT29 cells (E, F) into the tail vein (C, E) or into the portal vein (D, F) before receiving subcutaneous injections of CCX754, CCX771 or vehicle (control). Upon killing, the extent of tumour development was assessed. The horizontal bars indicate the median values of each group. $n=8-12$ mice per group. Abbreviation: ns = not significant; * $P<0.05$ and ** $P<0.0001$.

The VEGF and CXCL8 angiogenic factors are not under control of the CXCR7 receptors in colorectal lung metastases

The CXCR7/CXCR7 ligands axis might be directly implicated in the tumour angiogenesis but also indirectly, by regulating processes that lead up to the expression of proangiogenic factors such as CXCL8 and VEGF (Wang et al, 2008; Hou et al, 2010). Therefore, we assessed the mRNA expression of CXCL8 and VEGF in HT29-injected mice treated (or not) with a CXCR7 antagonist. As shown in Figure 4C, the treatment with the CCX771 compound did not significantly affect the expression of CXCL8 or VEGF in the human malignant cells nor the expression of VEGF in the murine stromal cells (the homologous CXCL8 does not exist in mouse).

DISCUSSION

The chemokine CXCL12 has been implicated in multiple steps of tumorigenesis and progression of metastatic disease (Balkwill, 2004; Zlotnik, 2008). It was generally believed that CXCL12 mediated these processes via a single cell-surface receptor, CXCR4. Since then CXCR7 has been identified as an alternate receptor for CXCL12, and many studies have highlighted that CXCR7 receptors also have key functions in promoting the development of several types of tumours (Burns et al, 2006; Miao et al, 2007; Meijer et al, 2008; Wang et al, 2008; Bennani-Baiti et al, 2010; Grymula et al,

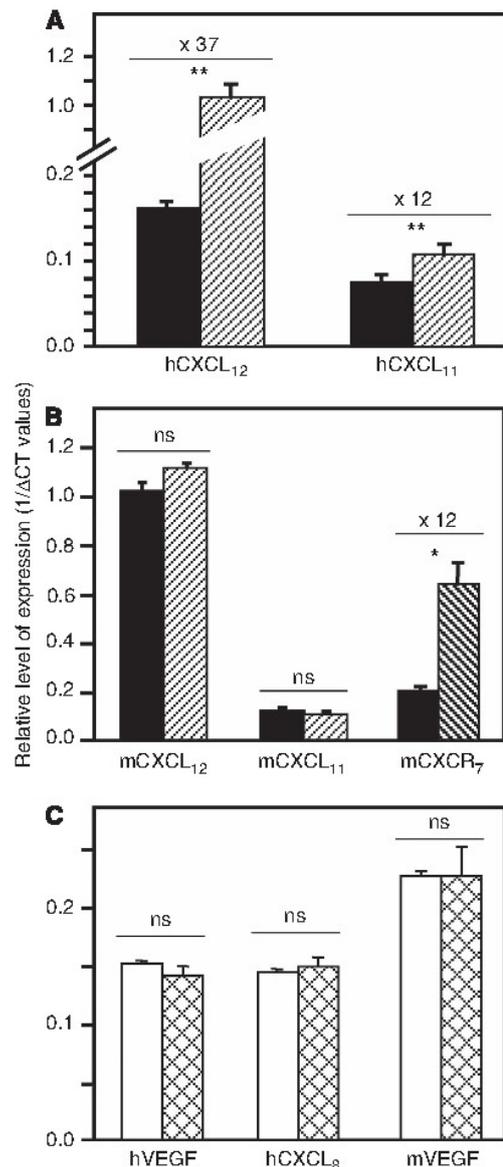


Figure 4 Expression of CXCR7 ligands, VEGF and CXCL8 within metastases of colon carcinoma. (A, B) Quantitative RT-PCR analysis of expression of CXCR7 and its ligands in metastatic liver ($n=2$, black bars) and lung ($n=2$, hatched bars) from HT29/SCID models using human (A) or mouse (B) probes. (C) Quantitative RT-PCR analysis of expression of CXCL8 and VEGF in metastatic lung from not treated (empty bars) or treated by CCX771 (cross-hatched bars) HT29/Scid mice using human or mouse probes. The relative level of expression of genes is calculated using mouse raspl or human actin and GAPDH as normalising genes and expressed as $1/(\Delta)C_T$. Abbreviation: ns = not significant; * $P<0.05$ and ** $P<0.005$.

2010; Hattermann et al, 2010; Kollmar et al, 2010). Consequently, tumour events regulated by CXCL12 seem more complex than previously thought, justifying the examination of earlier findings related to this chemokine in light of an additional receptor. CXCR7 expression has been reported in various human cancers, including lung, prostate, breast and liver carcinoma (Miao et al, 2007; Wang et al, 2008; Iwakiri et al, 2009; Marechal et al, 2009; Zheng et al, 2010). To date, CXCR7 has never been examined in human colon carcinoma.

In the present study, we first evaluated the expression of CXCR7 in the human colorectal adenocarcinoma. Our results show a stronger induction of mRNA expression for this receptor in CRC compared with normal colon mucosa. At the cellular level, in the primary tumours, the presence of the CXCR7 protein was restricted to tumour-associated endothelial cells, whereas it was clearly absent in epithelial and endothelial normal cells, as well as in tumour cells. With the exception of the centrilobular veins in the healthy liver, which, surprisingly, were positive for CXCR7, the same cellular distribution of the CXCR7 protein was observed in lung and liver metastases. These results are consistent with studies in other human cancers that have also described CXCR7 expression on the neovasculature associated with tumour, but not on most of the non-transformed cells or non-tumour vasculature (Miao *et al*, 2007; Monnier *et al*, 2012). Nevertheless, one study has demonstrated, by using specific antibodies as defined by Berahovitch *et al* (2010), that in human biopsies of rhabdomyosarcomas, breast and lung cancers, CXCR7 was expressed on a majority of tumour-associated blood vessels but, also, on the malignant cells (Miao *et al*, 2007). All these observations lead to speculate that the CXCR7 expression in tumour vessels is a common feature of all cancers, whereas the presence of this receptor in malignant cells would be restricted to a few types of cancers.

Besides, our study has shown that expression of CXCL12, the common chemokine to CXCR4 and CXCR7 receptors, was significantly higher in CRC than in normal colon mucosa. This finding is consistent with previous studies where the increased expression of CXCL12 in colorectal tumours has also been significantly associated with tumour stage, lymphatic invasion, venous invasion, lymph node and distant metastases and decreased survival rate (Verbeke *et al*, 2011). As for the other known ligand for CXCR7, and as we previously reported (Cambien *et al*, 2009), our results showed a mRNA induction of CXCL11 in CRC compared with normal colon, which was confirmed at the protein level by Yang *et al* (2011).

Collectively, all these data suggested that the CXCR7-CXCR7 ligands axis could have key functions on the process of human colon carcinoma metastasis and prompted us to assess its *in vivo* relevance. With the aim of investigating if CXCR7 could also intervene in the growth of metastases of CRC, we tested whether a systemic treatment with CXCR7 antagonists, such as CCX754 or CCX771 compounds (Burns *et al*, 2006), could affect local growth of pre-established metastases. Interestingly, this systemic treatment by CXCR7 antagonist strongly reduced the tumour expansion within lungs of both HT29- and C26-inoculated mice. Thus, CXCR7 appeared to be a key factor in the progression of colon cancer metastases in the lungs of mice. Moreover, and in contrast to the effects on pulmonary metastases, the extent of liver metastasis was unaffected by the CXCR7 antagonist treatment, suggesting that CXCR7 may mediate the metastasis process of colon carcinoma in an organ-specific manner.

To gain further insights into an organ-specific inhibition of metastatic colon cancer growth through CXCR7 antagonism, we analysed the expression of CXCR7 and its ligands within lung and liver tumours. Investigations at mRNA level were conducted on tumours from HT29 model, which was then crucial to quantify and to distinguish mRNAs resulting from human malignant cells themselves from those resulting from murine stromal cells. Thus, our data highlighted that, in pulmonary metastases compared with liver foci, human CRC cells expressed more CXCL11 and CXCL12, whereas murine stromal cells expressed more CXCR7 receptors. Together, these results suggested that CXCR7 ligands secreted by tumour cells could reach, in the lungs but not in the

liver, levels sufficient to induce a paracrine process, which may further contribute to the progression of metastases and/or exacerbation of the disease. Moreover, knowing that CXCR7 receptors were exclusively expressed by the endothelial cells in CRC, it was tempting to speculate that the CXCR7 ligands could directly or/and indirectly regulate vascular development within lung metastases.

The CXCR7 axis is known to be indirectly implicated in tumour vascularisation through processes leading up to the expression of proangiogenic factors such as CXCL8 and VEGF (Wang *et al*, 2008; Hou *et al*, 2010). In our study, we observed that in the lung metastases of CRC, CXCR7 axis failed to regulate the expression of CXCL8 and VEGF (at the level of transcription), rather suggesting a direct control of CXCR7 axis on vascular tumour growth. In this case, as it has been reported, CXCL12 could help the angiogenesis process by stimulating the migration and division of the endothelial cells (Duda *et al*, 2011) and/or could facilitate the vasculogenesis process through the attraction of the endothelial progenitor cells (Dai *et al*, 2011; Yan *et al*, 2012). It should be noted that, *in vivo* pathological concentrations of CXCL12 alone fail to induce significant vascularisation (Mirshahi *et al*, 2000), whereas in contrast, in synergy with soluble factors, such as VEGF, they can be able to induce potent vascularisation (Kryczek *et al*, 2005). So, it is reasonable to assume that in lung metastases, unlike liver metastases, the levels of CXCL12 are sufficient to trigger these synergistic effects, thereby confirming the study by Meijer *et al* (2008) who suggested that CXCR7 axis may control tumour development mainly in the tissues with high CXCL12 expression. In light of these findings, we propose that the combination of anti-VEGF and anti-CXCR7 strategies could be particularly effective in the treatment of lung metastasis of colon cancer.

Finally, our study suggests that chemokine expression by tumour cells is essential for metastatic development in the lungs. Nevertheless, host environment notably shapes tumour cell-chemokine expression and could thereby contribute, together with intrinsic properties of colon tumour cells, to tissue specificity of metastatic process.

In summary, our data point to a distinct role of the CXCR7/chemokines axis in lung metastasis compared with liver metastasis. Systemic treatments with CXCR7 antagonists significantly reduce metastasis of colon cancer cells in the lungs without affecting that of the liver and provide supporting evidence that targeting the CXCR7 axis may be beneficial in limiting metastatic colon cancer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by Cancéropôle Provence Alpes Côte d'Azur (Grant: ACI 07086AA). We thank Dr Mark ET Penfold (ChemoCentryx, Inc) for providing CXCR7 antagonists and our successful scientific discussions. We also thank all the technicians of the Animal Facility of the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, C3M (INSERM, Unit 1065, Nice, France) for the quality of their work, Nadège Gonthier of the High-speed quantitative RT-PCR Facility of the Equipe Associée EA 6302 (CHU Archet 1, Nice France) for the excellent technical assistance and Pr Mery Tulic (University of Western Australia) for help with the English language and critical reading of the manuscript.

Supplementary Information accompanies the paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

REFERENCES

Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005) The chemokine

SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* **280**(42): 35760–35766

- Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4(7): 540–550
- Bennani-Baiti IM, Cooper A, Lawlor ER, Kauer M, Ban J, Aryee DN, Kovar H (2010) Intercohort gene expression co-analysis reveals chemokine receptors as prognostic indicators in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 16(14): 3769–3778
- Berahovitch R, Penfold M, Schall T (2010) Non specific CXCR7 antibodies. *Immunol Lett* 133: 112–114
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203(9): 2201–2213
- Cambien B, Karimjee BF, Richard-Fiardo P, Bziouech H, Barthel R, Millet MA, Martini V, Birnbaum D, Scoazec JY, Abello J, Al Saati T, Johnson MG, Sullivan TJ, Medina JC, Collins TL, Schmid-Alliana A, Schmid-Antomarchi H (2009) Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism. *Br J Cancer* 100(11): 1755–1764
- Corbett TH, Griswold DP, Mayo JG, Laster WR, Schabel Jr FM (1975) Cyclophosphamide-adriamycin combination chemotherapy of transplantable murine tumors. *Cancer Res* 35(6): 1568–1573
- Dai X, Tan Y, Cai S, Xiong X, Wang L, Ye Q, Yan X, Ma K, Cai L (2011) The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 15(6): 1299–1309
- Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK (2011) CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin Cancer Res* 17(8): 2074–2080
- Grymula K, Tarnowski M, Wysoczynski M, Drukala J, Barr FG, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ (2010) Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int J Cancer* 127(11): 2554–2568
- Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, Mentlein R (2010) The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 70(8): 3299–3308
- Hou KL, Hao MG, Bo JJ, Wang JH (2010) CXCR7 in tumorigenesis and progression. *Chin J Cancer* 29(4): 456–459
- Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, Sonobe M, Nagai S, Okubo K, Wada H, Date H, Miyahara R (2009) Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 115(11): 2580–2593
- Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM (2011) Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res* 317(5): 685–690
- Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, Haberd GC, Tilton B, Menger MD, Schilling MK (2010) CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer* 126(6): 1302–1315
- Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrassa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P, Zou W (2005) CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 65(2): 465–472
- Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W (2007) Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(3): C987–C995
- Marechal R, Demetter P, Nagy N, Berton A, Decaestecker C, Polus M, Closset J, Deviere J, Salmon I, Van Laethem JL (2009) High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 100(9): 1444–1451
- Meijer J, Ogink J, Roos E (2008) Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer* 99(9): 1493–1501
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(40): 15735–15740
- Mirshahi F, Pourtau J, Li H, Muraine M, Trochon V, Legrand E, Vannier J, Soria J, Vasse M, Soria C (2000) SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis *in vitro* and *in vivo* models. *Thromb Res* 99(6): 587–594
- Monnier J, Boissan M, L'Helgoualch A, Lacombe ML, Turlin B, Zucman-Rossi J, Theret N, Piquet-Pellorce C, Samson M (2012) CXCR7 is up-regulated in human and murine hepatocellular carcinoma and is specifically expressed by endothelial cells. *Eur J Cancer* 48(1): 138–148
- Mukaida N, Baba T (2012) Chemokines in tumor development and progression. *Exp Cell Res* 318(2): 95–102
- Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ, Wang J (2010) CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 29(4): 709–722
- Verbeke H, Struyf S, Laureys G, Van Damme J (2011) The expression and role of CXCR7 chemokines in colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 22(5–6): 345–358
- Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS (2008) The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283(7): 4283–4294
- Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW (2005) Colorectal cancer. *Lancet* 365(9454): 153–165
- Yan X, Cai S, Xiong X, Sun W, Dai X, Chen S, Ye Q, Song Z, Jiang Q, Xu Z (2012) Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *J Cell Biochem* 113(4): 1437–1446
- Yang S, Wang B, Guan C, Wu B, Cai C, Wang M, Zhang B, Liu T, Yang P (2011) Foxp3 + IL-17 + T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J Leukoc Biol* 89(1): 85–91
- Zabel BA, Wang Y, Lewen S, Berahovich RD, Penfold ME, Zhang P, Powers J, Summers BC, Miao Z, Zhao B, Jalili A, Janowska-Wieczorek A, Jaen JC, Schall TJ (2009) Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J Immunol* 183(5): 3204–3211
- Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E (2003) The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 63(13): 3833–3839
- Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F, Ren GS (2010) Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 31
- Zlotnik A (2008) New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J Pathol* 215(3): 211–213
- Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B (2011) Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* 11(9): 597–606

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported License.

SUPPLEMENTARY APPENDIX

Supplementary Table 1: Comparative analysis of the level of mRNA expression between the different tissues

Human colon tissues				
Target	Tumour colon (n=29)	Healthy colon (n=14)	$\Delta\Delta C_T$	Fold ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)
hCXCR7	$\Delta C_T=16.21$	$\Delta C_T=18.29$	-2,08	4.2
hCXCR4	$\Delta C_T=17.88$	$\Delta C_T=19.66$	-1.84	3.4
hCXCL11	$\Delta C_T=8.83$	$\Delta C_T=12.02$	-3.19	9.1
hCXCL12	$\Delta C_T=7.93$	$\Delta C_T=10.34$	-2.41	5.3
Experimental mice tumours				
Target	Liver metastases (n=2)	Lung metastases (n=2)	$\Delta\Delta C_T$	Fold ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)
hCXCL11	$\Delta C_T=13.46$	$\Delta C_T=9.87$	-3.59	12
hCXCL12	$\Delta C_T=6.22$	$\Delta C_T=0.98$	-5.24	37
mCXCR7	$\Delta C_T=4.92$	$\Delta C_T=1.31$	-3.61	12

The mean value of ΔC_T of tissue samples for tumour and healthy human colon tissues and, liver and lung metastases from experimental mice tumours are presented in the table.

Comparative level of mRNA expression between tumour (Y) and healthy (X) colon tissues or between lung (Y) and liver (Y) metastases was calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (Applied Biosystems User Bulletin N° 2 (P/N 4303859) using the formula $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T Y - \Delta C_T X$ and expressed as fold over healthy for human colon tissues or as fold over liver for experimental mice tumours.

Supplementary Table 2: Summary of tumour samples informations

Case	Tissue type	Tumour vessels expressing CXCR7 (%)	Staining intensity	Normal vessels expressing CXCR7, except centrolobular veins
1	PCA	50	3+	no
2	PCA	40	3+	yes
3	PCA	50	3+	yes
4	PCA	80	3+	no
5	PCA	30	2+ to 3+	yes
6	PCA	90	2+	no
7	PCA	10	2+	no
8	PCA	<10	1+ to 2+	no
9	PCA	30	2+	no
10	PCA	15	2+	no
11	PCA	20	3+	yes
12	HMCA	50	3+	yes
13	HMCA	40	3+	no
14	HMCA	30	2+ to 3+	no
15	HMCA	10	2+	no
16	HMCA	20	3+	no
17	HMCA	10	2+ to 3+	no
18	HMCA	60	2+ to 3+	no
19	HMCA	70	2+ to 3+	no
20	HMCA	30	1+ to 2+	no
21	PMCA	<10	1+ to 2+	no
22	PMCA	10	1+ to 2+	no
23	PMCA	50	3+	no
24	PMCA	30	2+ to 3+	no
25	PMCA	50	3+	no
26	PMCA	50	3+	no
27	PMCA	20	2+ to 3+	no
28	PMCA	10	2+ to 3+	no

In tumours, the percentage of CXCR7-positive vessels and the staining intensity were analyzed. In order to do that, a semi-quantitative scoring system was used. Immunostaining was classified as follow: 1+ (weak), 2+ (medium) and 3+ (strong).

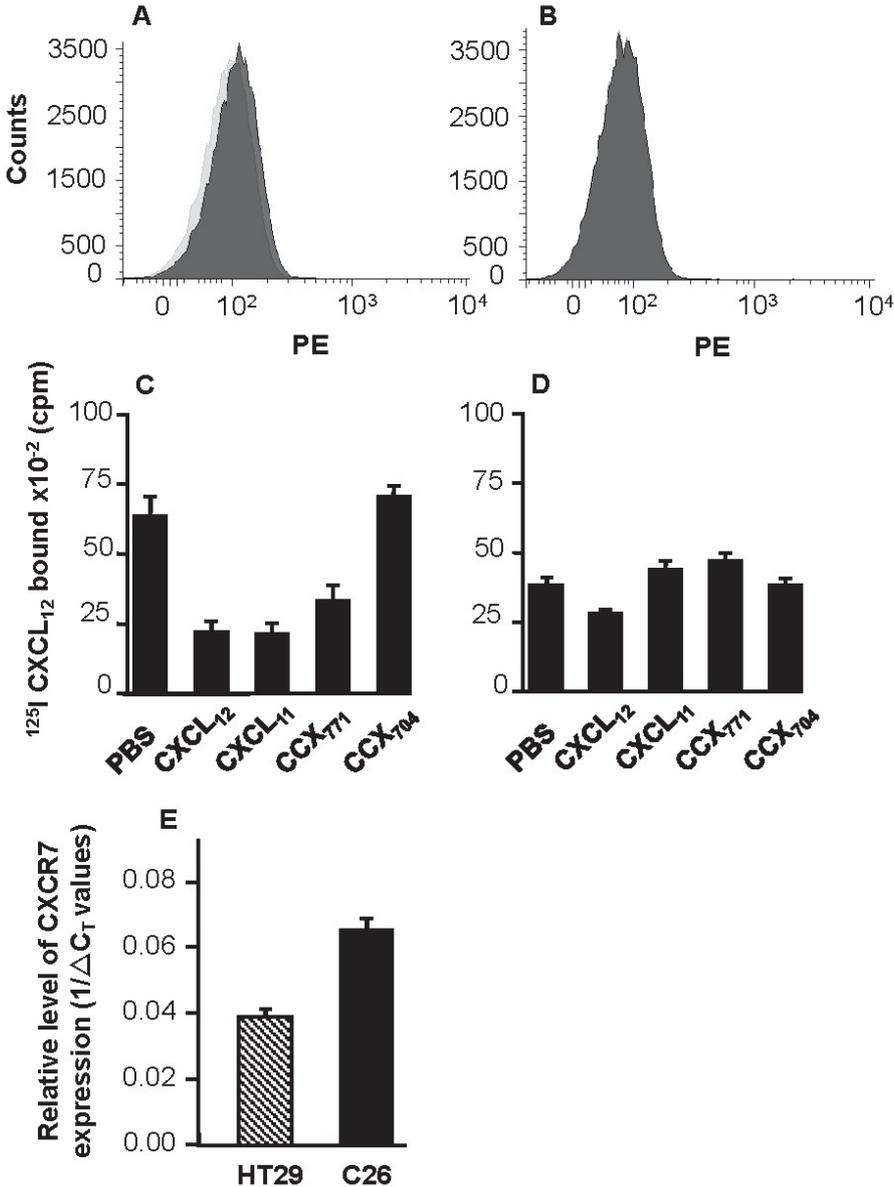
For the normal vessels, the presence (yes) or the absence (no) of staining was notified.

For all the tissues analyzed, primary tumours and metastases, the tumour vasculature positive for CXCR7 was observed in the center as well as in the periphery of tumours. The percentage of vessels expressing CXCR7 and the intensity of staining varied depending on the biopsy. Otherwise, the CXCR7 expression by tumour vessels was not significantly different in primary tumours and metastases.

Abbreviations: PCA=Primary Colon Adenocarcinoma, LMCC=Hepatic Metastases from Colorectal

Adenocarcinoma, PMCA=Pulmonary Metastases from Colorectal Adenocarcinoma.

Supplementary Figure 1 (S1): Surface expression of CXCR7 in colon carcinoma cell lines



Expression of CXCR7 on C26 (A) and HT29 (B) cells was quantified by flow cytometry using CXCR7 antibody 11G8. Histograms indicate isotype control (clear) and specific CXCR7 staining (filled). For A and B, data shown are representative of 3 independent experiments. Binding of ¹²⁵I CXCL₁₂ to C26 (C) and HT29 (D) cells was assessed in the absence or in the presence of unlabeled CXCL₁₂ or CXCL₁₁ (100 nM each), the CXCR7 antagonist CCX771 or the control compound CCX704 with no affinity for CXCR7 (10 μM each). (E) Quantitative RT-PCR analysis of CXCR7 in colon carcinoma cells. The relative expression level of genes is calculated using actin and GAPDH (HT29 cells) or 18S (C26 cells) as normalizing genes and expressed as 1/ΔC_T. (C-E) The mean ± SEM of duplicate per condition is shown. Representative of 2 independent experiments.

Supplementary Figure

Supplementary Figure 1 (S1): Surface expression of CXCR7 in colon carcinoma cell lines

We surveyed surface expression of CXCR7 in the C26 and the HT29 colon cancer cell lines, chosen in our study for their ability to develop lung and liver metastases in mice (Mitchell *et al*, 1997; Vitale *et al*, 2007). To do that, experiments were conducted by flow cytometry using anti-CXCR7-specific mAbs (clone 11G8, R&D Systems) and by radioligand-binding assays using ¹²⁵I-CXCL12. This latest approach exploited the unique pattern of chemokine-binding defined for CXCR7 (Burns *et al*, 2006) where both CXCL11 and CXCL12 specifically interact with this receptor and where each chemokine effectively competes with the other for the binding. Using both approaches, a low level of CXCR7 was observed on the surface of C26 cells (Fig. S1A and S1C) whereas the expression of this receptor on the surface of HT29 cells was undetectable (Fig S1B and S1D). Consistent with the protein data, CXCR7 mRNAs were found weakly represented in the C26 cells and at the limit of detection in HT29 cells (Fig. S1E).

Nevertheless, it is important to underline that we tested two other CXCR7 antibodies, a polyclonal Ab 38089 from Abcam and a monoclonal Ab clone 358426 from R&D Systems, which respectively stained positively for CXCR7 the HT29 cell line by western blot and by flow cytometry. By immunohistochemistry, monoclonal Ab clone 358426 stained positively for CXCR7, the tumour cells from sections of HT29 xenograft mouse model or human CRCs (data not shown). However, these results disagreeing with our ¹²⁵I-CXCL12 binding experiments and given the recent paper of Berahovitch (Berahovitch *et al*, 2010) showing the non-specificity of these two antibodies, we have not considered positive the CXCR7 expression by the human colon tumour cells and particularly, by the HT29 cell line.

Bibliography

- Berahovitch R, Penfold M, Schall T (2010) Non specific CXCR7 antibodies. *Immunology Letters* **133**: 112-114
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovitch R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* **203**(9): 2201-13
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovitch R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(40): 15735-40

- Mitchell BS, Horny HP, Schumacher U (1997) Immunophenotyping of human HT29 colon cancer cell primary tumours and their metastases in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J* **29**(5): 393-9
- Vitale S, Cambien B, Karimdjee BF, Barthel R, Staccini P, Luci C, Breitmayer V, Anjuere F, Schmid-Alliana A, Schmid-Antomarchi H (2007) Tissue-specific differential antitumoral effect of molecular forms of fractalkine in a mouse model of metastatic colon cancer. *Gut* **56**(3): 365-72

Supplementary Material

Flow cytometry

C26 cells were preincubated with a purified rat anti-mouse CD16/CD32 monoclonal antibody (mouse BD Fc Block™, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and HT29 cells, with a purified human IgG (R&D Systems Europe, Lille, France). Murine and human cells were then incubated in the dark with a Phycoerythrin (PE)-conjugated mouse monoclonal anti-human CXCR7 antibody (IgG1 clone 11G8, R&D Systems Europe) for 30 min at 4°C. Cells were washed, then resuspended in ice-cold PBS containing 0.5% BSA and 2 mmol/L EDTA and 7AAD (BD Pharmingen, Lexington, KY, USA) was added to exclude dead cells. Mouse IgG1 isotype control-PE was used as a negative control (R&D Systems Europe). CXCR7-positive cells were analyzed using a BD FACSCanto II flow cytometer.

Binding experiments

Assays to assess binding of ¹²⁵I-CXCL12 to CXCR7 expressed on C26 and HT29 cells were performed as previously described (Miao *et al*, 2007).

TaqMan real-time PCR experiments.

Experiments were carried out using human and mouse TaqMan® gene expression assays (CXCR7: Hs 00604567m1 and Mn 00436210m1, CXCR4: Hs 00237052m1, CXCL11: Hs 00171138m1 and Mn 00444662m1, CXCL12: Hs 00171022m1 and Mn 00445552m1, VEGF: Hs 00173626 and Mn 00437304, CXCL8: Hs 00174103) (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). Cycle parameters were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Relative mRNA expression were determined using ΔC_T values obtained by subtracting C_T control (either human actin and GAPDH, mouse rasIp or 18S) from C_T target gene (either human or mouse CXCR7, CXCR4, CXCL11, CXCL12, VEGF or CXCL8) measured in the same RNA preparation.

C. Complément de discussion et conclusions de la partie I

Malgré les progrès des traitements anticancéreux, les métastases constituent la principale cause de décès par cancer ; leur prévention et leur éradication représentent donc un véritable challenge dans la prise en charge des patients. L'enjeu de la recherche est aujourd'hui de définir de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces, mais également d'identifier des marqueurs biologiques permettant de prédire l'évolution métastatique d'un cancer, afin d'évaluer les risques de chaque patient. Les chimiokines et leurs récepteurs ont très récemment été mis en lumière pour leur participation dans le développement métastatique des tumeurs, faisant d'elles des cibles thérapeutiques potentielles.

Le récepteur de chimiokines CXCR7 (longtemps considéré comme un récepteur orphelin) est, depuis la découverte de son interaction avec CXCL12 (Balabanian et al., 2005), considéré avec attention dans la biologie du cancer (Sánchez-Martín et al., 2013). L'intérêt pour ce récepteur est aujourd'hui d'autant plus important que son implication dans la croissance *in vivo* des cellules cancéreuses a été démontrée (Burns et al., 2006; Maussang et al., 2013; Miao et al., 2007; Zheng et al., 2010), et que l'altération de son expression dans les tumeurs a été associée à la survie des patients atteints de différents cancers (Hao et al., 2012a; Schrevel et al., 2012; Wang et al., 2012). Cependant, son rôle dans la progression métastatique des cancers reste à approfondir.

