

Université de Montréal

**Étude du mode de liaison de l'antagoniste de CXCR4, TC14012, sur ACKR3 et
évaluation de CXCR4 et d'ACKR3 comme marqueurs de survie de la leucémie
pédiatrique dans un modèle murin xénogénique.**

par

Nicolas Montpas

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Biochimie

Juillet, 2017

© Nicolas Montpas, 2017

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce Thèse intitulée :

Étude du mode de liaison de l'antagoniste de CXCR4, TC14012, sur ACKR3 et évaluation de CXCR4 et d'ACKR3 comme marqueurs de survie de la leucémie pédiatrique dans un modèle murin xénogénique.

par :

Nicolas Montpas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

D^r Tarik Möröy, Ph. D., Président-rapporteur

D^r Nikolaus Heveker, Ph.D., directeur de recherche

D^{re} Sonia Cellot, M.D., Ph.D., membre du jury

D^{re} Krista Heinonen, Ph.D., Évaluatrice externe

D^r Louis-Éric Trudeau, Représentant du doyen

Résumé

CXCL12 est une chimiokine non inflammatoire impliquée dans la domiciliation et la rétention des cellules souches hématopoïétiques à l'intérieur de niches spécifiques de la moelle osseuse. Elle agit par le biais de deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires, CXCR4 et ACKR3. La migration ainsi que l'attachement cellulaire en réponse à CXCL12 découlent de l'activation de CXCR4. ACKR3, qui ne signale pas par la voie des protéines G, mais uniquement par la voie arrestine, aurait pour rôle de dégrader la chimiokine, menant ainsi à la création et au maintien d'un gradient de CXCL12 primordial à l'orientation cellulaire lors de la migration.

Étant une cible pharmacologique d'intérêt dans plusieurs processus pathologique dont notamment l'infection au VIH et la dissémination métastatique de cancers, CXCR4 fut l'objet d'un développement intensif d'antagonistes le ciblant. Malgré la faible homologie de séquence entre CXCR4 et ACKR3, certains de ses antagonistes, tels que l'AMD3100 ou le TC14012, sont des ligands agonistes de ACKR3. Les causes de cet effet inverse sur CXCR4 et ACKR3 ne sont pas connues. Ainsi, dans le premier article de cette thèse, le mode de liaison du TC10412 sur ACKR3 a été déterminé, en s'appuyant sur les données du cristal de CXCR4 en complexe avec CVX15 (un dérivé du TC14012). Les résultats cumulés d'essais fonctionnels et de simulations de dynamique moléculaire ont permis l'identification de déterminantes clés du récepteur ACKR3 et du TC14012 permettant leur interaction. Ces informations sont essentielles pour le développement futur de molécules ciblant spécifiquement l'un ou l'autre de ces récepteurs.

La leucémie aigüe lymphoblastique de type pré-B (B-LAL) est la néoplasie la plus fréquente en pédiatrie. Si les taux de rémission sans complications sur 5 ans dépassent les 85%, plus de 25% de ces enfants porteront des séquelles graves potentiellement mortelles tout au long de leur vie due à un sur-traitement. La stratification plus précise du risque individuel de rechute permettrait des réductions ou intensifications thérapeutiques correspondants.

Il a été montré récemment que la survie de souris xénotreffées avec des échantillons de patients (PDX) B-LAL corrélait avec le risque individuel de rechute. Ainsi, dans la deuxième section de cette thèse, nous rapportons, pour la première fois, une méthode servant à l'identification de nouveaux marqueurs de risque à l'aide d'un modèle de souris PDX greffé avec des échantillons B-LAL pédiatriques. Le modèle a d'abord été validé à l'aide de marqueurs de pronostics connus pour la B-LAL pédiatrique (t(12;21), l'hyperdiploïdie (HD) et CD20). Nous avons ensuite démontré que l'utilisation combinée de plusieurs marqueurs (CXCR4^{élevé}ACKR3^{faible}, non-t(12;21) et non-HD) prédit avec précision une courte survie des souris PDX. Cette étude exploratoire balise les paramètres pour une étude future, prospective ou rétrospective, qui devra établir une association entre notre algorithme et l'évolution clinique individuelle des patients leucémiques. En perspective, notre approche contribuera à l'optimisation de la stratification du risque individuel de rechute chez les patients atteints d'une B-LAL.

Mots clés

CXCL12 • CXCR4 • ACKR3 • inhibiteur de CXCR4 • T140
• TC14012 • souris PDX • Leucémie • cancer pédiatrique • B-LAL
• stratification du risque

Abstract

CXCL12 is a non-inflammatory chemokine involved in hematopoietic stem cell homing and retention to specific bone marrow niches. Its signaling is transduced through two 7 transmembrane receptors, CXCR4 and ACKR3. CXCR4 controls migration cues and cellular attachment by a G-protein-dependent signaling pathway. The second receptor, ACKR3, promotes CXCL12 degradation through a G-protein-independent, arrestin-dependent pathway. The latter leads to the generation and maintenance of a sharp CXCL12 gradient, promoting directional cell migration.

Because of its involvement in a range of pathological processes including, but not restricted to, HIV entry and metastatic dissemination of cancers, CXCR4 is an attractive pharmacological target. Over the past two decades, several antagonists targeting it were synthesized. Despite the low sequence homology between CXCR4 and ACKR3, two of these antagonists, AMD3100 and TC14012, were shown to act as agonists on ACKR3. The causes of this reverse effect on CXCR4 and ACKR3 are not known. Thus, in the first article of this thesis, we used ACKR3 substitution mutants and molecular modeling based on the CXCR4 crystal bound to CVX15 (a TC14012 derivative) to determine the binding mode of TC14012 on ACKR3. The cumulative results of functional assays and molecular dynamics simulations allowed the identification of key determinants in the interaction between ACKR3 and TC14012. These results provide essential information for the future development of more specific ligands targeting one of these receptors.

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common paediatric neoplasia. While the 5-year event-free survival exceeds 85%, more than 25% of these “cured” children will suffer potentially life-threatening sequelæ due to over-treatment. A more precise stratification strategy of the individual risk of relapse is required to allow an accurate personalised therapy reduction or intensification.

It has recently been shown that the survival of patient-derived xenografted (PDX) mice correlates with the individual risk of relapse in children with B-ALL. Thus, in the

second section of this thesis, we report for the first time a method to identify new risk markers using B-ALL PDX mice model. The model was first validated using known prognostic markers for pædiatric B-ALL (t(12;21), hyperdiploid (HD) and CD20). We then demonstrated that the combined use of markers (CXCR4^{high} ACKR3^{low}, non-t(12;21) and non-HD) predicts with great sensitivity a short survival of PDX mice. The key parameters highlighted in this study will now have to be validated in a prospective or retrospective study. The latter would test the association of our combined parameters with the individual clinical outcome of B-ALL children to validate our PDX results. Our algorithm may eventually lead to a more accurate individual risk stratification of pædiatric B-ALL patients thus guiding personalized therapy adjustment.

KEYWORDS

CXCL12 • CXCR4 • ACKR3 • CXCR4 inhibitors • T140 • TC14012
• PDX mice • Leukemia • Pediatric cancer • B-ALL • Risk stratification

Table des matières

RÉSUMÉ	III
MOTS CLÉS	IV
ABSTRACT	V
KEYWORDS	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTES DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES ET DES SCHÉMAS	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XVII
CHAPITRE I – INTRODUCTION	1
1.1 LES CHIMIOKINES ET LEURS RÉCEPTEURS	2
1.1.1 LES CHIMIOKINES	2
1.1.2 LES RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES	2
1.1.3 LA SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES	4
1.1.4 LA RÉPONSE CHIMIOTACTIQUE	6
1.2 CXCL12 ET SES RÉCEPTEURS	7
1.2.1 LE RÉCEPTEUR CXCR4	8
1.2.2 LE RÉCEPTEUR DE CHIMIOKINE ACKR3	10
1.2.3 L'OLIGOMÉRISATION DES RÉCEPTEURS CXCR4 ET ACKR3	13
1.2.4 CXCL12 ET L'HÉMATOPOÏÈSE	15
1.2.5 CXCL12 ET LA DISSÉMINATION MÉTASTATIQUE	19
1.3 LES LIGANDS SYNTHÉTIQUES DU SYSTÈME CXCL12/CXCR4/ACKR3	22
1.3.1 LES LIGANDS SYNTHÉTIQUES DE CXCR4	23
1.3.2 LES LIGANDS SYNTHÉTIQUES D'ACKR3	28

1.4 LA LEUCÉMIE AIGÛE LYMPHOBLASTIQUE PRÉCURSEUR DES CELLULES B	30
1.4.1 DÉFINITION ET TRAITEMENT DE LA B-LAL PÉDIATRIQUE	31
1.4.2 LA RECHUTE ET LES MARQUEURS DE STRATIFICATION DU RISQUE	32
1.4.3 LE RISQUE LIÉ À L'ÂGE ET AU COMPTE LEUCOCYTAIRE	33
1.4.4 LE PHÉNOTYPE DES B-LAL	35
1.4.5 LES MARQUEURS CYTOGÉNÉTIQUES	37
1.4.6 LA MALADIE RÉSIDUELLE	39
1.4.7 LES SOURIS NSG & LES GREFFES XÉNOGÉNIQUES DE CELLULES PRIMAIRES	40
<u>OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE</u>	42
1.6 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	42
1.6.1 PREMIÈRE SECTION: DÉTERMINATION DU MODE DE LIAISON DU TC14012 SUR ACKR3	42
1.6.2 DEUXIÈME SECTION : L'EXPRESSION DE CXCR4 ET D'ACKR3 DANS LES B-LAL PÉDIATRIQUES EST PRÉDICTIF DE LA SURVIE DE SOURIS PDX	43
<u>2 CHAPITRE II – 1^{ER} ARTICLE</u>	44
2.1 DÉTERMINATION DU MODE DE LIAISON DU TC14012 SUR ACKR3	45
2.1.1 MISE EN CONTEXTE	45
<u>3 CHAPITRE III – 2^E ARTICLE</u>	85
3.1 L'EXPRESSION DE CXCR4 ET D'ACKR3 DANS LES B-LAL PÉDIATRIQUES EST PRÉDICTIF DE LA SURVIE DES SOURIS PDX	86
3.1.1 MISE EN CONTEXTE	86
<u>4 CHAPITRE IV – DISCUSSION</u>	124
4.1 PREMIÈRE SECTION : DÉTERMINATION DU MODE DE LIAISON DU TC14012 SUR ACKR3	125
4.1.1 COMPARAISON DU MODE DE LIAISON DU TC14012 ENTRE ACKR3 ET CXCR4	126
4.1.2 LA FLEXIBILITÉ MOLÉCULAIRE DES PETITS PEPTIDES	127
4.1.3 LIMITES ET PERSPECTIVES DE L'ÉTUDE	129
4.2 DEUXIÈME SECTION : L'EXPRESSION DE CXCR4 ET D'ACKR3 DANS LES B-LAL PÉDIATRIQUES EST PRÉDICTIF DE LA SURVIE DES SOURIS NSG XÉNOGREFFÉES	132
4.2.1 LA VALIDATION DU MODÈLE MURIN	133
4.2.2 LE SYSTÈME CXCL12/CXCR4/ACKR3 DANS LA PRÉDICTION DU PRONOSTIC	137

4.2.3	LA COMBINAISON DES MARQUEURS PRONOSTICS	142
4.2.4	PERSPECTIVES & LIMITATIONS	143
CHAPITRE V - CONCLUSION		148
RÉFÉRENCES		150

Listes des Tableaux

CHAPITRE I – INTRODUCTION

Tableau 1.1. Molécules utilisées en pédiatrie pour le traitement de la B-LAL	33
Tableau 1.2. Paramètres utilisés afin de déterminer le risque de rechute des patients	34

CHAPITRE II – DÉTERMINATION DU MODE DE LIAISON DU TC14012 SUR ACKR3

Table 2.1. EC50 Value of the TC14012 derivatives	72
Table 2.S1. Analysis of salt bridges length during the MD simulations	84

CHAPITRE III – L'EXPRESSION DE CXCR4 ET D'ACKR3 DANS LES B-LAL PÉDIATRIQUES EST PRÉDICTIF DE LA SURVIE DE SOURIS NSG XÉNOGREFFÉES

Table 3.1. B-ALL patients characteristics	101
Table 3.S1. CD20 threshold determination	117
Table 3.S2. CXCR4 surface expression cutoff determination	118
Table 3.S3. Intracellular CXCR4 expression, threshold determination	119
Table 3.S4. ACKR3 surface expression, threshold determination	120
Table 3.S5. Intracellular ACKR3 expression, threshold determination	121
Table 3.S6. ACKR3 expression, threshold determination	122
Table 3.S7. ACKR3 expression, threshold determination limited to CXCR4shigh samples	123

Liste des figures et des schémas

CHAPITRE I – INTRODUCTION

Figure 1.1 :	Schématisation de la promiscuité des chimiokines et de leurs récepteurs	3
Figure 1.2 :	Schématisation du rôle d'ACKR3 dans la migration cellulaire CXCR4-dépendante	13
Figure 1.3 :	Schématisation de la signalisation des récepteurs CXCR4 et ACKR3 (CXCR7)	15
Figure 1.4 :	Schématisation des différentes niches de la moelle osseuse	18
Figure 1.5 :	Les cellules tumorales ont une préférence pour les tissus exprimant CXCL12 lors de la dissémination métastatique	21
Figure 1.6 :	CXCR4 et le Plerixafor	25
Figure 1.7 :	Le T140 et ces dérivés	27
Figure 1.8 :	Schéma représentant la suite d'apparition des antigènes dans la différenciation des lymphocytes B	37

CHAPITRE II – DÉTERMINATION DU MODE DE LIAISON DU TC14012 SUR ACKR3

Scheme 2.1.	Sequences of the Parental T140 and the Tested Analogues	73
Scheme 2.2.	(A) CXCR7 Snakeplot with Residues Mutated in This Study Highlighted in Black and (B) Sequence Alignment of CXCR7 and CXCR4 Extracellular Loop 2 (ECL2)	74
Scheme 2.3.	CXCR7 Helical Wheel Diagram Seen from the Extracellular Side of the Receptor, with Parts of ECL2	75
Figure 2.1.	T140 is no CXCR7 agonist	76
Figure 2.2.	Recruitment of β -arrestin to CXCR7 by T140 analogues	77
Figure 2.3.	Conformations of TZ14004 and T140 in solution during MD simulations	78
Figure 2.4.	Recruitment of β -arrestin to CXCR7 D179A and D275 mutants	79
Figure 2.5.	Recruitment of β -arrestin to CXCR7 ECL2 mutants	80
Figure 2.6.	H-Bonds formed between ligands and CXCR7	81
Figure 2.S1.	Surface expression of the CXCR7 Mutants	82
Figure 2.S2.	Salt bridge length during MD simulations	83

CHAPITRE III – L'EXPRESSION DE CXCR4 ET D'ACKR3 DANS LES B-LAL PÉDIATRIQUES EST PRÉDICTIF DE LA SURVIE DE SOURIS NSG XÉNOGREFFÉES

Figure 3.1.	Replicates of PDX TTL and survival are highly reproducible and correlate, but do not correlate with demographic or risk factors	102
Figure 3.2.	Absence of both hyperdiploidy and the t(12;21) translocation predict short PDX survival	103
Figure 3.3.	CD20 expression predicts PDX survival	104
Figure 3.4.	Surface expression of CXCR4 predicts survival of PDX mice	105
Figure 3.5.	ACKR3 expression mitigates the effect of CXCR4	106
Figure 3.6.	PDX survival using combined risk markers	107
Figure 3.S1.	Kaplan-Meier plots of PDX survival using cutoffs that were determined in table S1 (10%, S1A; and 37%, S1C), and the common arbitrary cutoff (20%, S1B) for CD20 expression	115
Figure 3.S2	Intracellular CXCR4 does not predicts survival of PDX mice	116

CHAPITRE IV – DISCUSSION

Figure 4.1.	Schématisation de la structure moléculaire des composés FC131 et FC313	128
-------------	--	-----

Liste des abréviations

7TMR :	Récepteur à sept domaines transmembranaires – « <i>Seven transmembrane receptor</i> »
α :	Alpha
ABC :	Anticorps liés aux cellules – « <i>Antibodies bound to cell</i> »
AMP :	Adénosine monophosphate
AMPC :	AMP cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
β :	Bêta
BRET :	Transfert d'énergie par résonance d'une bioluminescence – « <i>Bioluminescence resonance energy transfer</i> »
B-LAL :	Leucémie aigüe lymphoblastique précurseur des cellules B
CSH :	Cellule souche hématopoïétique
C-terminal :	carboxyl-terminal
EC ₅₀ :	Concentration effective médiane
ECL :	Boucle extracellulaire – « <i>Extracellular loop</i> »
ERK :	« <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> »
γ :	Gamma

FRET :	Transfert d'énergie par résonance d'une fluorescence – « <i>Fluorescent resonance energy transfer</i> »
GAPDH:	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GDP:	Guanosine diphosphate
GPCR:	Récepteur couplé aux protéines G – « <i>G-protein coupled receptor</i> »
GRK:	Kinases spécifiques aux 7TMRs – « <i>G-protein-coupled receptor kinase</i> »
GTP:	Guanosine triphosphate
HD :	Hyperdiploïdie
HIF-1:	Facteur induit par l'hypoxie 1 – « <i>hypoxia induced factor 1</i> »
HUVEC:	Lignée primaire provenant de veine de cordon ombilicale – « <i>Human umbilical vein endothelial cell</i> »
IC ₅₀ :	Concentration inhibitrice médiane
ICL:	Bouche intracellulaire – « <i>intracellular loop</i> »
IgH :	Chaîne lourde des immunoglobulines – « <i>Immunoglobulin heavy chain</i> »
LAL :	Leucémie aigüe lymphoblastique
LAM :	Leucémie aigüe myéloïde
MAP :	« <i>Mitogen-activated protein</i> »
MD :	Simulation de dynamique moléculaire
MFI :	Indice de fluorescence moyenne – « <i>Mean fluorescence index</i> »
MRD :	Maladie résiduelle – « <i>Minimal residual disease</i> »

- NOD : Souris non obèse diabétique – « *nonobese diabetic* »
- NSG : NOD/*scid-IL2R γ ^{-/-}* - « *nonobese diabetic severe combined immunodeficiency IL2 γ null* »
- N-terminal : amino-terminal
- PCR : Réactions de polymérase en chaînes
- PDX : xélogreffe de cellules malignes de patients dans des souris – « *Patient-derived xenograft mice* »
- qPCR : PCR quantitative
- ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène – « *Reactive oxygen species* »
- Scid* : Immunodéficience combinée grave – « *severe combined immunodeficiency* »
- SNC : Système nerveux central
- TBI : Irradiation corporelle totale - « *Total body irradiation* »
- TCR : Récepteur des cellules T – « *T-cell receptor* »
- TGF- β : « *Transforming growth factor beta* »
- TM : Passage transmembranaire
- TTL : Temps de développement de la leucémie - « *Time-to-leukaemia* »
- VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire – « *Vascular endothelial growth factor* »
- VIH : Virus d'immunodéficience humaine
- VS : Criblage virtuel – « *Virtual screening* »

WHIM : Verrue, hypogammaglobulinémie, immunodéficience et myélokathexie –
« *Warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency and myelokathexis* »

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Professeur Nikolaus Heveker de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fait confiance. Les nombreuses conversations en lien avec mon projet ou sur l'actualité scientifique m'ont inspiré dans mon développement intellectuel et personnel. Il a toujours su trouver les mots pour aller chercher le meilleur de moi-même.

Les travaux de cette thèse n'auraient pas été possibles sans l'apport de plusieurs collaborateurs : Stéphanie Gravel, Jérôme Cabana, Marilou Lefrançois, Shinya Oishi (et les membres du Labo du Dr Fujii), Geneviève St-Onge, François Fontaine, Kathie Béland, Ndongo Mohammed Sangare, Guillaume Sylvain, Geneviève Morin, Nour El Amine, Jean-Christophe Beltra, Cédric Mathieu, Christian Beauséjour, Simon Nicoletti, Aurélien Colamartino, Catherine Proulx et Marie-Ève Pelletier.

J'aimerais également accorder une mention spéciale à Sandy Lalonde, Dominika Kozubska et tous les membres de l'association étudiante avec qui j'ai eu l'occasion de travailler dont : Stéphanie Bilodeau, Joelle Grégoire-Béliveau, José-Mario Capochichi, Assila Belounis, Gaël Moquin-Beaudry, Valérie Orlando, Houda Tahiri, Martin Berryer, Sarah Kheil et William Lemieux.