Notre étude a permis de mettre en évidence que le récepteur CXCR7 contrôle le développement des métastases pulmonaires des cancers colorectaux (CCRs), alors qu'il ne semble pas jouer un rôle majeur dans la progression de ces cancers au niveau du foie. De plus, des travaux l'équipe (auxquels j'ai participé) ont montré que CXCR7 est également impliqué dans le développement des métastases pulmonaires d'ostéosarcome (**Article III** Goguet-Surmenian et al., 2013). Ces résultats corroborent les données de la littérature qui montrent que CXCR7 participe au développement des métastases pulmonaires des cancers mammaires (Miao et al., 2007) et de l'hépatocarcinome (Xue et al., 2012).

Cependant, nos résultats semblent contredire les travaux présentés par Meijer et ses collaborateurs en 2008. Dans leur modèle expérimental de métastases pulmonaires (obtenues par injection de cellules coliques CT26 dans la veine de la queue des souris), les auteurs concluent que CXCR7 n'influencerait pas le développement de ces métastases (extinction de CXCR7 par la technique d'interférence à l'ARN) (Meijer et al., 2008). Par ailleurs, dans un autre modèle de métastases spontanées de cancer du sein, le nombre de nodules pulmonaires diminue lorsque les cellules cancéreuses injectées aux souris surexpriment le récepteur CXCR7 (Hernandez et al., 2011). De plus, il a été très récemment suggéré que CXCR7 ne contrôlerait pas le potentiel

métastatique des cellules de carcinome pulmonaire non à petites cellules dans différents organes (Choi et al., 2013). Il est à noter que dans l'ensemble des travaux cités précédemment, les auteurs modifient l'expression de CXCR7 par les cellules tumorales (extinction ou surexpression) avant leur injection aux animaux, mais ne modifient pas l'expression ou l'activité du récepteur par les cellules de l'hôte (notamment celle des cellules endothéliales). Ces résultats ne vont donc pas à l'encontre de ceux obtenus par l'équipe qui suggèrent un effet de CXCR7 sur le développement métastatique via son expression par les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs plutôt que par l'adressage des cellules cancéreuses dans les poumons. Nos travaux ainsi que ceux d'autres équipes ont montré que CXCR7 était surexprimé par les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs de divers cancers (Goguet-Surmenian et al., 2013; Guillemot et al., 2012; Miao et al., 2007; Monnier et al., 2012) ; dans ce contexte, CXCR7 se voit aujourd'hui proposé comme un marqueur des vaisseaux sanguins associés aux tumeurs (Hattermann et al., 2010; Maishi et al., 2012).

Le récepteur CXCR7 n'est pas le seul récepteur de chimiokines décrit comme contrôlant la dissémination métastatique des cancers. L'attention s'est notamment portée sur ce récepteur du fait qu'il reconnaît CXCL12, également agoniste du récepteur CXCR4. Ce dernier est surexprimé dans de nombreux cancers et participe à leur développement métastatique ; CXCR4 intervient notamment dans les métastases pulmonaires du cancer du sein, du pancréas, de la tête et du cou, et du mélanome (Müller et al., 2001; Porvasnik et al., 2009; Takenaga et al., 2004; Yoon et al., 2007) mais également dans les métastases hépatiques du cancer du pancréas (Porvasnik et al., 2009) et les métastases ganglionnaires du cancer du sein (Müller et al., 2001). Le récepteur CXCR7 reconnaît également spécifiquement un deuxième ligand : CXCL11, agoniste du récepteur CXCR3. Ce récepteur CXCR3, exprimé par les cellules tumorales, a été impliqué (notamment par des travaux réalisés par l'équipe) dans la domiciliation des métastases pulmonaires de différents cancers dont le cancer du sein, le cancer colorectal et l'ostéosarcome (Cambien et al., 2009; Pradelli et al., 2009; Walser et al., 2006). En revanche, une étude réalisée au sein du laboratoire a montré que CXCR3 n'interviendrait pas dans la dissémination des cellules cancéreuses coliques au niveau du foie (Cambien et al., 2009). En somme, ces exemples illustrent le fait que le nombre et la nature des récepteurs de chimiokines impliqués dans la dissémination métastatique des différents cancers dépend à la fois de la tumeur primaire et de l'organe secondaire dans lequel vont se développer les métastases.

Toutefois, les données de la littérature indiquent que l'implication des couples chimiokines/récepteurs et le réseau formé entre les différentes paires (exemple de CXCR4-CXCR7-CXCR3) sont bien plus complexes que supposé au départ. Selon le type de cancer, les cellules tumorales expriment seulement certains récepteurs de chimiokines (c'est-à-dire une

combinaison donnée de récepteurs) leur permettant de répondre aux chimiokines présentes dans le microenvironnement tumoral. Selon les organes, différentes chimiokines sont exprimées de manière constitutive dans les conditions physiologiques saines. Leur expression peut être altérée par des conditions inflammatoires ou par les cellules tumorales elles-mêmes. Vient s'ajouter à cela, l'expression d'une combinaison donnée de récepteurs de chimiokines par les cellules de l'hôte (cellules immunitaires, fibroblastes et cellules endothéliales). Ces cellules jouent un rôle primordial dans le déroulement des différentes étapes tumorales : réponse immunitaire anti- ou pro-tumorale, ou encore stimulation ou inhibition de l'angiogénèse tumorale. Le succès du développement métastatique dépend de la balance entre toutes ces interactions, qui dépendent elles-mêmes de la tumeur d'origine et de l'organe secondaire cible.

Dans notre étude, nous n'avons pas identifié dans leur ensemble les mécanismes responsables de l'inhibition du développement métastatique lors du blocage de CXCR7. Cependant, CXCR7 n'est pas exprimé par les cellules tumorales et est par contre exprimé par les cellules des vaisseaux sanguins associés aux tumeurs, suggérant que CXCR7 intervient probablement dans la croissance tumorale, au niveau des poumons, via la régulation de l'angiogénèse. Les études réalisées précédemment par l'équipe, sur l'implication de CXCR3 dans les métastases pulmonaires des cancers coliques et de l'ostéosarcome, ont montré que le récepteur CXCR3 est exprimé par les cellules tumorales ; son activation par ses ligands influence la chimiotaxie, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Cambien et al., 2009; Pradelli et al., 2009). Les travaux réalisés par l'équipe, en accord avec la littérature, montrent ainsi que les chimiokines et leurs récepteurs interviennent dans le processus métastatique au moyen de différents mécanismes, directs ou indirects. Il est donc important de définir, pour chaque cancer et pour chaque organe cible, par qui sont exprimés les acteurs mis en jeu et quelles sont les fonctions qu'ils exercent dans la progression tumorale. Les réponses à ces questions permettront d'estimer vers quel effet final la balance obtenue sera dirigée.

Si l'ensemble apparaît comme complexe, le blocage des chimiokines ou de leurs récepteurs dans les traitements des métastases reste pertinent et à fort potentiel thérapeutique. Le blocage des récepteurs de chimiokines peut empêcher la migration des cellules tumorales vers les organes secondaires, réduire les effets prolifératifs et les avantages de survie ou bien encore, limiter l'angiogénèse tumorale dans les tumeurs primaires aussi bien que dans les métastases. Par ailleurs, il a été démontré que la chimiokine CXCL12 participe aux mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux (Duda 2011), argument puissant pour encourager le développement des stratégies thérapeutiques ciblant les chimiokines/récepteurs. La compréhension des mécanismes subjacents aux chimiokines permettra d'envisager plus efficacement une utilisation en clinique

des bloqueurs des chimiokines/récepteurs. Il s'agira ensuite de définir la (les) cible(s) thérapeutique(s) (quelle(s) chimiokine(s) ? quel(s) récepteur(s) ?) en fonction de chaque cancer et en fonction de chaque organe cible pour lequel le patient présente des risques de métastases. Néanmoins, l'utilisation seule de ces stratégies en clinique semble ambitieuse ; le couplage aux thérapies existantes paraît plus adapté, que ce soit dans le traitement des tumeurs primaires et des métastases.

En conclusion, notre travail a démontré que le récepteur CXCR7 est exprimé par les cellules des vaisseaux sanguins associés aux tumeurs dans les CCRs, aussi bien qu'au niveau des métastases de ces cancers. Notre travail suggère que le blocage du récepteur CXCR7 par un antagoniste spécifique pourrait être utilisé à des fins thérapeutiques pour traiter les métastases pulmonaires de cancer colique et d'ostéosarcome. Nos travaux mettent également en lumière le fait que les récepteurs de chimiokines peuvent jouer un rôle pro-tumoral dans le développement métastatique lorsqu'ils sont exprimés par les cellules du microenvironnement tumoral. Par ailleurs, nous mettons en évidence que l'impact de l'expression des récepteurs de chimiokines par les cellules du stroma tumoral sur la progression des métastases est dépendant de l'organe secondaire dans lequel celles-ci se développent ; alors que CXCR7 intervient dans le développement des métastases pulmonaires, il n'influence pas celui des métastases hépatiques des CCRs. Le choix des récepteurs de chimiokines à cibler dans le traitement des métastases doit donc tenir compte du type de cancer mais aussi du site secondaire où vont s'établir les métastases.

L'ensemble de nos résultats appuie l'idée d'utiliser ces couples chimiokines/récepteurs comme de nouvelles cibles pour le traitement des métastases pulmonaires. L'association en clinique d'une chimiothérapie ou d'agents ciblés avec l'inhibition d'un ou plusieurs couples chimiokines/récepteurs pourrait optimiser les traitements existants et améliorer la survie des patients. Toutefois, du fait de l'implication des chimiokines dans de nombreux processus biologiques et de la complexité de leur réseau, des essais précliniques supplémentaires seront nécessaire pour limiter le risque d'effets non souhaités, tels qu'une perte d'efficacité des réponses immunitaires nécessaires aux défenses du patient contre les pathogènes, ou contre la tumeur elle-même. Enfin, des essais cliniques devront être réalisés afin d'optimiser cette nouvelle approche thérapeutique.

Il apparaît clairement que les interactions chimiokines/récepteurs sont impliquées dans le développement de métastases à distance. Cependant, la capacité des cellules tumorales à se développer dans un nouveau tissu dépend de nombreux paramètres inhérents à la cellule elle-même et au tissu environnant, mais surtout à l'interface qui existe entre les deux. La nature et les mécanismes de régulation des interactions qui ont lieu entre les cellules tumorales et le microenvironnement sont la clé de la progression tumorale. Une meilleure connaissance de ces phénomènes biologiques permettra la mise en place de stratégies thérapeutiques de plus en plus spécifiques et efficaces.

II. Les chimiokines et leurs récepteurs, des acteurs anti-tumoraux : étude préclinique d'immunothérapie génique des métastases hépatiques du cancer colorectal par CX3CL1

Effets du transfert de gène CX3CL1-Ig dans les hépatocytes sur les métastases hépatiques des cancers colorectaux

Cette étude fait l'objet d'un article en cours de préparation (Article II)

A. Introduction

Les cancers colorectaux (CCRs) métastatiques, réservent un sombre pronostic pour les patients. Malgré les progrès des traitements anticancéreux, le taux de survie à 5 ans de ces patients reste faible (11,5%). Les métastases hépatiques représentent 50% des métastases des CCRs. Alors que la résection chirurgicale est encore aujourd'hui le seul traitement curatif proposé aux patients atteints d'un CCR métastasé au niveau du foie, seuls 10% d'entre eux sont opérables. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces est donc nécessaire. Ces nouveaux traitements auront pour objectif d'éliminer les métastases ou bien de les réduire pour permettre leur ablation chirurgicale, ou encore d'empêcher la récurrence après une résection. Une des stratégies explorées à l'heure actuelle est celle de l'immunothérapie. Cette stratégie thérapeutique, basée sur la stimulation du système immunitaire du patient, peut se concevoir suivant un mode passif ou actif. Dans un mode passif, des anticorps ou des cellules effectrices (obtenues par expansion *ex vivo*) sont administrés directement aux patients. Au contraire, le mode actif vise à stimuler directement les réponses immunitaires anti-tumorales de l'hôte. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour stimuler l'immunité anti-tumorale des patients (Salem et al., 2001; Xiang et al., 2013) ; dans notre cas, nous nous sommes intéressées à la stratégie basée sur l'utilisation des chimiokines (Franciszkievicz et al., 2012; Mohit and Rafati, 2012; Rosenblatt et al., 2002).

La majorité des tumeurs solides sont le siège d'une infiltration leucocytaire dont la composition varie d'un patient à l'autre, et qui dépend à la fois du type de tumeur et de l'environnement tumoral. Les chimiokines, par leurs actions chémoattractantes, participent à l'élaboration de cet infiltrat en attirant les diverses populations leucocytaires sur le site tumoral. Selon les chimiokines exprimées au sein de la tumeur, différentes sous-populations de cellules

immunitaires sont recrutées ; chacune de ces populations conduit à un effet distinct sur la progression tumorale, avec soit des effets pro-tumoraux, soit des effets anti-tumoraux (Lança and Silva-Santos, 2012; de Visser et al., 2006). En recrutant des populations cellulaires aux propriétés anti-tumorales, certaines chimiokines présentent donc un intérêt particulier pour l'immunothérapie des cancers. Dans ce contexte, il a été proposé qu'une importante expression exogène de certaines chimiokines au niveau du site tumoral pourrait permettre le recrutement intra-tumoral de cellules inductrices et effectrices de la réponse immunitaire de l'hôte, et ainsi stimuler efficacement une réponse immunitaire anti-tumorale (Franciszkiwicz et al., 2012). Pour exemple, dans un modèle spontané de carcinome broncho-alvéolaire chez la souris, il a été montré que le transfert de cellules dendritiques (DCs), modifiées génétiquement pour exprimer la chimiokine CCL21, entraîne une diminution significative du volume tumoral, résultant de la mise en place d'une réponse anti-tumorale innée (impliquant des cellules NK et des monocytes) et d'une réponse anti-tumorale spécifique (impliquant des lymphocytes T) (Yang et al., 2006). De nombreuses autres études précliniques pourraient ainsi être citées. Dans le CCR, le transfert des gènes codant CCL17, CCL20 ou encore CXCL10 entraîne une régression des tumeurs, voire leur élimination complète (Fushimi et al., 2000; Kanagawa et al., 2007; Narvaiza et al., 2000). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'en recrutant des leucocytes, plus particulièrement des monocytes, des DCs, des cellules NK ou des lymphocytes T (LTs) au sein de la tumeur, les chimiokines sont capables de provoquer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

La fractalkine (CX3CL1) est une chimiokine non conventionnelle qui, contrairement aux autres chimiokines (exceptée CXCL16) existe sous deux formes : une forme membranaire et une forme soluble. La forme membranaire (composée d'un domaine intracellulaire, d'une région transmembranaire, d'un domaine mucine et d'un domaine chimiokine, **Figure 21**) possède des propriétés de molécule d'adhésion vis-à-vis des leucocytes exprimant son récepteur CX3CR1 (Fong et al., 1998). Son clivage protéolytique génère une forme soluble de 90 kDa, seule forme dotée de propriétés chémoattractantes. CX3CL1, sous sa forme soluble, est décrite comme participant au recrutement et à l'activation des acteurs essentiels de la réponse immune anti-tumorale tels que les lymphocytes Th1, les LTs cytotoxiques, les cellules NK et les monocytes (Imai et al., 1997). De ce fait, elle apparaît comme une chimiokine particulièrement intéressante dans le cadre d'une approche d'immunothérapie des cancers. Par ailleurs, des études récentes ont montré que le niveau d'expression de CX3CL1 dans les cancers coliques, les adénocarcinomes gastriques et les cancers du sein est positivement corrélé à la survie des patients. (Hyakudomi et al., 2008; Ohta et al., 2005; Park et al., 2012). Dans les CCRs, si Ohta *et al.* ont apporté les premiers éléments de cette corrélation, celle-ci a été confirmée par une deuxième étude, dans laquelle une expression élevée de CX3CL1 au niveau des tumeurs coliques primaires a été

associée à une forte infiltration leucocytaire (LTs Th1, LTs CD8⁺ cytotoxiques) et aussi corrélée à un facteur de bon pronostic chez ces patients (Mlecnik et al., 2010). La fractalkine représente donc un bon marqueur pour le pronostic des patients atteints de différents cancers, dont les CCRs.

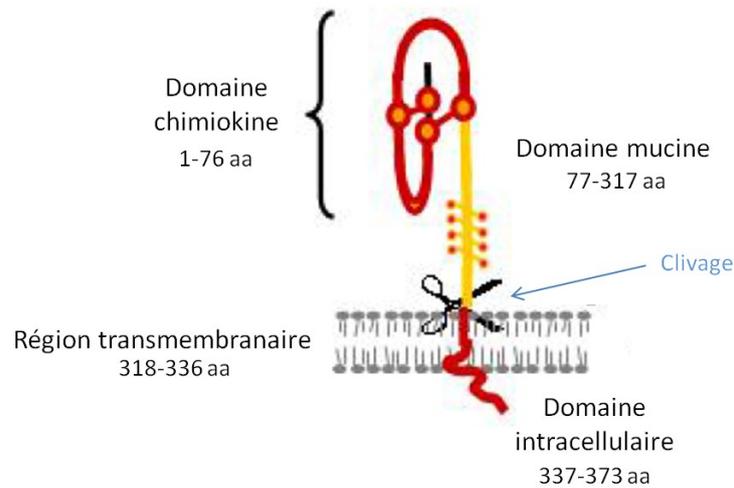


Figure 21 : Schéma de la structure de CX3CL1

aa : acides aminés

Des travaux préalables de l'équipe ont montré, dans un modèle de CCR chez la souris, que les cellules tumorales coliques génétiquement modifiées pour exprimer CX3CL1 ont un pouvoir tumorigène et métastatique significativement diminué par rapport aux cellules tumorales sauvages (Vitale et al., 2007). Ceci a également été démontré par différents groupes dans d'autres types de cancers tels que le lymphome, le cancer des poumons, le neuroblastome et l'hépatocarcinome (Guo et al., 2003a; Lavergne et al., 2003; Tang et al., 2007; Xin et al., 2005; Zeng et al., 2005). L'expression de CX3CL1 par les cellules tumorales se traduit par un recrutement leucocytaire important, spécifique de la tumeur d'origine et constitué principalement de cellules NK, de LTs et de DCs. De façon intéressante, Nukiwa *et al.* ont montré que le transfert de DCs, modifiées génétiquement *ex vivo* pour surexprimer CX3CL1, diminue significativement la croissance des tumeurs coliques et celle des cellules tumorales mélanocytaires, et ce, de manière dépendante des LTs CD4⁺ et CD8⁺ (Nukiwa et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats a conduit l'équipe à poser l'hypothèse que le gène CX3CL1 pourrait représenter un « gène-médicament » efficace dans les stratégies d'immunothérapie des CCRs. Pour cela, l'effet du délivrage du gène CX3CL1 a été étudié sur le développement des métastases préétablies de cancers coliques chez la souris. L'équipe a d'ores et déjà montré que le délivrage du gène CX3CL1 au niveau des poumons diminuait significativement le développement des métastases pulmonaires de CCR et d'ostéosarcome (Richard-Fiardo et al., 2011). L'effet des chimiokines étant fortement lié à l'environnement dans lequel elles exercent leurs actions, je me

suis également intéressée, dans ce travail de thèse, à l'effet du délivrage du gène CX3CL1 au niveau du foie sur le développement de métastases hépatiques de CCR.

B. Présentation des modèles d'études

Afin de réaliser cette étude préclinique d'immunothérapie génique, l'équipe a développé des modèles de métastases hépatiques expérimentales chez la souris (Vitale et al., 2007). Une fois les métastases préétablies, le gène CX3CL1 a été injecté dans la veine de la queue sous forme plasmidique. Le plasmide construit code pour la protéine CX3CL1 fusionnée au fragment Fc d'une IgG2a (CX3CL1-Ig) (Collaboration avec le Dr Philippe Deterre, INSERM UMR 945, UPMC Paris 6) ; ce fragment permet la formation de dimères de CX3CL1 et augmente ainsi la demi-vie de la protéine produite (Lavergne et al., 2003) (**Figure 22**). [...] **diffusion non autorisée**

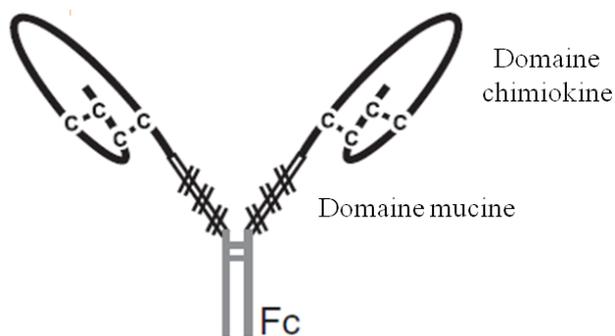


Figure 22 : Représentation schématique de la protéine CX3CL1-Ig

Le plasmide construit code pour la protéine CX3CL1 fusionnée au fragment Fc d'une IgG2a, ce qui entraîne la formation de dimères de CX3CL1 et augmente la demi-vie de la protéine produite.

[...] **diffusion non autorisée**

Article II

Effect of CX3CL1-Ig transgene delivery in experimental hepatic tumors of colorectal cancer using [X] as stabilizer of DNA nanocarriers

diffusion non autorisée

Elodie Guillemot^{1,2}, Babou Karimdje-Soilihi^{1,2,3}, Karim Dorgham⁴, Emilie Goguet-Surmenian^{1,2}, Marie-Ange Millet^{1,2}, Anne Lazari^{1,5}, Philippe Deterre⁴, Valérie Julia^{1,5}, Marie-Christine Saint-Paul^{1,6}, Jean-François Michiels^{1,6}, Heidy Schmid-Antomarchi^{1,2*}, Annie Schmid-Alliana^{1,2*}.

¹Université de Nice Sophia-Antipolis, UFR Médecine, 06107 Nice, France ; ²FRE-CNRS 3472, 06107 Nice, France ; ³Polyclinique St Jean, 06800 Cagnes/mer ; France, ⁴UMR-S 945 Inserm, Paris, France, ⁵UMR7275 CNRS, UMR-S 1080 Inserm, 06560 Valbonne, France ; ⁶Laboratoire Central d'Anatomie Pathologique, CHU Pasteur, 06002 Nice, France.

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr Annie Schmid-Alliana, FRE-CNRS 3472, Faculté de Médecine, 28 Avenue de Valombrose, 06107 Nice cedex 02, FRANCE

Email: schmid@unice.fr - Phone: 00 334 37 77 98 - Fax: 00 334 93 37 77 50.

Article II :

DIFFUSION NON AUTORISEE

C. Discussion et conclusions de la partie II

L'amélioration des traitements pour les patients porteurs de métastases, notamment dans le cas des cancers colorectaux (CCR), représente encore aujourd'hui un enjeu majeur pour la recherche. Les stratégies d'immunothérapie qui visent à réduire, voire à éradiquer ces métastases, ont d'ores et déjà démontré leur intérêt et leur potentiel dans de nombreuses études (Salem et al., 2001; Xiang et al., 2013), encourageant ainsi à poursuivre leur développement. Toutefois, le succès de l'immunothérapie des cancers dépend de l'efficacité du recrutement et de l'activation des populations leucocytaires au niveau des tumeurs. Dans ce contexte, la fractalkine (CX3CL1), décrite pour son rôle dans le recrutement des acteurs essentiels de la réponse immunitaire anti-tumorale, apparaît comme une molécule chémoattractante d'intérêt. De plus, la toxicité des chimiothérapies systémiques actuelles incite au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, dans lesquelles les traitements seront délivrés spécifiquement au niveau des sites métastatiques.

Notre étude montre que le délivrage du gène codant pour CX3CL1-Ig, formulé à [X] permettant de cibler les hépatocytes, réduit le développement des métastases hépatiques des tumeurs coliques. Le [X] est ainsi capable de délivrer un gène et donc de permettre l'expression de la protéine codée par celui-ci, spécifiquement au niveau du foie. Dans une approche similaire de délivrage ciblé dans les tissus, l'équipe a démontré que le délivrage du gène codant pour CX3CL1-Ig au niveau des poumons réduisait significativement le développement des métastases pulmonaires de CCR et d'ostéosarcome (Richard-Fiardo et al., 2011). Ces résultats démontrent que l'expression de CX3CL1 dans le microenvironnement tumoral peut conduire à une réduction du développement tumoral dans le cas des métastases hépatiques de CCR ou des métastases pulmonaires de CCR et d'ostéosarcome.

Cependant, selon le type de cancer considéré, l'axe CX3CL1/CX3CR1 semble participer de façon contradictoire à la progression tumorale (D'Haese et al., 2010). Ainsi, CX3CL1 a été impliquée dans la mise en place de réponses anti-tumorales dans le CCR, le cancer des poumons, l'hépatocarcinome et le lymphome (Guo et al., 2003a, 2003b; Lavergne et al., 2003; Tang et al., 2007; Xin et al., 2005). À l'inverse, dans d'autres types de cancer, cette chimiokine a été rapportée comme jouant le rôle d'acteur pro-tumoral, en particulier lorsque les cellules néoplasiques expriment son récepteur CX3CR1. Il a notamment été rapporté que dans le cancer de l'ovaire, l'expression de CX3CL1 intervient positivement dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales (Gaudin et al., 2011). Dans le cancer du sein, bien que l'expression du récepteur CX3CR1 dans les tumeurs primaires ne soit pas corrélée à la survie globale des patients,

elle est associée à la survenue de métastases au niveau du cerveau dans lequel CX3CL1 (l'unique ligand de CX3CR1) est produite (Andre et al., 2006). Dans le cancer de la prostate, CX3CR1 est exprimé par les cellules tumorales, et participe à la formation des métastases osseuses (CX3CL1 étant aussi sécrétée au niveau des os) (Jamieson et al., 2008; Shulby et al., 2004). Enfin, dans le cas du cancer du pancréas, le récepteur CX3CR1 a été impliqué dans l'invasion péri-neurale, c'est-à-dire dans la dissémination des cellules cancéreuses dans l'espace péri-nerveux où CX3CL1 est également exprimée (Marchesi et al., 2008, 2010).

Dans notre étude, l'expression de CX3CL1 dans le microenvironnement tumoral résulte en une diminution du développement des métastases hépatiques de cancers coliques, suggérant l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Plusieurs études s'intéressant à différents types de cancer ont rapporté que les LTs CD8⁺, CD4⁺ et les cellules NK sont les principaux leucocytes responsables de cette réponse anti-tumorale (Guo et al., 2003b; Lavergne et al., 2003; Xin et al., 2005). Des travaux ultérieurs de l'équipe, réalisés chez la souris et à l'aide de cellules cancéreuses modifiées génétiquement pour produire CX3CL1 en continu, ont permis de démontrer l'importance particulière des LTs CD4⁺ dans la réponse anti-tumorale induite par CX3CL1 au niveau des métastases hépatiques de CCR (Vitale et al., 2007). [...] **diffusion non autorisée**

En conclusion, notre étude a permis de montrer pour la première fois que [X] est un outil efficace qui permet, associé à des nanoparticules lipidiques, le ciblage et le délivrage d'un gène au niveau du foie et son expression. Ce système offre un avantage significatif par rapport aux traitements systémiques traditionnels en limitant leurs effets secondaires sur les organes sains des patients. Nous démontrons également pour la première fois que le délivrage du gène CX3CL1-Ig au niveau du foie est capable de stimuler une réponse anti-tumorale efficace de l'hôte conduisant à une diminution du développement des métastases hépatiques de CCR.

Les travaux réalisés à ce jour n'ont pas permis de déterminer précisément les mécanismes immunitaires sous-jacents à la réponse anti-tumorale induite par CX3CL1 dans notre modèle, ils apportent cependant des premiers éléments de décryptage. [...] **diffusion non autorisée**

Les résultats obtenus dans cette étude sont encourageants pour une utilisation en clinique du gène codant pour CX3CL1 dans les traitements des cancers colorectaux métastasés au niveau du foie ou des poumons. Toutefois, étant donné que cette stratégie d'immunothérapie visent à moduler les réponses du système immunitaire, les études cliniques devront veiller à ce que les doses de CX3CL1 produites soient suffisantes pour obtenir un effet anti-tumoral, mais surtout qu'elles n'entraînent pas de réponse inflammatoire indésirable pour le patient. Enfin, si le transfert du gène CX3CL1 seul sur le site métastatique est prometteur, son association avec les traitements préexistants conduiront probablement à de meilleurs résultats cliniques pour les patients.

III. Conclusions et perspectives générales

Le cancer est une maladie complexe dont les acteurs principaux se jouent de leurs voisins en prenant le meilleur et en évitant le pire. En effet, bien que les propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses guident la progression tumorale, les cellules de l'hôte qui entourent ces dernières ne jouent pas un rôle secondaire. Elles sont au contraire déterminantes dans le succès des différentes étapes du développement tumoral. Le cancer colorectal (CCR) ne déroge pas à ces règles et l'amélioration des traitements de ses métastases reste encore aujourd'hui un enjeu majeur pour la recherche.

Les chimiokines et leurs récepteurs, initialement décrits dans les réponses immunitaires pour leur rôle dans le recrutement des leucocytes, sont aujourd'hui impliqués dans de nombreux autres processus physiologiques et pathologiques. Aujourd'hui, si l'implication des couples chimiokines/récepteurs dans le cancer, et notamment dans les métastases, est clairement établie, en revanche leurs fonctions dans la physiopathologie des tumeurs restent complexes. En effet, certaines chimiokines vont favoriser la croissance des tumeurs primaires et des métastases, alors que d'autres au contraire, vont s'y opposer en stimulant notamment l'immunité anti-tumorale. Cette apparente dualité de fonctions des chimiokines les désigne comme des médiateurs clefs du dialogue entre les cellules tumorales et leur environnement et comme des molécules au rôle déterminant dans la progression des cancers. L'objectif de mon travail de thèse a consisté à explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les cancers colorectaux métastasés, visant soit à mettre à profit les propriétés anti-tumorales d'une chimiokine, ou au contraire, à bloquer un récepteur de chimiokines décrit pour ses effets pro-tumoraux.

Le blocage des chimiokines ou des récepteurs de chimiokines comme nouvelles stratégies thérapeutiques des cancers semble prometteur. De nombreuses molécules (antagonistes, anticorps, ARN interférents, etc.) ont été développées dans le but de bloquer spécifiquement la signalisation des couples chimiokines/récepteurs d'intérêt. Les nombreuses études réalisées à l'aide de modèles animaux ont démontré l'efficacité de ces stratégies, mais ont également permis de mettre en évidence le fait que les couples chimiokines/récepteurs participent au développement tumoral de manière tissu-spécifique. Ainsi, selon le type de cancer considéré et l'environnement dans lequel celui-ci se développe, différentes chimiokines et différents récepteurs sont mis en cause. Dans ce contexte, les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de démontrer que le récepteur CXCR7 représente une cible thérapeutique pertinente et à fort potentiel pour le traitement des métastases pulmonaires de CCR et d'ostéosarcome. Alors que dans la littérature, l'expression des

récepteurs de chimiokines par les cellules cancéreuses joue un rôle déterminant dans leur implication pro-tumorale, dans notre étude nous montrons que CXCR7 n'est pas exprimé par les cellules tumorales coliques et d'ostéosarcome, mais par les cellules des vaisseaux sanguins associés aux tumeurs. Notre étude montre donc que l'expression des récepteurs de chimiokines par le microenvironnement tumoral, et notamment les cellules endothéliales, peut également impacter le développement des tumeurs. Par ailleurs, notre étude confirme également que les chimiokines/récepteurs participent différemment au développement des métastases d'un même type de cancer en fonction de l'organe secondaire dans lequel celles-ci surviennent. Ainsi, CXCR7 ne semble pas participer à la croissance des métastases hépatiques de CCR, contrairement aux métastases pulmonaires.

Les chimiokines sont par définition des molécules chémoattractantes, elles interviennent dans le recrutement des leucocytes au sein des tumeurs et donc dans l'immunosurveillance. Les stratégies d'immunothérapies anti-tumorales, qui consistent en l'apport exogène ou en l'expression de certaines chimiokines dans les tumeurs, ont fait l'objet de nombreuses études. Les résultats observés dépendent (i) des chimiokines testées, (ii) du type de cancer étudié et (iii) de l'environnement dans lequel ce dernier se développe. De plus, l'ensemble de ces études tend à montrer que l'apport des chimiokines dans l'environnement tumoral conduit à une réponse immunitaire anti-tumorale efficace suite au recrutement des cellules NK, des cellules T et/ou des cellules dendritiques. Dans ce contexte, les travaux précédents de l'équipe, ainsi que ceux d'autres laboratoires, ont désigné CX3CL1 comme une chimiokine d'intérêt à fort potentiel anti-tumoral. Le modèle d'étude développé au cours de ma thèse, ainsi que celui développé précédemment par l'équipe, ont permis de démontrer que le transfert du gène CX3CL1, spécifiquement au niveau du site métastatique des cancers colorectaux, diminue significativement les métastases hépatiques et pulmonaires. **[X] diffusion non autorisée**

Cependant, dans l'optique d'une application en clinique des deux stratégies thérapeutiques proposées dans mon travail de thèse, il est important de considérer que toutes deux peuvent influencer le système immunitaire du patient. Dans le cas de la thérapie génique, une expression trop élevée de CX3CL1 dans un tissu est susceptible de provoquer une réaction inflammatoire inattendue. De même, en bloquant CXCR7, nous ne pouvons pas exclure la possibilité de perturber les cellules immunitaires qui exprimeraient ce récepteur. Bien que nous n'ayons relevé aucun effet semblable dans nos modèles, les études précliniques à venir devront être soucieuses des effets secondaires possibles que peuvent provoquer ces traitements au niveau inflammatoire et dans les défenses immunitaires du patient.

Bien que prometteuses, ces deux approches devront faire leurs preuves dans des essais cliniques où l'hétérogénéité de l'infiltration leucocytaire entre les patients est fortement susceptible de moduler les réponses à ces traitements. L'amélioration de nos connaissances sur la complexité du réseau chimiokines/récepteurs mais également sur le dialogue entre les cellules cancéreuses et le reste des cellules de l'organisme est primordiale afin d'appréhender au mieux les effets secondaires que peuvent entraîner toutes les nouvelles thérapies (exemple des résistances aux traitements anti-VEGF) utilisées à ce jour et à venir. Enfin, ces stratégies thérapeutiques doivent être plus sérieusement envisagées en association avec les thérapies actuelles afin de combiner les effets de chacun et assurer le meilleur résultat aux patients.

ANNEXES

Keywords: osteosarcoma; lung progression; animal models; chemokines/receptors; therapeutic target

CXCR7-mediated progression of osteosarcoma in the lungs

E Goguet-Surmenian^{1,2}, P Richard-Fiardo^{1,2}, E Guillemot^{1,2}, M Benchetrit^{1,3}, A Gomez-Brouchet⁴, P Buzzo⁵, B Karimjee-Soilihi^{1,2,6}, P Alemanno⁶, J-F Michiels^{1,3}, A Schmid-Alliana^{1,2,7} and H Schmid-Antomarchi^{*,1,2,7}

¹Université de Nice Sophia-Antipolis, UFR Sciences, Nice 06108, France; ²CNRS 3472, Nice 06202, France; ³Centre Hospitalier Universitaire, Laboratoire Central d'Anatomie Pathologique, Hôpital Pasteur, Nice 06002, France; ⁴Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Rangueil, Toulouse 31400, France; ⁵Département de Pharmacie, Centre Antoine Lacassagne, Nice 06189, France and ⁶Polyclinique Saint Jean, Cagnes/mer 06800, France

Background: Osteosarcoma (OS) is the most frequent primary malignant bone tumour in children and adolescents with a high propensity for lung metastasis. Chemokines and chemokine receptors have been described to have an important role in many malignancies including OS. The aim of this study was to investigate the expression of CXCR7 receptor in OS tissues and its role in the progression of the disease in the lungs.

Methods: Immunohistochemistry was used to study CXCR7 expression in primary tumours and metastatic tissues from patients with OS. Its contribution to tumour expansion in the lungs has been also assessed using animal models and synthetic-specific CXCR7 ligands.

Results: CXCR7 was expressed on human primary bone tumours and on lung metastases. Its expression was predominantly located on tumour-associated blood vessels. Mice challenged with OS cells and systematically treated with synthetic CXCR7 ligands presented a significant reduction of lung nodules compared with untreated mice.

Conclusion: This study shows that CXCR7 has a critical role in OS progression in the lungs, where are expressed CXCR7 ligands, especially CXCL12. Moreover, we highlight that synthetic CXCR7 ligands could represent a powerful therapeutic tool to impede lung OS progression.

Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignant bone tumour in children and adolescents. Despite significant improvements made over the past several decades in the therapeutic approach of OS, patients with metastases still have a very poor prognosis (less than 20% long-term survival). Osteosarcoma metastasises most commonly to the lungs, and pulmonary metastases are generally thought to be associated with a poor patient outcome (Aljubran *et al*, 2009).

Of the many factors involved in tumorigenesis, the chemokine/chemokine-receptor system has a critical role in tumour initiation, promotion and progression. Many cancers have a complex chemokine network that influences the immune cells infiltration of a tumour, as well as growth, survival and migration of

tumour cells, and angiogenesis (Johrer *et al*, 2008; O'Hayre *et al*, 2008).

Many studies have shown that the chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 are critical components in the regulation of tumour spread and metastasis in several types of cancer (O'Hayre *et al*, 2008). CXCR4 expression was previously shown in OS, but the correlation between CXCR4 level and OS prognosis is still debated (Oda *et al*, 2006; Lin *et al*, 2011; Baumhoer *et al*, 2012). Nevertheless, human and murine OS cell lines have been reported to express CXCR4 and, using animal models of OS, it was demonstrated that the inhibition of this chemokine receptor reduces the tumour progression in the lungs (Perissinotto *et al*, 2005; Kim *et al*, 2008).

*Correspondence: Dr H Schmid-Antomarchi; E-mail: antomarc@unice.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Revised 27 July 2013; accepted 29 July 2013

© 2013 Cancer Research UK. All rights reserved 0007–0920/13

Besides CXCR4, CXCL12 has been shown to exhibit a high affinity to the receptor CXCR7/RDC-1 (Balabanian *et al*, 2005; Burns *et al*, 2006). The expression of CXCR7 has been reported in a variety of tumour cell lines and human tumour samples (Burns *et al*, 2006; Miao *et al*, 2007; Meijer *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Calatuzzolo *et al*, 2010; Grymula *et al*, 2010; Hattermann *et al*, 2010; Kollmar *et al*, 2010; Luker *et al*, 2010; Miekus *et al*, 2010; Sun *et al*, 2010; Zheng *et al*, 2010; Guillemot *et al*, 2012). Moreover, tumour growth and aggressiveness are often correlated with the alteration of the receptor expression (Bennani-Baiti *et al*, 2010; D'Alterio *et al*, 2010; Grymula *et al*, 2010). A number of these studies have reported the critical role of CXCR7 in tumour vascular formation, angiogenesis and growth promotion of various cancers *in vivo* (Burns *et al*, 2006; Miao *et al*, 2007; Meijer *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Kollmar *et al*, 2010; Guillemot *et al*, 2012). However, the role of CXCR7 in OS has not yet been clearly evaluated. The present study was carried out to assess the contribution of CXCR7 receptor in the pulmonary expansion of OS. First, we investigated whether CXCR7 was expressed in OS cells and tissues of human and murine origins. Then, we explored whether the interactions between CXCR7 and its ligands are critical components for OS progression in the lungs. To test this hypothesis, experimental lung tumours of OS as well as specific synthetic CXCR7 ligands were used.

Our results indicate that CXCR7 mainly expressed on tumour-associated vessels can regulate OS progression in the lungs, where are expressed CXCR7 ligands, and thus could have a critical role in the metastatic process of OS.

MATERIALS AND METHODS

Human tissues. Tumour tissues from surgical resection specimens were obtained from the Department of Anatomopathology of Rangueil Hospital (Toulouse, France). All patients gave written informed consent and the study was approved by the hospital's ethics committee. Ten OSs derived from primary skeletal lesions and 8 cases from lung metastatic lesions (corresponding to lung recurrences in 8 out of 10 patients). Standard histological diagnosis was performed on 5- μ m sections of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. The histological diagnosis was reviewed by A.G-B (MD, PhD).

Tumour cell lines. The K7M2 cell line (mouse OS) was obtained from American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France). The SaOS-LM7 cell line (human OS) was kindly provided by E Kleinerman from Anderson Cancer Center (Houston, TX, USA). Cell lines were maintained in DMEM (K7M2) and in MEM (SaOS-LM7) as previously described (Pradelli *et al*, 2009).

Histology/immunohistochemistry. Formalin-fixed, paraffin-embedded sections of primary tumour and/or metastatic tissues from patients with OS and from mouse cancer models were stained with haematoxylin and eosin for morphological evaluation. For CXCR7 immunostaining, the tissue sections were subjected for 20 min to heat-mediated antigen retrieval in citrate buffer (pH 6) before blocking in sequential peroxidase and protein block for 20 min. Samples were incubated with anti-CXCR7 antibody clone 11G8 (R&D Systems, Lille, France) for 45 min at 10 μ g ml⁻¹ and 20°C and then, with a secondary HRP-conjugated goat anti-mouse antibody.

TaqMan real-time PCR experiments. Total RNA was extracted from mouse healthy lungs using RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). One microgram of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the Superscript III enzyme (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's instructions.

Real-Time PCR was performed in an ABI PRISM 7900 using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with a total of 12.5 ng cDNA as a template for amplification. Cycle parameters were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Relative mRNA expression levels are presented as ΔC_T , which show an inverse correlation with absolute mRNA levels. ΔC_T values were obtained by subtracting C_T control (mouse 18S, Mm 03928990-g1) from C_T target gene (mouse CXCL11 and CXCL12, Mm 00444662m1 and Mm 00445552m1, respectively) measured in the same RNA preparation.

Flow cytometry. K7M2 cells were preincubated with a purified rat anti-mouse CD16/CD32 monoclonal antibody (mouse BD Fc Block; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and SAOS-LM7 cells, with a purified human IgG (R&D Systems) in order to block non-specific antibody binding. Cells were then stained with a PhycoErythrin-conjugated mouse monoclonal anti-human CXCR7 antibody or with an isotype-matched control antibody (clone 11G8 or IgG1 control, R&D Systems, 0.1 μ g of IgG1 per 10⁶ cells) for 30 min at 4°C. Cells were analysed using a BD FACScanto II flow cytometer.

Animal studies. All of the procedures involving animals and their care were conducted in accordance with institutional guidelines (Permit number A06-088-14) and after approval by the local ethics committee (Permit number NCA 2008-02).

Experimental lung tumours of OS, referring to the late steps of the metastatic process (i.e., extravasation from the blood stream and tumour growth in the lungs) were induced by intravenous injection of K7M2 and SaOS-LM7 cells into 6- to 8-week-old BALB/c and Nude mice (Harlan, Gannat, France), respectively, as previously described (Pradelli *et al*, 2009). The treatments with synthetic-specific CXCR7 ligands were delivered to mice by intraperitoneal injections of 100 mg kg⁻¹ of the CCX771 compound or its early prototype, the CCX754 compound (Burns *et al*, 2006; Zabel *et al*, 2009), according to preventive or curative treatments as described below.

The preventive treatment was performed by treating mice one day before injection of K7M2 cells and for 3 consecutive days (from days -1 to day +3). The curative treatment was achieved by treating animals daily with synthetic CXCR7 ligands from days +5 to day +15 after the injection of K7M2 cells and from days +5 to +15 and again, days +20 to +30 following SaOS-LM7 injection. Fifteen days after the injection of the K7M2 cells or 10 weeks after the injection of the SaOS-LM7 cells, the mice were killed and the lungs were insufflated with 10% neutral-buffered formalin or with India ink dye (Williams and Lisanti, 2004) that reveals white tumour nodules against a black lung background. The extent of tumour development was assessed by recording the number of visible tumour nodules on the pleural surface and by recording the volume of all tumour nodules (cumulative volume).

Statistical analysis. Statistical comparisons were performed using the non-parametric Man-Whitney *U*-test and statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

CXCR7 expression in human tissues. CXCR7 expression was first analysed in human OS tissues derived from primary skeletal lesions ($n = 10$) and from lung metastatic lesions ($n = 8$) (Figure 1A and B, respectively) by using the CXCR7-specific monoclonal antibody 11G8 (Berahovich *et al*, 2010b). CXCR7 immunoreactivity was detected in at least 30% of the samples (3 out of 10 primary lesions, 3 out of 8 lung metastases; primary lesion and lung metastases were found together CXCR7-positive

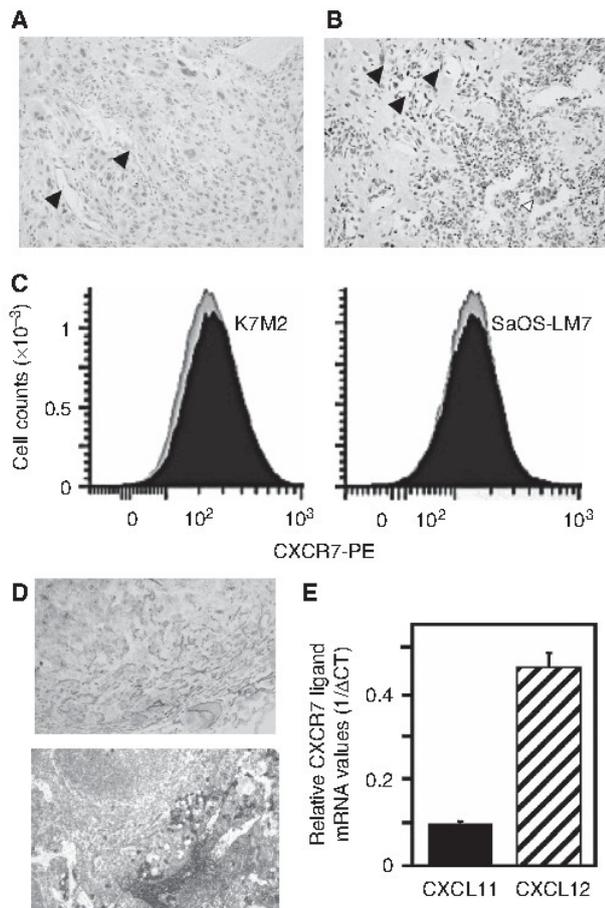


Figure 1. Expression of CXCR7 and its ligands in murine and human tissues. (A, B) Immunohistochemical analysis of CXCR7 expression on human biopsies of primary skeletal OS (A) and lung metastatic lesions (B). The filled arrows show CXCR7-stained tumour-associated vessels, whereas the open arrow signals CXCR7-stained OS cells. Magnifications $\times 400$. (C) Flow cytometry investigation of surface CXCR7 expression on K7M2 and SaOS-LM7 cells. Grey histograms represent cells stained with the isotype-matched control antibody. Black histograms show cells stained with an anti-CXCR7 antibody. Panels are representative of two independent experiments. (D) CXCR7 immunostaining of lung sections from SaOS-LM7-bearing mice (upper panel). Spleen sections from nude mouse are used as CXCR7-positive tissue control (lower panel). Positive staining is depicted as brown. Magnification $\times 200$. (E) Quantitative real-time PCR for the analysis of CXCR7 ligands expression in mouse healthy lungs. The relative expression levels of genes were calculated using 18S as a normalising gene and expressed as $1/\Delta C_T$. The mean \pm s.e.m. of duplicate per condition is shown. Representative of three independent experiments.

for one patient). In both types of lesions, CXCR7-specific reactivity was mostly located on tumour-associated vessels. The number of immunoreactive tumoral vessels within a lesion varied among the sample and ranged from 30 to 50%. Occasionally, CXCR7-specific reactivity was also apparent on tumour cells. In contrast, tumour osteoid, healthy tissues and normal vasculature were not stained by CXCR7 antibodies.

It is important to underline that we tested several other CXCR7 antibodies, one rabbit polyclonal (Abcam, PLC, Paris, France) and one mouse monoclonal (R&D) and found discordant stainings (data not shown). Interestingly, Berahovich *et al* (2010a)

highlighted that most CXCR7 antibodies commercially available were not specific, except for CXCR7 11G8 clone, thereby giving concrete explanation to discordant stainings that we observed with the other antibodies.

CXCR7 expression in mouse tumour cells and tissues. The CXCR7 expression was then investigated in lung tumours obtained in mice challenged with K7M2 and SaOS-LM7 OS cells. First, the cell surface CXCR7 expression was examined *in vitro* on both cell lines by flow cytometry, using the specific 11G8 anti-CXCR7 antibody. The expression of this receptor was undetectable in mouse K7M2 as well as in human SaOS-LM7 (Figure 1C) cells. The *in vivo* CXCR7 expression was then assessed in the tumour-bearing lungs from SaOS-LM7- and K7M2-inoculated mice. CXCR7 immunoreactivity was detected in all tumoural lung samples. As observed for human OS tissue samples, in SaOS-LM7 mouse lung sections (Figure 1D), CXCR7 immunostaining was mainly located on tumour-associated vessels and in a few cases, on some scarce tumour cells (not shown). In contrast, CXCR7 antibodies did not stain healthy tissues or normal vasculature. The same staining pattern was observed in the K7M2 model (data not shown).

Together, these data underline the relevance of our mouse models for human pathology study.

CXCR7 ligands expression in mouse lungs. Chemokines have a paramount role in the tumour progression through autocrine or paracrine mechanisms. We were thus interested in evaluating the lungs ability of healthy mice to produce the CXCR7 ligands. Quantitative real-time PCR analysis of CXCL11 and CXCL12 gene expression indicated that mouse lungs expressed both chemokines (Figure 1E).

CXCR7-mediated inhibition of lung nodules. We were first interested in evaluating the effects of systemic treatment with synthetic CXCR7 ligands, such as CCX754 and CCX771 compounds (Burns *et al*, 2006; Zabel *et al*, 2009), during the early stages of lung tumour formation. To this end, the effects of preventive-called treatment with CCX754, which started before OS cell inoculation and was continued two additional days, was evaluated in the model using K7M2 cells (Figure 2A). As depicted in Figure 2B, mice from both CCX754- and vehicle-treated groups developed numerous macroscopic pulmonary tumour foci. The extent of lung tumour development was significantly reduced by CCX754 treatment. CCX754-treated mice exhibited a 79% reduction in the number of lung nodules compared with vehicle-treated mice (13.3 nodules *versus* 63.2 nodules, respectively) (Figure 2C, left panel). The inhibitory effect of this treatment was also highlighted by the cumulative tumour volume that presented a 86% reduction in CCX754-treated mice compared with vehicle-treated mice (8.54 mm^3 *versus* 59.2 mm^3 respectively) (Figure 2C, right panel). Similar effects were obtained with the CCX771 compound (data not shown) that was used in the following experiments.

The effects of systemic CCX771 treatment were then evaluated on pre-established OS lung tumours. With this aim, K7M2-inoculated mice were subjected to curative CCX771 treatment or vehicle control (Figure 3A) and examined for tumour development (Figure 3B–D). As shown in Figure 3B, all mice from both groups developed macroscopic pulmonary tumour foci. However, there was a significant metastatic burden reduction in the lungs of CCX771-treated mice compared with the control group, as reflected in the number of foci (54.4 nodules *versus* 103 nodules, respectively) and in the cumulative tumour volume (36.5 mm^3 *versus* 82.2 mm^3 , respectively) (Figure 3C). Those data were confirmed by the histological analysis of lungs showing fewer and smaller tumour foci in CCX771-treated mice compared with vehicle-treated mice (Figure 3D).

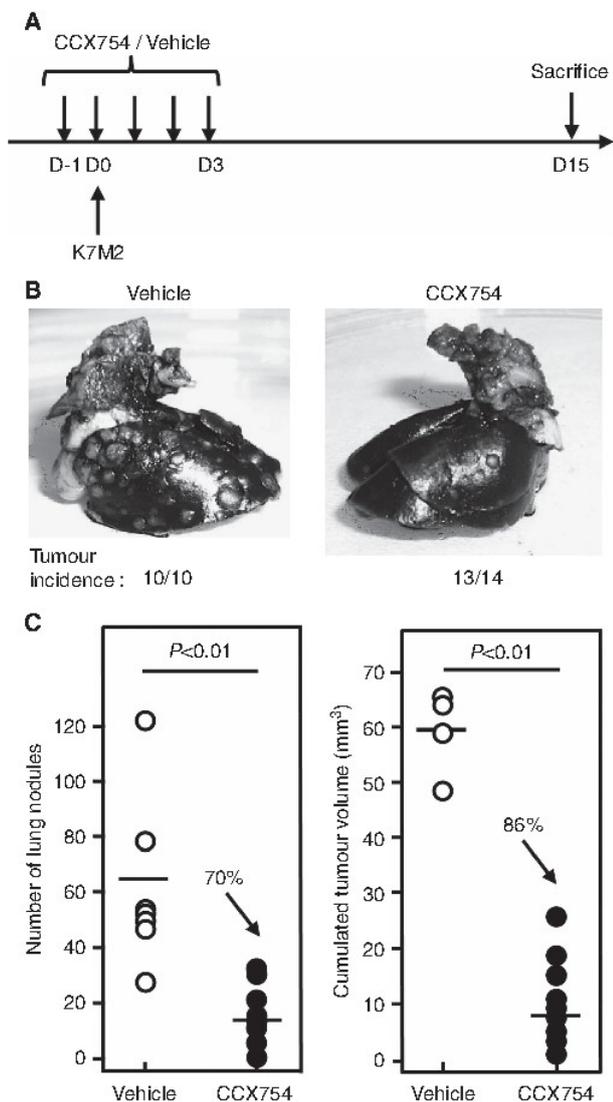


Figure 2. Effects of CXCR7-targeted treatment in the prevention of OS lung development. (A) Schematic representation of the preventive CXCR7-targeted treatment. K7M2 cells were injected into the tail vein of mice pretreated with vehicle or CCX754 compound, as described in the Materials and Methods section. Fifteen days later, mice were killed for lung examination ($n = 10–14$ mice per group). (B) Representative crude photographs of India ink-stained lungs harvested from vehicle- and CCX754-treated mice. (C) Extent of tumour development by recording the number of pulmonary nodules (left panel) and by measuring the cumulative tumour volume (right panel) in the lungs. Each dot represents the number or the cumulative volume of nodules for one mouse and the middle line represents the median values of each group of mice.

The effects of systemic treatment with synthetic CXCR7 ligands were next evaluated in human cells using the SaOS-LM7 model. SaOS-LM7-inoculated mice were subjected to curative CCX771 treatment or vehicle (Figure 4A) and the extent of tumour development was assessed as described above. As shown in Figure 4B, all vehicle-treated mice developed lung tumours, whereas only 50% of CCX771-treated mice displayed lung macroscopic nodules. Moreover, CCX771-treated mice exhibited fewer lung nodules than the control group (8.7 nodules *versus* 21.6

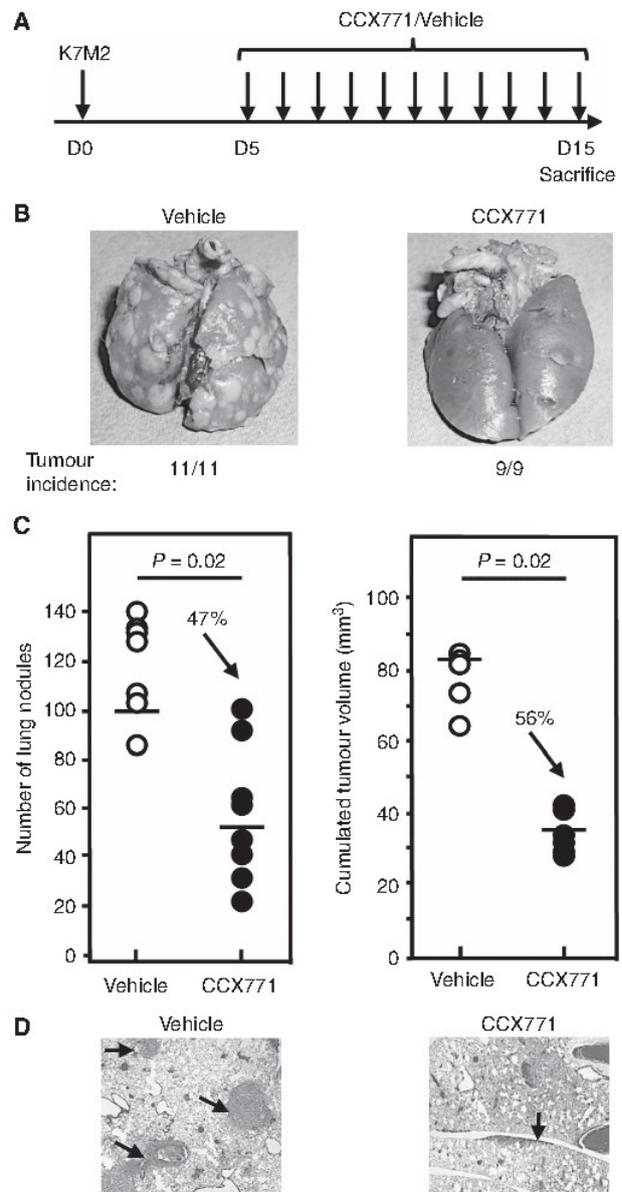


Figure 3. Effects of CXCR7-targeted treatment on pre-established K7M2 lung tumours. (A) Schematic representation of the curative CXCR7-targeted treatment. Mice were injected with K7M2 cells into the tail vein before receiving intraperitoneal injections of CCX771 or vehicle, as described in the Materials and Methods section. Fifteen days after injection of the K7M2 cells, mice were killed for lung examination ($n = 9–11$ mice per group). (B) Representative crude photographs of the lungs of vehicle-treated and CCX771-treated tumour-bearing mice. (C) Extent of tumour development by recording the number of pulmonary nodules (left panel) and by measuring the cumulative tumour volume (right panel) in the lungs. Each dot represents the number or the cumulative volume of nodules for one mouse and the middle line represents the median values of each group of mice. (D) Representative haematoxylin/eosin staining of lungs from vehicle-treated and CCX771-treated tumour-bearing mice. Arrows show metastases. Magnifications $\times 40$.

nodules, respectively) (Figure 4C, left panel). This inhibitory effect of CCX771 compound was also reflected in the cumulative tumour volume with a 65% reduction compared with the vehicle-treated

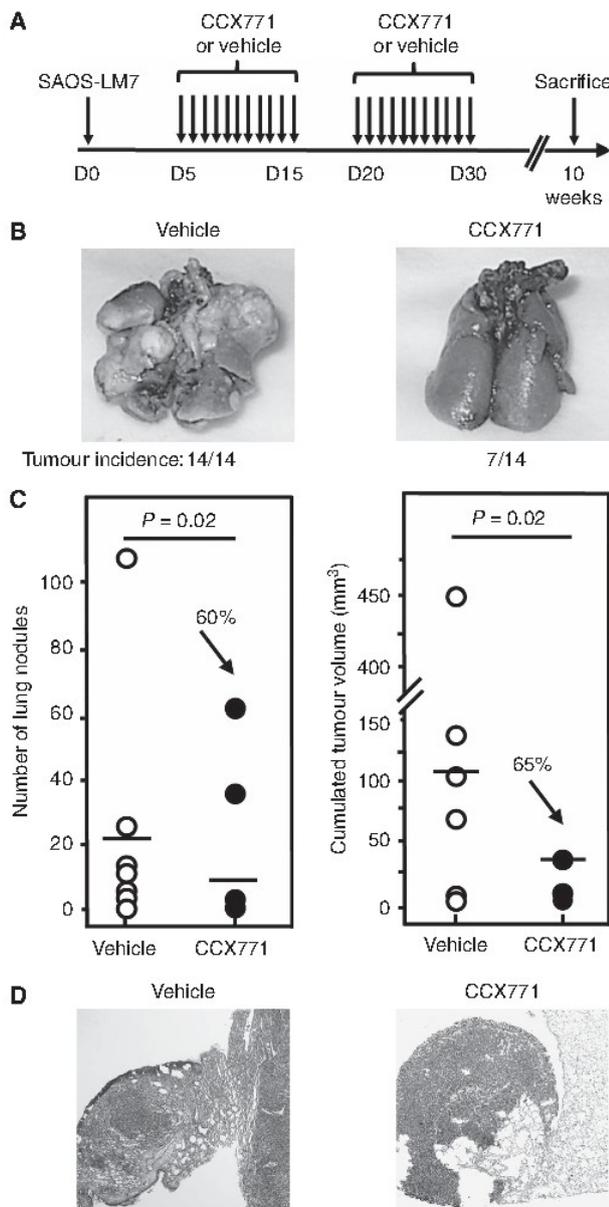


Figure 4. Effects of CXCR7-targeted treatment on pre-established SaOS-LM7 lung tumours. (A) Schematic representation of the curative CXCR7-targeted treatment. Mice were injected with SaOS-LM7 cells into the tail vein before receiving intraperitoneal injections of CCX771 or vehicle, as described in the Materials and Methods section. Ten weeks after injection of the SaOS-LM7 cells, mice were killed for lung examination ($n = 14$ mice per group). (B) Representative crude photographs of the lungs of vehicle-treated and CCX771-treated tumour-bearing mice. (C) Extent of tumour development by recording the number of pulmonary nodules (left panel) and by measuring the cumulative tumour volume (right panel) in the lungs. Each dot represents the number or the cumulative volume of nodules for one mouse and the middle line represents the median values of each group of mice. (D) Representative haematoxylin/eosin staining of lungs from vehicle-treated and CCX771-treated tumour-bearing mice. Deep purple areas show metastases. Magnifications $\times 40$.

group (39.1 mm^3 versus 110 mm^3 , respectively) (Figure 4C, right panel). These data were confirmed by the histological analysis of lungs, showing an almost complete invasion of pulmonary tissues

by tumour cells in control group, whereas the tumour burden was limited to some lung tissue areas in the group of CCX771-treated mice (Figure 4D).