Je veux également remercier tous les membres de laboratoire passés ou encore actifs pour les bons moments passés ensemble : Geneviève St-Onge la confidente et la coach de vie, Steph pour la science, les sorties ET pour les moments d'hyperactivités suivant un surplus de caféine (désolé Geneviève Morin), Marilou pour les découvertes musicales et de la culture underground de Montréal, David le culturiste, Julien le policier, Mathias l'énergique (pauvre Ryosuke), Guillaume le pince-sans-rire (le parfum, ça cache tout!), Simon l'énigmatique, Nassr le M.D. Ph.D. (on va jamais réussir à te battre Nassr) et François le psychiatre (essai toujours de battre Nassr). Grâce à vous, ce long parcours a paru passer en l'espace d'un clin d'œil.

Finalement, je ne tiens à remercier mes amis – Steph, Val, Guillaume, Louis, Mila, Charlie, Fred, Karl, Ian, Pierre, John, P-A, Éric – ma famille et tout particulièrement Catherine Proulx, ma conjointe et la mère de mon enfant, pour tout le support, spécialement durant la rédaction de ma thèse. Votre présence a fait toute la différence!

« Art is never finished, only abandoned »
-Leonardo Da Vinci-

Chapitre I – Introduction

1.1 Les chimiokines et leurs récepteurs

1.1.1 Les chimiokines

Les chimiokines sont des protéines chimioattractantes de la famille des cytokines ayant une masse variant entre 8 et 12 kDa. Chez l'humain, les chimiokines comprennent 53 membres et sont catégorisées en quatre classes selon le motif conservé de deux cystéines en amino-terminal (N-terminal) soit : CCL, CXCL, CX₃CL et XCL (Bachelier et al. 2014). La signalisation induite par les chimiokines découle de leur liaison à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TMR) appelés récepteurs de chimiokines. Il existe une promiscuité entre les chimiokines et leurs récepteurs où certaines chimiokines peuvent lier plusieurs récepteurs et certains récepteurs plusieurs chimiokines (voir figure 1.1).

1.1.2 Les récepteurs de chimiokines

Les récepteurs de chimiokines font tous partie de la grande famille des récepteurs à 7TMR. Ces derniers agissent à titre d'intermédiaire afin de transmettre une signature chimique extracellulaire en signalisation intracellulaire. Les 7TMRs sont constitués d'une région N-terminale extracellulaire, d'une partie carboxy-terminale (C-terminal) intracellulaire et de sept hélices alpha transmembranaires (TM1 à TM7) reliées entre elles par trois boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3) et trois boucles extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3). Dans la membrane cellulaire, les TM1 et TM7 interagissent de sorte qu'une cavité, appelée pochette de liaison, se crée au centre du récepteur. La pochette de liaison est séparée en deux sections soit la pochette de liaison majeure, située au centre des TM3 à TM7, et la pochette de liaison mineure, se trouvant au centre des TM1, 2, 3 et 7. Les parties extracellulaires (ECL et N-terminal) et les pochettes de liaison du récepteur forment le domaine d'interaction avec les ligands. En intracellulaire, les ICLs et le C-terminal sont

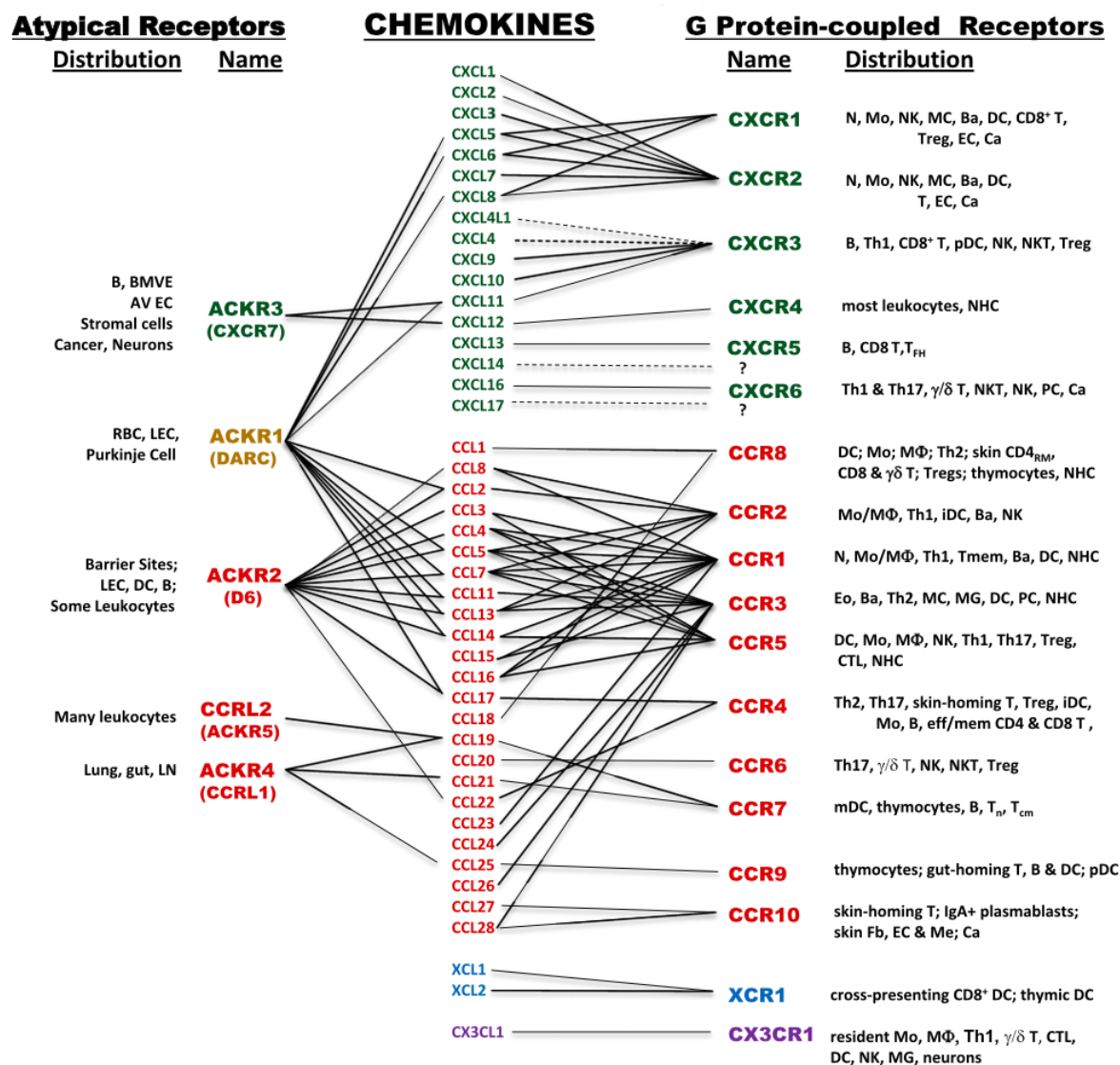


Figure 1.1 : Schématisation de la promiscuité des chimiokines et de leurs récepteurs. À gauche se trouvent les récepteurs atypiques, à droite les récepteurs typiques et au centre les chimiokines. Les traits indiquent les couples récepteurs-ligands caractérisés jusqu'à présent. (tiré de (Bachelierie et al. 2014) avec la permission de l'ASPET, © 2014)

impliqués dans l'interaction avec le complexe signalétique des protéines G hétérotrimériques et avec la β -arrestine. C'est par ces interactions avec des protéines intracellulaires que les 7TMRs transmettent la signalisation induite par les ligands.

Les récepteurs de chimiokines sont scindés en deux groupes distincts soit : les récepteurs typiques et les récepteurs atypiques (Bachelerie et al. 2014). La détermination du groupe auquel appartient un récepteur dépend de la voie de signalisation privilégiée par ce récepteur suite à la liaison du ligand.

Ainsi, les récepteurs de chimiokines typiques signalisent préférentiellement via les protéines G hétérotrimériques (Bachelerie et al. 2014). C'est la signalisation induite par ces protéines qui promeut la réponse migratoire des cellules. Les récepteurs de chimiokines typiques sont nommés en fonction de la sous-classe de chimiokine qu'ils lient, suivi de la lettre « R » soit : CCR, CXCR, CX₃CR et XCR.

De leur côté, les récepteurs de chimiokines atypiques, tous nommés ACKR (pour « *atypical chemokine receptor* »), se démarquent des récepteurs typiques en ne signalisant pas par le biais des protéines G. Ainsi, leur liaison à leur ligand ne promeut pas une réponse chimiotactique. Cela dit, certains d'entre eux participent au processus migratoire en promouvant la dégradation des chimiokines via une signalisation dépendante de la β -arrestine. Cette régulation des chimiokines en circulation participe à la formation d'un gradient de chimiokines nécessaire à l'orientation cellulaire durant la chimiotaxie.

1.1.3 La signalisation des récepteurs de chimiokines

La liaison d'une chimiokine à son récepteur induit une signalisation complexe menant à une variété de réponses cellulaires. Les différentes voies de signalisation activées par les chimiokines sont en grande partie relayées par le biais des protéines G hétérotrimériques et par la β -arrestine. Dans cette section, nous introduirons de manière générale ces deux partenaires des 7TMR. Ces dernières seront abordées de

nouveau de manière plus spécifique dans les sections introduisant les récepteurs à l'étude dans cette thèse.

1.1.3.1 Les protéines G hétérotrimériques

Sous leur forme inactive, les protéines G hétérotrimériques interagissent constitutivement avec certains 7TMRs, dont les récepteurs de chimiokines typiques, afin de former un complexe de signalisation appelé GPCR (récepteur couplé aux protéines G) (Nobles et al. 2005; Galés et al. 2006; Ayoub et al. 2007; Quoyer et al. 2013). Formées des sous-unités alpha (α), bêta (β) et gamma (γ), les protéines G hétérotrimériques comportent deux unités de signalisation fonctionnelles soit : la sous-unité α et le complexe $\beta\gamma$ (McCudden et al. 2005). La sous unité α est pourvue d'une activité GTPase permettant l'hydrolyse d'un GTP (guanosine triphosphate) en GDP (guanosine diphosphate). À noter que sous sa forme inactive, la sous-unité α reste liée au GDP.

La transmission du signal externe vers les protéines G se fait par le biais d'un changement conformationnel du récepteur découlant de la liaison ligand-récepteur. Ce dernier engendre à son tour une modification structurale de la sous-unité α lui permettant ainsi d'échanger son GDP pour un GTP (Chung et al. 2011). Une fois lié au GTP, le complexe protéines G-récepteur se sépare, puis la sous-unité α se détache du complexe $\beta\gamma$. Les deux unités de signalisation étant maintenant actives, différentes voies de signalisation sont stimulées (McCudden et al. 2005). Le couple récepteur-ligand étant toujours actif, plusieurs vagues de protéines G peuvent être activées avant la désensibilisation du récepteur par la β -arrestine.

1.1.3.2 La bêta-arrestine

Suite à la liaison du ligand au récepteur, des kinases spécifiques aux 7TMRs (GRK; « *G-protein-coupled receptor kinase* ») sont recrutées au récepteur et viennent phosphoryler ce dernier en C-terminal. Cette phosphorylation provoque une augmentation de l'affinité des récepteurs pour des protéines d'échafaudages

nommées les arrestines (Reiter & Lefkowitz 2006). On dénombre quatre arrestines (1 à 4) différentes. Les arrestines 1 et 4 étant principalement exprimées dans la rétine, les arrestines auxquelles nous ferons référence dans cette thèse sont les arrestines 2 et 3 (également appelées β -arrestines 1 et 2) qui elles, sont exprimées de manière ubiquitaire.

Une fois recrutées au récepteur, les β -arrestines sont impliquées dans différents processus cellulaires. D'une part, elles désensibilisent les récepteurs des protéines G par compétition stérique (Benovic et al. 1987; Lohse et al. 1990). De plus, les β -arrestines participent au transport intracellulaire des récepteurs en contrôlant la rétention de ces derniers dans les endosomes (Khoury et al. 2014; DeWire et al. 2007). Également, une des fonctions d'importance des β -arrestines est leur capacité à interagir avec différentes enzymes signalétiques (Luttrell et al. 1999; Shenoy et al. 2006). Jusqu'alors associées à la terminaison de la signalisation, les β -arrestines sont maintenant connues pour engendrer une signalisation G-indépendante. Chez les récepteurs de chimiokines, si ce type de signalisation est présent pour les récepteurs typiques, il constitue également le seul relais de signalisation pour les récepteurs atypiques (Kalatskaya et al. 2009).

1.1.4 La réponse chimiotactique

Le système signalétique chimiokines-récepteurs contrôle une forme de migration dirigée des cellules que l'on appelle chimiotaxie. Chez les vertébrés, la chimiotaxie est responsable de différents processus biologiques et pathologiques, dont l'embryogenèse, la réponse immunitaire, l'inflammation, la cicatrisation, l'hématopoïèse, les maladies auto-immunes et la dissémination métastatique (Cai & Devreotes 2011; Roussos et al. 2011). Pour se produire, cette réponse complexe nécessite l'action concertée de trois processus cellulaires interreliés soit : la détection du gradient, la polarisation et la motilité (Iglesias & Devreotes 2008; Shi et al. 2013).

La détection du gradient fait référence à la capacité de la cellule à interpréter la présence d'un gradient de chimiokines extracellulaires afin d'orienter la cellule dans

la direction où la concentration de chimiokines est la plus élevée (Iglesias & Devreotes 2008). Le processus repose sur le taux d'occupation des récepteurs autour de la cellule qui est nécessairement plus élevé du côté où la concentration de chimiokines est la plus élevée. La différence d'occupation des récepteurs autour de la cellule crée une asymétrie de la réponse signalétique à l'intérieur de la cellule. En effet, la signalisation sera plus importante du côté où il y a plus de chimiokines provoquant ainsi la polarisation de la cellule (Iglesias & Devreotes 2008). À l'avant de la cellule, l'activité signalétique importante engendre la polymérisation d'actine menant à l'élongation de pseudopodes en direction de la concentration plus élevée de chimiokines. À l'arrière, la signalisation moins soutenue provoque quant à elle la contraction des fibres de myosine. L'effet combiné de l'avant et de l'arrière de la cellule est responsable de la motilité cellulaire.

1.2 CXCL12 et ses récepteurs

CXCL12 (également appelé « *stromal cell-derived factor 1* » ou SDF-1) est une chimiokine non inflammatoire exprimée et sécrétée constitutivement par les cellules stromales de la moelle osseuse et par d'autres tissus, dont le cœur, le foie, la rate et les poumons (Yu et al. 2006). Elle agit à titre de ligand pour deux récepteurs de chimiokines, soit CXCR4 et ACKR3. L'intérêt pour l'étude de l'axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 émane de sa participation dans différents processus biologiques clés, tels que la cardiogenèse, la neurogenèse, l'angiogenèse, la cardioprotection et l'hématopoïèse (Zou et al. 1998; Sierro et al. 2007; Hu et al. 2007). On lui reconnaît également un rôle pathologique notamment dans l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH), le syndrome WHIM (verrues, hypogammaglobulinémie, immunodéficience et myélokathexie) et dans la dissémination métastatique (Feng et al. 1996; Muller et al. 2001; Hernandez et al. 2003). Étant donné l'orientation de cette thèse, les prochaines sections détailleront l'implication de CXCL12 et de ses récepteurs dans l'hématopoïèse et dans la

dissémination métastatique. Mais avant d'aborder ces sujets, il convient d'introduire les récepteurs de CXCL12.

1.2.1 Le récepteur CXCR4

CXCR4 est un récepteur de chimiokine ayant pour seul ligand naturel CXCL12. Pendant près de dix ans, il fut également considéré comme étant l'unique récepteur de CXCL12, une information qui fut révisée suite à la découverte que ce dernier liait également un récepteur jusqu'alors orphelin aujourd'hui appelé ACKR3 ou CXCR7 (introduit dans la section suivante) (Balabanian et al. 2005; Burns et al. 2006). Néanmoins, CXCR4 est, à ce jour, le seul récepteur de chimiokine typique connu de CXCL12, donc doué d'une signalisation menant à une réponse migratoire. CXCR4 agit également comme l'un des corécepteurs impliqués dans l'entrée du tropisme T du VIH (Berger et al. 1999). Dans cette section, il sera question d'introduire le patron d'expression de ce récepteur et sa signalisation.

1.2.1.1 L'expression du récepteur CXCR4

Au niveau physiologique, CXCR4 est exprimé à la surface d'une grande diversité de types cellulaires découlant principalement, mais pas exclusivement, des lignées hématopoïétiques. Dans les lignées myéloïdes, CXCR4 est exprimé à la surface des cellules progénitrices myéloïdes ainsi que des monocytes, des neutrophiles, des macrophages et des cellules dendritiques (Bleul et al. 1997; Zaitseva et al. 1997; Di Marzio et al. 1998; Kim et al. 2006). Dans les lignées lymphoïdes, on le retrouve à la surface des cellules progénitrices des lymphocytes B et T, de tous les précurseurs des cellules B, des précurseurs précoces des cellules T et à la surface des cellules B et T matures (Bleul et al. 1997; Aiuti, Tavian, et al. 1999). CXCR4 est également exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Aiuti, Turchetto, et al. 1999). Si son expression semble ubiquitaire dans les cellules hématopoïétiques, il a été montré que le profil d'expression de CXCR4 est sujet à des variations selon le stade de développement de certaines de ces lignées. C'est notamment le cas lors de la maturation des cellules T et des macrophages (Di Marzio et al. 1998; Aiuti, Tavian,

et al. 1999). Cette variation d'expression joue un rôle dans la localisation des cellules dans l'organisme, mais également dans le positionnement des cellules à l'intérieur d'un tissu. Nous approfondirons ce sujet lorsque nous aborderons le rôle de CXCL12 dans l'hématopoïèse.

Au niveau pathologique, il a été montré que l'expression de CXCR4 est augmentée dans plusieurs types de cancers solides et hématologiques dont, entre autres les leucémies aigües lymphoblastiques précurseurs des cellules B (B-LAL) (Taichman et al. 2002; Zeelenberg et al. 2003; Phillips et al. 2003; Retz et al. 2005; Andre et al. 2006; Pan et al. 2006; Kajiyama et al. 2008; Scala et al. 2005; Jiang et al. 2006; Koishi et al. 2006; Spoo et al. 2007; D'Alterio et al. 2010; Konoplev et al. 2011; Wang et al. 2012; He et al. 2013; D'Alterio et al. 2014; van den Berk et al. 2014; Sterlacci et al. 2016; Matsuo et al. 2016). Nous verrons dans une section subséquente quelles sont les implications d'une telle dérégulation de CXCR4 dans la progression tumorale et leucémique.

1.2.1.2 La signalisation de CXCR4

Étant un récepteur de chimiokine typique, la liaison de CXCL12 à CXCR4 permet l'activation d'une cascade de signalisation complexe, dépendante des protéines G hétérotrimériques. Pour CXCR4, l'isoforme privilégié de la sous-unité $G\alpha$ est la $G\alpha_i$ (Di Salvo et al. 2000). Cette dernière est reconnue pour inhiber l'adénylate cyclase, diminuant ainsi la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). La $G\alpha_i$ active également les tyrosines kinases de type Src, qui activent à leur tour la phosphorylation des MAP kinase ERK 1 et 2. De son côté, la sous-unité $G\beta\gamma$ stimule différents effecteurs menant ultimement à la réponse chimiotactique et à l'adhésion cellulaire via l'activation des intégrines, une classe de protéines membranaires spécialisées dans le contact cellule-cellule (Shen et al. 2001; Hidalgo et al. 2001). La signalisation G-dépendante est souvent évaluée par la mesure du flux calcique intracellulaire, un évènement reflétant à la fois l'activité de la sous-unité $G\alpha$ que du complexe $G\beta\gamma$ (Park et al. 1993; Hatse et al. 2002; Hernandez et al. 2003; Levoye et al. 2009; Wescott et al. 2016).