DISCUSSION

This study tested the hypothesis that CXCR7 is critical for the progression of OS in the lungs. Here we show that CXCR7 is expressed in human OS tissues, more specifically in primary bone tumours as well as in lung metastases. We found that this receptor was expressed mainly on tumour-associated blood vessels and rarely on tumour cells and not at all on healthy bone, lungs or vasculature. These results were consistent with studies on other human cancers that had also described CXCR7 expression on the neovasculature associated with tumour and not on most non-transformed cells or on non-tumour vasculature (Miao *et al*, 2007; Guillemot *et al*, 2012; Monnier *et al*, 2012). These data suggested that CXCR7 may have an important role during the development of OS lung metastasis and have thus prompted us to assess their *in vivo* relevance in OS.

To investigate whether CXCR7 affects OS expansion in the lungs, we tested whether a systemic treatment with specific synthetic CXCR7 ligands could affect local growth of pre-established lung tumours in mice. Indeed, this treatment has been proven to strongly reduce the tumour expansion within the lungs of both SaOS-LM7- and K7M2-inoculated mice. De facto, CXCR7 may be viewed as a key factor in the progression of OS in the lungs. In addition, preventive CXCR7-targeted treatment administered to mice before the OS cell inoculation significantly reduced tumour formation, also pointing to a role of CXCR7 during the early stages of lung development of OS.

Collectively, these results highlight an essential role of CXCR7 in both the early and the late expansion stages of OS in the lungs and provide the first evidence of the potential of CXCR7-targeted strategies to cure or prevent OS lung expansion.

Despite numerous studies investigating the role of CXCR7 in tumorigenesis of a variety of tumours, the mechanism of action for this receptor remains unclear. Although our study did not allow us to elucidate the molecular mechanisms by which CXCR7 controls OS progression, our data nevertheless suggested possible mechanisms of action.

CXCR7 is a second receptor for CXCL12 that binds this chemokine with greater affinity than CXCR4. Several studies in zebrafish development and in mammalian systems suggest that CXCR7 primarily functions to sequester CXCL12 (Boldajipour *et al*, 2008; Luker *et al*, 2010; Naumann *et al*, 2010). Thus, reducing CXCL12 from its surrounding environment, CXCR7 shapes the extracellular CXCL12 gradient that directs the migration of CXCR4-expressing cells. Computational modelling revealed that CXCL12-producing cells and CXCR7-expressing cells functioned in a source-sink model of gradient formation for CXCR4-dependent chemotaxis (Torisawa *et al*, 2010). In addition to generating chemotactic gradients, CXCR7 may also maintain CXCL12/CXCR4 signalling by limiting desensitisation of CXCR4 during chronic exposure to CXCL12. As evidenced by our PCR experiments and reported by others (Muller *et al*, 2001), natural CXCR7 ligands, especially CXCL12, are expressed in healthy lungs. CXCR4 expression has been described on vascular endothelial cells and on their circulating progenitors (Miao *et al*, 2007; Dai *et al*, 2011; Monnier *et al*, 2012; Yan *et al*, 2012) and several reports have highlighted OS cells as CXCR4-expressing cells (Perissinotto *et al*, 2005; Kim *et al*, 2008). As CXCR7 serves as scavenger for CXCL12, it can be suggested that *in vivo* blockade of CXCR7 might result in enhanced levels of CXCL12. Indeed, it has been reported (Wang *et al*, 2012) that *in vivo* CCX754 treatment increase the levels of

CXCL12 in peripheral blood. Thus, it can be assumed that increasing amounts of chemokine released in the peripheral blood impedes CXCL12 gradient formation and promotes the desensitisation of CXCR4. Consequently, the migration and/or proliferation of CXCR4⁺ cells, especially OS cells, endothelial and endothelial-progenitor cells, would be altered and tumour expansion slowed or prevented. Thus, we could explain, as previously shown by Baumhoer *et al* (2012), that strong expression of CXCL12 is associated with a favourable outcome in OS.

CXCR7 is phylogenetically closely related to chemokine receptors but fails to couple to G proteins and to induce typical chemokine receptor-mediated cellular responses (Fredriksson *et al*, 2003; Burns *et al*, 2006; Thelen and Thelen, 2008). Unlike classical chemokine receptors, CXCR7 signals through β -arrestins in response to ligand binding without detectable activation of G proteins. β -Arrestins were initially discovered as negative regulators of G protein-mediated signalling by seven-transmembrane receptors (Lohse *et al*, 1990), but it was subsequently discovered that they were themselves capable of positively regulating cell signalling. Chemical compounds such as CCX771 and their precursors, originally developed by ChemoCentryx as « CXCR7 inhibitors », have shown agonistic activity in terms of CXCR7-dependent β -arrestin recruitment (Zabel *et al*, 2009). Consequently, we cannot exclude that the synthetic ligands of CXCR7 impede the OS lung expansion through mechanisms other than the chemokine scavenging one.

In summary, this study shows that CXCR7 has a critical role in OS progression in the lungs, where are expressed CXCR7 ligands, especially CXCL12. Moreover, we highlight that synthetic CXCR7 ligands can represent a powerful therapeutic tool to suppress or prevent lung OS progression.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Eugénie Kleinerman from MD Anderson Cancer Center of the University of Texas for providing SaOS-LM7 cell line and to Dr Mark ET Penfold (ChemoCentryx Inc.) for providing the synthetic CXCR7 ligands CCX771 and CCX754. We also thank Pr Mery Tulic (University of Western Australia) for her help with English language and all the technicians of the Animal Facility of INSERM Unit 1065 (Nice, France) for the excellent technical assistance. This research was supported by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the French National Center for Scientific Research (CNRS), by the French Cancer Research Association (ARC, Grant 4034) and by the Cancéropôle PACA (ACI 42259). P Richard-Fiardo is a recipient of an ARC postdoctoral fellowship.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Aljubran AH, Griffin A, Pintilie M, Blackstein M (2009) Osteosarcoma in adolescents and adults: survival analysis with and without lung metastases. *Ann Oncol* 20(6): 1136–1141.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280(42): 35760–35766.
- Baumhoer D, Smida J, Zillmer S, Rosemann M, Atkinson MJ, Nelson PJ, Jundt G, von Luttechau I, Nathrath M (2012) Strong expression of CXCL12 is associated with a favorable outcome in osteosarcoma. *Mod Pathol* 25(4): 522–528.
- Bennani-Baiti IM, Cooper A, Lawlor ER, Kauer M, Ban J, Aryee DN, Kovar H (2010) Intercohort gene expression co-analysis reveals chemokine receptors as prognostic indicators in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 16(14): 3769–3778.
- Berachovich RD, Penfold ME, Schall TJ (2010a) Nonspecific CXCR7 antibodies. *Immunol Lett* 133(2): 112–114.
- Berachovich RD, Zabel BA, Penfold ME, Lewen S, Wang Y, Miao Z, Gan L, Pereda J, Dias J, Slukvin II, McGrath KE, Jaen JC, Schall TJ (2010b) CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes. *J Immunol* 185(9): 5130–5139.
- Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, Wilson D, Xu Q, Raz E (2008) Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132(3): 463–473.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berachovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumour development. *J Exp Med* 203(9): 2201–2213.
- Calatozzolo C, Canazza A, Pollo B, Pierro ED, Ciusani E, Maderna E, Salce E, Sponza V, Frigerio S, Meco FD, Schinelli S, Salmaggi A (2010) Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. *Cancer Biol Ther* 11(2): 242–253.
- D'Alterio C, Consales C, Polimeno M, Franco R, Cindolo L, Portella L, Cioffi M, Calemme R, Marra L, Claudio L, Perdoni S, Pignata S, Facchini G, Carteni G, Longo N, Pucci L, Ottaiano A, Costantini S, Castello G, Scala S (2010) Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 10(7): 772–781.
- Dai X, Tan Y, Cai S, Xiong X, Wang L, Ye Q, Yan X, Ma K, Cai L (2011) The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 15(6): 1299–1309.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63(6): 1256–1272.
- Grymula K, Tarnowski M, Wyszczynski M, Drukala J, Barr FG, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ (2010) Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int J Cancer* 127(11): 2554–2568.
- Guillemot E, Karimjee-Soilhi B, Pradelli E, Benchetrit M, Goguet-Surmenian E, Millet MA, Larbret F, Michiels JF, Birnbaum D, Alemanno P, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A (2012) CXCR7 receptors facilitate the progression of colon carcinoma within lung not within liver. *Br J Cancer* 107(12): 1944–1949.
- Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, Mentlein R (2010) The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 70(8): 3299–3308.
- Johrer K, Pleyer L, Olivier A, Maizner E, Zelle-Rieser C, Greil R (2008) Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines. *Expert Opin Biol Ther* 8(3): 269–290.
- Kim SY, Lee CH, Midura BV, Yeung C, Mendoza A, Hong SH, Ren L, Wong D, Korz W, Merzouk A, Safari H, Zhang H, Hwang ST, Khanna C, Helman LJ (2008) Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin Exp Metastasis* 25(3): 201–211.
- Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, Haberl GC, Tilton B, Menger MD, Schilling MK (2010) CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer* 126(6): 1302–1315.
- Lin F, Zheng SE, Shen Z, Tang LN, Chen P, Sun YI, Zhao H, Yao Y (2011) Relationships between levels of CXCR4 and VEGF and blood-borne metastasis and survival in patients with osteosarcoma. *Med Oncol* 28(2): 649–653.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248(4962): 1547–1550.
- Luker KE, Steele JM, Mihalko LA, Ray P, Luker GD (2010) Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene* 29(32): 4599–4610.

- Meijer J, Ogink J, Roos E (2008) Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer* **99**(9): 1493–1501.
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumour growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(40): 15735–15740.
- Miekus K, Jarocha D, Trzyna E, Majka M (2010) Role of I-TAC-binding receptors CXCR3 and CXCR7 in proliferation, activation of intracellular signaling pathways and migration of various tumour cell lines. *Folia Histochem Cytobiol* **48**(1): 104–111.
- Monnier J, Boissan M, L'Helgoualch A, Lacombe ML, Turfin B, Zucman-Rossi J, Theret N, Piquet-Pellorce C, Samson M (2012) CXCR7 is up-regulated in human and murine hepatocellular carcinoma and is specifically expressed by endothelial cells. *Eur J Cancer* **48**(1): 138–148.
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**(6824): 50–56.
- Naumann U, Camerani E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M (2010) CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* **5**(2): e9175.
- O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ (2008) Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J* **409**(3): 635–649.
- Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Matsuda S, Tanaka K, Yokoyama R, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M (2006) CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis. *Mod Pathol* **19**(5): 738–745.
- Perissinotto E, Cavalloni G, Leone F, Fonsato V, Mitola S, Grignani G, Surrenti N, Sangiolo D, Bussolino F, Piacibello W, Aglietta M (2005) Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. *Clin Cancer Res* **11**(2 Pt 1): 490–497.
- Pradelli E, Karimjee-Soilihi B, Michiels JF, Ricci JE, Millet MA, Vandenbos F, Sullivan TJ, Collins TL, Johnson MG, Medina JC, Kleinerman ES, Schmid-Alliana A, Schmid-Antomarchi H (2009) Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. *Int J Cancer* **125**(11): 2586–2594.
- Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ, Wang J (2010) CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* **29**(4): 709–722.
- Thelen M, Thelen S (2008) CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* **198**(1–2): 9–13.
- Torisawa YS, Mosadegh B, Bersano-Begey T, Steele JM, Luker KE, Luker GD, Takayama S (2010) Microfluidic platform for chemotaxis in gradients formed by CXCL12 source-sink cells. *Integr Biol (Camb)* **2**(11–12): 680–686.
- Wang H, Beaty N, Chen S, Qi CF, Masiuk M, Shin DM, Morse 3rd HC (2012) The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12. *Blood* **119**(2): 465–468.
- Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS (2008) The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* **283**(7): 4283–4294.
- Williams TM, Lisanti MP (2004) The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* **36**(8): 584–595.
- Yan X, Cai S, Xiong X, Sun W, Dai X, Chen S, Ye Q, Song Z, Jiang Q, Xu Z (2012) Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *J Cell Biochem* **113**(4): 1437–1446.
- Zabel BA, Wang Y, Lewen S, Berahovich RD, Penfold ME, Zhang P, Powers J, Summers BC, Miao Z, Zhao B, Jalili A, Janowska-Wieczorek A, Jaen JC, Schall TJ (2009) Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J Immunol* **183**(5): 3204–3211.
- Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F, Ren GS (2010) Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumour growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* **29**: 31.

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported License.

Technical Advance: Actin CytoFRET, a novel FRET flow cytometry method for detection of actin dynamics in resting and activated T cell

Frédéric Larbret,^{*,†} Nicholas Dubois,^{‡,§} Frédéric Brau,^{||} Elodie Guillemot,^{§,¶} Karim Mahiddine,[†] Sophie Tartare-Deckert,^{‡,§} Valérie Verhasselt,^{*} and Marcel Deckert^{‡,§,||}

^{*}Tolérance Immunitaire and [§]Faculté de Médecine, Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice, France; [†]INSERM, U576, Flow Cytometry Facility, Hôpital Archet 1, Nice, France; [‡]INSERM, U1065, C3M, Microenvironnement, Signalisation et Cancer, Nice, France; ^{||}CNRS, UMR6097, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France; and [¶]FRE-CNRS 3472, Nice, France

RECEIVED JANUARY 11, 2013; REVISED MAY 30, 2013; ACCEPTED JUNE 1, 2013. DOI: 10.1189/jlb.0113022

ABSTRACT

Actin cytoskeleton plays a critical role in regulating T cell motility and activation. However, the lack of a real-time quantitative method to analyze actin assembly has limited the progress toward understanding actin regulation. Here, we describe a novel approach to probe actin dynamics on living T cells using FRET combined with flow cytometry. We have first generated a Jurkat T cell line stably coexpressing EGFP and mOrange FPs fused to actin. The real-time variation of actin monomer assembly or disassembly into filaments was quantified using a ratiometric flow cytometry method measuring changes in the mOrange/EGFP emission ratio. The method was validated on resting T cells by using chemical compounds with known effects on actin filaments and comparison with conventional microscopy imaging. Our method also detected the rapid and transient actin assembly in T cells stimulated by anti-CD3/CD28-coated beads, demonstrating its robustness and high sensitivity. Finally, we provide evidence that lentiviral-mediated transduction of shRNAs in engineered Jurkat cells could be used as a strategy to identify regulators of actin remodeling. In conclusion, the flow cytometric FRET analysis of actin polymerization represents a new technical advance to study the dynamics of actin regulation in intact cells. *J. Leukoc. Biol.* 94: 000–000; 2013.

Abbreviations: EC₅₀=half-maximal effective concentration, EYFP=enhanced YFP, FP=fluorescent protein, FRET=fluorescence resonance energy transfer, FRET-ACT=FRET-actin reporter cell line, FRET-CTRL=FRET-control reporter cell line, HSP90=heat shock protein 90, IS=immunological synapse, JASP=Jasplakinolide, LB=Latrunculin B, MFI=mean fluorescence intensity, mTFP1=monomeric teal (cyan) fluorescent protein derived from *Clavularia* cFP484, PGK=phosphoglycerate kinase, RNAi=RNA interference, sh=small hairpin, WASP=Wiskott-Aldrich syndrome protein, WPRE=woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

Introduction

Actin cytoskeleton dynamics critically regulate a variety of biological processes, including T cell activation [1]. One central event of T cell stimulation is the formation of cell–cell contacts between lymphocytes and APCs, leading to the formation of an actin-rich structure at the T cell/APC contact zone, known as the IS [2, 3]. This event involves the engagement of the TCR and membrane receptors, such as the costimulatory receptor CD28, that triggers multiple intracellular signaling pathways [4, 5]. In addition to integrating these complex molecular pathways of T cell activation, actin reorganization controls additional intrinsic properties of circulating T lymphocytes, including cell plasticity, polarization, adhesion, migration, and survival [6].

In spite of the importance of actin remodeling for proper T cell functions, there is a paucity of methods allowing the real-time monitoring of actin dynamics in living lymphocytes. Phalloidin staining is a popular method to measure the total amount of F-actin. However, cells need to be fixed and permeabilized, prohibiting live cell analysis and real-time monitoring of actin dynamics. In addition, phalloidin has been reported to share its binding site with the actin-binding protein cofilin, thus altering the pattern of actin filaments labeled by phalloidin [7]. FRET analysis has emerged as a convenient approach to investigate the dynamics of protein–protein interactions in living systems. Previous studies have reported the use of fluorescent-actin variants combined with the FRET technique to analyze the equilibrium between G-actin and F-actin in other cellular systems [8, 9] and highly plastic cellular structures, such as the neuronal synapse [10]. However, a major drawback of these methods is that they are based on nonquantitative time-lapse microscopy examination, which is time-consuming

1. Correspondence: University of Nice Sophia-Antipolis, INSERM U1065 (C3M), Team "Microenvironment, Signaling and Cancer," Bâtiment Universitaire Archimed, 151 Route de Ginestière BP 23194, 06204 Nice cedex 3, France. E-mail: deckert@unice.fr

and lacks robust statistical analysis. In addition, the interpretation of the results may present a high degree of subjectivity [11]. Furthermore, investigations on nonadherent living cells raise additional difficulties for time-lapse microscopy measurements because of random cell movements that make cell tracking technically challenging. Compared with conventional microscopy, flow cytometry analysis of living cells displays several advantages, including being population-based and permitting the fast recording of a large number of events. The majority of FRET determinations carried out with flow cytometry was developed for cytometers equipped with 488 nm and 405 nm lasers adapted to the popular pair of FPs—CFP and YFP [12–15]. However, the photophysical properties of this fluorescent tandem are not optimal for FRET experiments. First, CFP and YFP have broad excitation and emission spectra with a small Stokes shift [16]. Second, quantum yield of CFP is low, implying that a relatively high amount of excitation energy is needed to generate FRET. Moreover, YFP can photoconvert into CFP-like species [17]. Finally, other FPs have emerged during the last several years [18], increasing the possibility to develop FRET pairs of fluorescent markers best adapted for quantitative flow cytometry analysis.

In this study, we report the development of a novel method of actin dynamics monitoring in live T cells based on FRET detection by flow cytometry. Following the optimization of different FRET reporters formed by two FPs (donor and acceptor), we generated a Jurkat T cell line stably expressing EGFP- and mOrange-actin fusion proteins to assess the equilibrium between G- and F-actin in living cells. Our method was validated on resting and stimulated T cells by using chemical actin cytoskeleton modulators and lentiviral-mediated transduction of shRNAs targeting the regulator of actin polymerization, WASP. The flow cytometric FRET analysis of actin assembly thus represents a new technical advance to study the dynamics of actin regulation in intact T cells.

MATERIALS AND METHODS

Cells, culture, antibodies, and reagents

The Jurkat T cell leukemic line and 293T human kidney cells were from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Jurkat and 293T cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ in RPMI, supplemented with 10% FBS (HyClone, South Logan, UT, USA) and DMEM, 10% FBS, respectively. Antibodies against β -actin, EGFP, WASP, and HSP90 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-mOrange was from Clontech (Mountain View, CA, USA). Chemicals and actin toxins were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). For treatment with actin toxins, Jurkat cells were grown in 48-well plates at a density of 1×10^6 cells/ml and incubated with JASP and LB at 500 nM for different times at 37°C.

Plasmid constructions

Plasmid constructions, cloning, and DNA sequencing were carried out according to standard protocols. The plasmids encoding EYFP, mCherry, and mOrange were from Clontech. The plasmid encoding CFP H148D [19] was a kind gift from Dr. Oliver Albagli (INSERM U790, Institut Gustave Roussy, PR1, 39 Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France). For single-color expression (EGFP, mOrange, CFP H148D, T-Sapphire, or mTFP1), the pRRLSIN.cPPT.PGK-EGFP.WPRE vector (Plasmid #12252; Addgene, Cambridge, MA, USA) was transformed by replacing EGFP cDNA with a cDNA

encoding a different FP using *Bam*HI and *Bsp*GI digestion. The fusion FP pairs CFP/EYFP, EGFP/mCherry, and EGFP/mOrange were also cloned by adding at the C-terminal of the donor FP the appropriate acceptor FP into the *Bsp*GI site of the PRRL vectors transformed previously. For the fusion FP pairs T-Sapphire/mOrange and mTFP1/mOrange, we modified the pRRLSIN.cPPT.PGK-EGFP-mOrange.WPRE vector by replacing EGFP with T-Sapphire (provided by Dr. Otilia Zapata-Hommer, Max-Planck-Institut für Neurobiologie Am Klopferspitz 18a 82152 Martinsried, Germany) or with the mTFP1 (a gift from Dr. Oliver Albagli) using the *Bam*HI and *Bsp*GI cutting sites. For EGFP fused to actin or mOrange fused to actin, actin cDNA was amplified by PCR using the following primers: 5'-GCCCGATAAACCCTACTGT-3' and 5'-ATAATAGTACTACTAGAAGCATTTGCG-3'. The amplified cDNA was then cut with *Bsp*GI inserted into the *Bsp*GI sites of pRRLSIN.cPPT.PGK-EGFP.WPRE or pRRLSIN.cPPT.PGK-mOrange.WPRE. The sh-LacZ control pENTR/H1/TO vector was described previously [20]. The H1-shLacZ cassette from the pENTR/H1/TO plasmid was cut using *Sal*I and *Eco*RV and inserted into the *Xho*I and *Eco*RV sites of the pRRLSIN.cPPT.PGK-CFP.WPRE lentiviral vector. The WASP shRNA lentiviral expression vector pRRL-H1-shWASP-PGK-EGFP was a generous gift of Dr. Anne Galy (INSERM, UMR_S951, G n thion, Evry, France) [21]. The cDNA encoding EGFP in the original vector was replaced by CFP H148D cDNA using *Bam*HI and *Bsp*GI restriction sites.

Lentivirus production

Lentiviral particles were produced as described previously [22]. Briefly, 293T cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with pMD2.G (Plasmid #12259; Addgene) and pCMVRS.74 (Plasmid #22036; Addgene) and a selected pRRL vector from those described above. Supernatants were collected 72 h after the transfection, centrifugated for 5 min at 3000 rpm, and filtered. Lentivirus stocks containing $\sim 10^9$ infectious particles/ml were aliquoted and stored frozen at -80°C .

Generation of FRET reporter and stable shRNA cell lines

To generate the FRET reporter cell lines, 1×10^6 Jurkat cells were infected with 1 ml lentiviral particles encoding EGFP-actin for 12 h, washed, and cultured for 48 h. Cells were then washed twice and cloned by FACS with a BD FACSAria II cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After 3 weeks, the EGFP-actin-expressing Jurkat cells were infected with mOrange-actin or free mOrange lentiviral particles. Cells expressing a similar and high amount of mOrange were then cloned by cell sorting to generate the FRET-ACT and the FRET-CTRL. Stable shRNA Jurkat cells were obtained following infection with lentiviral particles encoding shRNA sequences targeting LacZ and WASP mRNAs. Cells were washed, cultured for 48 h, and sorted on a BD FACSAria II cell sorter.

Cell lysis and immunoblotting

Cells were lysed in ice-cold lysis buffer: 1% Triton X-100 in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) for 30 min on ice. Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblot analyses as described before [20].

Measurement of F-actin/G-actin ratio

Cells were washed in ice-cold PBS prior to lysis with 500 μ l F-actin stabilization buffer (100 mM PIPES, pH 6.9, 30% glycerol, 5% DMSO, 1 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM ATP, and protease inhibitors) on ice for 10 min. Supernatants containing G-actin were recovered after centrifugation at 16,000 *g* for 75 min at 4°C. Pellets containing F-actin were resuspended in 500 μ l F-actin depolymerization buffer (100 mM PIPES, pH 6.9, 1 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂, and 5 μ M cytochalasin D) on ice for 1 h. Equal volumes of supernatant (G-actin) and pellet (F-actin) were subjected to immunoblot analysis using antibodies against actin,

EGFP, or mOrange. The ratios of F-actin to G-actin were determined for endogenous actin, EGFP-actin, and mOrange-actin using densitometry and ImageJ software.

CD3/CD28-mediated Jurkat activation

FRET-CTRL and FRET-ACT Jurkat cells were activated with anti-CD3/CD28-coupled beads (Dynabeads human T-activator CD3/CD28; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells (1×10^4) were cultured with beads (1×10^6) in 200 μ l RPMI 1640 with 10% FBS in a round-bottom microplate for different times at 4°C or 37°C. The beads were then labeled with Alexa Fluor 647-conjugated anti-IgG1 antibody during 15 min at 4°C or 37°C. Cell/bead conjugates were analyzed by flow cytometry by gating on Alexa Fluor 647 fluorescence. FRET ratio was then determined on FRET-CTRL and FRET-ACT cells in conjugates formed at 4°C or 37°C. The efficacy of cell/bead conjugation was also verified by confocal microscopy.

Phalloidin staining

Jurkat cells were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS and permeabilized with 0.05% saponin in PBS, 1% BSA, for 20 min at room temperature. Cells were washed, and F-actin was labeled with 100 ng/ml Alexa Fluor 647 phalloidin (Life Technologies) for 30 min at 22°C. Following three washes in 1% BSA in ice-cold PBS, polymerized actin was measured by flow cytometry or confocal microscopy.

FRET measurement

To measure FRET for EGFP-mCherry and EGFP-mOrange tandems, cells were excited with the 488-nm laser, and donor fluorescence was collected in the EGFP channel with a 530/30-nm filter, whereas the FRET-signal was measured with a 585/42-nm filter for mOrange and 610/15-nm filter for mCherry. To measure mOrange, cells were excited at 560 nm, whereas emission was taken with a 585/42-nm filter. For experiments with CFP H148D-EYFP and T-Sapphire-mOrange FP pairs, a 405-nm excitation wavelength was used. CFP H148D and T-Sapphire fluorescence emissions were detected through 460/20- and 510/50-nm bandpass filters, respectively, whereas FRET signals were measured with a 530/30-nm filter for the CFP H148D-EYFP couple and a 585/82-nm for the T-Sapphire/mOrange pair. These measurements were performed using a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) equipped with four lasers (405, 488, 633, and 560 nm). The mTFPI-mOrange FRET pair was analyzed using a FACSVantage SE flow cytometer equipped with a 457-nm wavelength excitation laser. mTFPI fluorescence emission was then collected with a 510/50-nm bandpass filter and FRET signal with a 582/42-nm filter.

FRET measurements on treated or untreated FRET-CTRL and FRET-ACT cells were performed using Fortessa or FACSCanto II flow cytometers by using a 488-nm donor-excitation wavelength. FRET variations were calculated by determining the ratio between the fluorescence intensity emitted at 585/42 nm that corresponds to mOrange emission as a result of FRET and the fluorescence intensity emitted at 530/30 nm corresponding to EGFP. For each sample, we evaluated a minimum of 5000 cells that fell within the adjusted morphology gate.

Confocal microscopy analysis

Confocal laser-scanning microscopy analyses were performed on living FRET-ACT cells cultivated in chamber slides (Lab-Tek, Hatfield, PA, USA). Observations were performed with a laser-scanning confocal microscope (LSM780; Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA), equipped with an AxioObserver inverted microscope, using a Plan-Apochromat 63 \times /1.4 NA oil-immersion objective. The EGFP, mOrange, and FRET emissions were imaged by a λ acquisition (32 images) on a spectral window with the multichannel detector from 500 to 670 nm, with a 488-nm argon laser excitation. Mean intensity of FRET (image at 590 nm) versus EGFP emission (image at 510 nm) was extracted from the λ series on regions of interest drawn on the cells. Data were represented as a FRET ratio determination. In some experiments, FRET-ACT cells were cultured on fibronectin-coated chamber slides

before phalloidin staining, as described above, and microscopy analysis of F-actin, EGFP-actin, and mOrange-actin distribution.

Statistical analysis

Unless otherwise stated, experiments were repeated at least three times, and representative data are shown. Data are expressed as the mean \pm so. Student's *t*-tests were performed to determine statistical significance. A *P* value of <0.05 was considered significant.

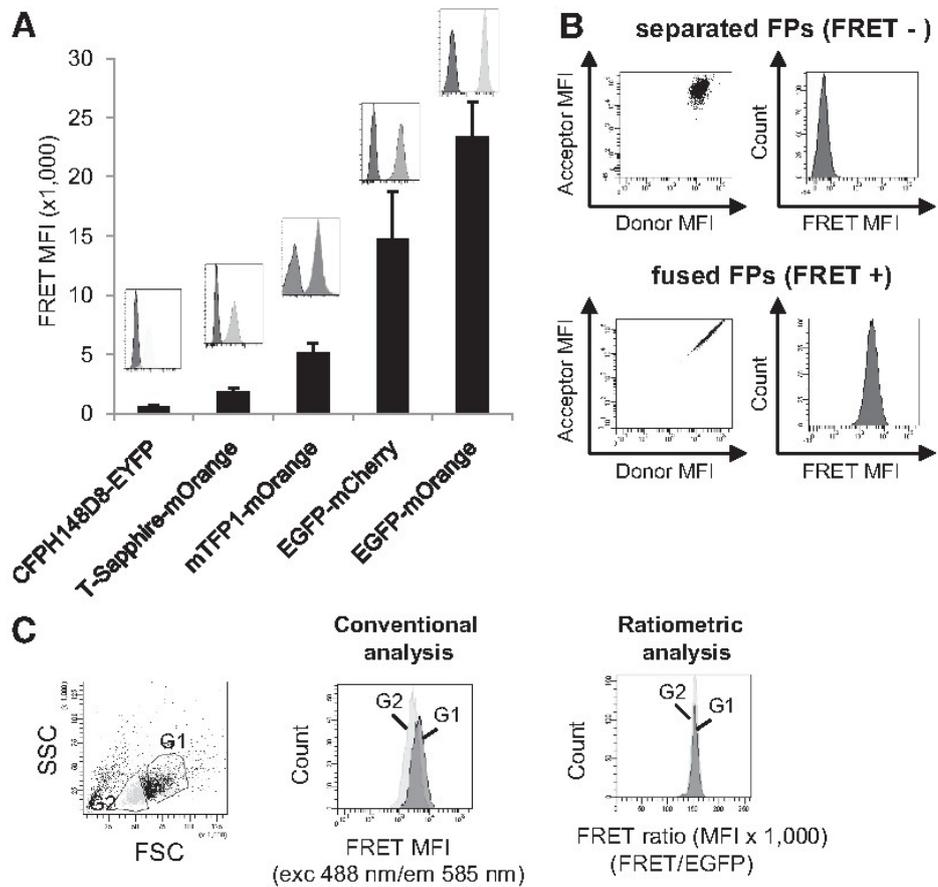
RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of FRET analysis by flow cytometry

To establish an assay to measure FRET signals by FACS, we first determined the most efficient pair of FPs in the flow cytometry analysis. The combination of ECFP and EYFP is one of the most popular currently used in FRET analysis. However, this pair of FP is not optimal because of the low quantum yield of ECFP and the spectral overlap between donor and acceptor (66%; Supplemental Table 1). We thus constructed and tested five different pairs of FP for flow cytometric energy-transfer measurements, according to the spectral overlap between donor and acceptor FP, their quantum yield, their stability, and the percentage of donor absorbance laser (Supplemental Table 1). Fluorescent properties also had to be adapted for lasers found in commonly available flow cytometers. With the use of three donor proteins with the excitation wavelengths CFP H148D and T-Sapphire (405 nm), mTFPI (457 nm), and EGFP (488 nm) and two acceptor proteins with the excitation wavelengths EYFP (488 nm) and mCherry and mOrange (560 nm), we designed five chimeras with the same polypeptide linker between donor and acceptor (Supplemental Fig. 1A). With the use of lentiviral gene transduction, each pair of FP was stably expressed in Jurkat cells. FRET analysis by FACS was then performed using a standard method, based on the measurement of the acceptor fluorescence under the donor-excitation source (Supplemental Fig. 1B). For each FP used, we applied a set of filters detailed in Supplemental Fig. 1A. We then determined the most efficient FRET pair by comparing the MFI on the donor-excitation laser line and found that the EGFP-mOrange fusion was the best pair of FPs in the production of FRET signals (Fig. 1A). As a control, we show that when expressed separately in Jurkat cells, donor and acceptor did not produce FRET signals compared with the FP fusion (Fig. 1B) and that each FP fusion was expressed at a similar protein level, as indicated by immunoblot analysis (Supplemental Fig. 1C). In addition to an optimally excited donor protein, mOrange shows a higher quantum yield and spectral overlap with EGFP than mCherry, thus explaining the performance of the EGFP-mOrange fusion in terms of FRET emission (Fig. 1A).

We next compared FRET signals obtained with the EGFP-mOrange pair by flow cytometry using two different methods: the conventional FRET analysis consisting of the measure of acceptor intensity under the donor-excitation wavelength and a ratiometric analysis, in which the ratio of acceptor and donor signals is determined under the donor-excitation wavelength (FRET ratio; Fig. 1C). Unlike the conventional method, the ratiometric method takes into account the modification of the fluorescence properties of both donor and acceptor FPs, such as donor-quenching or acceptor fluorescence emission.

Figure 1. Optimization of flow cytometric FRET analysis. (A) Representative FACS histograms showing the intensity of the FRET signal in cells transfected with the indicated pair of fused, donor-acceptor FPs compared with the mock signal. Bar histograms show relative MFI of FRET for each kind of fused FPs. Data represent the mean \pm SD of three different experiments. (B) Jurkat cells were transfected with separated donor (EGFP) and acceptor (mOrange) FPs or with fused donor-acceptor FPs, and the FRET signal was analyzed by flow cytometry. A representative determination out of three independent experiments is shown. (C) Comparison of two different flow cytometry methods to measure FRET of the EGFP-mOrange FP pair. Two morphological gates (G1 and G2) were drawn to analyze Jurkat cells expressing the EGFP-mOrange FP pair (left). FRET signals were then measured in G1 and G2 by the conventional method consisting of the measure of acceptor intensity under the donor excitation wavelength [excitation (exc) 488 nm/emission (em) 585 nm; middle] or a ratiometric analysis, in which a ratio between FRET signals (excitation 488 nm/emission 510 nm) is determined (right). Data are representative of three determinations. SSC, Side-scatter; FSC, forward-scatter.



In addition, the ratiometric method is likely to decrease non-FRET fluorescence variations that follow changes in culture conditions (e.g., pH changes, reagent addition) or autofluorescence induced by cell-size modifications. Indeed, cell-size increase (Gate G1 vs. G2) resulted in increased, nonspecific FRET signals when measured with the conventional method (22,229 vs. 15,352) but not with the ratiometric method (152,309 vs. 152,242), which takes into account the modification of both donor and acceptor FPs (Fig. 1C). Another advantage of the ratiometric analysis is the use of a linear fluorescence scale that allows the representation of FRET variations as a percentage of variation from basal FRET. The EGFP and mOrange pair of FPs, combined with a ratiometric method of FRET analysis by flow cytometry, was hence chosen for subsequent analyses.

Generation of a reporter cell line for the analysis of FRET-actin sensors by flow cytometry

First, EGFP and mOrange fluorescent chimeras of actin proteins were engineered. As the distance between actin monomers in F-actin is 55 Å, the alignment of donor and acceptor fluorescent-actin variants in filaments allows the generation of

FRET signals resulting from actin dynamics in living cells, as shown in the schematic view of our method's principle (Fig. 2A). With the use of a combination of sequential lentiviral transduction and single-cell sorting (Supplemental Fig. 2), we generated two Jurkat cell lines: a FRET-negative control cell line stably expressing EGFP-actin and free mOrange (FRET-CTRL cell line) and a FRET-positive experimental cell line stably expressing EGFP-actin and mOrange-actin (FRET-ACT cell line). One limitation of our method may arise from the inclusion of endogenous actin monomers into actin filaments, a phenomenon that may decrease the alignment of FRET-generating donor and acceptor fluorescent-actin monomers. However, densitometry analysis of an antiactin immunoblot showed that actin FPs represented 51% of the total amount of actin in FRET-ACT cells, reducing the impact of this aspect on FRET dynamics. Also, the relative expression of actin FPs was found similar, as shown by immunoblot analysis using anti-EGFP and anti-mOrange antibodies (Fig. 2B). We next controlled that the actin FPs are properly incorporated into actin cytoskeleton of Jurkat cells. A biochemical sedimentation method separating F-actin from G-actin showed that EGFP-actin, mOrange-actin, and endogenous actin were distributed equally into F-actin

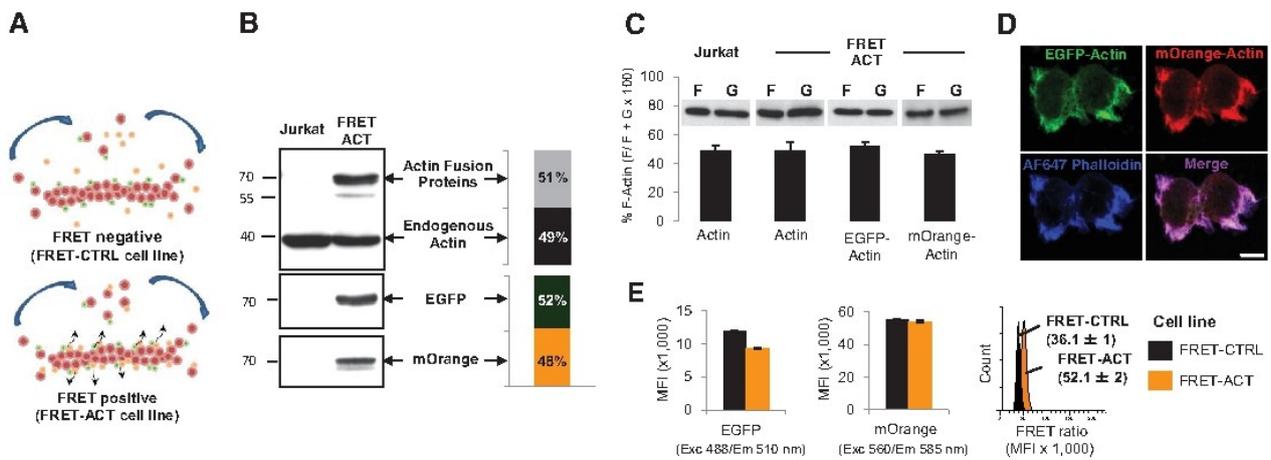


Figure 2. Development of FRET-CTRL and FRET-ACT Jurkat cells. (A) Principle of the method. FRET-ACT cells express EGFP-actin and mOrange-actin FPs. FRET-CTRL cells express the EGFP-actin FP and free mOrange. In FRET-ACT cells, but not in FRET-CTRL, when EGFP-actin and mOrange-actin locate close to each other in polymerized actin, FRET signals are emitted. (B) The amount of actin fusion proteins in FRET-ACT cells was compared with endogenous actin levels by immunoblotting with antibodies against actin, EGFP, and mOrange. Histograms show the relative expression of each form of actin as determined by densitometry. Data are representative of three experiments. (C) Analysis of the distribution of endogenous actin, EGFP-actin, and mOrange-actin in filamentous (F) versus globular (G) actin pools. Fractions containing F- and G-actin were isolated from Jurkat or FRET-ACT cells, as described in Materials and Methods and analyzed by anti-actin immunoblotting. Histograms represent the ratio of F/G-actin in each condition. Data, representative of two experiments, were determined by band densitometry using ImageJ software. (D) Colocalization of EGFP-actin, mOrange-actin, and endogenous F-actin in FRET-ACT cells. Cells were grown on fibronectin-coated chamber slides for 24 h at 37°C before staining with Alexa Fluor 647 phalloidin and confocal microscopy analysis of EGFP-actin, mOrange-actin, and endogenous F-actin distribution. Micrographs are representative of two experiments. Original scale bar = 5 μ m. (E) Ratiometric analysis of FRET signals generated by FRET-CTRL and FRET-ACT cell lines. Cells were analyzed by flow cytometry using the ratiometric method described above. Left histograms represent the MFI of mOrange and EGFP signals in FRET-ACT and FRET-CTRL cells. (Right) Representative FACS histogram of FRET signals in FRET-ACT and FRET-CTRL cells and the mean \pm SD of five different determinations.

(Fig. 2C). Confocal microscopy next confirmed that EGFP-actin and mOrange-actin fluorescence signals overlapped phalloidin staining in adherent FRET-ACT cells (Fig. 2D). FRET signals were then analyzed by flow cytometry using the ratiometric method described above. As shown in Fig. 2E, FRET-ACT cells emitted stronger FRET signals than FRET-CTRL cells (44% increase in FRET-ACT cells compared with FRET-CTRL cells). As controls, levels of mOrange-actin and free mOrange expression were found identical in each cell line, as shown by FACS measurement under 560 nm excitation. The slight decrease of EGFP donor fluorescence observed in FRET-ACT cells is likely a result of donor quenching induced by the low basal FRET signal emitted by FRET-ACT cells, a process that is expected in living cells with spontaneous actin cytoskeleton plasticity.

Pharmacological validation of FRET-actin analysis by flow cytometry

To examine whether our method accurately reflects actin dynamics in living cells, we tested the effect of the actin-depolymerizing drug LB and the stabilizing agent JASP. FRET-CTRL and FRET-ACT cells were treated for different times at 37°C, and FRET ratio variations were monitored in real time by FACS. As shown in Fig. 3A, JASP rapidly increased FRET signals, whereas LB resulted in a decrease of FRET signals. Sta-

tistical analysis of these effects after 30 min of treatment showed that JASP and LB induced a $30 \pm 2\%$ increase and $8 \pm 3\%$ decrease of the FRET ratio, respectively (Fig. 3B). In contrast, no significant effect of these compounds was observed when applied to FRET-CTRL cells. The effect of JASP on FRET signal was in agreement with previous studies showing that JASP stabilizes actin filaments and enhances the rate of actin-filament nucleation [23, 24]. Conversely, the effect of LB can be attributed to its capacity to complex with actin monomers, thereby inhibiting actin polymerization [25]. The separated determination of FRET signal variations and EGFP intensities are shown in Supplemental Fig. 3. Flow cytometric analysis of cells stained with Alexa Fluor 647 phalloidin indicated that the reduction in FRET signals that followed LB treatment correlated with a decrease in phalloidin staining (Supplemental Fig. 4). Further analyses showed that the variation of FRET-actin signals induced by JASP and LB on FRET-ACT cells changed as a function of the drug concentration (Fig. 3C). The EC_{50} for JASP and LB, calculated using the FRET-actin method (50 nM and 139 nM, respectively), was consistent with published EC_{50} for these two drugs [23, 25], demonstrating the sensitivity of our method. However, LB seems to have a relatively smaller effect on FRET signals compared with phalloidin staining. At the molecular level, it is possible that upon LB, a basal level of FRET signals persists as a result of discrete

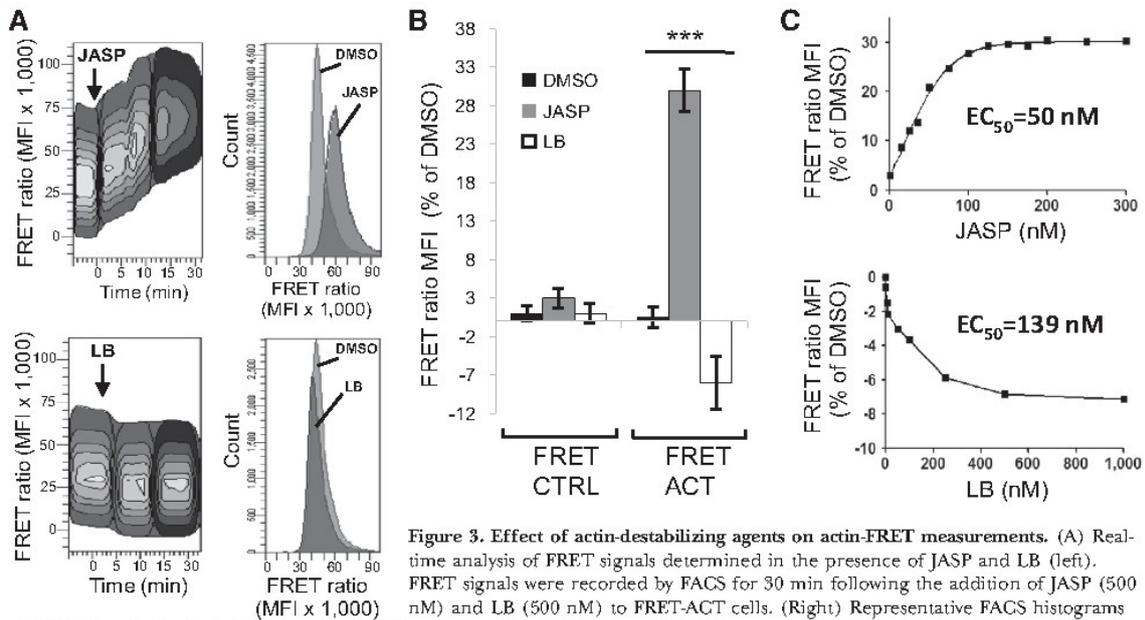


Figure 3. Effect of actin-destabilizing agents on actin-FRET measurements. (A) Real-time analysis of FRET signals determined in the presence of JASP and LB (left). FRET signals were recorded by FACS for 30 min following the addition of JASP (500 nM) and LB (500 nM) to FRET-ACT cells. (Right) Representative FACS histograms of FRET signals obtained following 30 min of treatment with JASP, LB, and DMSO as a control vehicle. (B) Statistical analysis of the variations of the FRET ratio induced by JASP and LB treatment. FRET-CTRL and FRET-ACT cells were untreated or treated with DMSO, JASP (500 nM), and LB (500 nM) for 30 min at 37°C, and FRET signals were recorded by FACS. Data are expressed as the percentage of the actin-FRET ratio MFI between untreated (DMSO) and treated cells. The mean \pm SD of six determinations is shown (***) $P < 0.001$. (C) Dose determination of JASP and LB treatment on actin-FRET signals. Cells were incubated with different concentrations of each drug for 30 min at 37°C. FRET signals were then collected and expressed as described above. The EC₅₀ for each drug was calculated using GraphPad software. Data are representative of two independent experiments.

actin nucleation sites refractory to phalloidin labeling, in which actin monomers complexed with sequestering proteins could induce FRET signals [26, 27]. These observations therefore establish a minimum threshold of actin dynamic detection by FRET in live cells.

To validate further our FACS-based FRET assay, we performed a confocal laser-scanning microscopy analysis on living FRET-ACT cells cultured in chamber slides. To compare with flow cytometric FRET determinations, data were represented as a FRET ratio calculated for 30 cells (Fig. 4A). JASP treatment led to the appearance of large masses of polymerized actin at the cortical region of FRET-ACT cells (Fig. 4B, upper), associated with a dramatic increase of FRET-actin signals (Fig. 4B, lower). On the contrary, exposure to LB, which resulted in the diminution of cortical actin that was replaced by a more diffuse fluorescence, induced the reduction of FRET signals (Fig. 4B, lower). Confocal microscopy and flow cytometric analyses of FRET-actin variations induced by JASP and LB treatment generated similar results. The increase of the FRET ratio induced by JASP was determined to be 27% by microscopy and 28% by flow cytometry, whereas the decrease of the FRET ratio, resulting from LB treatment, was determined to be 11% by microscopy and 7% by flow cytometry (Fig. 4C). Thus, our technique of FRET analysis by flow cytometry appears as sensitive as microscopy.

Flow cytometric FRET analysis of actin dynamics induced by CD3/CD28 stimulation

A dynamic reorganization of the actin cytoskeleton in response to TCR and the engagement of costimulatory receptors are required for IS formation and subsequent optimal T cell activation [2, 3]. To examine the effect of T cell activation on FRET-actin signals, FRET-CTRL and FRET-ACT cells were incubated with anti-CD3/CD28-coated polymer beads at 4°C or 37°C. After 45 min of incubation, beads were labeled with anti-IgG1, coupled with Alexa Fluor 647, and the mixture of cells and beads was analyzed by confocal microscopy and flow cytometry. Unlike cells incubated at 4°C, cells incubated at 37°C with anti-CD3/CD28 beads showed a clear enrichment of EGFP-actin at the Jurkat T cell-bead contact zone that is typical of an activated and polarized T cell (Fig. 5A, white arrows). A flow cytometric recording of FRET signals was performed on the populations P1 and P2, corresponding to the cell population free of beads and to the cell population attached to beads, respectively (Fig. 5B, left). We found that temperature had no significant effect on FRET signals emitted by the P1 population from FRET-CTRL or FRET-ACT cells. When the P2 population was examined, we observed a strong increase of FRET signals at 37°C on FRET-ACT cells but not on FRET-CTRL cells (Fig. 5B, right). The increase of FRET signals at 37°C in bead-conjugated FRET-ACT cells (P2) was time-dependent (Fig. 5C). Finally, the variation of FRET signals between

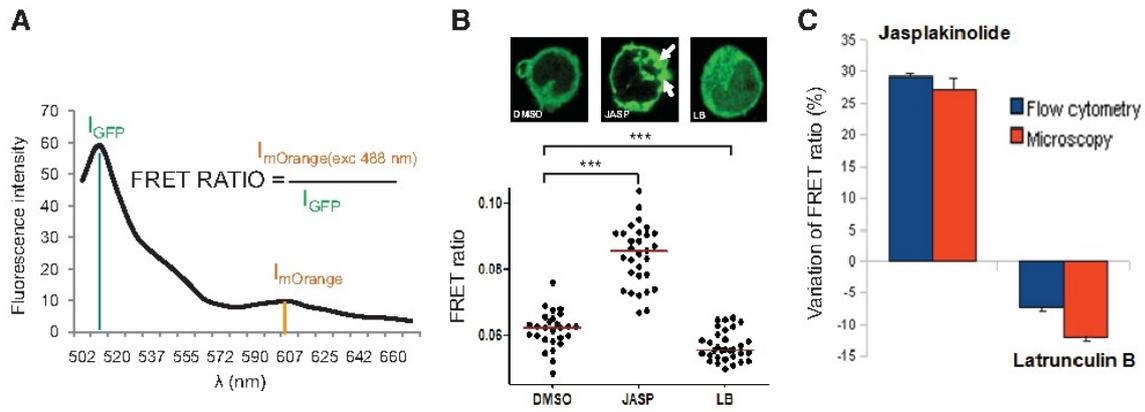


Figure 4. Comparison of confocal microscopy with flow cytometry techniques for actin-FRET signals collection. (A) EGFP and mOrange fluorescence was imaged by a λ acquisition (32 images) on a spectral window with the multichannel detector from 500 nm to 670 nm, with a laser argon excitation at 488 nm. The FRET ratio was calculated by comparing fluorescence intensity of mOrange emitted at 585 nm with EGFP emission at 510 nm. (B) FRET-ACT cells were treated with DMSO, JASP (500 nM), and LB (500 nM) for 30 min at 37°C. A sample of each condition was then imaged by confocal microscopy. Upper micrographs illustrate EGFP-actin distribution in a representative FRET-ACT Jurkat cell from each condition. White arrows show large masses of polymerized actin induced by JASP at the cell-cortical region. Dot plots show the actin-FRET ratio determined as described in A on 30 individual cells. Each line indicates the mean of the actin-FRET ratio following treatment with DMSO, JASP, and LB. Statistical significance was determined using a Mann-Whitney test (*** $P < 0.001$). (C) Comparison of FRET ratio variations obtained with confocal microscopy or flow cytometry. FRET-ACT cells were treated as described above with DMSO, JASP (500 nM), and LB (500 nM) for 30 min at 37°C. The variation of the actin-FRET ratio is expressed as the percentage of signals between untreated and treated cells. The mean \pm SD of three determinations is shown.

unconjugated and conjugated FRET-ACT cells incubated for 45 min at 37°C was quantified to a 22% increase (Fig. 5D). These experiments indicate that CD3/CD28-mediated T cell activation leads to the recruitment of fluorescent-actin fusion proteins to

growing new actin filaments, thereby generating FRET signals. Thus, our method allows the detection of the rapid and transient actin remodeling induced following T cell stimulation, providing another demonstration of its robustness and high sensitivity.

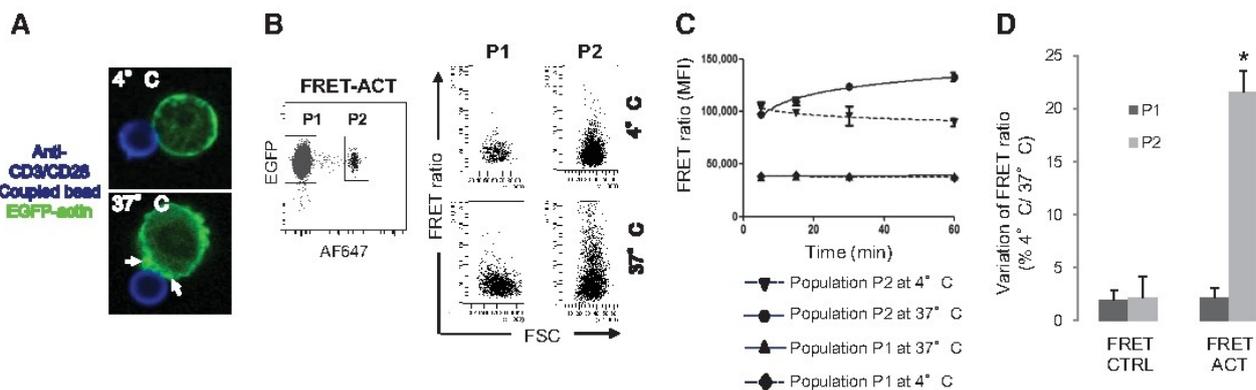


Figure 5. Effects of T cell activation on flow cytometric analysis of actin-FRET signals. FRET-ACT cells were incubated for 45 min with anti-CD3/CD28-coated beads at 4°C or 37°C, and beads were labeled with anti-mouse IgG1 coupled with Alexa Fluor 647. Cells were then analyzed by confocal microscopy and flow cytometry. (A) Representative micrographs of EGFP-actin distribution in a cell conjugated at 4°C or 37°C are shown. White arrows show accumulation of EGFP-actin at the cell-bead contact formed at 37°C. (B) Actin-FRET signals were analyzed by flow cytometry on unconjugated (P1) and bead-conjugated (P2) cell populations (left) at 4°C or 37°C (right). A determination of the actin-FRET ratio representative of three experiments is shown. (C) Time-course of FRET signal variations following FRET-ACT cell activation with anti-CD3/CD28-coated beads. Cells were incubated with beads for different times at 4°C or 37°C. The actin-FRET ratio was then determined on P1 (unconjugated) or P2 (conjugated) populations. Data represent the mean \pm SD of three determinations. (D) Variation of FRET signals between unconjugated and conjugated FRET-CTRL and FRET-ACT cells incubated for 45 min at 4°C or 37°C. Data are expressed as the percentage of the FRET ratio between cells incubated at 4°C and 37°C. Data represent the mean \pm SD of three determinations (* $P < 0.05$ compared with P1 and the FRET-CTRL cell line).