Outre sa signalisation par les protéines G, la liaison de CXCL12 sur CXCR4 provoque également la phosphorylation du récepteur par des GRKs menant à une modulation de la signalisation par le biais des β -arrestines 1 et 2 (Busillo et al. 2010). Initialement décrites comme des protéines inhibitrices de la signalisation G-dépendante, il a été montré que la β -arrestine 2 participerait à la réponse migratoire en activant des effecteurs communs à la voie des protéines G (Sun et al. 2002; Busillo et al. 2010). Parallèlement à ce processus de modulation signalétique, CXCR4 est endocyté et trié dans les compartiments intracellulaires. La majeure partie des récepteurs CXCR4 seront ubiquitinés et acheminés au lysosome où ils seront dégradés (Tarasova et al. 1998; Marchese & Benovic 2001).

1.2.2 Le récepteur de chimiokine ACKR3

En 2005/2006, un récepteur orphelin, le RDC-1, est identifié comme étant le récepteur des chimiokines CXCL11 (qui ne sera pas abordée dans cette thèse) et CXCL12 (Balabanian et al. 2005; Burns et al. 2006). Dès lors renommé CXCR7, la nomenclature de ce 7TMR a récemment été revue étant donné sa signalisation atypique indépendante des protéines G-hétérotrimériques. Maintenant connu sous le nom d'ACKR3, ce récepteur signalisant principalement par le biais des β -arrestines est incapable d'induire une réponse chimiotactique (Bachelerie et al. 2014). Néanmoins, tel que nous le verrons dans les sections subséquentes, ses activités cellulaires n'en sont pas moins importantes dans l'orientation des cellules qui migrent de manière CXCR4-CXCL12 dépendante. Dans cette section, le patron d'expression du récepteur sera d'abord présenté suivi de sa signalisation.

1.2.2.1 Le patron d'expression d'ACKR3

Chez la souris, ACKR3 est fortement exprimé au niveau embryonnaire (Burns et al. 2006). Son expression faiblit par la suite, mais est tout de même retrouvée dans différents tissus, dont le cœur, les poumons et les cellules endothéliales (Burns et al. 2006; Sierro et al. 2007; Berahovich et al. 2014). Si son expression dans les tissus est bien documentée et acceptée, des données conflictuelles de l'expression

d'ACKR3 dans les cellules hématopoïétiques primaires ont alimenté un débat. Alors que plusieurs groupes ont montré qu'ACKR3 est exprimé par les monocytes, les basophiles, les cellules dendritiques, les cellules NK, dans certains sous-types de cellules T, dans les cellules B et dans les CSH CD34⁺ (Balabanian et al. 2005; Infantino et al. 2006; Sierrro et al. 2007; Hartmann et al. 2008), Berahovich et al ont présenté des résultats indiquant plutôt qu'ACKR3 est absent des cellules hématopoïétiques (Berahovich et al. 2010). Ils font une critique sévère des résultats publiés jusqu'alors. En 2012, le laboratoire du Dr Thelen revient sur le débat en testant un panel d'anti-ACKR3 sur des lymphocytes B humains primaires et confirme la validité des anticorps en effectuant un essai de spectrométrie de masse suite à une immunoprécipitation (Humpert et al. 2012). Néanmoins, cette discordance dans les résultats d'expression d'ACKR3 dans les cellules hématopoïétiques appelle à la prudence quant à l'interprétation des résultats publiés.

Outre sa signalisation, la localisation cellulaire d'ACKR3 est également atypique. En effet, en absence de ligand, ACKR3 est majoritairement exprimé dans des endosomes précoces se trouvant sous la membrane plasmique ce qui en fait ainsi un récepteur intracellulaire (Hartmann et al. 2008). Pour répondre aux signaux externes et lier ses ligands, il a été montré que ce dernier cycle en continu entre ces endosomes et la surface cellulaire (Naumann et al. 2010; Canals et al. 2012). Ce trafic intracellulaire constitutif (en absence de ligands) n'est pas unique à ACKR3 chez les récepteurs de chimiokines. Effectivement, il a été montré que le récepteur atypique ACKR2 (aussi connu sous le nom de D6), fait de même (Weber et al. 2004).

L'expression d'ACKR3 est augmentée dans plusieurs types de cancers. C'est notamment le cas des carcinomes hépatocellulaires et rénaux, des cancers de la prostate, du côlon, des poumons, de la vésicule biliaire, du sein ainsi que des glioblastomes (Madden et al. 2004; Miao et al. 2007; Maishi et al. 2012; Yamada et al. 2015; Hattermann et al. 2010; D'Alterio et al. 2010; Zheng et al. 2010; Yao et al. 2011; Neve Polimeno et al. 2014). Dans les cancers hématologiques, l'expression de

son ARNm a été rapportée comme étant élevée dans les leucémies aigües myéloïdes (LAM) et dans les LAL de type B et T (Melo et al. 2014; Maiga et al. 2016).

1.2.2.2 Rôles et signalisation d'ACKR3

L'expression d'ACKR3 est associée à divers processus cellulaires. Tout comme ACKR2, ACKR3 a la capacité d'internaliser et d'amener ses ligands dans des compartiments de dégradation cellulaire (Weber et al. 2004; Boldajipour et al. 2008; Naumann et al. 2010; Benredjem et al. 2016). Quoiqu'indirecte, cette fonction agit sur l'efficacité de la chimiotaxie en modulant les gradients de CXCL12 présent dans le milieu guidant ainsi la migration CXCR4-dépendante (voir figure 1.2) (Boldajipour et al. 2008). De plus, il a été montré dans un essai *in vitro* utilisant la lignée NC-37 (lignée maligne de lymphome de Burkitt) que la migration transendothéliale est potentialisée par la stimulation d'ACKR3 avec CXCL12 (Zabel et al. 2011). Ainsi, ACKR3 serait un facteur dans l'orientation de la migration et dans la mobilisation cellulaire.

Outre son action sur la chimiotaxie CXCR4-dépendante, la surexpression d'ACKR3 confère aux cellules l'exprimant une meilleure survie dans les lignées tumorales MDA MB435S (cancer du sein), A764 et 25/07 (glioblastome) lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu contenant une concentration de sérum sous-optimale (Burns et al. 2006; Hattermann et al. 2010). Également, dans des essais sur la lignée SMMC-7721 (carcinome hépatocellulaire), la stimulation d'ACKR3 par CXCL12 induit la sécrétion de VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) et la formation de structures tubulaires par des cellules HUVEC, une lignée endothéliale primaire provenant de veine de cordon ombilical (Zheng et al. 2010). Ainsi, ces résultats *in vitro* reflètent la capacité d'ACKR3 à promouvoir un effet pro-survie/anti-apoptotique et proangiogénèse.

Il n'y a que très peu d'information concernant les voies de signalisation impliquées lors de l'activation d'ACKR3 menant à ces différents phénomènes. Suite à la liaison de CXCL12 sur ACKR3, il y a recrutement des β -arrestines sur le récepteur suivi

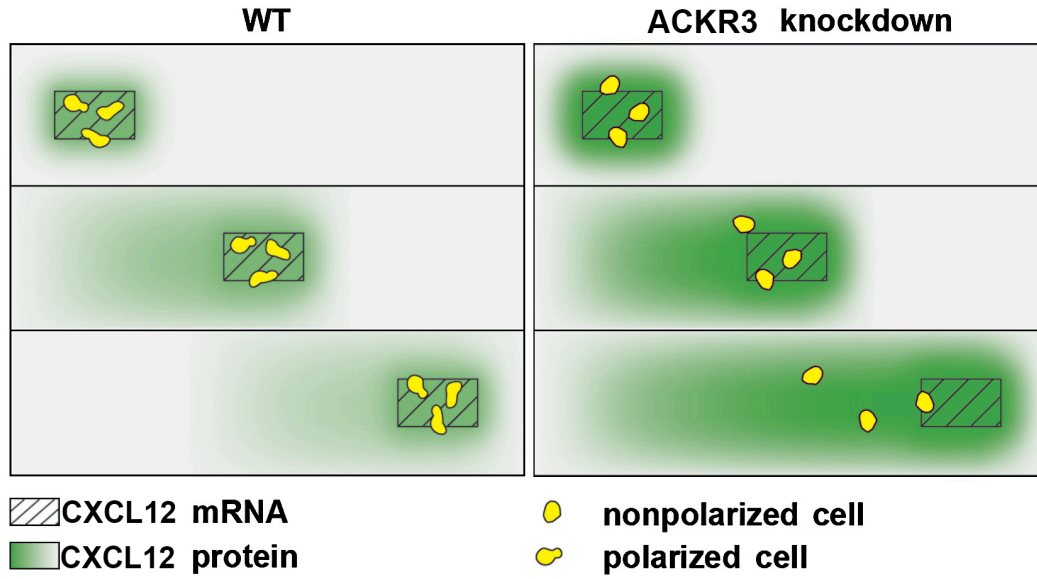


Figure 1.2 : Schématisation du rôle d'ACKR3 dans la migration cellulaire CXCR4-dépendante. Le modèle présente trois temps différents où l'expression de CXCL12 est décalée à droite pour chaque temps. La zone hachurée représente les cellules exprimant CXCL12 et le vert la diffusion de la protéine. En absence d'ACKR3, le gradient de CXCL12 n'est pas formé adéquatement et la chimiotaxie est moins efficace que pour les cellules l'exprimant (*adapté de (Boldajipour et al. 2008) avec la permission d'Elsevier, © 2008, License # 4138980398135*)

d'une signalisation menant à la phosphorylation de la MAP kinase ERK 1/2 et de AKT (Hartmann et al. 2008; Kalatskaya et al. 2009; Luker, Gupta, Steele, et al. 2009; Rajagopal et al. 2010; Gravel et al. 2010). À ce jour, le recrutement des β -arrestines constitue l'un des tests les plus répandus par les laboratoires du domaine pour évaluer l'activation d'ACKR3 (Kalatskaya et al. 2009; Luker, Gupta & Luker 2009; Zabel et al. 2009; Luker et al. 2010; Décaillot et al. 2011; Canals et al. 2012; Drury et al. 2011).

1.2.3 L'oligomérisation des récepteurs CXCR4 et ACKR3

Il a longtemps été assumé que les 7TMRs étaient exprimés et fonctionnaient en tant qu'entités monomériques. Cependant, un grand nombre d'études utilisant des expériences de co-immunoprécipitation, de transfert d'énergie par résonance d'une

bioluminescence (BRET) ou de fluorescence (FRET) ont montré que les 7TMRs existent sous forme de dimères ou même d'oligomères (Angers et al. 2002). C'est notamment le cas des récepteurs CXCR4 et ACKR3, où il a été montré qu'ils avaient la capacité d'homodimériser en absence de ligands (Babcock et al. 2003; Percherancier et al. 2005; Kalatskaya et al. 2009). Pour CXCR4, l'homodimère fut également observé lors de la résolution de sa structure par cristallographie (Wu et al. 2010). En effet, les cinq cristaux analysés du récepteur dans cette étude étaient organisés sous forme de dimères.

Outre les homodimères, les 7TMRs peuvent également s'hétérodimériser. D'ailleurs, deux groupes indépendants ont montré que CXCR4 et ACKR3 hétérodimérisent lorsqu'ils sont co-transfectés dans des cellules HEK293, CHO, Neuro2A et MDA-MB-231 (Levoye et al. 2009; Décaillot et al. 2011). Dans ces études, les auteurs suggèrent que l'hétérodimérisation d'ACKR3 et de CXCR4 module négativement la signalisation G-dépendante de CXCR4. En effet, les résultats de BRET présentés dans l'article de Levoye et al montrent que la présence d'ACKR3 modifie la nature de l'interaction de CXCR4 avec la sous-unité $G\alpha$, ce qui interfère avec le transfert du GDP pour le GTP de cette sous-unité (Levoye et al. 2009). De manière complémentaire, le groupe de Décaillot ajoute que l'hétérodimère recrute constitutivement la β -arrestine 2, ce qui pourrait expliquer les difficultés des protéines G à transduire un signal (Décaillot et al. 2011). Lorsque stimulé par CXCL12, l'hétérodimère CXCR4-ACKR3 induit une signalisation β -arrestine-dépendante qui est différente de la signalisation par les β -arrestines des récepteurs seuls (voir figure 1.3).

Dans les cellules primaires, il a été montré que les récepteurs CXCR4 et ACKR3 ne se trouvent pas dans le même compartiment cellulaire (Hartmann et al. 2008; Torossian et al. 2014). Même si Torossian et al ont montré une colocalisation partielle d'ACKR3 et de CXCR4, l'impact de ce type de colocalisation sur la signalisation qui en découle n'est pas clair.

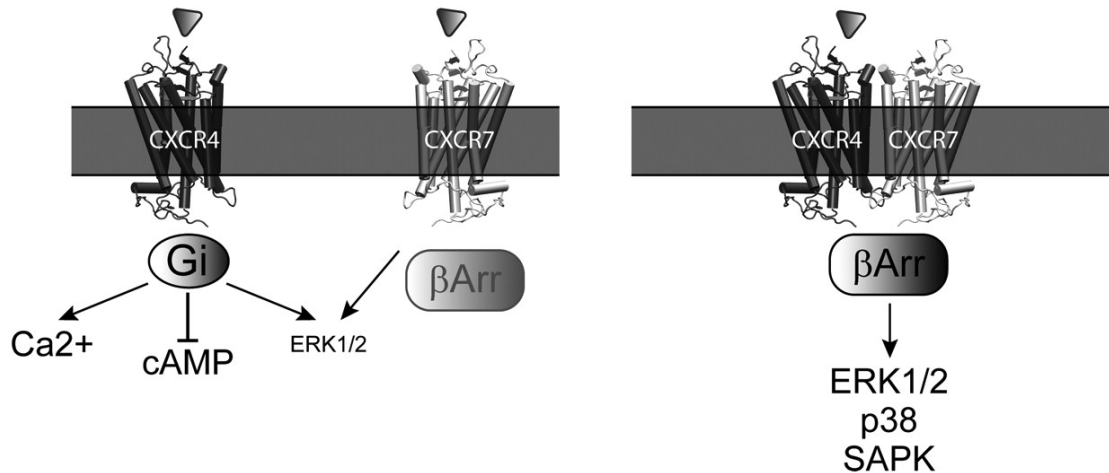


Figure 1.3 : Schématisation de la signalisation des récepteurs CXCR4 et ACKR3 (CXCR7). Lorsque CXCR4 et ACKR3 sont exprimés seuls (gauche), la liaison de CXCL12 sur ces récepteurs provoque une signalisation dépendante de la G_{αi} pour CXCR4 ou dépendante de la β-arrestine pour ACKR3. Lorsque co-exprimés (droite), la liaison de CXCL12 au dimère CXCR4-ACKR3 active une signalisation dépendante de la β-arrestine différente de celle observée avec ACKR3 seul (*adapté de (Décaillot et al. 2011)*)

1.2.4 CXCL12 et l'hématopoïèse

La fonction physiologique de CXCL12 la mieux documentée est son rôle dans l'hématopoïèse. Lorsqu'il est génétiquement invalidé chez la souris, on observe une diminution des progéniteurs des cellules B et des progéniteurs des cellules myéloïdes (Nagasawa et al. 1996). Ce n'est que quelques années plus tard qu'on décrira sa fonction chimioattractante pour la majorité des cellules hématopoïétiques dont notamment les CSH (D'Apuzzo et al. 1997; Aiuti et al. 1997; Bleul et al. 1998; Hamada et al. 1998; Peled et al. 1999; Wright et al. 2002). Plus récemment, il a été montré que l'activité migratoire induite par CXCL12 contrôle la localisation et la rétention des CSH dans des niches spécialisées de la moelle osseuse. (Sugiyama et al. 2006; Ding & Morrison 2013). Dans les prochaines sous-sections, les CSH et les niches de la moelle osseuse seront introduites afin de bien comprendre l'effet de la relation niche-résidente retrouvée dans ce milieu.

1.2.4.1 CXCL12 et les cellules souches hématopoïétiques

Les CSH sont des cellules souches somatiques multipotentes ayant la capacité de se différencier en tous les sous-types de cellules sanguines. Étant à l'origine de toutes des cellules hématopoïétiques, elles sont responsables du maintien du nombre de cellules appartenant autant aux lignées myéloïdes que lymphoïdes tout au long de la vie de l'organisme (Wilson & Trumpp 2006). Pour garantir leur fonction à long terme, l'état des CSH doit être finement régulé pour assurer leur autorenouvellement et ainsi prévenir leur épuisement. Cette régulation se fait par les facteurs d'un microenvironnement qui induisent un état de quiescence (phase G₀ du cycle cellulaire) pour environ 75% des CSH (Cheshier et al. 1999; Cheng et al. 2000; Arai et al. 2004). Cet état de quiescence prolongé, appelé « dormance » par certains auteurs, est primordial pour assurer la repopulation des cellules sanguines à long terme.

Pour avoir accès à ce microenvironnement, la localisation spatiale à l'intérieur des os est primordiale et CXCL12 joue un rôle clé dans ce processus. En effet, une délétion conditionnelle de CXCL12 ou de CXCR4 dans la souris mène à la mobilisation des CSH dans la circulation sanguine, à une prolifération accrue de ces dernières, et à leur épuisement (Sugiyama et al. 2006; Nie et al. 2008; Tzeng et al. 2011). Inversement, il a été montré chez la souris qu'une mutation empêchant la désensibilisation de CXCR4 prévient la différenciation des cellules lymphoïdes (Freitas et al. 2017). Ces observations supportent l'idée qu'en promouvant la domiciliation et la rétention des CSH dans des niches spécialisées de la moelle osseuse, le couple CXCL12-CXCR4 joue un rôle clé dans la quiescence des CSH.

1.2.4.2 CXCL12 et les niches de la moelle osseuse

Une niche est définie comme une région à l'intérieur d'un tissu qui maintient et régule directement par son microenvironnement un type de cellule souche, ou de cellule progénitrice (Morrison & Spradling 2008). Les niches de la moelle osseuse sont des

régions spécialisées des os régulant l'état et la fonction des CSH et de ses progéniteurs. À cause de la complexité anatomique de l'os, la niche où résident les CSH quiescentes (appelées CSH à long terme) fut longtemps sujette à débat. Récemment, les avancées réalisées en microscopie ont permis l'acquisition d'image tridimensionnelle d'os de souris, et ce, sans affecter leur structure anatomique (Kunisaki et al. 2013). Cette technologie a permis l'identification et la définition de trois niches distinctes, soit : la niche artérielle, la niche ostéovasculaire – ces deux niches pouvant être regroupées sous l'appellation de niches artériolaires – et la niche sinusoïdale (voir figure 1.4) (Kunisaki et al. 2013; Itkin et al. 2016). Dans ce modèle, les niches artériolaires seraient responsables de la maintenance des CSH alors que la mobilisation et la différenciation se produiraient dans la niche sinusoïdale.

Dans les niches artériolaires, les artères et les artérioles sont en contact entre autres avec des péricytes, des cellules stromales et des cellules réticulaires, toutes reconnues pour exprimer CXCL12 (Greenbaum et al. 2013; Kunisaki et al. 2013; Itkin et al. 2016). Outre ces cellules, les artères/artérioles de la moelle osseuse sont parcourues d'un réseau de nerfs sympathiques (Katayama et al. 2006). Ce sont ces dernières qui régulent l'expression de CXCL12 par les différentes lignées présentes et donc la rétention des CSH au sein des niches artériolaires. Chez la souris, il est intéressant de constater que le réseau nerveux sympathique de la moelle osseuse régule l'expression de CXCL12 selon un cycle circadien permettant ainsi au CSH de se mobiliser et se différencier durant la nuit (Méndez-Ferrer et al. 2008).

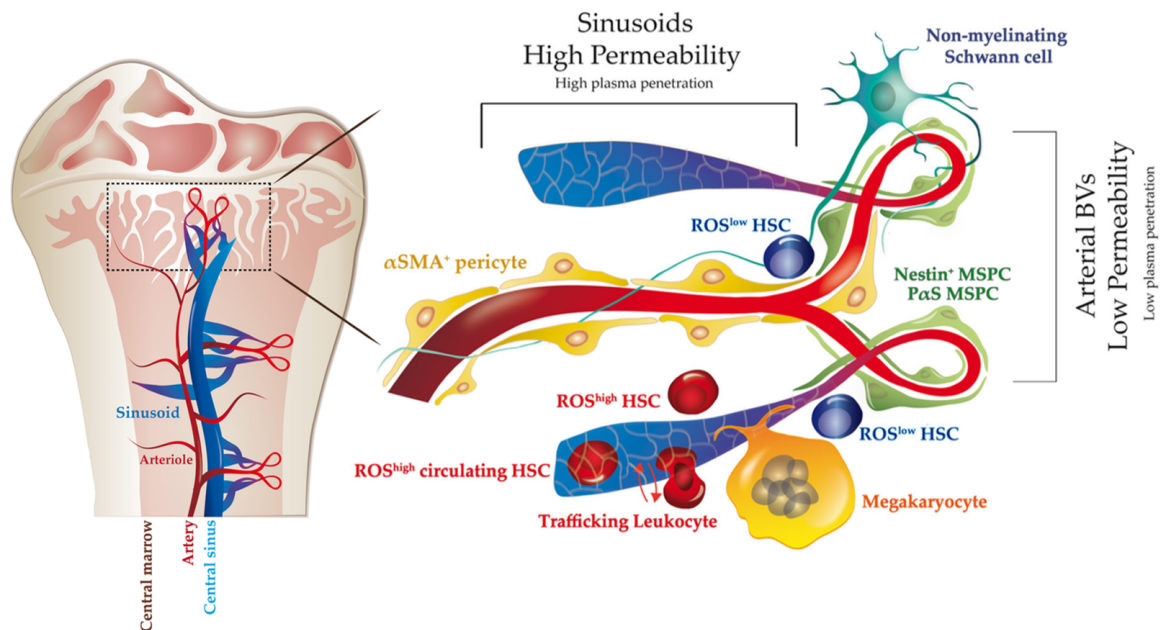


Figure 1.4 : Schématisation des différentes niches de la moelle osseuse. Les CSH quiescentes se trouvent dans les niches artériolaires en marge des péricytes et des cellules stromales (MSPC) alors que les CSH en division se trouvent près des veines sinusoidales (*adapté de (Itkin et al. 2016) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature, © 2016, licence 4138991472954*).

En plus de CXCL12, l'état de quiescence des CSH est régulé par plusieurs autres facteurs présents dans le microenvironnement des niches artériolaires. Parmi ceux-ci, il a récemment été montré qu'il y avait présence de cellules de Schwann non myélinisées et que ces dernières ont la capacité d'activer la cytokine TGF- β (« *transforming growth factor beta* ») (Yamazaki et al. 2011). Cette dernière, à la manière de CXCL12, participe à l'induction de la quiescence des CSH. Un autre groupe de facteurs dignes de mention sont les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Comme les artères sont moins perméables aux échanges fluidiques avec le sang que les veines sinusoidales, les régions en périphérie des artères sont des zones hypoxiques où les cellules résidentes sont moins exposées aux ROS (Itkin et al. 2016). Il a été montré que l'expression de CXCR4 est régulée par le facteur de transcription HIF-1 (« *Hypoxia induced factor* ») qui lui est surexprimé dans les milieux hypoxiques (Schioppa et al. 2003). Ainsi, le milieu hypoxique des zones

périartérielles provoquerait une surexpression de CXCR4 ce qui participerait à la rétention des cellules dans les niches artériolaires contribuant également à maintenir la quiescence des CSH (Ito et al. 2006; Miyamoto et al. 2007; Tesio et al. 2011; Golan et al. 2012).

1.2.5 CXCL12 et la dissémination métastatique

Grâce à un effort concerté de la communauté scientifique et des cliniciens, le traitement des cancers a beaucoup évolué au cours des dernières années. Malgré toute l'attention portée sur le sujet, la dissémination métastatique est encore aujourd'hui la cause principale des décès dus aux cancers. Le concept de métastase – défini comme étant la dispersion de cellules tumorales primaires vers d'autres organes – fut décrit pour la première fois par le chirurgien Stephan Paget en 1889 (Paget 1889). Après l'autopsie de plus de 900 patients morts de différents types de cancer, il a rapporté que la dissémination ne se faisait pas de manière aléatoire, mais respectait plutôt un patron bien précis. Il a rapporté que certaines cellules tumorales (« *seed* ») avaient une préférence pour certains organes (« *soil* »), un concept qu'il appela « *seed & soil* ». Il faudra attendre au début des années 2000 pour avoir une explication moléculaire au phénomène.

En effet, dans leurs travaux, Müller et al ont validé le concept du Dr Paget en montrant que la dissémination des cellules de cancer du sein est dépendante du niveau d'expression de CXCR4 – surexprimé chez les patients sélectionnés – et se produisait généralement dans les organes ayant une forte expression de la chimiokine CXCL12 (voir figure 1.5.) (Muller et al. 2001). Depuis, de nombreuses publications ont rapporté cette association entre la surexpression de CXCR4 et la dissémination métastatique pour différents types de tumeurs solides (Taichman et al. 2002; Zeelenberg et al. 2003; Phillips et al. 2003; Retz et al. 2005; Andre et al. 2006; Pan et al. 2006; Kajiyama et al. 2008).

L'une des problématiques liées à la dissémination métastatique provient de l'endroit où les cellules malignes adhéreront. CXCL12 étant notamment exprimé et sécrété

par les niches de la moelle osseuse, un concept généralement accepté stipule que les cellules cancéreuses surexprimant CXCR4 aient la capacité de migrer spécifiquement vers ces niches. Véritable sanctuaire pour les CSH, le microenvironnement de ces niches agit sans discrimination sur toutes les cellules y résidant. Ainsi, les cellules cancéreuses entrent dans l'état de quiescence cellulaire maintenu par les facteurs du microenvironnement. Classiquement, les agents chimiothérapeutiques utilisés pour traiter les différents types de cancers visent une caractéristique intrinsèque des cellules malignes, soit leur division rapide. Donc, en promouvant la quiescence des cellules résidentes, la relocalisation des cellules cancéreuses dans les niches de la moelle osseuse les protège du traitement chimiothérapeutique. Plusieurs études épidémiologiques ont investigué ce phénomène de chimiorésistance et ont rapporté une association significative entre une expression élevée du récepteur CXCR4 et le mauvais pronostic des patients souffrant de divers types de cancer solides et hématologiques (Scala et al. 2005; Jiang et al. 2006; Koishi et al. 2006; Spoo et al. 2007; D'Alterio et al. 2010; Konoplev et al. 2011; Wang et al. 2012; He et al. 2013; D'Alterio et al. 2014; van den Berk et al. 2014; Sterlacci et al. 2016; Matsuo et al. 2016).

Outre son effet sur la dissémination et la chimiorésistance, CXCR4 est également associé à d'autres phénomènes de la progression tumorale. Dans des essais *in vitro* sur des lignées tumorales de pancréas et de l'estomac, il est montré que CXCR4 a des propriétés promouvant la prolifération et la survie cellulaire lorsque stimulé par CXCL12 (Marchesi et al. 2004; Yasumoto et al. 2006). Ces effets sont partiellement renversés par l'ajout d'un inhibiteur de CXCR4, suggérant une implication commune des récepteurs CXCR4 et ACKR3.

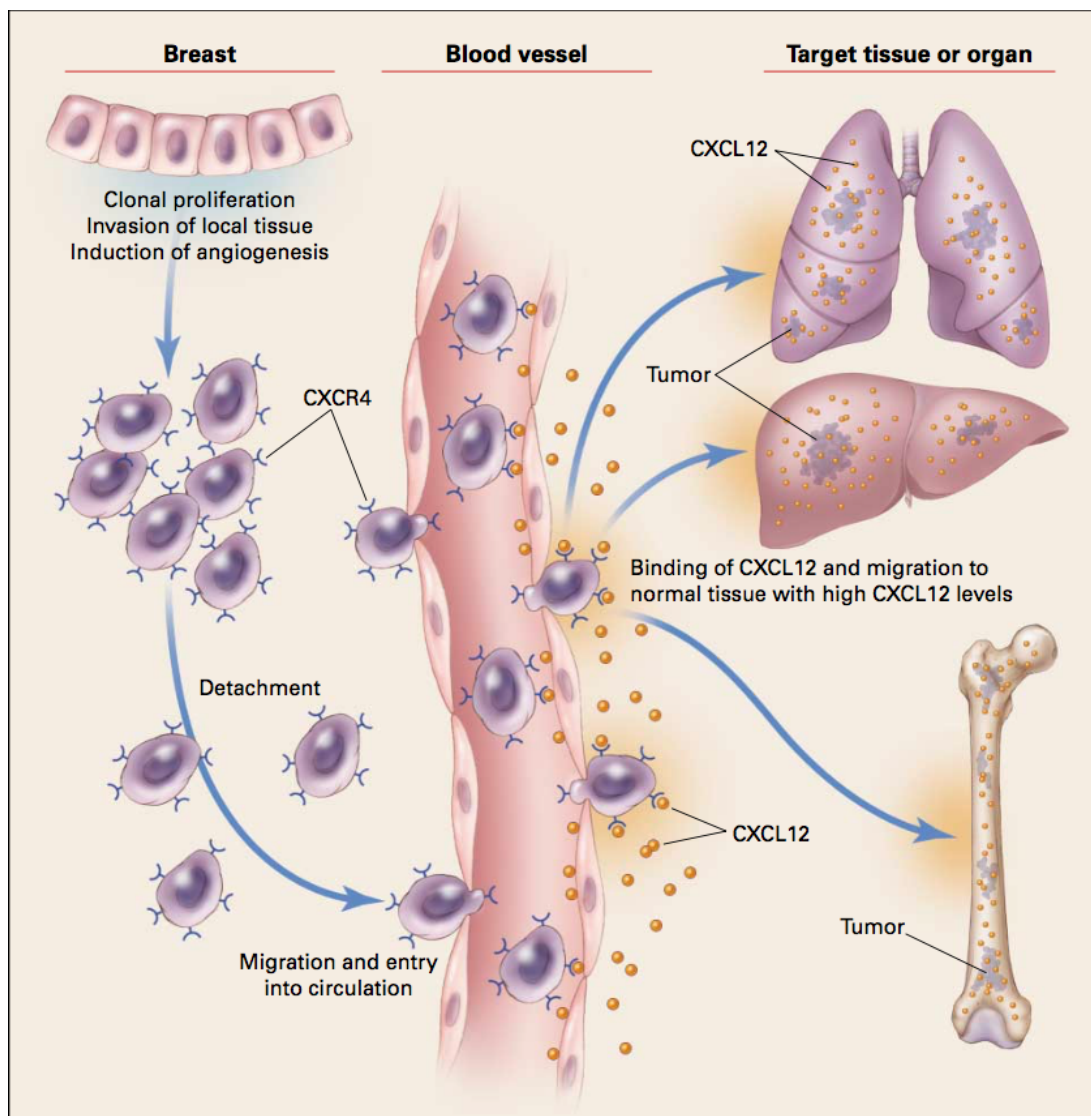


Figure 1.5 : Les cellules tumorales ont une préférence pour les tissus exprimant CXCL12 lors de la dissémination métastatique (*reproduit avec la permission de (Murphy 2001), © Massachusetts Medical Society*)

Dans les essais *in vitro* et dans les greffes xénogéniques de cellules tumorales dans les souris, l'expression d'ACKR3 est associée à l'angiogenèse, à la prolifération, à la survie cellulaire en plus de moduler la chimiotaxie CXCR4-dépendante (Burns et al. 2006; Boldajipour et al. 2008; Hattermann et al. 2010; Zheng et al. 2010). Pourtant, si l'implication clinique de CXCL12 et de CXCR4 est claire dans la dissémination métastatique et le pronostic des patients, à ce jour, peu d'études ont mesuré l'impact d'ACKR3 en clinique sur ces phénomènes. En effet, seules six études épidémiologiques sont, à notre connaissance, répertoriées sur le sujet (D'Alterio et al. 2010; Yao et al. 2011; Wang et al. 2012; Tachezy et al. 2013; D'Alterio et al. 2014; Neve Polimeno et al. 2014). Qui plus est, les six études rapportent des résultats variables sur la valeur pronostique d'ACKR3. En effet, d'Alterio, Yao, Wang et leur groupe respectif ont rapporté qu'une forte expression d'ACKR3 dans les carcinomes rénaux et les cancers de la vésicule biliaire est associée à un mauvais pronostic (D'Alterio et al. 2010; Yao et al. 2011; Wang et al. 2012). Inversement, dans les cancers du rectum, une forte expression d'ACKR3 est associée à un bon pronostic (D'Alterio et al. 2014). Dans les carcinomes hépatocellulaires et dans les cancers de l'œsophage, l'expression d'ACKR3 n'a aucune valeur pronostique (Tachezy et al. 2013; Neve Polimeno et al. 2014). Ainsi, l'impact du niveau d'expression d'ACKR3 sur le pronostic des patients souffrant de cancers semble vraisemblablement être cancer-dépendant. En absence d'un consensus dans la valeur pronostique d'ACKR3, il devient primordial d'étendre l'accumulation des données d'association entre l'expression d'ACKR3 et le pronostic des patients à d'autres cancers.

1.3 Les ligands synthétiques du système CXCL12/CXCR4/ACKR3

CXCL12 et ses récepteurs sont impliqués dans plusieurs processus biologiques d'importance dont notamment la domiciliation et la rétention des CSH dans des niches spécialisées de la moelle osseuse et la progression tumorale (Peled et al. 1999; Burns et al. 2006; Marchesi et al. 2004; Yasumoto et al. 2006; Yamada et al.

2015). Ces implications font des récepteurs CXCR4 et ACKR3 des cibles thérapeutiques intéressantes. À ce jour, plusieurs molécules visant l'un ou l'autre des récepteurs ont été développées. Dans la section qui suit, nous allons survoler les différentes applications pour lesquels les ligands synthétiques pourraient être utilisés.

1.3.1 Les ligands synthétiques de CXCR4

Il existe une multitude de ligands synthétiques et d'anticorps ciblant CXCR4. Trois indications potentielles ont été décrites pour ces molécules soit : l'inhibition de l'entrée du VIH (Tamamura, Sugioka, et al. 2001), la mobilisation des CSH (Broxmeyer et al. 2005) et la chimiosensibilisation (Nervi et al. 2009; Domanska et al. 2012). Dans cette sous-section, nous allons présenter le concept général derrière l'inhibition de CXCR4 dans les contextes de mobilisation des CSH et de chimiosensibilisation. Ensuite, nous allons introduire le Plerixafor et le TC14012, deux antagonistes de CXCR4.

1.3.1.1 L'inhibition de CXCR4

Suite à une immunosuppression ou à une irradiation corporelle totale, les patients doivent recevoir une greffe de CSH. Classiquement, les CSH étaient récupérées chez le donneur par ponction lombaire, une manœuvre à la fois douloureuse et invasive. Pour éviter cette manœuvre, un antagoniste de CXCR4 peut être utilisé. Ces derniers bloquent l'interaction CXCL12-CXCR4 qui est responsable de l'attachement des CSH dans les niches de la moelle osseuse. Ainsi, il provoque la mobilisation des CSH dans la circulation sanguine (Broxmeyer et al. 2005). Ces dernières peuvent alors être récupérées par aphérèse.

La deuxième avenue présentement envisagée pour les antagonistes de CXCR4 vise les cellules cancéreuses s'étant disséminées. Les métastases ont souvent été associées au phénomène de chimiorésistance (Scala et al. 2005; Jiang et al. 2006; Koishi et al. 2006; Spoo et al. 2007; D'Alterio et al. 2010; Konoplev et al. 2011; Wang et al. 2012; He et al. 2013; D'Alterio et al. 2014; van den Berk et al. 2014; Sterlacci et

al. 2016; Matsuo et al. 2016). Le paradigme est que cette résistance à la chimiothérapie découle du microenvironnement dans lequel se sont disséminées les cellules (Meads et al. 2008). Il y a une forte association entre l'expression de CXCR4, la dissémination métastatique et l'endroit où se nichent les cellules cancéreuses (Muller et al. 2001). Dans les modèles murins, il a été montré à plusieurs reprises que l'utilisation adjuvante d'un antagoniste de CXCR4 avait pour effet de sensibiliser les cellules au traitement chimiothérapique (Zeng et al. 2009; Parameswaran et al. 2011; Hassan et al. 2011; Weisberg et al. 2012; Domanska et al. 2012; Welschinger et al. 2013; Chen et al. 2015; Reinholdt et al. 2016; Gravina et al. 2017). Ainsi, plusieurs essais cliniques sont présentement en cours et visent à valider cet effet sensibilisateur notamment sur des patients souffrant de cancers hématologiques (Uy et al. 2012; Cooper et al. 2013; Becker et al. 2014; Ghobrial et al. 2014; Ghobrial et al. 2015; Borthakur et al. 2016).

1.3.1.2 Le Plerixafor

Le Plerixafor (aussi appelé AMD3100 et Mozobil™) est un bicyclame (voir figure 1.6A) ayant la capacité d'inhiber la liaison de CXCL12 sur CXCR4. D'abord développé comme inhibiteur de l'entrée du VIH dans les lymphocytes, son application clinique a rapidement changé suite à la découverte qu'il a la capacité de mobiliser les CSH dans la circulation sanguine. En 2008, les agences de régulation américaine et européenne ont autorisé son utilisation pour la mobilisation des CSH en vue d'une autogreffe pour les patients souffrant de lymphome ou de myélome multiple (DiPersio et al. 2007; DiPersio et al. 2009). Les résultats dans le modèle murin ont également démontré son efficacité comme chimiosensibilisateur (Weisberg et al. 2012; Domanska et al. 2012; Welschinger et al. 2013; Reinholdt et al. 2016). À cet effet, plusieurs études cliniques sont présentement en cours afin de valider l'efficacité de sensibilisation de la molécule pour divers cancers, dont les cancers hématologiques (Uy et al. 2012; Ghobrial et al. 2015).

D'abord décrit comme un antagoniste de CXCR4, la classification pharmacologique du Plerixafor pour CXCR4 fut revue en 2002 après qu'il eut été rapporté que l'ajout de la molécule induit de petites variations du flux calcique généré par le récepteur (Zhang et al. 2002). Depuis, il est plutôt caractérisé comme étant un agoniste partiel du récepteur. Le mode de liaison du Plerixafor sur CXCR4 a été caractérisé par des essais de compétition avec un anti-CXCR4 sur des récepteurs mutants (Rosenkilde et al. 2004). Tel que représenté à la figure 1.6B montrant une vue hélicoïdale du récepteur (vue du haut), l'inhibiteur vient bloquer l'accès à la pochette de liaison intramembranaire majeure (TM3 à TM7) en se liant avec les résidus D171 et A175 du TM3, Y255 et D262 du TM6 et E288 du TM7 (Rosenkilde et al. 2004).

Outre ces activités sur CXCR4, notre groupe a montré que le Plerixafor lie également le récepteur ACKR3 avec une faible affinité ($EC_{50} = 46 \mu M$) (Kalatskaya et al. 2009).