Effect of WASP knockdown on actin dynamics measured by flow cytometric FRET

We next examined whether our method can be adapted to the detection of actin-remodeling events induced by RNAi-mediated suppression of actin cytoskeleton regulators. WASP is involved in actin-filament formation through its interaction with the cytoskeletal-organizing complex actin-related protein 2/3 [28]. WASP deficiency has been linked to immune and hematopoietic cell dysfunction, resulting from cytoskeletal abnormalities [29]. WASP has also been implicated in T cell development, activation, and migration [6, 30, 31]. Here, we used lentiviral-mediated delivery of shRNA to stably knock down WASP expression in FRET-ACT Jurkat cells (Fig. 6A). Control phalloidin stainings performed on shLacZ and shWASP FRET-ACT cells showed that WASP knockdown decreased actin polymerization induced by TCR stimulation (Fig. 6B). With the use of the same approach described above to activate FRET-ACT cells, we analyzed actin-FRET signals on resting (P1) and activated (P2) populations of cells, transduced (CFP+) or not (CFP-) by the lentiviral shRNA constructs (Fig. 6C, upper). Flow cytometry analysis indicated that WASP knockdown had no significant effect on FRET signals emitted by resting cells (Fig. 6C, lower). When shLacZ FRET-ACT cells (CFP+ population) were activated with anti-CD3/CD28 beads for 1 h at 37°C, we found that conjugated Jurkat T cells (P2) displayed a clear increase in actin-FRET signals compared with unconjugated cells (P1). In contrast, increased FRET signals induced by anti-CD3/CD28 beads were reduced in WASP-deficient FRET-ACT cells (CFP+ P2 population). Statistical analysis showed that the FRET ratio MFI in activated shLacZ and shWasp cells was $182.6 \pm 2\%$ and $141.3 \pm 2\%$, respectively (Fig. 6D). Our data thus indicate that de novo formation of actin filaments induced by T cell activation generated FRET signals that required WASP expression. The partial effect of WASP knockdown on activation-dependent variation of FRET ratio was consistent with the existence of other T cell-actin regulators [3, 6].

In conclusion, we describe here a novel method of flow cytometric detection of FRET signals designed as a sensor of live remodeling of actin cytoskeleton in T cells. This technique, which appears complementary to conventional approaches, such as fluorescence microscopy, is adapted to pharmacological and genetic screenings of regulators of spontaneous and activation-induced actin polymerization. The possibility to “automatize” the entire process makes it attractive for high-throughput screening strategies aimed at identifying small molecule inhibitors of actin cytoskeleton. This aspect is important to develop new therapeutic agents targeting actin cytoskeleton in a wide range of pathologies, including immunological and allergic diseases and cancer. Furthermore, the association of our method with the RNAi approach represents an alternative tool to identify and study new proteins regulating actin dynamics. Finally, the development of novel FPs [32] will certainly increase the future applications of this technique. More generally, our method may prove useful for the study of other protein-protein interactions involved in critical cellular processes.

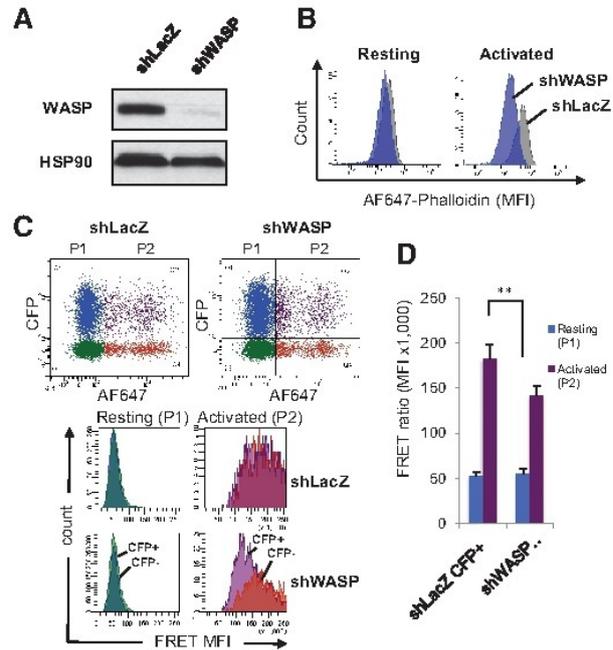


Figure 6. WASP knockdown in FRET-ACT cells decreases actin-FRET signals. (A) FRET-ACT Jurkat cells were transduced with lentiviral constructs encoding the FP CFP and shRNAs targeting LacZ and WASP mRNAs (shLacZ and shWASP). CFP+ cells were lysed and analyzed by immunoblotting with antibodies against WASP or HSP90 as a protein-loading control. (B) Flow cytometric analysis of phalloidin staining on shLacZ and shWASP FRET-ACT cells. Cells were treated or not with anti-CD3/CD28 antibodies for 5 min at 37°C and labeled with Alexa Fluor 647 phalloidin. A representative histogram of fluorescent phalloidin MFI is shown. Data are representative of three experiments. (C) Flow cytometric analysis of actin-FRET signals collected on FRET-ACT cells transduced with shLacZ and shWASP lentiviral particles and activated with anti-CD3/CD28-coated beads, as described in Fig. 5. Actin-FRET signals were determined in unconjugated cells (P1 gate, resting cells) and in conjugated cells (P2 gate, activated cells) on the CFP- or CFP+ population. Representative histograms of the actin-FRET MFI recording are shown. (D) Statistical analysis of the variations of the actin-FRET ratio in activated shWASP cells. Actin-FRET signals were recorded in resting and activated CFP+ shLacZ and CFP+ shWASP and expressed as FRET ratio MFI. Data represent the mean \pm SD of four determinations (** $P < 0.005$).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from INSERM and the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche (to N.D. and E.G.). We thank Didier Trono for the lentiviral vector pRRL.SIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE and packaging vectors pMD2.G and pCMVR8; Anne Galy for the shWASP construct; Damien Alcor (INSERM U1065/C3M) for assistance with the confocal microscope; and Julie Cazareth (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire) for assistance with the Fortessa analysis. This study is dedicated to the memory of Professor Alain Bernard.

DISCLOSURES

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Samstag, Y., Eibert, S. M., Klemke, M., Wabnitz, G. H. (2003) Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 30–48.
2. Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. C., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., Dustin, M. L. (2001) The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 375–396.
3. Piragyte, J., Jun, C. D. (2012) Actin engine in immunological synapse. *Immune Netw.* **12**, 71–83.
4. Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F. (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 110–122.
5. Deckert, M., Moon, C., Le Bras, S. (2005) The immunological synapse and Rho GTPases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **291**, 61–90.
6. Burkhardt, J. K., Carrizosa, E., Shaffer, M. H. (2008) The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 233–259.
7. Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I., Sakai, H. (1987) Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5262–5266.
8. Wang, Y. L., Taylor, D. L. (1981) Probing the dynamic equilibrium of actin polymerization by fluorescence energy transfer. *Cell* **27**, 429–436.
9. O'Donoghue, S. I., Hamblly, B. D., dos Remedios, C. G. (1992) Models of the actin monomer and filament from fluorescence resonance-energy transfer. *Eur. J. Biochem.* **205**, 591–601.
10. Okamoto, K., Hayashi, Y. (2006) Visualization of F-actin and C-actin equilibrium using fluorescence resonance energy transfer (FRET) in cultured cells and neurons in slices. *Nat. Protoc.* **1**, 911–919.
11. Swedlow, J. R. (2012) Innovation in biological microscopy: current status and future directions. *Bioessays* **34**, 333–340.
12. Chan, F. K. (2004) Monitoring molecular interactions in living cells using flow cytometric analysis of fluorescence resonance energy transfer. *Methods Mol. Biol.* **261**, 371–382.
13. He, L., Olson, D. P., Wu, X., Karpova, T. S., McNally, J. G., Lipsky, P. E. (2003) A flow cytometric method to detect protein-protein interaction in living cells by directly visualizing donor fluorophore quenching during CFP → YFP fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Cytometry A* **55**, 71–85.
14. Van Wageningen, S., Pennings, A. H., van der Reijden, B. A., Boezeman, J. B., de Lange, F., Jansen, J. H. (2006) Isolation of FRET-positive cells using single 408-nm laser flow cytometry. *Cytometry A* **69**, 291–298.
15. Vereb, G., Nagy, P., Szollosi, J. (2011) Flow cytometric FRET analysis of protein interaction. *Methods Mol. Biol.* **699**, 371–392.
16. Chapman, S., Oparka, K. J., Roberts, A. G. (2005) New tools for in vivo fluorescence tagging. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 565–573.
17. Raarup, M. K., Fjorback, A. W., Jensen, S. M., Muller, H. K., Kjaergaard, M. M., Poulsen, H., Wiborg, O., Nyengaard, J. R. (2009) Enhanced yellow fluorescent protein photoconversion to a cyan fluorescent protein-like species is sensitive to thermal and diffusion conditions. *J. Biomed. Opt.* **14**, 034039.
18. Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., Tsien, R. Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–1572.
19. Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B., Piston, D. W. (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* **22**, 445–449.
20. GuezGuez, A., Prod'homme, V., Mouska, X., Baudot, A., Blin-Wakkach, C., Rottapel, R., Deckert, M. (2010) 3BP2 Adapter protein is required for receptor activator of NFκB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 20952–20963.
21. Jeanson-Leh, L., Blondeau, J., Galy, A. (2007) Optimization of short hairpin RNA for lentiviral-mediated RNAi against WAS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 498–503.
22. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., Trono, D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–267.
23. Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L., Korn, E. D. (1994) Jaspilkinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14869–14871.
24. Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., Fosen, K. M. (2000) Effects of jaspilkinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J. Biol. Chem.* **275**, 5163–5170.
25. Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C., Elson, E. L. (2001) Effects of cytochalasin D and Latrunculin B on mechanical properties of cells. *J. Cell Sci.* **114**, 1025–1036.
26. Cao, L. G., Fishkind, D. J., Wang, Y. L. (1993) Localization and dynamics of nonfilamentous actin in cultured cells. *J. Cell Biol.* **123**, 173–181.
27. Paavilainen, V. O., Bertling, F., Falck, S., Lappalainen, P. (2004) Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* **14**, 386–394.
28. Marchand, J. B., Kaiser, D. A., Pollard, T. D., Higgs, H. N. (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **3**, 76–82.
29. Thrasher, A. J., Burns, S. O. (2010) WASP: a key immunological multitasker. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 182–192.
30. Haddad, E., Zugaza, J. L., Louache, F., Debili, N., Crouin, C., Schwarz, K., Fischer, A., Vainchenker, W., Bertoglio, J. (2001) The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* **97**, 33–38.
31. Cotta-de-Almeida, V., Westerberg, L., Maillard, M. H., Onaldi, D., Wachtel, H., Meelu, P., Chung, U. I., Xavier, R., Alt, F. W., Snapper, S. B. (2007) Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 15424–15429.
32. Lam, A. J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J. D., Cranfill, P. J., Baird, M. A., McKeown, M. R., Wiedenmann, J., Davidson, M. W., Schnitzer, M. J., Tsien, R. Y., Lin, M. Z. (2012) Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* **9**, 1005–1012.

KEY WORDS:
FRET · Flow cytometry · actin · fluorescent protein

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Absenger, G., Szkandera, J., Pichler, M., Stotz, M., Armingier, F., Weissmueller, M., Schaberl-Moser, R., Samonigg, H., Stojakovic, T., and Gerger, A. (2013). A derived neutrophil to lymphocyte ratio predicts clinical outcome in stage II and III colon cancer patients. *Br. J. Cancer* *109*, 395–400.
- Adam, R., Delvart, V., Pascal, G., Valeanu, A., Castaing, D., Azoulay, D., Giacchetti, S., Paule, B., Kunstlinger, F., Ghémard, O., et al. (2004). Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann. Surg.* *240*, 644–657; discussion 657–658.
- Addison, C.L., Daniel, T.O., Burdick, M.D., Liu, H., Ehlert, J.E., Xue, Y.Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., and Strieter, R.M. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol.* *165*, 5269–5277.
- Algars, A., Irjala, H., Vaittinen, S., Huhtinen, H., Sundström, J., Salmi, M., Ristamäki, R., and Jalkanen, S. (2012). Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* *131*, 864–873.
- Allavena, P., Sica, A., Vecchi, A., Locati, M., Sozzani, S., and Mantovani, A. (2000). The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol. Rev.* *177*, 141–149.
- Alon, R., and Shulman, Z. (2011). Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. *Exp. Cell Res.* *317*, 632–641.
- Alvaro, T., Lejeune, M., Salvadó, M.T., Bosch, R., García, J.F., Jaén, J., Banham, A.H., Roncador, G., Montalbán, C., and Piris, M.A. (2005). Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1467–1473.
- Amersi, F.F., Terando, A.M., Goto, Y., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., Tran, A.N., Faries, M.B., Morton, D.L., and Hoon, D.S.B. (2008). Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. *Clin. Cancer Res.* *14*, 638–645.
- Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S.K., Luscinskas, F.W., and Gabuzda, D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.* *197*, 1701–1707.
- Andre, F., Cabioglu, N., Assi, H., Sabourin, J.C., Delalogue, S., Sahin, A., Broglio, K., Spano, J.P., Combadiere, C., Bucana, C., et al. (2006). Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann. Oncol.* *17*, 945–951.
- Angell, H., and Galon, J. (2013). From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 261–267.
- Arcangeli, M.-L., Frontera, V., and Aurrand-Lions, M. (2013). Function of junctional adhesion molecules (JAMs) in leukocyte migration and homeostasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *61*, 15–23.
- Arenberg, D.A., Kunkel, S.L., Polverini, P.J., Glass, M., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (1996). Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J. Clin. Invest.* *97*, 2792–2802.
- Arenberg, D.A., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Shanafelt, A., Hesselgesser, J., Horuk, R., and Strieter, R.M. (1997). The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J. Leukoc. Biol.* *62*, 554–562.
- Arenberg, D.A., Keane, M.P., DiGiovine, B., Kunkel, S.L., Morris, S.B., Xue, Y.Y., Burdick, M.D., Glass, M.C., Iannettoni, M.D., and Strieter, R.M. (1998). Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *J. Clin. Invest.* *102*, 465–472.

- Atzpodien, J., and Reitz, M. (2008). Peripheral blood neutrophils as independent immunologic predictor of response and long-term survival upon immunotherapy in metastatic renal-cell carcinoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* *23*, 129–134.
- Augsten, M., Hägglöf, C., Olsson, E., Stolz, C., Tsagozis, P., Levchenko, T., Frederick, M.J., Borg, A., Micke, P., Egevad, L., et al. (2009). CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 3414–3419.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Aguezny, N.E.H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W.H., et al. (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4⁺ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res.* *12*, 465–472.
- Bailey, C., Negus, R., Morris, A., Ziprin, P., Goldin, R., Allavena, P., Peck, D., and Darzi, A. (2007). Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin. Exp. Metastasis* *24*, 121–130.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y.C., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* *280*, 35760–35766.
- Ben-Baruch, A. (2012). The Tumor-Promoting Flow of Cells Into, Within and Out of the Tumor Site: Regulation by the Inflammatory Axis of TNF α and Chemokines. *Cancer Microenviron* *5*, 151–164.
- Batchelor, T.T., Duda, D.G., di Tomaso, E., Ancukiewicz, M., Plotkin, S.R., Gerstner, E., Eichler, A.F., Drappatz, J., Hochberg, F.H., Benner, T., et al. (2010). Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* *28*, 2817–2823.
- Bates, G.J., Fox, S.B., Han, C., Leek, R.D., Garcia, J.F., Harris, A.L., and Banham, A.H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* *24*, 5373–5380.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* *385*, 640–644.
- Bellocq, A., Antoine, M., Flahault, A., Philippe, C., Crestani, B., Bernaudin, J.F., Mayaud, C., Milleron, B., Baud, L., and Cadranet, J. (1998). Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am. J. Pathol.* *152*, 83–92.
- Bennani-Baiti, I.M., Cooper, A., Lawlor, E.R., Kauer, M., Ban, J., Aryee, D.N.T., and Kovar, H. (2010). Intercohort gene expression co-analysis reveals chemokine receptors as prognostic indicators in Ewing's sarcoma. *Clin. Cancer Res.* *16*, 3769–3778.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 401–410.
- Bernardini, G., Gismondi, A., and Santoni, A. (2012). Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions. *Immunol. Lett.* *145*, 39–46.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* *11*, 889–896.
- Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., et al. (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* *107*, 2112–2122.
- Biswas, S.K., Sica, A., and Lewis, C.E. (2008). Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J. Immunol.* *180*, 2011–2017.

- Boland, C.R., and Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2073–2087.e3.
- Boon, T., Coulie, P.G., and Van den Eynde, B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today* 18, 267–268.
- Bosco, M.C., Reffo, G., Puppo, M., and Varesio, L. (2004). Hypoxia inhibits the expression of the CCR5 chemokine receptor in macrophages. *Cell. Immunol.* 228, 1–7.
- Boyle, P., and Langman, J.S. (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 321, 805–808.
- 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.
- Braun, S.E., Chen, K., Foster, R.G., Kim, C.H., Hromas, R., Kaplan, M.H., Broxmeyer, H.E., and Cornetta, K. (2000). The CC chemokine CK beta-11/MIP-3 beta/ELC/Exodus 3 mediates tumor rejection of murine breast cancer cells through NK cells. *J. Immunol.* 164, 4025–4031.
- Brew, R., Erikson, J.S., West, D.C., Kinsella, A.R., Slavin, J., and Christmas, S.E. (2000). Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 12, 78–85.
- Browning, M., Petronzelli, F., Bicknell, D., Krausa, P., Rowan, A., Tonks, S., Murray, N., Bodmer, J., and Bodmer, W. (1996). Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47, 364–371.
- Broxmeyer, H.E. (2008). Chemokines in hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 15, 49–58.
- Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M., and Kipps, T.J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96, 2655–2663.
- Burgess, A.W., Faux, M.C., Layton, M.J., and Ramsay, R.G. (2011). Wnt signaling and colon tumorigenesis—a view from the periphery. *Exp. Cell Res.* 317, 2748–2758.
- 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.
- Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V.F., Iglesias, M., Céspedes, M.V., Sevillano, M., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X.H.-F., et al. (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 22, 571–584.
- Cambien, B., Karimjee, B.F., Richard-Fiardo, P., Bziouech, H., Barthel, R., Millet, M.A., Martini, V., Birnbaum, D., Scoazec, J.Y., Abello, J., et al. (2009). Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism. *Br. J. Cancer* 100, 1755–1764.
- Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.
- Chan, A.T., and Giovannucci, E.L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2029–2043.e10.
- Chang, S.-C., Lin, P.-C., Yang, S.-H., Wang, H.-S., Li, A.F.-Y., and Lin, J.-K. (2009). SDF-1 α G801A polymorphism predicts lymph node metastasis in stage T3 colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 16, 2323–2330.

- Chang, S.-F., Chang, H.-Y., Tong, Y.-C., Chen, S.-H., Hsaio, F.-C., Lu, S.-C., and Liaw, J. (2004). Nonionic polymeric micelles for oral gene delivery in vivo. *Hum. Gene Ther.* *15*, 481–493.
- Choi, Y.H., Burdick, M.D., Strieter, B.A., Mehrad, B., and Strieter, R.M. (2013). CXCR4, but not CXCR7, discriminates metastatic behavior in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Res.*
- Chu, Y., Yang, X., Xu, W., Wang, Y., Guo, Q., and Xiong, S. (2007). In situ expression of IFN-gamma-inducible T cell alpha chemoattractant in breast cancer mounts an enhanced specific anti-tumor immunity which leads to tumor regression. *Cancer Immunol. Immunother.* *56*, 1539–1549.
- De Clercq, E. (2003). The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* *2*, 581–587.
- De Clercq, E. (2005). Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem* *5*, 805–824.
- De Clercq, E. (2009). The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem. Pharmacol.* *77*, 1655–1664.
- Coffelt, S.B., Hughes, R., and Lewis, C.E. (2009). Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta* *1796*, 11–18.
- Comerford, I., and Nibbs, R.J.B. (2005). Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors? *Immunol. Lett.* *96*, 163–174.
- Correale, P., Rotundo, M.S., Del Vecchio, M.T., Remondo, C., Migali, C., Ginanneschi, C., Tsang, K.Y., Licchetta, A., Mannucci, S., Loiacono, L., et al. (2010). Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *J. Immunother.* *33*, 435–441.
- Crittenden, M., Gough, M., Harrington, K., Olivier, K., Thompson, J., and Vile, R.G. (2003). Expression of inflammatory chemokines combined with local tumor destruction enhances tumor regression and long-term immunity. *Cancer Res.* *63*, 5505–5512.
- Cui, G., Yuan, A., Goll, R., Vonen, B., and Florholmen, J. (2009). Dynamic changes of interleukin-8 network along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Immunol. Immunother.* *58*, 1897–1905.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *351*, 337–345.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004a). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* *10*, 942–949.
- Curiel, T.J., Cheng, P., Mottram, P., Alvarez, X., Moons, L., Evdemon-Hogan, M., Wei, S., Zou, L., Kryczek, I., Hoyle, G., et al. (2004b). Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res.* *64*, 5535–5538.
- D’Alterio, C., Consales, C., Polimeno, M., Franco, R., Cindolo, L., Portella, L., Cioffi, M., Calemma, R., Marra, L., Claudio, L., et al. (2010). Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets* *10*, 772–781.
- D’Haese, J.G., Demir, I.E., Friess, H., and Ceyhan, G.O. (2010). Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential. *Expert Opin. Ther. Targets* *14*, 207–219.
- Dai, X., Tan, Y., Cai, S., Xiong, X., Wang, L., Ye, Q., Yan, X., Ma, K., and Cai, L. (2011). The role of CXCR7 on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 1299–1309.
- Dang, C.V., O’Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-Myc target

gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16, 253–264.

Datta, D., Flaxenburg, J.A., Laxmanan, S., Geehan, C., Grimm, M., Waaga-Gasser, A.M., Briscoe, D.M., and Pal, S. (2006). Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res.* 66, 9509–9518.

David, S., Passirani, C., Carmoy, N., Morille, M., Mevel, M., Chatin, B., Benoit, J.-P., Montier, T., and Pitard, B. (2013). DNA nanocarriers for systemic administration: characterization and in vivo bioimaging in healthy mice. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e64.

Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2010). Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 103–120.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 313–326.

Desigaux, L., Gourden, C., Bello-Roufai, M., Richard, P., Oudrhiri, N., Lehn, P., Escande, D., Pollard, H., and Pitard, B. (2005). Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum. Gene Ther.* 16, 821–829.

Dhawan, P., and Richmond, A. (2002). Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J. Leukoc. Biol.* 72, 9–18.

Ding, Y., Shimada, Y., Maeda, M., Kawabe, A., Kaganoi, J., Komoto, I., Hashimoto, Y., Miyake, M., Hashida, H., and Imamura, M. (2003). Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9, 3406–3412.

Dirkx, A.E.M., Oude Egbrink, M.G.A., Wagstaff, J., and Griffioen, A.W. (2006). Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1183–1196.

Domanska, U.M., Kruijzinga, 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.

Droeser, R.A., Hirt, C., Eppenberger-Castori, S., Zlobec, I., Viehl, C.T., Frey, D.M., Nebiker, C.A., Rosso, R., Zuber, M., Amicarella, F., et al. (2013). High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS ONE* 8, e64814.

Du, J., Luan, J., Liu, H., Daniel, T.O., Peiper, S., Chen, T.S., Yu, Y., Horton, L.W., Nanney, L.B., Strieter, R.M., et al. (2002). Potential role for Duffy antigen chemokine-binding protein in angiogenesis and maintenance of homeostasis in response to stress. *J. Leukoc. Biol.* 71, 141–153.

Duda, D.G., Kozin, S.V., Kirkpatrick, N.D., Xu, L., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). CXCL12 (SDF1 α)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin. Cancer Res.* 17, 2074–2080.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.

Dwinell, M.B., Eckmann, L., Leopard, J.D., Varki, N.M., and Kagnoff, M.F. (1999). Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 117, 359–367.

Dwyer, R.M., Potter-Beirne, S.M., Harrington, K.A., Lowery, A.J., Hennessy, E., Murphy, J.M., Barry, F.P., O'Brien, T., and Kerin, M.J. (2007). Monocyte Chemotactic Protein-1 Secreted by Primary Breast Tumors Stimulates Migration of Mesenchymal Stem Cells. *Clin Cancer Res* 13, 5020–5027.

Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Christensen, J.G., Mutsaers, A.J., and Kerbel, R.S. (2007). Multiple circulating

proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 17069–17074.

Edin, S., Wikberg, M.L., Dahlin, A.M., Rutegård, J., Öberg, Å., Oldenberg, P.-A., and Palmqvist, R. (2012). The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS ONE* *7*, e47045.

Ellyard, J.I., Simson, L., and Parish, C.R. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* *70*, 1–11.

Emtage, P.C., Wan, Y., Hitt, M., Graham, F.L., Muller, W.J., Zlotnik, A., and Gauldie, J. (1999). Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models. *Hum. Gene Ther.* *10*, 697–709.

Evans, V.A., Khoury, G., Saleh, S., Cameron, P.U., and Lewin, S.R. (2012). HIV persistence: chemokines and their signalling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* *23*, 151–157.

Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I.S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L.-P., Gimotty, P.A., Gilks, C.B., Lal, P., Zhang, L., et al. (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* *475*, 226–230.

Facciabene, A., Motz, G.T., and Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res.* *72*, 2162–2171.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* *6*, 479–507.

Feijó, E., Alfaro, C., Mazzolini, G., Serra, P., Peñuelas, I., Arina, A., Huarte, E., Tirapu, I., Palencia, B., Murillo, O., et al. (2005). Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. *Int. J. Cancer* *116*, 275–281.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* *127*, 2893–2917.

Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7551–7559.

Fioretti, F., Fradelizi, D., Stoppacciaro, A., Ramponi, S., Ruco, L., Minty, A., Sozzani, S., Garlanda, C., Vecchi, A., and Mantovani, A. (1998). Reduced tumorigenicity and augmented leukocyte infiltration after monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) gene transfer: perivascular accumulation of dendritic cells in peritumoral tissue and neutrophil recruitment within the tumor. *J. Immunol.* *161*, 342–346.

Van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 241–260.

Fong, A.M., Robinson, L.A., Steeber, D.A., Tedder, T.F., Yoshie, O., Imai, T., and Patel, D.D. (1998). Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J. Exp. Med.* *188*, 1413–1419.

Forssell, J., Oberg, A., Henriksson, M.L., Stenling, R., Jung, A., and Palmqvist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1472–1479.

Francia di Celle, P., Mariani, S., Riera, L., Stacchini, A., Reato, G., and Foa, R. (1996). Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood* *87*, 4382–4389.

Franciszkiwicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C., and Mami-Chouaib, F. (2012). Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res.* *72*, 6325–6332.

Fratlicelli, P., Sironi, M., Bianchi, G., D'Ambrosio, D., Albanesi, C., Stoppacciaro, A., Chieppa, M., Allavena, P., Ruco, L., Girolomini, G., et al. (2001). Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of

- polarized Th1 responses. *J. Clin. Invest.* *107*, 1173–1181.
- Fridlender, Z.G., and Albelda, S.M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* *33*, 949–955.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* *16*, 183–194.
- Funada, Y., Noguchi, T., Kikuchi, R., Takeno, S., Uchida, Y., and Gabbert, H.E. (2003). Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* *10*, 309–313.
- Fushimi, T., Kojima, A., Moore, M.A., and Crystal, R.G. (2000). Macrophage inflammatory protein 3alpha transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth. *J. Clin. Invest.* *105*, 1383–1393.
- Galiatsatos, P., and Foulkes, W.D. (2006). Familial adenomatous polyposis. *Am. J. Gastroenterol.* *101*, 385–398.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* *313*, 1960–1964.
- Galon, J., Fridman, W.-H., and Pagès, F. (2007). The Adaptive Immunologic Microenvironment in Colorectal Cancer: A Novel Perspective. *Cancer Res* *67*, 1883–1886.
- Galon, J., Pagès, F., Marincola, F.M., Angell, H.K., Thurin, M., Lugli, A., Zlobec, I., Berger, A., Bifulco, C., Botti, G., et al. (2012). Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* *10*, 205.
- Galon, J., Angell, H.K., Bedognetti, D., and Marincola, F.M. (2013). The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* *39*, 11–26.
- Gao, Y.-J., and Ji, R.-R. (2010). Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol. Ther.* *126*, 56–68.
- Gao, Q., Qiu, S.-J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.-Y., Xiao, Y.-S., Xu, Y., Li, Y.-W., and Tang, Z.-Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.* *25*, 2586–2593.
- Gaudin, F., Nasreddine, S., Donnadiou, A.-C., Emilie, D., Combadière, C., Prévot, S., Machelon, V., and Balabanian, K. (2011). Identification of the chemokine CX3CL1 as a new regulator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian cancer. *PLoS ONE* *6*, e21546.
- Gaudry, M., Brégerie, O., Andrieu, V., El Benna, J., Pocard, M.A., and Hakim, J. (1997). Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* *90*, 4153–4161.
- Gay, L.J., and Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 123–134.
- Geiger, T.R., and Peeper, D.S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1796*, 293–308.
- Gerhardt, H., and Semb, H. (2008). Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? *J. Mol. Med.* *86*, 135–144.
- Gerstner, E.R., Eichler, A.F., Plotkin, S.R., Drappatz, J., Doyle, C.L., Xu, L., Duda, D.G., Wen, P.Y., Jain, R.K., and Batchelor, T.T. (2011). Phase I trial with biomarker studies of vatalanib (PTK787) in patients with newly diagnosed glioblastoma treated with enzyme inducing anti-epileptic drugs and standard radiation and temozolomide. *J. Neurooncol.* *103*, 325–332.
- Ghadjar, P., Coupland, S.E., Na, I.-K., Noutsias, M., Letsch, A., Stroux, A., Bauer, S., Buhr, H.J., Thiel,

- E., Scheibenbogen, C., et al. (2006). Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastases in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* *24*, 1910–1916.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G., and Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* *277*, 225–228.
- Giese, N.A., Raykov, Z., DeMartino, L., Vecchi, A., Sozzani, S., Dinsart, C., Cornelis, J.J., and Rommelaere, J. (2002). Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther.* *9*, 432–442.
- Gijsbers, K., Gouwy, M., Struyf, S., Wuyts, A., Proost, P., Opdenakker, G., Penninckx, F., Ectors, N., Geboes, K., and Van Damme, J. (2005). GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Exp. Cell Res.* *303*, 331–342.
- Giovarelli, M., Cappello, P., Forni, G., Salcedo, T., Moore, P.A., LeFleur, D.W., Nardelli, B., Di Carlo, E., Lollini, P.L., Ruben, S., et al. (2000). Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes. *J. Immunol.* *164*, 3200–3206.
- Godessart, N., and Kunkel, S.L. (2001). Chemokines in autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 670–675.
- Goguet-Surmenian, E., Richard-Fiardo, P., Guillemot, E., Benchetrit, M., Gomez-Brouchet, A., Buzzo, P., Karimdjee-Soilihi, B., Alemanno, P., Michiels, J.-F., Schmid-Alliana, A., et al. (2013). CXCR7-mediated progression of osteosarcoma in the lungs. *Br. J. Cancer.*
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* *32*, 593–604.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 953–964.
- Gosling, J., Dairaghi, D.J., Wang, Y., Hanley, M., Talbot, D., Miao, Z., and Schall, T.J. (2000). Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK. *J. Immunol.* *164*, 2851–2856.
- Gough, P.J., Garton, K.J., Wille, P.T., Rychlewski, M., Dempsey, P.J., and Raines, E.W. (2004). A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J. Immunol.* *172*, 3678–3685.
- Gregory, A.D., and Houghton, A.M. (2011). Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* *71*, 2411–2416.
- Grymula, K., Tarnowski, M., Wysoczynski, M., Drukala, J., Barr, F.G., Ratajczak, J., Kucia, M., and Ratajczak, M.Z. (2010). Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int. J. Cancer* *127*, 2554–2568.
- Guiducci, C., Di Carlo, E., Parenza, M., Hitt, M., Giovarelli, M., Musiani, P., and Colombo, M.P. (2004). Intralesional injection of adenovirus encoding CC chemokine ligand 16 inhibits mammary tumor growth and prevents metastatic-induced death after surgical removal of the treated primary tumor. *J. Immunol.* *172*, 4026–4036.
- Guiducci, C., Vicari, A.P., Sangaletti, S., Trinchieri, G., and Colombo, M.P. (2005). Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res.* *65*, 3437–3446.
- Guillemot, E., Karimdjee-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.