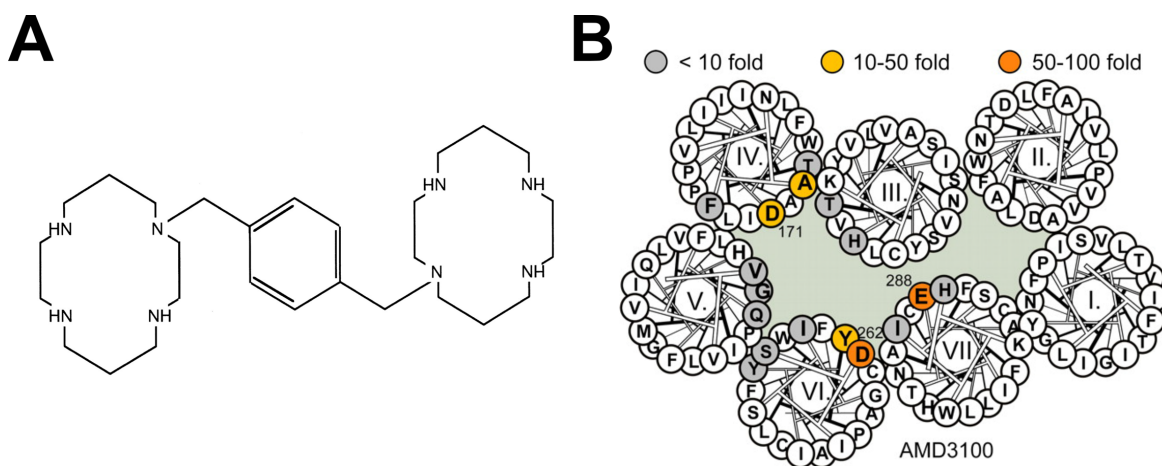


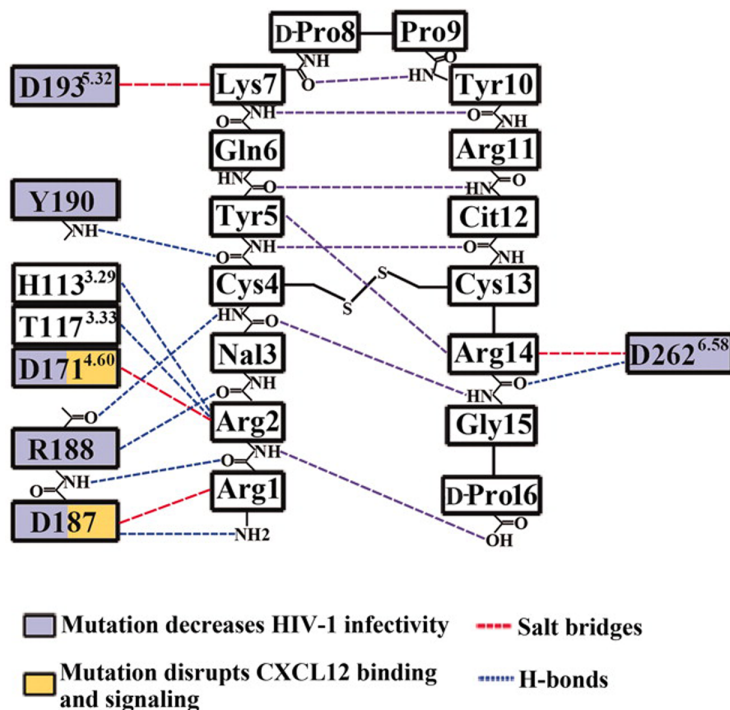
Figure 1.6 : CXCR4 et le Plerixafor. A. Schéma représentant la structure du Plerixafor (Labrosse et al. 1998). B. Schématisation du récepteur CXCR4 par des boucles hélicoïdales soulignant les résidus importants de la liaison du récepteur au Plerixafor. Les résidus importants à la liaison du Plerixafor sont identifiés en jaune (diminue l'affinité d'un facteur 10 à 50 lorsque muté) ou en orange (diminue l'affinité d'un facteur 50 à 100 lorsque muté). (Adapté de (Rosenkilde et al. 2004))

De plus, dans les essais de radio-liaison de cette étude, il est noté que la présence simultanée du Plerixafor et de CXCL12 potentialise la liaison de CXCL12 au récepteur, suggérant ainsi que c'est un ligand allostérique. Ainsi, contrairement à son effet sur CXCR4, sur ACKR3, le Plerixafor agit à titre d'agoniste en promouvant le recrutement de la β -arrestine 2 au récepteur.

1.3.1.3 Le T140 et son dérivé le TC14012

Le T140 est un peptide de 14 acides aminés agissant à titre d'agoniste inverse de CXCR4 (voir figure 1.7) (Zhang et al. 2002). Il est composé de deux feuilletts bêta antiparallèles stabilisés par un pont disulfure liant les cystéines 4 et 13. Dans des essais *in vitro*, il a été montré que le T140 inhibe le flux calcique et la chimiotaxie découlant de l'activation de CXCR4 par CXCL12 (Zhang et al. 2002; Tamamura et al. 2003). Cependant, la charge nette du peptide (+7) s'est avérée être cytotoxique dans les tests de viabilité réalisés sur des cellules en culture. Pour remédier à la situation, Tamamura et al ont substitué l'arginine 6 et la lysine 8 pour des citrullines, un acide aminé neutre possédant une structure similaire à l'arginine (Tamamura, Omagari, et al. 2001). Cette modification a permis de diminuer la charge nette de la molécule (+5) et sa cytotoxicité. L'autre problème décelé sur le T140 concernait sa stabilité. En effet, dans le sérum félin, le T140 a une demi-vie d'environ huit heures due à sa dégradation par des carboxypeptidases clivant l'arginine en position 14. Pour déjouer l'action de ces peptidases, le C-terminal fut amidé (Tamamura, Omagari, et al. 2001). Le peptide résultant de ces modifications est le TC14012.

Le TC14012 est doué des mêmes propriétés et d'une affinité similaire au T140 sur CXCR4 ($IC_{50} = 2,5nM$) (Tamamura et al. 2003). Cependant, si le T140 est spécifique à CXCR4, le TC14012 lie ACKR3 et agit à titre d'agoniste sur ce dernier avec un EC_{50} de 350 nM. Tout comme pour le Plerixafor, le manque de sélectivité du TC14012 est inquiétant et se devait d'être investigué tel que nous l'avons fait dans le premier article de cette thèse. La synthèse de molécules plus spécifiques pour chacun des récepteurs en dépend.



Position:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
T140	H	Arg	Arg	Nal	Cys	Tyr	Arg	Lys	D Lys	Pro	Tyr	Arg	Cit	Cys	Arg	OH
TC14012	H	Arg	Arg	Nal	Cys	Tyr	Cit	Lys	D Cit	Pro	Tyr	Arg	Cit	Cys	Arg	NH ₂
CVX15	H	Arg	Arg	Nal	Cys	Tyr	Gln	Lys	D pro	Pro	Tyr	Arg	Cit	Cys	Arg	Gly - DPro - OH

Figure 1.7 : Le T140 et ses dérivés. (Haut) Schéma représentant les résidus de CXCR4 impliqués dans la liaison avec le CVX15 (*adapté de* (B. Wu et al. 2010), *Reproduit avec la permission de AAAS, © 2010, Licence # 4139010318066*). (Bas) Alignement des séquences du T140, TC14012 et du CVX15.

Le mode de liaison du TC14012 n'a jamais été caractérisé sur CXCR4. Cela dit, en 2010, le cristal de CXCR4 fut publié couplé à CVX15, un dérivé du T140 (B. Wu et al. 2010). Dans cet article, les auteurs décrivent le mode de liaison du couple CXCR4-CVX15. Tout comme pour le Plerixafor, le CVX15 se lie dans la pochette de liaison intramembranaire majeure du récepteur CXCR4. Il est également intéressant de constater que le CVX15 lie, entre autres, les mêmes arginines en position 171 (TM4) et 262 (TM6) que le Plerixafor (voir figure 1.7). Outre cette ressemblance, le cristal de CXCR4 révèle que l'interaction avec le peptide est stabilisée par quatre résidus

chargés de l'ECL2 soit les : D187, R188, Y190 et D193. Dans le premier article de cette thèse, nous avons basé notre investigation en partie sur la structure cristallographique de CXCR4 couplé à CVX15, notamment pour construire le modèle structural d'ACKR3.

1.3.2 Les ligands synthétiques d'ACKR3

Présentement, aucun inhibiteur d'ACKR3 n'est admis pour une utilisation en clinique. Pourtant, l'implication pathophysiologique de ce récepteur en fait une cible fort intéressante. Outre quelques anticorps (dont les hybridomes 6E10 et 11G8), les composés de la série CCX451 et ses dérivés sont les seules molécules ciblant ACKR3 présentement disponibles pour la recherche (Burns et al. 2006; Zabel et al. 2009). Dans cette sous-section, nous allons d'abord présenter le concept derrière l'inhibition d'ACKR3, puis nous introduirons les composés CCX451 et ses dérivés.

1.3.2.1 ACKR3, une cible pharmacologique intéressante?

La problématique derrière l'utilisation pharmacologique de molécules ciblant ACKR3 réside dans la diversité des fonctions biologiques qui lui sont attribuées. D'une part, on le décrit comme un modulateur de la migration CXCR4-dépendante (Boldajipour et al. 2008; Levoye et al. 2009; Décaillot et al. 2011). Considérant le rôle de CXCR4 dans la dissémination métastatique et la progression tumorale, un modulateur négatif de sa fonction migratoire devrait se refléter positivement sur le pronostic des patients. Chez les patients souffrant de cancers du côlon, il a d'ailleurs été observé qu'une forte expression d'ACKR3 est associée à un bon pronostic (D'Alterio et al. 2014).

D'autre part, on décrit aussi ACKR3 comme un acteur important de la progression tumorale. Dans les essais *in vitro*, il promeut la survie, la prolifération, l'angiogenèse et la migration transendothéliale (Burns et al. 2006; Boldajipour et al. 2008; Hattermann et al. 2010; Zheng et al. 2010; Naumann et al. 2010). De même, chez la souris, une expression accrue d'ACKR3 est associée à l'angiogenèse et à la dissémination métastatique (Yamada et al. 2015; Stacer et al. 2016). D'ailleurs,

l'expression d'ACKR3 fut associée à un mauvais pronostic dans trois études épidémiologiques indépendantes touchant des patients atteints de carcinomes rénaux et de cancer de la vésicule biliaire (D'Alterio et al. 2010; Yao et al. 2011; Wang et al. 2012).

La divergence des effets biologiques observés pour ACKR3 suggère que sa fonction dépend du contexte et possiblement aussi type cellulaire. Néanmoins, pour certains types de cancer (rénaux, vésicule biliaire et glioblastomes), ACKR3 constitue certainement une cible pharmacologique à explorer.

1.3.2.2 CCX451 et ses dérivés

Les composés CCX451 et ses dérivés (CCX754, CCX662 et CCX771) sont des inhibiteurs d'ACKR3. Développées par la compagnie ChemoCentryx, ces molécules inhibent spécifiquement la liaison de CXCL12 et de CXCL11 sur ACKR3. Dans les prochaines lignes, nous allons faire un bref survol des essais *in vitro* et *in vivo* publiés concernant ces molécules.

La première étude ayant rapporté l'existence de ces molécules fut celle de Jennifer Burns et al (Burns et al. 2006). Dans cet article, ils montrent qu'*in vitro*, la présence de CCX451 inhibe la prolifération et l'effet pro-survie induits par ACKR3. De la même manière, dans des souris xénogreffées avec des lignées cellulaires humaines de lymphome ou de carcinome de poumon, la molécule CCX754 inhibe la croissance tumorale et prolonge la survie des animaux (Burns et al. 2006). Ce même groupe publie quelques années plus tard que la molécule CCX771 inhibe également la migration transendothéliale ACKR3-dépendante (Zabel et al. 2009; Zabel et al. 2011). Basé sur ces résultats, un groupe japonais a récemment montré qu'ACKR3 était surexprimé dans les cellules endothéliales en marge des zones tumorales pour les cancers du côlon, du foie et des poumons (Yamada et al. 2015). Dans ce dernier article, ils décrivent que, dans des souris greffées en sous-cutané par une lignée cellulaire de mélanome humain, l'expression d'ACKR3 est modulée à la hausse sur les cellules endothéliales avoisinant le microenvironnement créé autour du greffon.

Dans ce modèle de souris, l'administration de CCX771 a eu un effet inhibiteur sur la croissance tumorale, l'angiogenèse et les métastases aux poumons (Yamada et al. 2015).

Une autre application envisagée pour les inhibiteurs de la série CCX est leur utilisation en concomitance avec la radiothérapie dans les glioblastomes multiformes (Walters et al. 2014). En effet, dans leurs essais, l'administration de la molécule CCX662 suite à l'irradiation induit une meilleure régression tumorale et améliore la survie de rats atteints d'une tumeur au cerveau ou de souris ayant reçu une greffe intracrânienne d'une lignée de glioblastome multiforme humaine.

Contrairement aux anticorps, les composés CCX ne sont pas des antagonistes d'ACKR3, mais bien des agonistes. En effet, Zabel et al ont montré que ces composés avaient la capacité de recruter la β -arrestine 2 au même titre que CXCL11 et CXCL12 (Zabel et al. 2009). Évidemment, l'effet physiologique des composés CCX est bel et bien mesurable. Mais le fait que ces molécules mènent à un recrutement de la β -arrestine sur ACKR3, une protéine connue pour induire une signalisation cellulaire, appelle à la prudence dans l'interprétation des résultats présentés dans ces articles. Malgré tout, la fonction d'ACKR3 est associée à plusieurs processus liés à la progression tumorale et elle reste une cible potentielle intéressante.

1.4 La leucémie aigüe lymphoblastique précurseur des cellules B

La B-LAL est la néoplasie pédiatrique la plus fréquente au Canada (Statistics 2014). Les progrès réalisés au cours des cinq dernières décennies ont permis l'atteinte d'un taux de survie sans complications sur 5 ans dépassant les 85% (Pui, Campana, et al. 2009; Schmiegelow et al. 2010; Hunger et al. 2016). Pour amener la majorité des enfants en rémission, le plan de traitement utilisé s'étale sur plus de 2 ans et prévoit l'utilisation de hautes doses d'agents chimiothérapeutiques parfois jumelés à de la radiothérapie. Récemment, plusieurs articles ont rapporté l'effet pervers de la combinaison entre l'utilisation de doses élevées d'agents carcinogènes et la longue

durée du traitement. En effet, dans les différentes cohortes étudiées, plus du quart des survivants ont développé un effet secondaire sévère, mortel ou incapacitant dans les 25 ans qui ont suivi leur rémission (Diller 2011; Armstrong et al. 2016; Turcotte et al. 2017). Dans la prochaine section, il sera d'abord question d'introduire la B-LAL pédiatrique, ensuite nous définirons la maladie résiduelle et la rechute, puis nous poursuivrons avec les marqueurs de stratification du risque de rechute.

1.4.1 Définition et traitement de la B-LAL pédiatrique

La B-LAL est une hémopathie maligne affectant les cellules sanguines progénitrices engagées dans la voie de différenciation des lymphocytes B. Afin de se développer en B-LAL, ces cellules doivent subir une ou des altérations à l'ADN – incluant les aneuploïdies, les translocations et les mutations somatiques – qui bloqueront leur processus de maturation au stade lymphoblastique (Pui et al. 2008). À ce stade de développement, les lymphoblastes sont toujours bien ancrés à la moelle osseuse. La dérégulation dans le processus de division cellulaire de ces derniers entraîne d'abord une augmentation substantielle de leur nombre dans la moelle suivie par un débordement de l'organe dans la circulation sanguine.

Le traitement pour les patients se détaille généralement en 5 phases générales comprenant la prophase/induction (32 jours), la première phase de consolidation (3 semaines), le traitement du système nerveux central (SNC) (3 semaines), la deuxième phase de consolidation (27 semaines) et se conclut par la phase de continuation (72 semaines) (Place et al. 2015; Alvarnas et al. 2016). Les deux premières phases visent à diminuer substantiellement le nombre de cellules leucémiques afin de les amener sous le seuil de détection. La phase de traitement du SNC vise à prévenir ou à détruire les cellules leucémiques s'étant infiltrées dans le SNC et a pour but de prévenir la rechute leucémique dans le SNC. Les phases de consolidation et de continuation ciblent davantage les cellules cancéreuses résiduelles qui pourraient mener à une rechute du patient. Durant toutes ces phases de traitement, une combinaison de molécules est utilisée de manière cyclique afin de diminuer la lymphopoïèse (hormones stéroïdiennes) et détruire les cellules en

division rapide (voir Tableau 1.1). À tout cela s'ajoute un traitement utilisant un inhibiteur des tyrosines kinases (Imatinib) pour les patients porteurs du chromosome de Philadelphie (BCR-ABL ou t(9;22); plus de détails à la section 1.4.4.3) et une irradiation crânienne pour les patients avec une invasion du SNC. Pour les patients stratifiés à haut et très haut risque de rechute, le plan de traitement prévoit l'utilisation de doses plus élevées d'agents chimiothérapeutiques. Également, suite à une rechute, certains patients ayant un risque très élevé (comme les t(9;22)) devront passer par l'irradiation corporelle totale (TBI) couplée à une greffe allogénique de cellules souches provenant d'un donneur compatible.

1.4.2 La rechute et les marqueurs de stratification du risque

La rechute est la cause la plus commune d'échec au traitement. Avec l'amélioration des méthodes de prédiction et de la prise en charge des patients à risque, le taux de rechute général pour les enfants atteints d'une B-LAL se situe autour de 10% (Place et al. 2015). La cause moléculaire de cet événement adverse n'est pas connue. Cela dit, la rechute est décrite comme découlant d'une ou de plusieurs sous-populations de cellules leucémiques qui auraient échappé au traitement chimiothérapeutique par un mécanisme de chimiorésistance intrinsèque ou acquis en cours de traitement (Bhojwani & Pui 2013). Une fois la rechute déclarée, la rémission des patients varie entre 30 et 70%, et ce, malgré l'intensification du traitement (Parker et al. 2010; Tallen et al. 2016).

Afin de prévenir la rechute leucémique, les protocoles de traitement tiennent maintenant compte d'une liste de critères permettant la stratification des patients au diagnostic et en cours de traitement afin d'offrir un traitement personnalisé (Place et al. 2015). Selon que le patient soit classifié à risque standard, élevé ou très élevé de rechute, la prise en charge du patient sera ajustée. Ainsi, au diagnostic, les cliniciens vont tenir compte de l'âge du patient, du nombre de globules blancs en circulation

Tableau 1.1 : Molécules utilisées en pédiatrie pour le traitement de la B-LAL

Classe de médicament	Nom des médicaments	Mécanisme d'action
Antimétabolites	Cytarabine	Inhibe la synthèse de CMP
	Mercaptopurine	Inhibe la synthèse d'AMP
	Methotrexate	Bloque la synthèse des purines par l'inhibition de la DHFR
	Asparaginase	Inhibe la synthèse protéique par l'hydrolyse de l'asparagine
Anthracycline	Doxorubicine	Inhibe l'action de la topoisomérase II en s'intercalant dans l'ADN
Vinca-Alcaloïde	Vincristine	Inhibe la formation du fuseau de microtubule
Hormones stéroïdiennes	Dexaméthasone	Immunodépresseur
	Hydrocorticoïde	
	Prednisone	

dans la périphérie et de l'invasion du SNC (voir Tableau 1.2). Une ponction de moelle osseuse est également réalisée afin d'en faire une analyse phénotypique et cytogénétique. Puis, une seconde ponction de moelle osseuse est réalisée à la fin de la phase d'induction afin d'évaluer la maladie résiduelle (MRD). Dans les sections suivantes, nous introduirons plus en détail les critères de l'âge et du compte leucocytaire, puis nous poursuivrons en expliquant en quoi consiste l'analyse phénotypique, l'analyse cytogénétique et la MRD.

1.4.3 Le risque lié à l'âge et au compte leucocytaire

Historiquement, l'âge des patients au diagnostic est lié au pronostic. Le meilleur pronostic étant obtenu chez les enfants de 1 à 9 ans, suivi des adolescents de 10 ans et plus, puis des bébés de moins de 12 mois (Pui et al. 2008). Dans les données récentes, la survie sans complication sur 5 ans des patients âgés entre 1 et 9 ans se

Tableau 1.2 : Paramètres utilisés afin de déterminer le risque de rechute des patients (Place et al. 2015)

Critères évalués au diagnostic	Risque		
	Standard	Élevé	Très élevé
Âge	365 jours à ≤ 10 ans	< 365 jours ou >10 ans	–
Compte en globules blancs	< 50 000 cellules/μL	> 50 000 cellules/μL	–
Invasion du SNC*	< 5 cellules/μL	≥ 5 cellules/μL	–
Paralysie du nerf crânien	Absence	Présence	–
Translocations t(9;22) BCR-ABL (Phi+)	Absence	Présence	–
Translocation t(4;11) - MLL	Absence	–	Présence
Ploïdie (caryotype)	≥ 44 chromosomes	–	< 44 chromosomes
Au jour 18			
Invasion du SNC	Absence	Présence	
Au jour 32			
Invasion du SNC	Absence	Présence	
Maladie résiduelle‡	< 0,001	–	≥ 0,001
Translocations t(9;22) BCR-ABL (Phi+)	Absence	–	Présence
Translocation t(4;11) - MLL	Absence	–	Présence
Ploïdie (caryotype)	≥ 44 chromosomes	–	< 44 chromosomes

* Mesuré dans le fluide cérébrospinal

‡ Ratio entre le nombre de copies mesurées par qPCR de gènes cibles (IgH ou TCR) contre GAPDH (Zhou et al. 2007)

situe à environ 88% alors qu'elle n'est que de 79% pour les patients âgés de 10 ans ou plus et de moins de 50% pour les bébés de moins de 1 an, et ce, malgré l'intensification de la thérapie (Place et al. 2015; Pui et al. 2008). Ainsi, les enfants âgés de 1 et 9 ans au diagnostic auront un risque lié à l'âge standard, alors que les enfants de moins de 1 an ou de 10 ans et plus sont automatiquement qualifiés à haut risque.

Le compte leucocytaire est une valeur pronostique variable, c'est-à-dire qu'elle peut évoluer dans le temps (Pui et al. 2008). Il reflète potentiellement l'avancement ou l'agressivité de la maladie au moment du diagnostic. Pour avoir un risque standard, le compte initial doit se trouver sous le seuil de 50 000 leucocytes/ μ L (Place et al. 2015). Cependant, même sous ce seuil, une augmentation du compte leucocytaire pendant le traitement est généralement associée à la chimiorésistance et à un mauvais pronostic chez la B-LAL. À titre indicatif, la survie sans complication sur 5 ans en séparant les patients selon ce critère est de 89% pour les patients ayant moins de 50 000 leucocytes/ μ L et de 72% pour les autres (Place et al. 2015).

Malgré cette association entre le risque lié à l'âge, le risque lié au compte leucocytaire et le pronostic des patients, il a été rapporté qu'environ le tiers des patients qui ont un risque standard avec l'utilisation combinée de ces deux marqueurs vont développer une rechute (Pui et al. 2008). Pour pallier à cette faiblesse, les cliniciens ont intégré un panel de marqueurs phénotypiques et cytogénétiques permettant une stratification plus représentative du risque de rechute réel des patients. Ces marqueurs seront introduits dans les sections subséquentes.

1.4.4 Le phénotype des B-LAL

L'analyse immunophénotypique des LAL se fait par cytométrie en flux afin de déterminer la présence et de quantifier la proportion d'antigènes à la surface des cellules provenant de la ponction de moelle osseuse. Cette étape a pour but de définir le type de LAL s'étant développé chez le patient et se sépare en 3 groupes

distincts soit : les LAL précurseurs des cellules B (appelé B-LAL dans cette thèse), les LAL des cellules B matures et les LAL des cellules T (Bassan & Hoelzer 2011).

En pédiatrie, la B-LAL représente environ 70% des cas (Pui, Relling, et al. 2009). Pendant la différenciation des cellules B, le profil de certains antigènes de surface change en fonction du stade de maturation de la cellule (voir figure 1.8). Dans les B-LAL, les populations de blastes sont dans la majorité des cas des précurseurs des cellules B (pre-B-I à immature dans la figure 1.8). Ces dernières sont généralement caractérisées par la présence d'une forte expression des antigènes de surface CD10 et CD19 (Vardiman et al. 2009). Selon l'Organisation mondiale de la Santé, il y a présence d'une leucémie lorsque la proportion de cellules CD10⁺CD19⁺ dépasse 20% des cellules dans la moelle osseuse (Vardiman et al. 2009). Le marqueur de surface CD20 est également utilisé afin de détecter les LAL des cellules B matures. Dans ces leucémies, le profil des antigènes est défini comme étant CD10⁺CD19⁺CD20⁺ (Gökbuget & Hoelzer 2006).

Quoiqu'exprimée faiblement et uniquement de manière transitoire dans la maturation des cellules B saines (van Zelm et al. 2005), l'expression de CD20 est hétérogène dans plusieurs néoplasies touchant les cellules B (Ginaldi et al. 1998). C'est le cas notamment des B-LAL où 40 à 50% des patients vont l'exprimer (Thomas et al. 2009). Étant donné que l'expression de CD20 à la surface des cellules pré-B de la moelle osseuse est plutôt anormale, plusieurs équipes ont tenté d'associer la présence d'une telle expression au pronostic des patients (Borowitz et al. 1997; Jeha et al. 2006; Naithani et al. 2012; M Kamazani et al. 2014; Mannelli et al. 2012; Solano-Genesta et al. 2013; Thomas et al. 2009; Maury et al. 2010; Chang et al. 2010; Thomas et al. 2010; Maury et al. 2016). Les résultats pour les B-LAL chez l'adulte présentent effectivement une association entre une forte expression de CD20 et un mauvais pronostic. Cependant, en pédiatrie, les conclusions sont non concluantes à l'exception de l'étude de Borowitz et al (Borowitz et al. 1997). Certains attribuent la divergence de conclusions en pédiatrie au fait que la prise en charge des patients s'est grandement améliorée au cours des années (Chang et al. 2010; Ou et

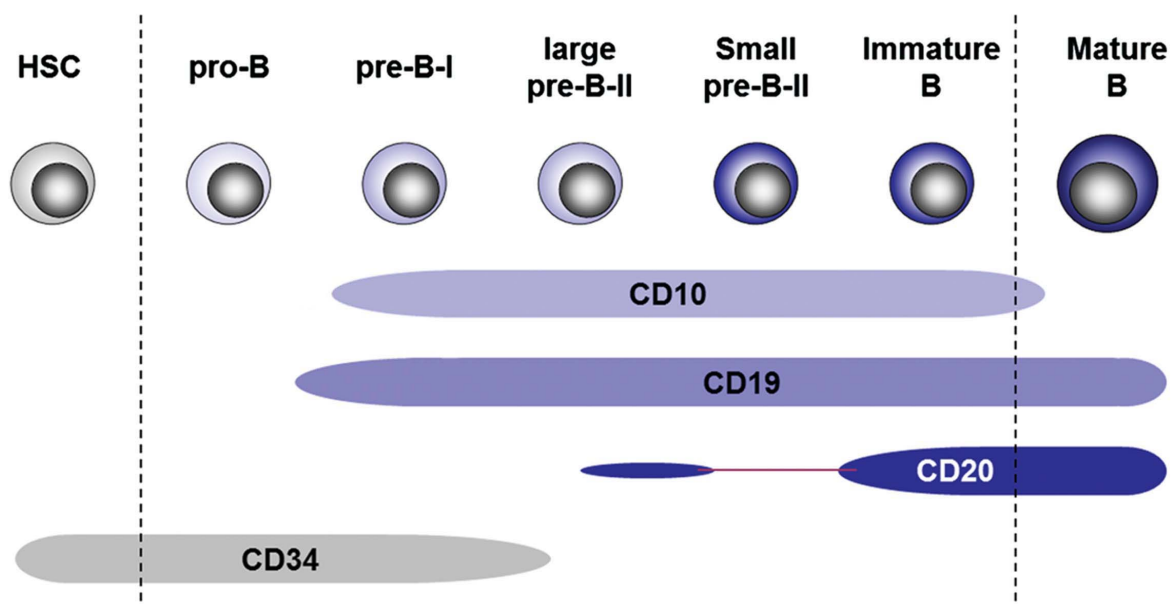


Figure 1.8 : Schéma représentant la suite d'apparition des antigènes dans la différenciation des lymphocytes B (tiré de (Rehe et al. 2013) avec la permission de EMBOpress : EMBO molecular medicine, © 2013)

al. 2015). Effectivement, en analysant les courbes de survie des études pédiatriques sur CD20, on remarque une tendance non significative allant dans le même sens que les conclusions chez l'adulte, et ce, pour la majorité des études.

1.4.5 Les marqueurs cytogénétiques

Différentes anomalies chromosomales et moléculaires caractérisent les B-LAL. L'information tirée de ces tests aide à la stratification du risque de rechute et aide ainsi à orienter la prise en charge des patients. Dans cette sous-section, nous survolerons les marqueurs cytogénétiques impliqués dans la stratification des enfants souffrant d'une B-LAL.

1.4.5.1 Les ploidies

L'anomalie chromosomale la plus fréquente en pédiatrie est l'hyperdiploïdie (HD). Représentant plus de 25% des cas chez les enfants qui ont une B-LAL, cette dernière est définie lorsque les blastes sont porteurs de plus de 50 chromosomes (Place et al.

2015; Pui et al. 2017). Cette anomalie est généralement associée à un bon pronostic pour les patients. En effet, dans les études épidémiologiques récentes, la survie sans complication des cas porteurs d'une HD est d'au moins 90% sur 5 ans (Place et al. 2015; Pui et al. 2017). La raison moléculaire derrière ces hauts taux de rémission découle du fait que 97% des blastes HD sont porteurs de trois ou quatre copies du chromosome 21. C'est sur ce chromosome que se trouve le gène codant pour le transporteur de folate responsable notamment du transport du méthotrexate à l'intérieur de la cellule (Belkov et al. 1999). Pour cette raison, les patients HD répondent généralement très bien au traitement chimiothérapeutique.

Inversement, l'hypodiploïdie est associée à un mauvais pronostic. Présent chez 1% des cas en pédiatrie, elle est définie par la présence de blastes ayant moins de 45 chromosomes. Des données récentes montrent qu'avec l'intensification de la thérapie, la survie sans effet adverse sur 5 ans atteint 88% (Place et al. 2015).

1.4.5.2 La translocation t(12;21)

Une autre anomalie chromosomale fréquente dans les B-LAL pédiatriques est le réarrangement ETV6-RUNX1. Ce dernier, découlant de la translocation des chromosomes 12 et 21 (t(12;21)), touche approximativement 20% des cas en pédiatrie (Place et al. 2015; Pui et al. 2017). Tout comme l'HD, la t(12;21) est également associée à un bon pronostic avec une survie sans complication sur 5 ans atteignant plus de 95% (Place et al. 2015; Pui et al. 2017). Encore aujourd'hui, la raison moléculaire de ce bon pronostic n'est pas connue. Cela dit, dans les cellules saines, les gènes ETV6 et RUNX1 codent chacun pour un facteur de transcription contrôlant respectivement l'expression des gènes responsables de la domiciliation et de la différenciation des cellules hématopoïétiques progénitrices à la moelle osseuse (L. C. Wang et al. 1998; North et al. 2004). Suite à la recombinaison, autant la domiciliation que la différenciation des blastes sont altérées (Hiebert et al. 1996; Palmi et al. 2014). Tel que présenté à la section 1.2.5, le dérangement du processus de domiciliation pourrait bien être à l'origine du meilleur pronostic de ce groupe de patients.

1.4.5.3 La translocation *t(9;22)* et ses homologues

Le réarrangement BCR-ABL résulte de la translocation entre les chromosomes 9 et 22 (*t(9;22)*), aussi connue sous le nom de chromosome de Philadelphie. Touchant près de 20% des enfants si on tient compte des leucémies ressemblant à la BCR-ABL, la *t(9;22)* et ses homologues engendrent une activité constitutive des tyrosines kinases provoquant, entre autres, une dérégulation de la prolifération (Hantschel & Superti-Furga 2004). Ces anomalies sont associées à un mauvais pronostic pour les B-LAL. En effet, avant l'entrée des inhibiteurs de tyrosine kinase (tel que l'imatinib) dans les plans de traitement, les survies sans complication et globale des enfants sur 7 ans étaient respectivement de 35% et 45%. (Aricò et al. 2016). Depuis la mise en marché de l'imatinib, la survie sans complication sur 5 ans atteint maintenant 63% (Place et al. 2015).

1.4.5.4 Les réarrangements MLL

Le réarrangement MLL résulte d'une translocation impliquant le locus 11q23. Il existe plus de 40 partenaires de réarrangement pour le MLL, les plus communs étant les translocations *t(4;11)* (représentant environ 50% des cas), *t(9;11)* et *t(10;11)* (Mullighan 2012). Les protéines fusions résultant de ce réarrangement procurent un gain de fonction par rapport à la MLL sauvage ce qui entraîne une augmentation de l'autorenouvellement cellulaire dans les cellules hématopoïétiques progénitrices (Pui, Relling, et al. 2009). Le réarrangement MLL est également associé à un mauvais pronostic. Des données récentes rapportent que la survie sans complication sur 5 ans est de 48% pour les B-LAL pédiatriques (Place et al. 2015).

1.4.6 La maladie résiduelle

La MRD est le marqueur de stratification du risque le plus performant dans la prédiction de la rechute (Zhou et al. 2007; Pui et al. 2017). Réalisés après la phase d'induction, les tests la mesurant cherchent à quantifier le pourcentage de blastes résiduels dans la moelle osseuse par des techniques de laboratoire sensibles telles la

PCR quantitative (qPCR) ou la cytométrie en flux (Donovan et al. 2000; Zhou et al. 2007). Ainsi, elle représente la réponse du patient face au traitement et tente de détecter la présence d'une chimiorésistance. La présence d'une MRD est associée à un mauvais pronostic. Dans une étude récente, il a été rapporté que la survie sans complication sur 5 ans est de 77% lorsqu'il y a plus de 0,001% de blastes détectés par PCR dans la moelle osseuse par rapport à 91% pour les cas sans MRD (Place et al. 2015).

1.4.7 Les souris NSG & les greffes xénogéniques de cellules primaires

Les souris NOD/*scid*-IL2R γ ^{-/-} (NSG - « *nonobese diabetic severe combined immunodeficiency IL2 γ null* ») sont des modèles de souris immunodéficientes permettant, entre autres, la reconstitution d'un système immunitaire humain par la xénogreffe de CSH. Ces modèles murins ne produisent pas de cellules lymphoïdes (B, T et NK) et sont porteurs de macrophages et de cellules dendritiques fonctionnellement déficients (Shultz et al. 2005; Shultz et al. 2007).

Outre son utilisation dans la reconstitution immunitaire, le modèle de souris NSG est couramment utilisé dans les phases précliniques du développement des médicaments. Leur immunodéfiance sévère permet d'effectuer des xénogreffes de cellules cancéreuses primaires ou immortalisées, un modèle appelé PDX (« *Patient-derived xenograft* »). Le modèle PDX permet entre autres de tester l'effet biologique d'une molécule novatrice dans un environnement *in vivo* mimant le contexte dans lequel la molécule sera utilisée. En plus de son utilisation dans la phase préclinique du développement du médicament, une série d'articles ont montré que le modèle PDX pouvait également être utilisé afin d'accroître la population de cellules leucémiques primaires humaines d'un échantillon (Borgmann et al. 2000; Nijmeijer 2001; Lock et al. 2002; Agliano et al. 2008; Meyer et al. 2011; Woiterski et al. 2013). Dans ces expériences d'expansion, il a été montré que les cellules leucémiques conservent leurs caractéristiques intrinsèques (Borgmann et al. 2000; Nijmeijer 2001; Lock et al. 2002). Plus récemment, Meyer, Woiterski et leur groupe respectif ont montré une association entre le temps de développement de la leucémie (TTL)

suivant la greffe chez la souris et le pronostic des patients (Meyer et al. 2011; Woiterski et al. 2013). Ces données suggèrent qu'il serait possible d'utiliser ces modèles murins dans l'identification de nouveaux marqueurs de stratification du risque. L'avantage de ces modèles par rapport aux données épidémiologiques des patients est qu'il permet de travailler avec les caractéristiques intrinsèques des cellules leucémiques tout en étant en absence de chimiothérapie. Le modèle PDX pourrait ainsi permettre l'identification de marqueurs pronostics qui, à cause de l'intensité du traitement, seraient difficilement identifiables. Cependant, l'utilisation du modèle PDX murin dans un tel contexte n'est pas courante.

Objectifs du projet de recherche

Le projet de recherche présenté dans cette thèse porte sur trois objectifs principaux séparés en deux articles scientifiques.

Précédemment, la sélectivité de certains ligands synthétiques de CXCR4 – dont le TC14012 – a été remise en question (Gravel et al. 2010). Ainsi, dans notre premier article, nous voulions définir le mode de liaison du TC14012 sur ACKR3. Une meilleure compréhension du mode de liaison entre TC14012 et ACKR3 pourrait aider à la synthèse future de molécules plus sélectives pour CXCR4 ou pour ACKR3.

L'intensité et la longueur du traitement chimiothérapique utilisé pour contrer la B-LAL en pédiatrie occasionnent, à long terme, des effets secondaires graves pour le quart des patients en rémission. L'amélioration de la stratification du risque individuel pourrait permettre la réduction de thérapie de certains individus diminuant ainsi leur risque d'effets adverses à long terme. Récemment, deux groupes ont montré que le TTL dans le modèle de souris PDX reflète le pronostic du patient pour les B-LAL pédiatriques (Meyer et al. 2011; Woiterski et al. 2013). Ces données suggèrent que le modèle pourrait être utilisé pour l'identification de marqueurs de risque. Dans le deuxième article, nous voulions d'abord valider le modèle de souris PDX pour l'identification de marqueurs pronostics. Le modèle a ensuite été utilisé pour tester l'association de différents marqueurs phénotypiques avec la survie des souris.

1.6 Objectifs spécifiques

1.6.1 Première section: Détermination du mode de liaison du TC14012 sur ACKR3

- Définir le mode de liaison du TC14012 sur ACKR3. Pour se faire, nous devons :

- Définir les déterminants du TC14012 lui conférant une activité sur ACKR3.
- Définir les résidus d'ACKR3 importants à la liaison du TC14012.
- Comparer le mode de liaison à celui du CVX15 (un dérivé du TC14012) sur CXCR4 précédemment défini lors de l'étude cristallographique du récepteur (Wu et al. 2010).

1.6.2 Deuxième section : L'expression de CXCR4 et d'ACKR3 dans les B-LAL pédiatriques est prédictif de la survie de souris PDX

- Valider le modèle de souris PDX pour l'identification de marqueurs de stratification des B-LAL pédiatriques.
 - Tester l'association entre la survie de souris greffées avec des échantillons de patients pédiatriques atteints d'une B-LAL et des marqueurs cytogénétiques connus (HD et t(12;21)).
- Identifier des marqueurs phénotypiques pour les B-LAL pédiatriques associés à la survie des souris PDX
 - Tester l'association entre la survie des souris et l'expression de CD20, un marqueur associé au mauvais pronostic chez la forme adulte de la maladie.
 - Tester l'association entre la survie de l'animal et l'expression de CXCR4
 - Tester l'association entre la survie des souris et l'expression d'ACKR3
 - Vérifier s'il y a un effet combiné de CXCR4 et d'ACKR3 sur la survie des souris

Chapitre II - 1^{er} article

2.1 Détermination du mode de liaison du TC14012 sur ACKR3

2.1.1 Mise en contexte

Précédemment, notre groupe a montré que deux des molécules ciblant CXCR4 (le Plerixafor et le TC14012) ont également la capacité d'activer ACKR3 (Kalatskaya et al. 2009; Gravel et al. 2010). Si cet aspect des molécules pouvait s'avérer intéressant, ce manque de sélectivité est, à priori, inquiétant. La synthèse de molécules plus sélectives passe d'abord et avant tout par une meilleure compréhension du mode de liaison de ces molécules sur les récepteurs. Si le mode de liaison à ces molécules a été défini pour CXCR4, il ne l'est pas pour ACKR3.

Publié dans le journal « Biochemistry » en 2015, notre article rapporte le mode de liaison du TC14012 à ACKR3 (CXCR7). L'axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 fut largement décrit au cours des années pour son implication dans le développement fœtal, l'hématopoïèse, le maintien des cellules souches hématopoïétiques et, plus récemment, pour son rôle prépondérant dans la dissémination métastatique. Si CXCR4 fut largement étudié, un nombre plus restreint d'études pharmacologiques ont porté directement - et uniquement - sur ACKR3. Le premier sujet abordé dans cette thèse visait à approfondir les connaissances dans la pharmacologie du récepteur ACKR3.

Dans cette étude, Geneviève Morin et moi-même avons produit les récepteurs mutés utilisés lors de cette étude. Les différents peptides utilisés ont été synthétisés par Tomoko Kuroyanagi, Dr Shinya Oishi et Dr Nobutaka Fujii. Les recrutements de la β -arrestines sur ACKR3 et la quantification de l'expression d'ACKR3 par cytométrie en flux ont été réalisés par Stéphanie Gravel et moi-même. Les essais de radio-liaison ont été faits par Geneviève St-Onge. La modélisation du récepteur et les simulations de la dynamique moléculaire des peptides ont été réalisées par Jérôme Cabana et Pierre Lavigne. L'analyse et l'interprétation des données ont été faites par moi-même,

Jérôme Cabana et Nikolaus Heveker. Tous les auteurs ont participé à l'écriture du manuscrit.

Mode of Binding of the Cyclic Agonist Peptide TC14012 to CXCR7: Identification of Receptor and Compound Determinants

Nicolas Montpas,^{#,†,‡} Jérôme Cabana,^{#,§} Geneviève St-Onge,[†] Stéphanie Gravel,^{†‡}
Geneviève Morin,[†] Tomoko Kuroyanagi,^{||} , Pierre Lavigne,[§] Nobutaka Fujii,^{||} Shinya
Oishi,^{||} and Nikolaus Heveker^{*,†,‡}

† Research Centre, Sainte-Justine Hospital, University of Montreal, Montréal H3T 1C5,
Canada

‡ Department of Biochemistry, University of Montreal, Montréal H3T 1J4, Canada

§ Departments of Biochemistry and Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke
J1H 5N4, Canada

|| Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501,
Japan

Equal contribution of these authors

This research was originally published in Biochemistry.