- Guleng, B., Tateishi, K., Ohta, M., Kanai, F., Jazag, A., Ijichi, H., Tanaka, Y., Washida, M., Morikane, K., Fukushima, Y., et al. (2005). 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.* *65*, 5864–5871.
- Günther, K., Leier, J., Henning, G., Dimmler, A., Weissbach, R., Hohenberger, W., and Förster, R. (2005). Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int. J. Cancer* *116*, 726–733.
- Guo, J., Wang, B., Zhang, M., Chen, T., Yu, Y., Regulier, E., Homann, H.E., Qin, Z., Ju, D.W., and Cao, X. (2002). Macrophage-derived chemokine gene transfer results in tumor regression in murine lung carcinoma model through efficient induction of antitumor immunity. *Gene Ther.* *9*, 793–803.
- Guo, J., Zhang, M., Wang, B., Yuan, Z., Guo, Z., Chen, T., Yu, Y., Qin, Z., and Cao, X. (2003a). Fractalkine transgene induces T-cell-dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of dendritic cells. *Int. J. Cancer* *103*, 212–220.
- Guo, J., Chen, T., Wang, B., Zhang, M., An, H., Guo, Z., Yu, Y., Qin, Z., and Cao, X. (2003b). Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1. *Immunol. Lett.* *89*, 1–7.
- Guo, X., Oshima, H., Kitmura, T., Taketo, M.M., and Oshima, M. (2008). Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J. Biol. Chem.* *283*, 19864–19871.
- Gupta, S., Feng, L., Yoshimura, T., Redick, J., Fu, S.M., and Rose, C.E., Jr (1996). Intra-alveolar macrophage-inflammatory peptide 2 induces rapid neutrophil localization in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *15*, 656–663.
- Habermann, J.K., Paulsen, U., Roblick, U.J., Upender, M.B., McShane, L.M., Korn, E.L., Wangsa, D., Krüger, S., Duchrow, M., Bruch, H.-P., et al. (2007). Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* *46*, 10–26.
- Hampel, H., Frankel, W.L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., Clendenning, M., Sotamaa, K., Prior, T., Westman, J.A., et al. (2008). Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* *26*, 5783–5788.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353–364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., and Proudfoot, A.E. (2005). Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 385–410.
- Hao, M., Zheng, J., Hou, K., Wang, J., Chen, X., Lu, X., Bo, J., Xu, C., Shen, K., and Wang, J. (2012a). Role of chemokine receptor CXCR7 in bladder cancer progression. *Biochem. Pharmacol.* *84*, 204–214.
- Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., and Yang, S.-M. (2012b). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 948098.
- 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.
- He, J.-R., Shen, G.-P., Ren, Z.-F., Qin, H., Cui, C., Zhang, Y., Zeng, Y.-X., and Jia, W.-H. (2012). Pretreatment levels of peripheral neutrophils and lymphocytes as independent prognostic factors in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Head & Neck* *34*, 1769–1776.
- He, M., Mochhala, S.M., Adhikari, S., and Bhatia, M. (2009). Administration of exogenous fractalkine, a CX3C chemokine, is capable of modulating inflammatory response in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Shock* *31*, 33–39.

- Heidemann, J., Ogawa, H., Dwinell, M.B., Rafiee, P., Maaser, C., Gockel, H.R., Otterson, M.F., Ota, D.M., Luger, N., Domschke, W., et al. (2003). Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J. Biol. Chem.* *278*, 8508–8515.
- Hemdan, N.Y.A. (2013). Anti-cancer versus cancer-promoting effects of the interleukin-17-producing T helper cells. *Immunol. Lett.* *149*, 123–133.
- Hemdan, N.Y.A., Birkenmeier, G., and Wichmann, G. (2012). Key molecules in the differentiation and commitment program of T helper 17 (Th17) cells up-to-date. *Immunol. Lett.* *148*, 97–109.
- Hensbergen, P.J., Wijnands, P.G.J.T.B., Schreurs, M.W.J., Scheper, R.J., Willemze, R., and Tensen, C.P. (2005). The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8⁺ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis. *J. Immunother.* *28*, 343–351.
- Hernandez, L., Magalhaes, M.A.O., Coniglio, S.J., Condeelis, J.S., and Segall, J.E. (2011). Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* *13*, R128.
- Herrera, M., Herrera, A., Domínguez, G., Silva, J., García, V., García, J.M., Gómez, I., Soldevilla, B., Muñoz, C., Provencio, M., et al. (2013). Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* *104*, 437–444.
- 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.
- Hojo, S., Koizumi, K., Tsuneyama, K., Arita, Y., Cui, Z., Shinohara, K., Minami, T., Hashimoto, I., Nakayama, T., Sakurai, H., et al. (2007). High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Cancer Res.* *67*, 4725–4731.
- Holash, J., Wiegand, S.J., and Yancopoulos, G.D. (1999). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* *18*, 5356–5362.
- Holm, N.T., Abreo, F., Johnson, L.W., Li, B.D.L., and Chu, Q.D. (2009). Elevated chemokine receptor CXCR4 expression in primary tumors following neoadjuvant chemotherapy predicts poor outcomes for patients with locally advanced breast cancer (LABC). *Breast Cancer Res Treat* *113*, 293–299.
- Homey, B., Müller, A., and Zlotnik, A. (2002). Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 175–184.
- Hou, K.-L., Hao, M.-G., Bo, J.-J., and Wang, J.-H. (2010). CXCR7 in tumorigenesis and progression. *Chin J Cancer* *29*, 456–459.
- Houghton, A.M. (2010). The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle* *9*, 1732–1737.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013.
- Huang, S., Mills, L., Mian, B., Tellez, C., McCarty, M., Yang, X.-D., Gudas, J.M., and Bar-Eli, M. (2002). Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am. J. Pathol.* *161*, 125–134.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., et al. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* *102*, 1186–1195.

- 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.
- Hwang, J., Kim, C.W., Son, K.-N., Han, K.Y., Lee, K.H., Kleinman, H.K., Ko, J., Na, D.S., Kwon, B.S., Gho, Y.S., et al. (2004). Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* *570*, 47–51.
- Hwang, J., Son, K.-N., Kim, C.W., Ko, J., Na, D.S., Kwon, B.S., Gho, Y.S., and Kim, J. (2005). Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. *Cytokine* *30*, 254–263.
- Hyakudomi, M., Matsubara, T., Hyakudomi, R., Yamamoto, T., Kinugasa, S., Yamanoi, A., Maruyama, R., and Tanaka, T. (2008). Increased expression of fractalkine is correlated with a better prognosis and an increased number of both CD8⁺ T cells and natural killer cells in gastric adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* *15*, 1775–1782.
- Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T.J., et al. (1997). Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* *91*, 521–530.
- Imaizumi, T., Yoshida, H., and Satoh, K. (2004). Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J. Atheroscler. Thromb.* *11*, 15–21.
- Ishida, T., Ishii, T., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Inagaki, H., and Ueda, R. (2006). Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* *66*, 5716–5722.
- Ishida, T., Joh, T., Uike, N., Yamamoto, K., Utsunomiya, A., Yoshida, S., Saburi, Y., Miyamoto, T., Takemoto, S., Suzushima, H., et al. (2012). Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol.* *30*, 837–842.
- Ito, A., Ishida, T., Yano, H., Inagaki, A., Suzuki, S., Sato, F., Takino, H., Mori, F., Ri, M., Kusumoto, S., et al. (2009). Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mouse model. *Cancer Immunol. Immunother.* *58*, 1195–1206.
- Itzkowitz, S.H., and Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *287*, G7–17.
- Jablonska, E., Puzewska, W., Grabowska, Z., Jablonski, J., and Talarek, L. (2005). VEGF, IL-18 and NO production by neutrophils and their serum levels in patients with oral cavity cancer. *Cytokine* *30*, 93–99.
- Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., Lienenklaus, S., and Weiss, S. (2010). Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J. Clin. Invest.* *120*, 1151–1164.
- Jamieson, W.L., Shimizu, S., D'Ambrosio, J.A., Meucci, O., and Fatatis, A. (2008). CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism. *Cancer Res.* *68*, 1715–1722.
- Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2044–2058.
- Jensen, H.K., Donskov, F., Marcussen, N., Nordmark, M., Lundbeck, F., and von der Maase, H. (2009). Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *27*, 4709–4717.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 239–252.

- Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Ino, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2008). Involvement of SDF-1 α /CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* *122*, 91–99.
- Kanagawa, N., Niwa, M., Hatanaka, Y., Tani, Y., Nakagawa, S., Fujita, T., Yamamoto, A., and Okada, N. (2007). CC-chemokine ligand 17 gene therapy induces tumor regression through augmentation of tumor-infiltrating immune cells in a murine model of preexisting CT26 colon carcinoma. *Int. J. Cancer* *121*, 2013–2022.
- Kawada, K., Sonoshita, M., Sakashita, H., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., Manabe, T., Inaba, K., Minato, N., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2004). Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res.* *64*, 4010–4017.
- Kawada, K., Hosogi, H., Sonoshita, M., Sakashita, H., Manabe, T., Shimahara, Y., Sakai, Y., Takabayashi, A., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2007). Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* *26*, 4679–4688.
- Keane, M.P., Belperio, J.A., Xue, Y.Y., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (2004). Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J. Immunol.* *172*, 2853–2860.
- Keeley, E.C., Mehrad, B., and Strieter, R.M. (2010). CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv. Cancer Res.* *106*, 91–111.
- Keeley, E.C., Mehrad, B., and Strieter, R.M. (2011). Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp. Cell Res.* *317*, 685–690.
- Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H., and Harashima, H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* *58*, 32–45.
- Kiefer, F., and Siekmann, A.F. (2011). The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 2811–2830.
- Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Reza, R., Marquez, L.A., Christofidou-Solomidou, M., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2001). The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem Cells* *19*, 453–466.
- Kim, J., Takeuchi, H., Lam, S.T., Turner, R.R., Wang, H.-J., Kuo, C., Foshag, L., Bilchik, A.J., and Hoon, D.S.B. (2005). Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J. Clin. Oncol.* *23*, 2744–2753.
- 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.
- Kim, S.Y., Lee, C.H., Midura, B.V., Yeung, C., Mendoza, A., Hong, S.H., Ren, L., Wong, D., Korz, W., Merzouk, A., et al. (2008). Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin. Exp. Metastasis* *25*, 201–211.
- Kioi, M., Vogel, H., Schultz, G., Hoffman, R.M., Harsh, G.R., and Brown, J.M. (2010). Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 694–705.
- Knutson, K.L., and Disis, M.L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *54*, 721–728.
- Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E.N., Mellody, K.T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T.T., Wang, Z.C., Richardson, A.L., Weinberg, R.A., et al. (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 20009–20014.

- Kollmar, O., Junker, B., Rupertus, K., Menger, M.D., and Schilling, M.K. (2007). Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *Eur J Surg Oncol* 33, 803–811.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Kakolyris, S., O’Byrne, K.J., Apostolikas, N., Skarlatos, J., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (1998). Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non-small-cell lung cancer: impact on tumour neoangiogenesis and survival. *Br. J. Cancer* 77, 1696–1703.
- Kozin, S.V., Kamoun, W.S., Huang, Y., Dawson, M.R., Jain, R.K., and Duda, D.G. (2010). Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation. *Cancer Res.* 70, 5679–5685.
- Kusumanto, Y.H., Dam, W.A., Hospers, G.A.P., Meijer, C., and Mulder, N.H. (2003). Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 6, 283–287.
- Labelle, M., and Hynes, R.O. (2012). The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov* 2, 1091–1099.
- Lackner, C., Jukic, Z., Tsybrovskyy, O., Jatzko, G., Wette, V., Hoefler, G., Klimpfinger, M., Denk, H., and Zatloukal, K. (2004). Prognostic relevance of tumour-associated macrophages and von Willebrand factor-positive microvessels in colorectal cancer. *Virchows Arch.* 445, 160–167.
- Laguri, C., Arenzana-Seisdedos, F., and Lortat-Jacob, H. (2008). Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines—the CXCL12 example. *Carbohydr. Res.* 343, 2018–2023.
- Lakshmi Narendra, B., Eshvendar Reddy, K., Shantikumar, S., and Ramakrishna, S. (2013). Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm. Res.* 62, 823–834.
- Lança, T., and Silva-Santos, B. (2012). The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: Implications for cancer surveillance and immunotherapy. *Oncoimmunology* 1, 717–725.
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., et al. (2003). An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.* 197, 1537–1549.
- Lavergne, E., Combadière, B., Bonduelle, O., Iga, M., Gao, J.-L., Maho, M., Boissonnas, A., Murphy, P.M., Debré, P., and Combadière, C. (2003). Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res.* 63, 7468–7474.
- Lavergne, E., Combadière, C., Iga, M., Boissonnas, A., Bonduelle, O., Maho, M., Debré, P., and Combadière, B. (2004). Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration. *J. Immunol.* 173, 3755–3762.
- Lazennec, G., and Richmond, A. (2010). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 16, 133–144.
- Lechner, M.G., Russell, S.M., Bass, R.S., and Epstein, A.L. (2011). Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* 3, 1317–1340.
- Lee, J.W., and Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol. Cells* 17, 188–202.
- Lee, H.-W., Choi, H.-J., Ha, S.-J., Lee, K.-T., and Kwon, Y.-G. (2013). Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 170–179.
- Lee, L.F., Hellendall, R.P., Wang, Y., Haskill, J.S., Mukaida, N., Matsushima, K., and Ting, J.P. (2000). IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *J. Immunol.*

164, 2769–2775.

Lee, S.-J., Namkoong, S., Kim, Y.-M., Kim, C.-K., Lee, H., Ha, K.-S., Chung, H.-T., Kwon, Y.-G., and Kim, Y.-M. (2006). Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H2836–2846.

Leek, R.D., Lewis, C.E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., and Harris, A.L. (1996). Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* *56*, 4625–4629.

Leick, M., Catusse, J., Follo, M., Nibbs, R.J., Hartmann, T.N., Veelken, H., and Burger, M. (2010). CCL19 is a specific ligand of the constitutively recycling atypical human chemokine receptor CRAM-B. *Immunology* *129*, 536–546.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* *396*, 643–649.

Leslie, A., Carey, F.A., Pratt, N.R., and Steele, R.J.C. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* *89*, 845–860.

Letrou-Bonneval, E., Chèvre, R., Lambert, O., Costet, P., André, C., Tellier, C., and Pitard, B. (2008). Galactosylated multimodular lipoplexes for specific gene transfer into primary hepatocytes. *J Gene Med* *10*, 1198–1209.

Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Assfalg, G., Asemissen, A.M., Thiel, E., and Scheibenbogen, C. (2004). Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J. Invest. Dermatol.* *122*, 685–690.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* *7*, 678–689.

Liang, Z., Wu, T., Lou, H., Yu, X., Taichman, R.S., Lau, S.K., Nie, S., Umbreit, J., and Shim, H. (2004). Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res.* *64*, 4302–4308.

Liang, Z., Yoon, Y., Votaw, J., Goodman, M.M., Williams, L., and Shim, H. (2005). Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res.* *65*, 967–971.

Liang, Z., Brooks, J., Willard, M., Liang, K., Yoon, Y., Kang, S., and Shim, H. (2007). CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *359*, 716–722.

Lin, E.Y., Li, J.-F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D.A., Qian, H., Xue, X., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* *66*, 11238–11246.

Lissbrant, I.F., Stattin, P., Wikstrom, P., Damber, J.E., Egevad, L., and Bergh, A. (2000). Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int. J. Oncol.* *17*, 445–451.

Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., and Landau, N.R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* *86*, 367–377.

Liu, Y., Huang, H., Saxena, A., and Xiang, J. (2002). Intratumoral coinjection of two adenoviral vectors expressing functional interleukin-18 and inducible protein-10, respectively, synergizes to facilitate regression of established tumors. *Cancer Gene Ther.* *9*, 533–542.

Lo, B.K.K., Yu, M., Zloty, D., Cowan, B., Shapiro, J., and McElwee, K.J. (2010). CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* *176*, 2435–2446.

Loetscher, P., Pellegrino, A., Gong, J.H., Mattioli, I., Loetscher, M., Bardi, G., Baggiolini, M., and Clark-

- Lewis, I. (2001). The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J. Biol. Chem.* *276*, 2986–2991.
- López-Giral, S., Quintana, N.E., Cabrerizo, M., Alfonso-Pérez, M., Sala-Valdés, M., De Soria, V.G.G., Fernández-Rañada, J.M., Fernández-Ruiz, E., and Muñoz, C. (2004). Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J. Leukoc. Biol.* *76*, 462–471.
- Lusso, P. (2006). HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J.* *25*, 447–456.
- Luster, A.D., and Leder, P. (1993). IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J. Exp. Med.* *178*, 1057–1065.
- Lynch, H.T., Shaw, M.W., Magnuson, C.W., Larsen, A.L., and Krush, A.J. (1966). Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch. Intern. Med.* *117*, 206–212.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., and Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 9448–9453.
- Ma, W.-F., Du, J., Fu, L.-P., Fang, R., Chen, H.-Y., and Cai, S.-H. (2009a). Phenotypic Knockout of CXCR4 by a Novel Recombinant Protein TAT/54R/KDEL Inhibits Tumors Metastasis. *Mol Cancer Res* *7*, 1613–1621.
- Ma, X., Norsworthy, K., Kundu, N., Rodgers, W.H., Gimotty, P.A., Goloubeva, O., Lipsky, M., Li, Y., Holt, D., and Fulton, A. (2009b). CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 490–498.
- Maione, T.E., Gray, G.S., Petro, J., Hunt, A.J., Donner, A.L., Bauer, S.I., Carson, H.F., and Sharpe, R.J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* *247*, 77–79.
- Maishi, N., Ohga, N., Hida, Y., Akiyama, K., Kitayama, K., Osawa, T., Onodera, Y., Shinohara, N., Nonomura, K., Shindoh, M., et al. (2012). CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol. Int.* *62*, 309–317.
- Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 231–237.
- Mantovani, A., Bonecchi, R., and Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 907–918.
- Mantovani, A., Sica, A., Allavena, P., Garlanda, C., and Locati, M. (2009). Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum. Immunol.* *70*, 325–330.
- Marchesi, F., Piemonti, L., Fedele, G., Destro, A., Roncalli, M., Albarello, L., Doglioni, C., Anselmo, A., Doni, A., Bianchi, P., et al. (2008). The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* *68*, 9060–9069.
- Marchesi, F., Piemonti, L., Mantovani, A., and Allavena, P. (2010). Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *21*, 77–82.
- Maric, M., and Liu, Y. (1999). Strong cytotoxic T lymphocyte responses to a macrophage inflammatory protein 1alpha-expressing tumor: linkage between inflammation and specific immunity. *Cancer Res.* *59*, 5549–5553.
- Mashino, K., Sadanaga, N., Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Shibuta, K., Inoue, H., and Mori, M. (2002). Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.* *62*, 2937–2941.
- Matloubian, M., David, A., Engel, S., Ryan, J.E., and Cyster, J.G. (2000). A transmembrane CXC

chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat. Immunol.* *1*, 298–304.

Matsusue, R., Kubo, H., Hisamori, S., Okoshi, K., Takagi, H., Hida, K., Nakano, K., Itami, A., Kawada, K., Nagayama, S., et al. (2009). Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. *Ann. Surg. Oncol.* *16*, 2645–2653.

Maussang, D., Mujic-Delic, A., Descamps, F.J., Stortelers, C., Stigter-van Walsum, M., Vischer, H.F., van Roy, M., Vosjan, M., Gonzalez-Pajuelo, M., van Dongen, G.A.M.S., et al. (2013). Llama-derived single variable domains (Nanobodies) directed against CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo. *J. Biol. Chem.*

McEver, R.P., and Zhu, C. (2010). Rolling cell adhesion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *26*, 363–396.

Meijer, J., Ogink, J., and Roos, E. (2008). Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* *99*, 1493–1501.

Melillo, R.M., Castellone, M.D., Guarino, V., De Falco, V., Cirafici, A.M., Salvatore, G., Caiazzo, F., Basolo, F., Giannini, R., Kruhoffer, M., et al. (2005). The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J. Clin. Invest.* *115*, 1068–1081.

Melnikova, V.O., and Bar-Eli, M. (2006). Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8. *Pigment Cell Res.* *19*, 395–405.

Mendoza, M., and Khanna, C. (2009). Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1452–1462.

Mian, B.M., Dinney, C.P.N., Bermejo, C.E., Sweeney, P., Tellez, C., Yang, X.D., Gudas, J.M., McConkey, D.J., and Bar-Eli, M. (2003). Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB. *Clin. Cancer Res.* *9*, 3167–3175.

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.

Michael, M., Goldstein, D., Clarke, S.J., Milner, A.D., Beale, P., Friedlander, M., and Mitchell, P. (2006). Prognostic factors predictive of response and survival to a modified FOLFOX regimen: importance of an increased neutrophil count. *Clin Colorectal Cancer* *6*, 297–304.

Midgley, R., and Kerr, D. (1999). Colorectal cancer. *Lancet* *353*, 391–399.

Mishra, P., Banerjee, D., and Ben-Baruch, A. (2011). Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *J. Leukoc. Biol.* *89*, 31–39.

Miyamoto, M., Shimizu, Y., Okada, K., Kashii, Y., Higuchi, K., and Watanabe, A. (1998). Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* *47*, 47–57.

Mlecnik, B., Tosolini, M., Charoentong, P., Kirilovsky, A., Bindea, G., Berger, A., Camus, M., Gillard, M., Bruneval, P., Fridman, W.-H., et al. (2010). Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* *138*, 1429–1440.

Moghimi, S.M., and Hunter, A.C. (2000). Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.* *18*, 412–420.

Mohit, E., and Rafati, S. (2012). Chemokine-based immunotherapy: delivery systems and combination therapies. *Immunotherapy* *4*, 807–840.

Monnier, J., Boissan, M., L'Helgoualc'h, A., Lacombe, M.-L., Turlin, B., Zucman-Rossi, J., Théret, N., Piquet-Pellorce, C., and Samson, M. (2012). CXCR7 is up-regulated in human and murine hepatocellular carcinoma and is specifically expressed by endothelial cells. *Eur. J. Cancer* *48*, 138–148.

- Morille, M., Passirani, C., Letrou-Bonneval, E., Benoit, J.-P., and Pitard, B. (2009). Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting. *Int J Pharm* 379, 293–300.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969.
- Movahedi, K., Guillems, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233–4244.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., et al. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* 70, 5728–5739.
- Mueller, L., Goumas, F.A., Affeldt, M., Sandtner, S., Gehling, U.M., Brilloff, S., Walter, J., Karnatz, N., Lamszus, K., Rogiers, X., et al. (2007). Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am. J. Pathol.* 171, 1608–1618.
- Mukaida, N., and Baba, T. (2012). Chemokines in tumor development and progression. *Exp. Cell Res.* 318, 95–102.
- Mulé, J.J., Custer, M., Averbook, B., Yang, J.C., Weber, J.S., Goeddel, D.V., Rosenberg, S.A., and Schall, T.J. (1996). RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Hum. Gene Ther.* 7, 1545–1553.
- 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.
- Murakami, J., Li, T.-S., Ueda, K., Tanaka, T., and Hamano, K. (2009). Inhibition of accelerated tumor growth by blocking the recruitment of mobilized endothelial progenitor cells after chemotherapy. *Int. J. Cancer* 124, 1685–1692.
- Murakami, T., Cardones, A.R., Finkelstein, S.E., Restifo, N.P., Klaunberg, B.A., Nestle, F.O., Castillo, S.S., Dennis, P.A., and Hwang, S.T. (2003). Immune evasion by murine melanoma mediated through CC chemokine receptor-10. *J. Exp. Med.* 198, 1337–1347.
- Murdoch, C., Monk, P.N., and Finn, A. (1999). Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine* 11, 704–712.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 618–631.
- Murphy, P.M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 593–633.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145–176.
- Myant, K., and Sansom, O.J. (2011). Wnt/Myc interactions in intestinal cancer: partners in crime. *Exp. Cell Res.* 317, 2725–2731.
- 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.
- Narvaiza, I., Mazzolini, G., Barajas, M., Duarte, M., Zaratiegui, M., Qian, C., Melero, I., and Prieto, J. (2000). Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gamma-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy. *J. Immunol.* 164, 3112–

- Nibbs, R.J., Wylie, S.M., Yang, J., Landau, N.R., and Graham, G.J. (1997). Cloning and characterization of a novel promiscuous human beta-chemokine receptor D6. *J. Biol. Chem.* *272*, 32078–32083.
- Nieuwenhuis, M.H., and Vasen, H.F.A. (2007). Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *61*, 153–161.
- Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* *127*, 759–767.
- Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., Hieshima, K., Kakizaki, M., Dohmae, N., Yoshie, O., and Imai, T. (2002). Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J. Immunol.* *168*, 6173–6180.
- Nukiwa, M., Andarini, S., Zaini, J., Xin, H., Kanehira, M., Suzuki, T., Fukuhara, T., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Saijo, Y., et al. (2006). Dendritic cells modified to express fractalkine/CX3CL1 in the treatment of preexisting tumors. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1019–1027.
- Nussenbaum, F., and Herman, I.M. (2010). Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J Oncol* *2010*, 132641.
- 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.
- Ohta, M., Tanaka, F., Yamaguchi, H., Sadanaga, N., Inoue, H., and Mori, M. (2005). The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients. *Int. J. Oncol.* *26*, 41–47.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335–348.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2008). Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *18*, 11–18.
- Ottaiano, A., di Palma, A., Napolitano, M., Pisano, C., Pignata, S., Tatangelo, F., Botti, G., Acquaviva, A.M., Castello, G., Ascierto, P.A., et al. (2005). Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* *54*, 781–791.
- Owen, J.L., and Mohamadzadeh, M. (2013). Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Front. Physiol* *4*, 159.
- Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* *27*, 5944–5951.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* *1*, 99–101.
- Palmer, K., Hitt, M., Emtage, P.C., Gyorffy, S., and Gauldie, J. (2001). Combined CXC chemokine and interleukin-12 gene transfer enhances antitumor immunity. *Gene Ther.* *8*, 282–290.
- Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J.A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., et al. (1997). Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* *387*, 611–617.
- Papetti, M., and Herman, I.M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *282*, C947–970.