Reprinted with permission from Montpas, N., Cabana, J. et al. Biochemistry. 2015
Feb 24;54(7):1505-15. Copyright 2015 American Chemical Society

ABSTRACT

The chemokine receptor CXCR7 is an atypical CXCL12 receptor that, as opposed to the classical CXCL12 receptor CXCR4, signals preferentially via the β -arrestin pathway and does not mediate chemotaxis. We previously reported that the cyclic peptide TC14012, a potent CXCR4 antagonist, also engaged CXCR7, albeit with lower potency. Surprisingly, the compound activated the CXCR7–arrestin pathway. The reason underlying the opposite effects of TC14012 on CXCR4 and CXCR7, and the mode of binding of TC14012 to CXCR7, remained unclear. The mode of binding of TC14012 to CXCR4 is known from cocrystallization of its analogue CVX15 with CXCR4. We here report the mode of binding of TC14012 to CXCR7 by combining the use of compound analogues, receptor mutants and molecular modeling. We find that the mode of binding of TC14012 to CXCR7 is indeed similar to that of CVX15 to CXCR4, with compound positions Arg2 and Arg14 engaging CXCR7 key residues D179^{4,60} (on the tip of transmembrane domain 4) and D275^{6,58} (on the tip of transmembrane domain 6), respectively. Interestingly, the TC14012 parent compound T140 is not a CXCR7 agonist, due to conformational constraints in its pharmacophore, which in TC14012 are relieved through C-terminal amidation. However, an engineered salt bridge between the CXCR7 ECL2 substitution R197D and compound residue Arg1 permitted T140 agonism by repositioning the compound in the binding pocket. In conclusion, our results show that the opposite effect of TC14012 on CXCR4 and CXCR7 is not explained by different binding modes. Rather, engagement of the interface between transmembrane domains and extracellular loops readily triggers CXCR7, but not CXCR4, activation.

INTRODUCTION

CXCR7 (also known as ACKR3) is a receptor for chemokines CXCL11 and CXCL12, which in turn also bind CXCR3 and CXCR4, respectively.¹ In contrast to these receptors, CXCR7 does not mediate chemotaxis and preferentially signals via the β -arrestin pathway.¹⁻³ CXCR7 is highly expressed by neovascular endothelia and many cancer cell types and has been implicated in tumor growth via direct action on cancer cells, and through a potential role in neovascularization.^{1,4-6} Clinical interest of CXCR7 was recognized early on and validated by experiments in which synthetic CXCR7 ligands slowed tumor growth.¹ It subsequently turned out that these ligands, as well as all CXCR7 ligands described thereafter, acted as agonists of the arrestin pathway.^{2,7-9}

Receptor determinants interacting with synthetic CXCR7 ligands have not yet been identified, but such information will be crucial for the rational design of new drug candidates targeting CXCR7. We have previously reported that the cyclic peptide TC14012, known as a potent CXCR4 antagonist, also engaged CXCR7, albeit with a much lower potency.⁸ Contrary to its antagonist effect on CXCR4, it is an agonist of the CXCR7-arrestin pathway. Whether this opposite effect on the two receptors results from different modes of binding of the compound to CXCR4 and CXCR7 or from different responses of the receptor to ligands bound in a likewise manner remained unknown. The mode of binding of the compounds to CXCR4 is well-characterized, as the TC14012 analogue CVX15 has been cocrystallized with CXCR4,¹⁰ providing detailed insight into the relevant interaction determinants. Therefore, we reasoned, TC14012 was a good starting point for the elucidation of CXCR7 interaction determinants with synthetic ligands.

We here report the mode of binding of TC14012 to CXCR7 and identify key residues in both the receptor and the compound by combining the use of compound analogues with receptor mutagenesis and molecular modeling. The interaction of TC14012 with CXCR7 is similar to that of CVX15 with CXCR4: receptor key residues are CXCR7 D179^{4,60} on the tip of TM4 and D275^{6,58} on the tip of TM6, which engage compound positions Arg2 and Arg14, respectively. Unlike the case in CXCR4, no

ionic interaction with CXCR7 extracellular loop 2 (ECL2) was identified, but substitution of the repulsive R197 in CXCR7 ECL2 with alanine (R197A) yields a receptor that is potently activated by TC14012, with an EC₅₀ equal to that of the endogenous CXCL12 (14 nM) in our assay. Interestingly, the TC10412 parent compound T140 was not a CXCR7 agonist. This was due to conformational constraints in its pharmacophore, which are relieved in TC14012 by C-terminal amidation. However, introduction of a salt bridge by the CXCR7 ECL2 substitution R197D, which interacted with compound residue Arg1, repositioned T140 in the binding pocket and permitted activation of the mutant receptor.

Taken together, the study identifies key residues of CXCR7 involved in the interaction with synthetic agonists and shall guide future drug design efforts.

EXPERIMENTAL PROCEDURES.

Peptide Synthesis

The peptides were synthesized according to the procedures described in our previous studies.^{11,12} Briefly, the peptide sequences were synthesized by a standard protocol of Fmoc-based solid-phase peptide synthesis. The protected peptide resin was treated with a cocktail of deprotection reagents [TFA/thioanisole/*m*-cresol/EDT/H₂O (80:5:5:5:5) or TFA/EDT/H₂O/TIS (94:2.5:2.5:1)]. After removal of the resin by filtration, the crude peptide was dissolved in H₂O, and the pH was adjusted to 8.0 with NH₄OH for disulfide bond formation. The product was purified by preparative high-performance liquid chromatography on a Cosmosil 5C18-ARII preparative column (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan; 20 × 250 mm) to provide the expected peptides. The peptides were characterized by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (AXIMA-CFR plus, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Plasmids and Arrestin BRET

The β -arrestin2-RLuc plasmid was a generous gift from M. Bouvier and has been previously described.¹³ The cloning of CXCR7-YFP has been described previously.² All CXCR7 mutants (D179N, R197D, S198R, K206D, R197D/S198R, R197D/S198R/K206D, D275A and D275N) were produced using polymerase chain reaction site-directed mutagenesis and verified by Sanger sequencing. Recruitment of β -arrestin2 to CXCR7 and receptor mutants was tested using a bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based test, as previously described.²

Radioligand Binding Assays

Membranes of receptor-transfected HEK293 cells were prepared as described previously.¹⁴ Five micrograms of membrane protein was used per point. Binding was performed using 50 pM [¹²⁵I]CXCL12 (PerkinElmer) and indicated concentrations of the unlabeled competitor. Samples were equilibrated for 2 h at 4°C before unbound radioactivity was separated from bound radioactivity using filtration and counting.

Molecular Modeling

Receptor residues are indexed according to the nomenclature of Ballesteros and Weinstein.¹⁵ For homology modeling, we used the LOMETS server to generate homology structures of the CXCR7 receptor.¹⁶ We selected a structure generated from the crystal structure of the homologue CXCR4 receptor [Protein Data Bank (PDB) entry 3odu] generated by the threading program SP3 that featured both known disulfide bonds. The model had a coverage of 0.834, a Z score of 30.330, a Seq_id of 0.29, and a high confidence score.¹⁷ We slightly modified the end of ECL2 as it reached the top of TMD5 to accommodate the docking of the peptide ligands in a pose similar to that of CVX15 in the crystal structure of CXCR4 (PDB entry 3OE0). The backbone of the model is very similar to the crystal structure of the CXCR4 receptor in complex with the peptide antagonist CVX15 (PDB entry 3OE0), with a root-mean-square deviation (rmsd) distance of 0.912 Å between the positions of Ca atoms. The homology model was also analyzed with ProCheck,¹⁸ and the Ramachandran plot indicated that >99% of the residues were in the “most favored”

and “additionally allowed” regions. The rest of the stereochemistry was also of high quality. The unstructured N-terminal and C-terminal portions of the model were truncated by removing residues 1–32 and 321–362, respectively, to keep the simulation box as small as possible and to permit better performances for the molecular dynamics (MD) simulations. The model of the R197D–CXCR7 receptor was generated by replacing residue R197 with an aspartate using the mutagenesis feature in PyMOL. The T140 and TZ14004 molecules were designed from the CVX15 molecule from PDB entry 3OE0 using the mutagenesis feature in PyMOL. The ligands were manually docked by superposing the T140 or TZ14004 molecule on the CXV15 molecule of the crystal structure of CXCR4 after superposing the CXCR7 receptor model on the CXCR4 receptor model.

Molecular Dynamics Simulations

The GROMACS software suite¹⁹ was used to prepare and run the simulations. The CXCR7 and R197D–CXCR7 receptor models were inserted into a lipid bilayer consisting of 128 molecules of DOPC using the InflateGRO approach.²⁰ Simulation parameters were based on previous work.²¹ The membrane–receptor system was solvated with the SPC water model.²² Counterions were added at random positions, replacing water molecules, to keep the net charge of the system at 0. The ffg53a6 force field, modified to use the Berger lipids parameter,²³ was used for the calculations. Parameters for the DOPC molecules and the PDB file of the bilayer, developed by the Tieleman group,²⁴ were obtained from P. Tieleman’s Web site (moose.bio.ucalgary.ca). The naphtalene and citrulline side chains were manually parametrized for the force field based on existing parameters of other residues. *NVT* equilibration of the system was performed for 100 ps to reach the desired temperature of 310 K. This was followed by equilibration under *NPT* conditions for 15 ns with the pressure set at 1 bar. Such a long equilibration is necessary for proper equilibration of the lipids after embedding a protein in the membrane.²⁵ We monitored the system’s size on the X, Y, and Z axes to confirm the stabilization on the DOPC bilayer. The position of all heavy atoms of the receptor was restrained during equilibration. The system size after *NPT* equilibration was approximately 71 Å × 70 Å

× 81 Å, ensuring that the CXCR7 receptor molecule could not interact with its periodic image. Unrestrained MD simulations were run for 4 × 20 ns in 2 fs steps, for a total of 80 ns of simulation time per receptor or receptor–ligand complex. The simulation duration of 80 ns was deemed long enough for our study, which aims to analyze side chain reorientation and, to a certain extent, movement of the ligand. These motions occur on the nanosecond time scale.²⁶ The simulations were run under periodic boundary conditions at constant temperature (310 K) and pressure (1 bar) using the Nose-Hoover thermostat^{27,41} with a τ_T of 0.2 ps and the Parrinello–Rahman barostat with a τ_P of 5 ps, respectively. Simulation data were saved every 20 ps, for a total of 4001 frames. The stability of the systems was assessed by calculating the rmsd distance between the positions of C α atoms of the TMDs during the simulations. In all instances, the rmsds converged to a similar and stable value, close to 2.5 Å, indicating that equilibrium was reached before the MD simulations were initiated. The same protocol was used for simulations of the ligands in water, except for the use of a smaller, dodecahedral box and shorter NPT equilibration time (200 ps) because of the absence of lipids.

Trajectories Analysis

MD trajectories output from GROMACS were converted to PDB files with 200 frames per 80 ns (1 for every 20 saved) for visual inspection with the PyMOL Molecular Graphics System (version 1.3r1) and to compressed XTC trajectory files with all frames for other analyses. Evaluation of the presence of H-bonds during the simulations was performed with the `g_hbond` tool in GROMACS using the default cutoff angle value of 30 ° and a cutoff radius of 0.35 nm. The length of the salt bridges was measured with the `g_dist` tool within GROMACS using the centroids of the charged groups. This corresponds to C ζ for arginine, the center of mass of the C γ –O δ 1–O δ 2 group for aspartate, and the center of mass of the C δ –O ϵ 1–O ϵ 2 group for glutamate.

RESULTS.

TC14012, but Not T140, Is a CXCR7 Agonist on the Arrestin Pathway

Using the previously reported BRET-based CXCR7- β -arrestin recruitment assay, we found that the previously reported efficacious agonist activity of TC14012 on CXCR7⁸ is not shared by the original compound, T140 (Figure 2.1A). Heterologous compound competition with [¹²⁵I]CXCL12 for CXCR7 binding was weak ($\approx 10 \mu\text{M}$), but specific, as indicated by absence of an effect of TC14012 or T140 enantiomers [ent-TC14012 and ent-T140, (Figure 2.1B)]. The discrepancy between TC14012 IC₅₀ and arrestin recruitment EC₅₀ ($\approx 300 \text{ nM}$) is suggestive of interaction of the allosteric compound with the receptor. Of note, differences in IC₅₀ between TC14012 and T140 were small (3–5-fold), suggesting that the absence of arrestin responses to T140 was not solely due to weak binding.

TC14012 Arg14 Amidation Is Required for CXCR7 Agonism

We then identified the determinants in TC14012 for its activity on CXCR7. As shown in Scheme 2.1, the differences between T140 and TC14012¹¹ are limited to three positions. (i) T140 Arg6 is substituted with Cit6 in TC14012, (ii) D-Lys8 substituted with D-Cit8, and (iii) the free carboxyl terminus of Arg14 amidated in TC14012. To uncover which of these differences is responsible for TC14012 agonist activity on CXCR7, we used a set of compound derivatives that differ at only some of these positions (Scheme 2.1). The results demonstrate that C-terminal amidation is the major determinant for agonist activity on CXCR7, as all amidated compounds (TN14005, TN14003, and TZ14004)¹¹ induce significant arrestin recruitment, whereas those that were not amidated (TC14003 and TC14005)¹² did not, like T140 (Figure 2.2 and Table 2.1). In contrast, the substitution of Arg6 and D-Lys8 with Cit6 and D-Cit8 in TC14012, respectively, contributed little to compound agonism on CXCR7. Taken together, these results suggest that Arg14 amidation in TC14012 is required for its agonist activity on CXCR7.

Arg14 Amidation Affects Compound Conformation

Previous NMR studies with T140 have shown that the compound adopts a β -hairpin structure that is stabilized by the disulfide bond between Cys4 and Cys13 and an extensive network of intramolecular backbone interactions.²⁸ In CXCR4, T140 Arg14 is part of a bipartite pharmacophore that consists of Arg14 (with Arg1, Nal3, and Tyr5) on one hand, and Arg2 on the other.¹² Importantly, the hairpin fold extends beyond the disulfide bond and involves the Arg2 and Arg14 pharmacophores. We thus considered that these intramolecular interactions could be altered by Arg14 amidation and thereby change the overall conformation and the orientation of the pharmacophores.

To test this hypothesis, we performed molecular dynamics simulations of the T140 and TZ14004 [T140 with Arg14 amidation (Scheme 2.1)] ligands in water to evaluate the impact of the C-terminal amidation on their structure. The results of these simulations are shown in Figure 2.3. We found overall compound conformation is indeed affected, and this effect concerns particularly residues Arg1 and Arg2, which show significantly increased conformational flexibility in TZ14004 (Figure 2.3A). This results from the H-bonds formed by the C-terminal moiety, as the T140 carboxylate can form simultaneous H-bonds with the backbone amides of both Arg2 and Nal3, thus restraining torsion of the ψ angle of Arg2 within close limits (Figure 2.3B). In contrast, the amidated C-terminal moiety of TZ14004 forms only one H-bond with the backbone amide of Nal3. Accordingly, the mean distance between the C α atoms of Arg2 and Arg14 of TZ14004 is increased, with greater liberty of movement (from 5.6 ± 0.3 Å in T140 to 6.1 ± 1.1 Å for TZ14004). This increased conformational flexibility of the pharmacophores provided by Arg14 amidation in TC14012 and TZ14004 could facilitate the formation of critical salt bridges of Arg2 and Arg14 with their respective interaction partners.

The Interaction of the Compound with CXCR7 Is Similar to That with CXCR4

To identify TC14012 Arg2 and Arg14 interaction determinants in CXCR7, we resorted to receptor mutagenesis (for an overview of the mutants tested in this study, see Scheme 2.2). In the crystal structure of CXCR4 in complex with the T140

derivative antagonist CVX15 (see Scheme 2.1), Arg14 forms an ionic interaction with residue D262 of CXCR4 (D^{6.58} following the nomenclature of Ballesteros and Weinstein¹⁵), at the junction of TM6 and ECL3.¹⁰ Arg2, in turn, interacts with CXCR4 D171 (D^{4.60}) at the junction of TM4 and ECL2, and with parts of the second extracellular loop, ECL2 (see below). In CXCR7, residues D^{4.60} and D^{6.58} are conserved as D179^{4.60} and D275^{6.58}, respectively. To test whether they are also essential for TC14012 agonism on CXCR7, and thus whether the mode of binding to both receptors is similar, we mutated CXCR7 D^{4.60} to D179N and D^{6.58} to D275N and D275A. Like all receptor mutants used in this study, the mutants were expressed at the cell surface to degrees similar to that of wild-type CXCR7 (Figure 2.S1 of the Supporting Information).

As shown in Figure 2.4A, mutant D179N responded well to CXCL12, but there was no response to either TC14012 or T140. Similar observations were made with mutants D275N and D275A, as both mutations abolished TC14012 responses (Figure 2.4B, C), while CXCL12 responses were conserved [though altered (Figure 2.4D)]. These results show that CXCR7 D179^{4.60} and D275^{6.58} are indeed required for TC14012 agonism, in line with similar modes of binding of T140-derived compounds to CXCR4 and CXCR7. Taken together, these results reveal similarities of the mode of binding of the compound to CXCR4 and CXCR7 by engaging D^{4.60} and D^{6.58}, probably with the same compound pharmacophore residues Arg14 (engaging D^{6.58}) and Arg2 (engaging D^{4.60}), respectively.

Mutation of CXCR7 ECL2 Allows T140 Agonist Activity

Important CVX15–CXCR4 interaction determinants are located in the second extracellular loop (ECL2).¹⁰ CXCR7 ECL shows very little homology with CXCR4 ECL2 (Scheme 2.2B). Key residues D187 and R188 of CXCR4 adjacent to the conserved cysteine that links ECL2 to the top of TM3 (and that interact with CVX15 positions 1–4) and D193 (interacting with Lys7) are not conserved in CXCR7 (which has R197, S198, and K206 instead). To assess the role of this domain in CXCR7, we constructed and tested the triple mutant R197D/ S198R/K206D [DRD mutant

(Scheme 2.2A)], in which key CXCR4 ECL2 residues are introduced into CXCR7 ECL2. As shown in Figure 2.5A, this triple mutant responds weakly to CXCL12. However, surprisingly, T140 now efficiently activated arrestin recruitment, while the response to TC14012 [and TZ14004 (not shown)] was somewhat compromised. Similar results were obtained with the R197D/S198R double substitution that still affected the response to TC14012 (Figure 2.5B), while the responses of single mutant K206D (corresponding to CXCR4 D193, which engages CVX15 Lys7) were unaltered compared to those of wild-type CXCR7 (Figure 2.5C). R197 and S198 lie just behind the conserved cysteine residue in ECL2 and correspond to positions ECL2b C + 1 and ECL2b C + 2,²⁹ respectively, and are thus tethered to the top of TM3. Testing CXCR7 single mutants R197D and S198R to further break down their respective contributions revealed that the S198R substitution alone was sufficient to completely abolish either T140 or TC14012 activity (Figure 2.5D), while both compounds were agonists with very similar potency and efficacy on CXCR7 R197D (Figure 2.5E). The nonresponsiveness of S198R is potentially due to the creation of strong repulsive forces between the two adjacent arginines, R197 and R198, in this mutant and Arg1 and Arg2 in the compounds. To test this, we constructed mutant R197A, which has no basic residues, but does not mimic CXCR4 D193. This mutation dramatically increased the potency of TC14012 from an EC₅₀ of 390 nM on wild-type (WT) CXCR7 to 14 nM on the R197A mutant, equal to the potency of the endogenous agonist CXCL12 (Figure 2.5F). This indicates that, indeed, CXCR7 R197 contributes to the low potency of TC14012 on CXCR7, presumably via repulsive forces with the positively charged compound. T140 was only weakly efficient on R197A, however, although the response potency was essentially unaltered compared to that of R197D. This suggests that the introduction of D197, and not just the removal of the repulsive R197, allowed T140 to efficiently promote arrestin recruitment. Interestingly, the increased efficacy of T140 on R197D when compared to that of R197A was not reflected by the improved displacement of [¹²⁵I]CXCL12, which remained in the IC₅₀ micromolar range (Figure 2.5G,H). Similarly, the increased potency of TC14012 on R197A was accompanied by an only very moderate increase in IC₅₀, which remained far from the IC₅₀ [IC₅₀ of >700 nM and arrestin recruitment IC₅₀ of 14 nM (compare

panels F and H of Figure 2.5)], again in line with an allosteric binding mode.