- Park, M.H., Lee, J.S., and Yoon, J.H. (2012). High expression of CX3CL1 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating CD8⁺ T cells, natural killer cells, and dendritic cells in breast carcinoma. *J Surg Oncol* 106, 386–392.
- Patterson, B.C., and Sang, Q.A. (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* 272, 28823–28825.
- Paunescu, V., Bojin, F.M., Tatu, C.A., Gavriliuc, O.I., Rosca, A., Gruia, A.T., Tanasie, G., Bunu, C., Crisnic, D., Gherghiceanu, M., et al. (2011). Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 635–646.
- Pease, J.E. (2006). Asthma, allergy and chemokines. *Curr Drug Targets* 7, 3–12.
- Peiper, S.C., Wang, Z.X., Neote, K., Martin, A.W., Showell, H.J., Conklyn, M.J., Ogborne, K., Hadley, T.J., Lu, Z.H., Hesselgesser, J., et al. (1995). The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J. Exp. Med.* 181, 1311–1317.
- Pekarek, L.A., Starr, B.A., Toledano, A.Y., and Schreiber, H. (1995). Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.* 181, 435–440.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* 2, 764–776.
- 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.
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Lutz, M., Belperio, J.A., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2003). The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1676–1686.
- Piccard, H., Muschel, R.J., and Opdenakker, G. (2012). On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 82, 296–309.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2059–2072.
- Pitard, B., Pollard, H., Agbulut, O., Lambert, O., Vilquin, J.-T., Cherel, Y., Abadie, J., Samuel, J.-L., Rigaud, J.-L., Menoret, S., et al. (2002). A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum. Gene Ther.* 13, 1767–1775.
- Pitard, B., Bello-Roufaï, M., Lambert, O., Richard, P., Desigaux, L., Fernandes, S., Lanctin, C., Pollard, H., Zeghal, M., Rescan, P.-Y., et al. (2004). Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res.* 32, e159.
- Polanska, U.M., and Orimo, A. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *J. Cell. Physiol.* 228, 1651–1657.
- Ponz de Leon, M., and Di Gregorio, C. (2001). Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 33, 372–388.
- Porvasnik, S., Sakamoto, N., Kusmartsev, S., Eruslanov, E., Kim, W.-J., Cao, W., Urbanek, C., Wong, D., Goodison, S., and Rosser, C.J. (2009). Effects of CXCR4 antagonist CTCE-9908 on prostate tumor growth. *Prostate* 69, 1460–1469.
- Poupel, L., and Combadière, C. (2010). [Atherosclerosis□: on the trail of chemokines]. *Biol Aujourd'hui* 204, 285–293.
- Powrie, F., and Coffman, R.L. (1993). Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol. Today* 14, 270–274.
- Pradelli, E., Karimjee-Soilihi, B., Michiels, J.-F., Ricci, J.-E., Millet, M.-A., Vandenbos, F., Sullivan,

- T.J., Collins, T.L., Johnson, M.G., Medina, J.C., et al. (2009). Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. *Int. J. Cancer* *125*, 2586–2594.
- Proudfoot, A.E.I., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N.C., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 1885–1890.
- Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* *141*, 39–51.
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* *475*, 222–225.
- Qiuping, Z., Jei, X., Youxin, J., Wei, J., Chun, L., Jin, W., Qun, W., Yan, L., Chunsong, H., Mingzhen, Y., et al. (2004). CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in CD4+ T cells from patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of livin activation. *Cancer Res.* *64*, 7579–7587.
- Quante, M., Tu, S.P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S.S.W., Takashi, S., Baik, G.H., Shibata, W., Diprete, B., Betz, K.S., et al. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* *19*, 257–272.
- Quezada, S.A., Peggs, K.S., Simpson, T.R., and Allison, J.P. (2011). Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol. Rev.* *241*, 104–118.
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., and Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Exp. Cell Res.* *317*, 575–589.
- Redjal, N., Chan, J.A., Segal, R.A., and Kung, A.L. (2006). CXCR4 inhibition synergizes with cytotoxic chemotherapy in gliomas. *Clin. Cancer Res.* *12*, 6765–6771.
- Rees, M., Plant, G., and Bygrave, S. (1997). Late results justify resection for multiple hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* *84*, 1136–1140.
- Ren, G., Zhao, X., Wang, Y., Zhang, X., Chen, X., Xu, C., Yuan, Z., Roberts, A.I., Zhang, L., Zheng, B., et al. (2012). CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell* *11*, 812–824.
- Richard, P., Bossard, F., Desigaux, L., Lanctin, C., Bello-Roufai, M., and Pitard, B. (2005a). Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum. Gene Ther.* *16*, 1318–1324.
- Richard, P., Pollard, H., Lanctin, C., Bello-Roufai, M., Désigaux, L., Escande, D., and Pitard, B. (2005b). Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation. *J Gene Med* *7*, 80–86.
- Richard-Fiardo, P., Cambien, B., Pradelli, E., Beilvert, F., Pitard, B., Schmid-Antomarchi, H., and Schmid-Alliana, A. (2011). Effect of fractalkine-Fc delivery in experimental lung metastasis using DNA/704 nanospheres. *Cancer Gene Ther.* *18*, 761–772.
- Richert, M.M., Vaidya, K.S., Mills, C.N., Wong, D., Korz, W., Hurst, D.R., and Welch, D.R. (2009). Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. *Oncol. Rep.* *21*, 761–767.
- Robert, J. (2013). [Biology of cancer metastasis]. *Bull Cancer* *100*, 333–342.
- Robinson, S.C., Scott, K.A., Wilson, J.L., Thompson, R.G., Proudfoot, A.E.I., and Balkwill, F.R. (2003). A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res.* *63*, 8360–8365.
- Rocha, F.G., and D’Angelica, M. (2010). Treatment of liver colorectal metastases: role of laparoscopy, radiofrequency ablation, and microwave coagulation. *J Surg Oncol* *102*, 968–974.

- Rodríguez, J., Viúdez, A., Ponz-Sarvisé, M., Gil-Aldea, I., Chopitea, A., García-Foncillas, J., and Gil-Bazo, I. (2010). Improving disease control in advanced colorectal cancer: Panitumumab and cetuximab. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *74*, 193–202.
- Romagnani, P., Annunziato, F., Lasagni, L., Lazzeri, E., Beltrame, C., Francalanci, M., Uguccioni, M., Galli, G., Cosmi, L., Maurenzig, L., et al. (2001). Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J. Clin. Invest.* *107*, 53–63.
- Ropponen, K.M., Eskelinen, M.J., Lipponen, P.K., Alhava, E., and Kosma, V.M. (1997). Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J. Pathol.* *182*, 318–324.
- Rosenblatt, J.D., Shin, S.-U., Nechustan, H., Yi, K.H., and Tolba, K. (2002). Potential role of chemokines in immune therapy of cancer. *Isr. Med. Assoc. J.* *4*, 1054–1059.
- Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 217–242.
- Rot, A., and von Andrian, U.H. (2004). Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokines Grammar for Immune Cells. *Annual Review of Immunology* *22*, 891–928.
- Rousseau, R.F., Haight, A.E., Hirschmann-Jax, C., Yvon, E.S., Rill, D.R., Mei, Z., Smith, S.C., Inman, S., Cooper, K., Alcoser, P., et al. (2003). Local and systemic effects of an allogeneic tumor cell vaccine combining transgenic human lymphotactin with interleukin-2 in patients with advanced or refractory neuroblastoma. *Blood* *101*, 1718–1726.
- Rozel, S., Galbán, C.J., Nicolay, K., Lee, K.C., Sud, S., Neeley, C., Snyder, L.A., Chenevert, T.L., Rehemtulla, A., Ross, B.D., et al. (2009). Synergy between anti-CCL2 and docetaxel as determined by DW-MRI in a metastatic bone cancer model. *J. Cell. Biochem.* *107*, 58–64.
- Rubie, C., Oliveira-Frick, V., Rau, B., Schilling, M., and Wagner, M. (2006). Chemokine receptor CCR6 expression in colorectal liver metastasis. *J. Clin. Oncol.* *24*, 5173–5174; author reply 5174.
- Rubie, C., Frick, V.O., Pfeil, S., Wagner, M., Kollmar, O., Kopp, B., Graber, S., Rau, B.M., and Schilling, M.K. (2007). Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* *13*, 4996–5002.
- Rubin, J.B., Kung, A.L., Klein, R.S., Chan, J.A., Sun, Y., Schmidt, K., Kieran, M.W., Luster, A.D., and Segal, R.A. (2003). A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 13513–13518.
- Ruckes, T., Saul, D., Van Snick, J., Hermine, O., and Grassmann, R. (2001). Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309. *Blood* *98*, 1150–1159.
- Ruehlmann, J.M., Xiang, R., Niethammer, A.G., Ba, Y., Pertl, U., Dolman, C.S., Gillies, S.D., and Reisfeld, R.A. (2001). MIG (CXCL9) chemokine gene therapy combines with antibody-cytokine fusion protein to suppress growth and dissemination of murine colon carcinoma. *Cancer Res.* *61*, 8498–8503.
- Saccani, A., Schioppa, T., Porta, C., Biswas, S.K., Nebuloni, M., Vago, L., Bottazzi, B., Colombo, M.P., Mantovani, A., and Sica, A. (2006). p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res.* *66*, 11432–11440.
- Salcedo, R., Wasserman, K., Young, H.A., Grimm, M.C., Howard, O.M., Anver, M.R., Kleinman, H.K., Murphy, W.J., and Oppenheim, J.J. (1999). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am. J. Pathol.* *154*, 1125–1135.
- Salcedo, R., Resau, J.H., Halverson, D., Hudson, E.A., Dambach, M., Powell, D., Wasserman, K., and Oppenheim, J.J. (2000a). Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* *14*, 2055–2064.

- Salcedo, R., Ponce, M.L., Young, H.A., Wasserman, K., Ward, J.M., Kleinman, H.K., Oppenheim, J.J., and Murphy, W.J. (2000b). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* *96*, 34–40.
- Salcedo, R., Young, H.A., Ponce, M.L., Ward, J.M., Kleinman, H.K., Murphy, W.J., and Oppenheim, J.J. (2001). Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J. Immunol.* *166*, 7571–7578.
- Salem, M.L., Rubinstein, M.P., and Cole, D.J. (2001). Tumours: Immunotherapy. In eLS, (John Wiley & Sons, Ltd),.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C.R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today* *19*, 568–574.
- Sallusto, F., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. (2000). The Role of Chemokine Receptors in Primary, Effector, and Memory Immune Responses. *Annual Review of Immunology* *18*, 593–620.
- Salvesen, H.B., and Akslen, L.A. (1999). Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int. J. Cancer* *84*, 538–543.
- Sánchez-Martín, L., Sánchez-Mateos, P., and Cabañas, C. (2013). CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med* *19*, 12–22.
- Sandhu, S.K., Papadopoulos, K., Fong, P.C., Patnaik, A., Messiou, C., Olmos, D., Wang, G., Tromp, B.J., Puchalski, T.A., Balkwill, F., et al. (2013). A first-in-human, first-in-class, phase I study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *71*, 1041–1050.
- Saur, D., Seidler, B., Schneider, G., Algül, H., Beck, R., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., and Schmid, R.M. (2005). CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* *129*, 1237–1250.
- Sawanobori, Y., Ueha, S., Kurachi, M., Shimaoka, T., Talmadge, J.E., Abe, J., Shono, Y., Kitabatake, M., Kakimi, K., Mukaida, N., et al. (2008). Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* *111*, 5457–5466.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* *177*, 195–203.
- Scapini, P., Nesi, L., Morini, M., Tanghetti, E., Belleri, M., Noonan, D., Presta, M., Albini, A., and Cassatella, M.A. (2002). Generation of biologically active angiostatin kringle 1-3 by activated human neutrophils. *J. Immunol.* *168*, 5798–5804.
- Schadendorf, D., Möller, A., Algermissen, B., Worm, M., Sticherling, M., and Czarnetzki, B.M. (1993). IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J. Immunol.* *151*, 2667–2675.
- Schaerli, P., and Moser, B. (2005). Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol. Res.* *31*, 57–74.
- Schimanski, C.C., Schwald, S., Simiantonaki, N., Jayasinghe, C., Gönner, U., Wilsberg, V., Junginger, T., Berger, M.R., Galle, P.R., and Moehler, M. (2005). Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1743–1750.
- Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S.K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., et al. (2003). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J. Exp. Med.* *198*, 1391–1402.
- Schmidt, S., and Friedl, P. (2010). Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* *339*, 83–92.

- Schrevel, M., Karim, R., ter Haar, N.T., van der Burg, S.H., Trimbos, J.B.M.Z., Fleuren, G.J., Gorter, A., and Jordanova, E.S. (2012). CXCR7 expression is associated with disease-free and disease-specific survival in cervical cancer patients. *Br. J. Cancer* *106*, 1520–1525.
- Schwarze, S.R., Luo, J., Isaacs, W.B., and Jarrard, D.F. (2005). Modulation of CXCL14 (BRAK) expression in prostate cancer. *Prostate* *64*, 67–74.
- Shaked, Y., Henke, E., Roodhart, J.M.L., Mancuso, P., Langenberg, M.H.G., Colleoni, M., Daenen, L.G., Man, S., Xu, P., Emmenegger, U., et al. (2008). Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* *14*, 263–273.
- Shellenberger, T.D., Wang, M., Gujrati, M., Jayakumar, A., Strieter, R.M., Burdick, M.D., Ioannides, C.G., Efferson, C.L., El-Naggar, A.K., Roberts, D., et al. (2004). BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Res.* *64*, 8262–8270.
- Shen, H., Schuster, R., Stringer, K.F., Waltz, S.E., and Lentsch, A.B. (2006). The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. *FASEB J* *20*, 59–64.
- Shi, Q., Abbruzzese, J.L., Huang, S., Fidler, I.J., Xiong, Q., and Xie, K. (1999). Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin. Cancer Res.* *5*, 3711–3721.
- Shimoda, M., Mellody, K.T., and Orimo, A. (2010). Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 19–25.
- Shulby, S.A., Dolloff, N.G., Stearns, M.E., Meucci, O., and Fatatis, A. (2004). CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 4693–4698.
- Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Bernasconi, S., Allavena, P., Gaetano, B., Fei, F., LaRosa, G., Scotton, C., Balkwill, F., et al. (2000). Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma. *J. Immunol.* *164*, 733–738.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* *62*, 10–29.
- Sierro, F., Biben, C., Martínez-Muñoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R.M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., et al. (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 14759–14764.
- Singh, A.K., Arya, R.K., Trivedi, A.K., Sanyal, S., Baral, R., Dormond, O., Briscoe, D.M., and Datta, D. (2013). Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.* *24*, 41–49.
- Singh, S., Sadanandam, A., Nannuru, K.C., Varney, M.L., Mayer-Ezell, R., Bond, R., and Singh, R.K. (2009). Small-molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human melanoma growth by decreasing tumor cell proliferation, survival, and angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* *15*, 2380–2386.
- Singh, S., Wu, S., Varney, M., Singh, A.P., and Singh, R.K. (2011). CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation. *Microvasc. Res.* *82*, 318–325.
- Smith, H.A., and Kang, Y. (2013). The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J. Mol. Med.* *91*, 411–429.
- 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.
- Van Snick, J., Houssiau, F., Proost, P., Van Damme, J., and Renauld, J.C. (1996). I-309/T cell activation

- gene-3 chemokine protects murine T cell lymphomas against dexamethasone-induced apoptosis. *J. Immunol.* *157*, 2570–2576.
- Soto, H., Wang, W., Strieter, R.M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Hedrick, J., and Zlotnik, A. (1998). The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 8205–8210.
- Souto, J.C., Vila, L., and Brú, A. (2011). Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Med Res Rev* *31*, 311–363.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., and Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* *15*, 730–738.
- Speetjens, F.M., Liefers, G.J., Korbee, C.J., Mesker, W.E., van de Velde, C.J.H., van Vlierberghe, R.L., Morreau, H., Tollenaar, R.A., and Kuppen, P.J.K. (2009). Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. *Cancer Microenviron* *2*, 1–7.
- Stamatovic, S.M., Keep, R.F., Mostarica-Stojkovic, M., and Andjelkovic, A.V. (2006). CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *J. Immunol.* *177*, 2651–2661.
- Stockert, R.J. (1995). The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol. Rev.* *75*, 591–609.
- Strasly, M., Doronzo, G., Cappello, P., Capello, P., Valdembri, D., Arese, M., Mitola, S., Moore, P., Alessandri, G., Giovarelli, M., et al. (2004). CCL16 activates an angiogenic program in vascular endothelial cells. *Blood* *103*, 40–49.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., and Marriott, D. (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* *270*, 27348–27357.
- Strieter, R.M., Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A., and Keane, M.P. (2005). CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 593–609.
- Struyf, S., Burdick, M.D., Proost, P., Damme, J.V., and Strieter, R.M. (2004). Platelets Release CXCL4L1, a Nonallelic Variant of the Chemokine Platelet Factor-4/CXCL4 and Potent Inhibitor of Angiogenesis. *Circulation Research* *95*, 855–857.
- Struyf, S., Burdick, M.D., Peeters, E., Van den Broeck, K., Dillen, C., Proost, P., Van Damme, J., and Strieter, R.M. (2007). Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. *Cancer Res.* *67*, 5940–5948.
- Su, X., Ye, J., Hsueh, E.C., Zhang, Y., Hoft, D.F., and Peng, G. (2010). Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J. Immunol.* *184*, 1630–1641.
- Suyama, T., Furuya, M., Nishiyama, M., Kasuya, Y., Kimura, S., Ichikawa, T., Ueda, T., Nikaido, T., Ito, H., and Ishikura, H. (2005). Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXC receptor 3 in human renal cell carcinoma. *Cancer* *103*, 258–267.
- Suzuki, H., Chikazawa, N., Tasaka, T., Wada, J., Yamasaki, A., Kitaura, Y., Sozaki, M., Tanaka, M., Onishi, H., Morisaki, T., et al. (2010). Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 653–661.
- Svennevig, J.L., Lunde, O.C., Holter, J., and Bjørgsvik, D. (1984). Lymphoid infiltration and prognosis in colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer* *49*, 375–377.
- Tabatabai, G., Frank, B., Möhle, R., Weller, M., and Wick, W. (2006). Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain* *129*, 2426–2435.
- 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.
- Takanami, I. (2003). Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int. J. Cancer* 105, 186–189.
- Takenaga, M., Tamamura, H., Hiramatsu, K., Nakamura, N., Yamaguchi, Y., Kitagawa, A., Kawai, S., Nakashima, H., Fujii, N., and Igarashi, R. (2004). A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 226–232.
- Tamamura, H., Hori, A., Kanzaki, N., Hiramatsu, K., Mizumoto, M., Nakashima, H., Yamamoto, N., Otaka, A., and Fujii, N. (2003). T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett.* 550, 79–83.
- Tang, L., Hu, H., Hu, P., Lan, Y., Peng, M., Chen, M., and Ren, H. (2007). Gene therapy with CX3CL1/Fractalkine induces antitumor immunity to regress effectively mouse hepatocellular carcinoma. *Gene Ther.* 14, 1226–1234.
- Taub, D.D. (1996). Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 355–376.
- Tazyman, S., Niaz, H., and Murdoch, C. (2013). Neutrophil-mediated tumour angiogenesis: subversion of immune responses to promote tumour growth. *Semin. Cancer Biol.* 23, 149–158.
- Tirapu, I., Huarte, E., Guiducci, C., Arina, A., Zaratiegui, M., Murillo, O., Gonzalez, A., Berasain, C., Berraondo, P., Fortes, P., et al. (2006). Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoevasion mechanism of colon carcinoma. *Cancer Res.* 66, 2442–2450.
- Tobinai, K., Takahashi, T., and Akinaga, S. (2012). Targeting chemokine receptor CCR4 in adult T-cell leukemia-lymphoma and other T-cell lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep* 7, 235–240.
- Todaro, M., Francipane, M.G., Medema, J.P., and Stassi, G. (2010). Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 138, 2151–2162.
- Tomasetti, C., Vogelstein, B., and Parmigiani, G. (2013). Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1999–2004.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 71, 1263–1271.
- Tougeron, D., Fauquembergue, E., and Latouche, J.-B. (2013). Immunotherapy for colorectal cancer. *Bull Cancer* 100, 871–885.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–736.
- Umansky, V., and Sevko, A. (2013). Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Microenviron* 6, 169–177.
- Vallet, S., and Anderson, K.C. (2011). CCR1 as a target for multiple myeloma. *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 1037–1047.
- Vandercappellen, J., Van Damme, J., and Struyf, S. (2011). The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22, 1–18.
- Varney, M.L., Singh, S., Li, A., Mayer-Ezell, R., Bond, R., and Singh, R.K. (2011). Small molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human colon cancer liver metastases. *Cancer Lett.* 300, 180–188.

- Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Khan, P.M., and Lynch, H.T. (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum* 34, 424–425.
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P., and Lynch, H.T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116, 1453–1456.
- Verbeke, H., Struyf, S., Laureys, G., and Van Damme, J. (2011). The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 345–358.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271.
- Vicari, A.P., and Caux, C. (2002). Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 143–154.
- Vicari, A.P., Ait-Yahia, S., Chemin, K., Mueller, A., Zlotnik, A., and Caux, C. (2000). Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. *J. Immunol.* 165, 1992–2000.
- De Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 6, 24–37.
- Vitale, S., Schmid-Alliana, A., Breuil, V., Pomeranz, M., Millet, M.-A., Rossi, B., and Schmid-Antomarchi, H. (2004). Soluble fractalkine prevents monocyte chemoattractant protein-1-induced monocyte migration via inhibition of stress-activated protein kinase 2/p38 and matrix metalloproteinase activities. *J. Immunol.* 172, 585–592.
- Vitale, S., Cambien, B., Karimjee, B.F., Barthel, R., Staccini, P., Luci, C., Breittmayer, V., Anjuère, F., Schmid-Alliana, A., and Schmid-Antomarchi, H. (2007). Tissue-specific differential antitumour effect of molecular forms of fractalkine in a mouse model of metastatic colon cancer. *Gut* 56, 365–372.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr, and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.
- Volin, M.V., Woods, J.M., Amin, M.A., Connors, M.A., Harlow, L.A., and Koch, A.E. (2001). Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* 159, 1521–1530.
- Wainwright, D.A., Dey, M., Chang, A., and Lesniak, M.S. (2013). Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO. *Front Immunol* 4, 116.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27, 5932–5943.
- Walser, T.C., Rifat, S., Ma, X., Kundu, N., Ward, C., Goloubeva, O., Johnson, M.G., Medina, J.C., Collins, T.L., and Fulton, A.M. (2006). Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 66, 7701–7707.
- Walzer, T., and Vivier, E. (2011). G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration. *Trends Immunol.* 32, 486–492.
- Wan, W., and Murphy, P.M. (2013). Regulation of atherogenesis by chemokines and chemokine receptors. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 61, 1–14.
- Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K.J., Mehra, R., Loberg, R., and Taichman, R.S. (2008). The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 283, 4283–4294.
- Wang, L., Chen, W., Gao, L., Yang, Q., Liu, B., Wu, Z., Wang, Y., and Sun, Y. (2012). High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol* 10, 212.
- Weigelin, B., Krause, M., and Friedl, P. (2011). Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function

in the tumor microenvironment. *Immunol. Lett.* *138*, 19–21.

Weiss, L. (1992). Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin. Exp. Metastasis* *10*, 191–199.

Weiss, L., Grundmann, E., Torhorst, J., Hartveit, F., Moberg, I., Eder, M., Fenoglio-Preiser, C.M., Napier, J., Horne, C.H., and Lopez, M.J. (1986). Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J. Pathol.* *150*, 195–203.

Wenzel, J., Bekisch, B., Uerlich, M., Haller, O., Bieber, T., and Tüting, T. (2005). Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am. J. Clin. Pathol.* *124*, 37–48.

Wetzel, K., Struyf, S., Van Damme, J., Kayser, T., Vecchi, A., Sozzani, S., Rommelaere, J., Cornelis, J.J., and Dinsart, C. (2007). MCP-3 (CCL7) delivered by parvovirus MVMP reduces tumorigenicity of mouse melanoma cells through activation of T lymphocytes and NK cells. *Int. J. Cancer* *120*, 1364–1371.

De Wever, O., Nguyen, Q.-D., Van Hoorde, L., Bracke, M., Bruyneel, E., Gespach, C., and Mareel, M. (2004). Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* *18*, 1016–1018.

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.

Wislez, M., Rabbe, N., Marchal, J., Milleron, B., Crestani, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P., and Cadranel, J. (2003). Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res.* *63*, 1405–1412.

Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., et al. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* *318*, 1108–1113.

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.

Xiang, B., Snook, A.E., Magee, M.S., and Waldman, S.A. (2013). Colorectal cancer immunotherapy. *Discov Med* *15*, 301–308.

Xin, H., Kikuchi, T., Andarini, S., Ohkouchi, S., Suzuki, T., Nukiwa, T., Huqun, Hagiwara, K., Honjo, T., and Saijo, Y. (2005). Antitumor immune response by CX3CL1 fractalkine gene transfer depends on both NK and T cells. *Eur. J. Immunol.* *35*, 1371–1380.

Xu, J., Rodriguez, D., Petittler, E., Kim, J.J., Hangai, M., Moon, Y.S., Davis, G.E., Brooks, P.C., and Yuen, S.M. (2001). Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J. Cell Biol.* *154*, 1069–1079.

Xu, L., Duda, D.G., di Tomaso, E., Ancukiewicz, M., Chung, D.C., Lauwers, G.Y., Samuel, R., Shellito, P., Czitko, B.G., Lin, P.-C., et al. (2009). Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. *Cancer Res.* *69*, 7905–7910.

Xue, T.-C., Chen, R.-X., Han, D., Chen, J., Xue, Q., Gao, D.-M., Sun, R.-X., Tang, Z.-Y., and Ye, S.-L. (2012). Down-regulation of CXCR7 inhibits the growth and lung metastasis of human hepatocellular carcinoma cells with highly metastatic potential. *Exp Ther Med* *3*, 117–123.

Yan, X., Cai, S., Xiong, X., Sun, W., Dai, X., Chen, S., Ye, Q., Song, Z., Jiang, Q., and Xu, Z. (2012). Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *J. Cell. Biochem.* *113*, 1437–1446.

Yang, L., Jackson, E., Woerner, B.M., Perry, A., Piwnica-Worms, D., and Rubin, J.B. (2007). Blocking

- CXCR4-mediated cyclic AMP suppression inhibits brain tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 67, 651–658.
- Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A.E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D.P., Matrisian, L.M., Richmond, A., Lin, P.C., et al. (2008). Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13, 23–35.
- Yang, S.-C., Batra, R.K., Hillinger, S., Reckamp, K.L., Strieter, R.M., Dubinett, S.M., and Sharma, S. (2006). Intrapulmonary administration of CCL21 gene-modified dendritic cells reduces tumor burden in spontaneous murine bronchoalveolar cell carcinoma. *Cancer Res.* 66, 3205–3213.
- Yasumoto, K., Koizumi, K., Kawashima, A., Saitoh, Y., Arita, Y., Shinohara, K., Minami, T., Nakayama, T., Sakurai, H., Takahashi, Y., et al. (2006). Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res.* 66, 2181–2187.
- Yoon, Y., Liang, Z., Zhang, X., Choe, M., Zhu, A., Cho, H.T., Shin, D.M., Goodman, M.M., Chen, Z.G., and Shim, H. (2007). CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. *Cancer Res.* 67, 7518–7524.
- Yopp, A.C., Shia, J., Butte, J.M., Allen, P.J., Fong, Y., Jarnagin, W.R., DeMatteo, R.P., and D’Angelica, M.I. (2012). CXCR4 expression predicts patient outcome and recurrence patterns after hepatic resection for colorectal liver metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 19 Suppl 3, S339–346.
- Youn, B.S., Mantel, C., and Broxmeyer, H.E. (2000). Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol. Rev.* 177, 150–174.
- Zaja-Milatovic, S., and Richmond, A. (2008). CXC chemokines and their receptors: a case for a significant biological role in cutaneous wound healing. *Histol. Histopathol.* 23, 1399–1407.
- 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.
- Zeng, Y., Jiang, J., Huebener, N., Wenkel, J., Gaedicke, G., Xiang, R., and Lode, H.N. (2005). Fractalkine gene therapy for neuroblastoma is more effective in combination with targeted IL-2. *Cancer Lett.* 228, 187–193.
- Zhang, J., Patel, L., and Pienta, K.J. (2010). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 41–48.
- Zheng, K., Li, H.-Y., Su, X.-L., Wang, X.-Y., Tian, T., Li, F., and Ren, G.-S. (2010). Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29, 31.
- Zhong, C., Wang, J., Li, B., Xiang, H., Ultsch, M., Coons, M., Wong, T., Chiang, N.Y., Clark, S., Clark, R., et al. (2013). Development and Preclinical Characterization of a Humanized Antibody Targeting CXCL12. *Clin Cancer Res* 19, 4433–4445.
- Zhou, Q., Peng, R.-Q., Wu, X.-J., Xia, Q., Hou, J.-H., Ding, Y., Zhou, Q.-M., Zhang, X., Pang, Z.-Z., Wan, D.-S., et al. (2010). The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *J Transl Med* 8, 13.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* 238, 247–262.
- Zhu, A.X., Sahani, D.V., Duda, D.G., di Tomaso, E., Ancukiewicz, M., Catalano, O.A., Sindhvani, V., Blaszkowsky, L.S., Yoon, S.S., Lahdenranta, J., et al. (2009). Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J. Clin. Oncol.* 27, 3027–3035.
- Zhu, X.-D., Zhang, J.-B., Zhuang, P.-Y., Zhu, H.-G., Zhang, W., Xiong, Y.-Q., Wu, W.-Z., Wang, L., Tang, Z.-Y., and Sun, H.-C. (2008). High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular

carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *26*, 2707–2716.

Zigler, M., Villares, G.J., Lev, D.C., Melnikova, V.O., and Bar-Eli, M. (2008). Tumor immunotherapy in melanoma: strategies for overcoming mechanisms of resistance and escape. *Am J Clin Dermatol* *9*, 307–311.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* *12*, 121–127.

Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., and Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 597–606.