MD Simulations Reveal a Weakened Ability of T140 to Form Simultaneously Critical Salt Bridges in WT CXCR7

To further rationalize the structural basis of the findings described above, we performed molecular dynamics simulations with T140 or TZ14004 docked in complex with either CXCR7 or R197D CXCR7. Each receptor–ligand complex was simulated in quadruplicate for 20 ns, for a total of 80 ns of MD simulation time for each complex. TZ14004, rather than TC14012, was chosen for modeling to specifically address the role of the C-terminal amidation.

The MD simulations indicated that the CXCR7–ligand complexes are dynamic entities with much movement from the side chains. Nonetheless, three sectors in the WT CXCR7 receptor were identified that accommodate the side chains of residues Arg1, Arg2, and Arg14 of both ligands (Figure 2.6A). Arg1 and the N-terminal moiety formed H-bonds with H298 and Q301 (in TM7). Arg2 formed a salt bridge and, when distance and orientation permitted it, H-bonds with D179 (TM4). It could also form H-bonds with the surrounding side chains of Y200 (ECL2), S216 (TM5), and Y268 (TM6) as it was reoriented. Similarly, Arg14 formed a salt bridge (and H-bonds when permitted) with D275 (TM6), but as it was reoriented, it could also interact with the nearby S278 (H-bond) and E290 (salt bridge and H-bonds), at the junctions of ECL3 with both TM6 and TM7, respectively. In addition, a dynamic H-bond network was observed between CXCR7 ECL2 and residues of the compound hairpin (positions 3–12), with no striking difference between T140 and TC14012 (not shown). The main difference in MD simulations with the R197D CXCR7 mutant was that the N-terminal moiety and the Arg1 side chain were now reoriented in both T140 and TZ14004 to form a salt bridge with residue R197D, similar to the salt bridge formed between Arg1 and CXCR4 D187 in the CVX15–CXCR4 crystal (Figure 2.6B).¹⁰

In terms of observed interactions, no obvious singular differences between T140 and TC14012 could explain the inability of T140 to activate CXCR7. We thus explored the possibility that the more relaxed conformation of the TZ14004 pharmacophore

(Figure 2.3B) facilitates the simultaneous formation of the critical salt bridges (between Arg2 and D179 and between Arg14 and D275). We further hypothesized that the R197D mutation might favor such simultaneous salt bridges by moving Arg2 closer to D179 as a consequence of the repositioning of Arg1 in the R197D mutant.

To verify this claim, we monitored the distance between the charged groups of the two critical salt bridges during the MD simulations. The resulting graphs indicated that, for the T140–WT CXCR7 complex, the two salt bridges were indeed rarely simultaneously $<5 \text{ \AA}$ in length (Figure 2.S2A of the Supporting Information), a distance proposed as a cutoff beyond which salt bridges become destabilized, the enthalpic gain being too small to compensate for the entropic loss.³⁰ In addition, they appeared to be alternating in length, with either Arg2 being close to D179 or Arg14 being close to D275. This contrasted with the other three complexes (T140–R197D CXCR7, TZ14004–WT CXCR7, and TZ14004–R197D CXCR7), where indeed simultaneous salt bridges $<4\text{--}5 \text{ \AA}$ in length were observed (Figure 2.S2B–D of the Supporting Information). To further substantiate these observations and to evaluate the best binding conformation that can be attained, we analyzed the trajectories of each ligand–receptor complex individually for both salt bridge simultaneity and length (Table 2.S1 of the Supporting Information). In the best of the four trajectories, simultaneous salt bridges $<5 \text{ \AA}$ in length were present only one-fourth (25.6%) of the time for the T140–WT CXCR7 complex, compared to two-thirds (66.4%) of the time for the TZ14004–WT CXCR7 complex. In addition, the strongest, shortest salt bridges for the T140–WT CXCR7 complex had a sum length of $10.68 \pm 1.74 \text{ \AA}$, which was decreased to $8.84 \pm 1.46 \text{ \AA}$ for the TZ14004–WT CXCR7 complex. Accordingly, the Arg2–D179 salt bridge of the T140–WT CXCR7 complex has an average length of $6.19 \pm 1.50 \text{ \AA}$, which is more than 2 \AA longer than in the TZ14004–WT CXCR7 trajectory. These shortcomings of the T140–CXCR7 complex were indeed not observed in the T140–R197D CXCR7 complex. Here, simultaneous salt bridges $<5 \text{ \AA}$ in length with D179 and D275 occurred at an increased rate of 41.3% of the time; the sum of the length of both bonds decreased to $9.50 \pm 0.87 \text{ \AA}$, and the Arg2–D179 distance was indeed decreased to $4.21 \pm 0.48 \text{ \AA}$ (more than 2 \AA).

We also monitored other possible salt bridges formed by Arg2 and Arg14, with residues E213^{5,39} (top of TM5) and E290^{7,28} (ECL3 and TM7). The salt bridge between Arg14 and E290^{7,28} was the only one to be consistently formed at a somewhat short distance in the trajectories where aforementioned critical salt bridges were at their shortest, averaging 7.36 ± 1.33 Å for the T140–R197D CXCR7 complex, 6.01 ± 0.92 Å for the TZ14004–WT CXCR7 complex, and 5.96 ± 0.89 Å for the TZ14004–R197D CXCR7 complex (Figure 2.S2A–D of the Supporting Information). This pattern was, however, not observed for the T140–WT CXCR7 complex as this salt bridge was 12.38 ± 2.36 Å in length in the corresponding trajectory, which is beyond the generally accepted cutoff length of 8–10 Å for salt bridges in water because of the dielectric constant of water rendering the interaction negligible.³¹

Overall, the analysis of the MD simulations indicates that T140 forms weaker critical salt bridges over longer distances in the wild-type CXCR7 receptor, which as a consequence thwarts simultaneous engagement of the clamp positions in TM4 and TM6. The longer distance between Arg14 and E290^{7,28} with T140 in the wild-type CXCR7 receptor is also indicative of a slightly different binding conformation for this complex. However, T140 Arg1 interacts with mutant receptor D197, which reorients Arg2 closer to D179 in TM4 and facilitates simultaneous recognition of D179 and D275, thereby permitting receptor activation.

DISCUSSION

This work reports the mode of binding of TC14012 to CXCR7, combining receptor mutagenesis and the use of compound derivatives with molecular modeling to further rationalize the experimental findings. Given that TC14012 is a known antagonist of the canonical chemokine receptor CXCR4, which shares the chemokine ligand CXCL12 with CXCR7, but, in contrast, activates the arrestin pathway on CXCR7, our study yields insight into the unusual activation mechanism of CXCR7.

Mode of TC14012–CXCR7 Binding

Overall, we find striking similarities between the mode of binding of TC14012 to

CXCR7 and the mode of binding of its derivative CVX15 to CXCR4.¹⁰ In both circumstances, receptor residues D^{4.60} and D^{6.58} play key roles to form salt bridges with the compound pharmacophore Arg2 and Arg14, respectively. In addition, H-bond interactions with CXCR7 ECL2 (but no salt bridges as in CXCR4) are observed, so that, like in CXCR4, TC14012 roughly covers the major binding pocket formed by TM3– TM7 (Scheme 3). Of note, the identified key residues are similar to those reported for other CXCR4 antagonists. CXCR4 D171^{4.60} and D187 (ECL2b Cys + 1) are key residues for cyclic pentapeptide FC131.³² In addition, the Food and Drug Administration-approved CXCR4 antagonist AMD3100 also depends on D^{4.60} and D^{6.58}, with some contribution from ECL2.^{33,34} Therefore, the agonistic (on CXCR7) TC14012 adopts a mode of binding to CXCR7 that resembles that of binding of antagonists to CXCR4. A recent virtual screening approach suggests that this feature may be shared by other small CXCR7 ligands. Yoshikawa et al. developed a CXCR7 model that highlights CXCR7 positions D179^{4.60} and D275^{6.58} as key residues of the receptor pharmacophore.³⁵ Indeed, D^{4.60} and D^{6.58} were engaged by all four reference CXCR7 ligands, two of which were derived from the patent literature. Although arrestin recruitment experiments were not described, it is tempting to speculate that these small ligands also activate CXCR7 given that all reported compounds of the Chemo- centryx CCX series are CXCR7 agonists.^{7,36} Of note, another series of compounds, similar to the CCX compounds based on styrene-amides, all turned out to be CXCR7 agonists.⁹

T140

In contrast to TC14012, its parent compound, T140, was almost devoid of CXCR7 agonist activity, despite binding competition with CXCL12 that was only slightly inferior to that with TC14012 and no obvious differences in CXCR7 engagement when modeled. This resulted from the lack of flexibility in the T140 pharmacophore due to intramolecular interaction with the free T140 carboxyl terminus²⁸ that resulted in a constrained compound conformation. This constraint was released in the C-terminally amidated TC14012, resulting in much greater pharmacophore flexibility. The constrained T140 conformation favored only alternate but not simultaneous

engagement of CXCR7 D179^{4.60} by Arg2 and D275^{6.58} by Arg14. This shortcoming was adjusted by the introduction of the R197D mutation, which led to interaction of T140 Arg1 with D197, analogous to what was observed in the CVX15–CXCR4 crystal.¹⁰ This new interaction realigned T140 Arg2 with D179^{4.60}, thereby stabilizing the compound in an orientation that permitted simultaneous Arg14–D275^{6.58} engagement. These data point toward a necessity for CXCR7 agonists to concurrently interact with the upper parts of TM4 and TM6 to draw them together or, alternatively, push them apart, possibly involving TM3.

Role of ECL2

The role played by CXCR7 ECL2 was difficult to assess. Indeed, CXCR7 ECL2 is very different from CXCR4 ECL2 in both amino acid sequence and length, resulting in potential shortcomings in the molecular model we used. Nevertheless, H-bond networks resembling those seen between CVX15 and CXCR4 were observed. It became clear that residues ECL2b Cys + 1 and Cys + 2 (R197 and S198, respectively) are important. While substitution of R197D stabilized the orientation of T140 by creating a salt bridge with Arg1, removal of the charge with the R197A substitution failed to do so but nevertheless resulted in a much higher potency of activation by TC14012, which equaled that of CXCL12 on that mutant (14 nM). This suggests that the repulsive force of CXCR7 R197 is the major reason for the relatively weak potency of the compound on CXCR7. Why a similar effect was not observed with R197D remains unclear but may be related to the overall conformation of this part of ECL2. Similarly, the S198R single substitution was prohibitive for activity, probably by repulsion of the positively charged compound by R197 and R198. A similarly repulsive effect of CXCR4 R188 was already proposed to impinge on FC131 potency.³²

Mode of CXCR7–Arrestin Activation

In CXCR4, FC131, T140, and AMD3100 are believed to exert their antagonistic effect by denying access of the N-terminus of CXCL12 to the interaction with an elusive “site II”, thought to lie deeper in the binding crevice.^{10,37} One conclusion that

can thus be drawn from our results is that CXCR7 apparently does not require this second step to recruit arrestin. Rather, ligand–receptor interactions close to the receptor surface seem to be sufficient to trigger CXCR7 activation, without the need for interactions deep into the binding pocket. Indeed, comparison of the ligand binding pockets between different GPCRs revealed an outstandingly shallow interaction of CVX15 with CXCR4.³⁸ While this may be unsurprising for a receptor antagonist, it is rather unexpected for a receptor agonist. Along these lines of interpretation, we have previously reported AMD3100 to induce recruitment of arrestin to CXCR7.² Given that AMD3100 relies, like TC14012, on CXCR4 D171^{4,60} and D262^{6,58}, we may speculate that AMD3100 also adopts a similar binding mode with CXCR7, using D179^{4,60} and D275^{6,58}. This concurrence points toward a common, unusual mechanism by which the compounds trigger CXCR7 activation.

One of the hallmarks of agonists, as opposed to antagonists, is that they induce receptor movements that lead to signal transmission. The nature of such movements is difficult to derive from ligand fitting in static receptor models. It is, however, tempting to speculate that, for the recruitment of arrestin to CXCR7 to occur, and unlike in CXCR4 where TC14012 does not induce arrestin recruitment,⁸ TM rearrangement via the interaction with their tops can already lead to TM tilting or rotational movements that trigger signal transmission.

If, and how, these findings relate to the CXCR7 activation mechanism by its endogenous chemokine ligands CXCL12 and CXCL11 remains to be seen. The inability of CXCR7 to signal via G-protein-mediated pathways is still unexplained, but CXCR7 coupling, though not activation, with $G\alpha_i$ has been described in reconstituted systems.³⁹ Moreover, a few cell types seem to be permissive for CXCR7-mediated G-protein activation.⁴⁰ It is tempting to speculate that CXCR7 engagement by chemokines rapidly activates G-protein-independent arrestin recruitment by superficial receptor engagement. This in turn could precede and thus prevent G-protein activation, which would necessitate “site II” engagement. Further work will be required to test these hypotheses.

In summary, we have established that CXCR4 antagonists that also bind CXCR7 do so by very similar binding modes. Their opposite effects on both receptors are thus not explained by distinct receptor engagement. Rather, CXCR7 activation of the arrestin pathway is readily triggered by interactions with the receptor surface, bypassing the need for site II interactions deep in the receptor ligand binding pocket.

FUNDING

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (Grant MOP123421), and by Grants-in-Aid for Scientific Research and a Core-to-Core Program from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and Platform for Drug Discovery, Informatics, and Structural Life Science from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. # These authors contributed equally.

ABBREVIATIONS

CXCR4, CXC chemokine receptor 4; CXCR7, CXC chemokine receptor 7; CXCL12, CXC chemokine ligand 12; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; TM, transmembrane domain; ECL, extracellular loop; RLuc, *Renilla* luciferase; YFP, yellow fluorescent protein.

REFERENCES

- (1) Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Kuo, C. J., Wei, K., McMaster, B. E., Wright, K., Howard, M. C., and Schall, T. J. (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.
- (2) Kalatskaya, I., Berchiche, Y. A., Gravel, S., Limberg, B. J., Rosenbaum, J. S., and Heveker, N. (2009) AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol. Pharmacol.* 75 (5), 1240–1247.
- (3) Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N. P., Gerard, C., and Lefkowitz, R. J. (2010) β -Arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2), 628–632.
- (4) 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., Howard, M. C., and Schall, T. J. (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), 15735–15740.
- (5) 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 (7), 4283–4294.
- (6) Hattermann, K., Held-Feindt, J., Lucius, R., Muerkoster, S. S., Penfold, M. E., 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 (8), 3299–3308.
- (7) Zabel, B. A., Wang, Y., Lewen, S., Berahovich, R. D., Penfold, M. E., Zhang, P., Powers, J., Summers, B. C., Miao, Z., Zhao, B., Jalili, A., Janowska-Wieczorek, A., Jaen, J. C., and Schall, T. J. (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.

(8) Gravel, S., Malouf, C., Boulais, P. E., Berchiche, Y. A., Oishi, S., Fujii, N., Leduc, R., Sinnett, D., and Heveker, N. (2010) The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits β -arrestin to CXCR7: Roles of receptor domains. *J. Biol. Chem.* 285 (49), 37939– 37943.

(9) Wijtmans, M., Maussang, D., Sirci, F., Scholten, D. J., Canals, M., Mujic-Delic, A., Chong, M., Chatalic, K. L., Custers, H., Janssen, E., de Graaf, C., Smit, M. J., de Esch, I. J., and Leurs, R. (2012) Synthesis, modeling and functional activity of substituted styrene-amides as small-molecule CXCR7 agonists. *Eur. J. Med. Chem.* 51, 184–192.

(10) Wu, B., Chien, E. Y., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F. C., Hamel, D. J., Kuhn, P., Handel, T. M., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330 (6007), 1066–1071.

(11) Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Gotoh, K., Kanamoto, T., Xu, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Hattori, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., Otaka, A., and Fujii, N. (2001) Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (14), 1897–1902.

(12) Tamamura, H., Omagari, A., Oishi, S., Kanamoto, T., Yamamoto, N., Peiper, S. C., Nakashima, H., Otaka, A., and Fujii, N. (2000) Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (23), 2633–2637.

(13) Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., and Bouvier, M. (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* 22 (15), 3816–3824.

- (14) Kaya, A. I., Onaran, H. O., Ozcan, G., Ambrosio, C., Costa, T., Balli, S., and Ugur, O. (2012) Cell contact-dependent functional selectivity of β 2-adrenergic receptor ligands in stimulating cAMP accumulation and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287 (9), 6362–6374.
- (15) Ballesteros, J., and Weinstein, H. (1995) Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relations in G-Protein-Coupled Receptors. *Methods Neurosci.* 25, 366–428.
- (16) Wu, S., and Zhang, Y. (2007) LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 35 (10), 3375–3382.
- (17) Zhou, H., and Zhou, Y. (2005) Fold recognition by combining sequence profiles derived from evolution and from depth-dependent structural alignment of fragments. *Proteins* 58 (2), 321–328.
- (18) Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* 8 (4), 477–486.
- (19) Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J. (2005) GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* 26 (16), 1701–1718.
- (20) Kandt, C., Ash, W. L., and Tieleman, D. P. (2007) Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods* 41 (4), 475–488.
- (21) Lemkul, J. A., and Bevan, D. R. (2009) Perturbation of membranes by the amyloid β -peptide: A molecular dynamics study. *FEBS J.* 276 (11), 3060–3075.
- (22) Berweger, C. D., Vangunsteren, W. F., and Mullerplathe, F. (1995) Force-Field Parametrization by Weak-Coupling: Reengineering Spc Water. *Chem. Phys. Lett.* 232 (5–6), 429–436.

- (23) Berger, O., Edholm, O., and Jahnig, F. (1997) Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 72 (5), 2002–2013.
- (24) MacCallum, J. L., and Tieleman, D. P. (2006) Computer simulation of the distribution of hexane in a lipid bilayer: Spatially resolved free energy, entropy, and enthalpy profiles. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (1), 125–130.
- (25) Anezo, C., de Vries, A. H., Holtje, H. D., Tieleman, D. P., and Marrink, S. J. (2003) Methodological issues in lipid bilayer simulations. *J. Phys. Chem. B* 107 (35), 9424–9433.
- (26) Werner, T., Morris, M. B., Dastmalchi, S., and Church, W. B. (2012) Structural modelling and dynamics of proteins for insights into drug interactions. *Adv. Drug Delivery Rev.* 64 (4), 323–343.
- (27) Nose, S. (1984) A Unified Formulation of the Constant Temperature Molecular-Dynamics Methods. *J. Chem. Phys.* 81 (1), 511–519.
- (28) Tamamura, H., Sugioka, M., Odagaki, Y., Omagari, A., Kan, Y., Oishi, S., Nakashima, H., Yamamoto, N., Peiper, S. C., Hamanaka, N., Otaka, A., and Fujii, N. (2001) Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (3), 359–362.
- (29) Conner, M., Hawtin, S. R., Simms, J., Wootten, D., Lawson, Z., Conner, A. C., Parslow, R. A., and Wheatley, M. (2007) Systematic analysis of the entire second extracellular loop of the V(1a) vasopressin receptor: Key residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, identified. *J. Biol. Chem.* 282 (24), 17405–17412.
- (30) Kumar, S., and Nussinov, R. (2002) Relationship between ion pair geometries and electrostatic strengths in proteins. *Biophys. J.* 83 (3), 1595–1612.

- (31) Lee, K. K., Fitch, C. A., and Garcia-Moreno, E. B. (2002) Distance dependence and salt sensitivity of pairwise, Coulombic interactions in a protein. *Protein Sci.* 11 (5), 1004–1016.
- (32) Thiele, S., Mungalpara, J., Steen, A., Rosenkilde, M. M., and Vabeno, J. (2014) Determination of the binding mode for the cyclopentapeptide CXCR4 antagonist FC131 using a dual approach of ligand modifications and receptor mutagenesis. *Br. J. Pharmacol.* 171, 5313–5329.
- (33) Gerlach, L. O., Skerlj, R. T., Bridger, G. J., and Schwartz, T. W. (2001) Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* 276 (17), 14153–14160.
- (34) Labrosse, B., Brelot, A., Heveker, N., Sol, N., Schols, D., De Clercq, E., and Alizon, M. (1998) Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J. Virol.* 72 (8), 6381–6388.
- (35) Yoshikawa, Y., Oishi, S., Kubo, T., Tanahara, N., Fujii, N., and Furuya, T. (2013) Optimized method of G-protein-coupled receptor homology modeling: Its application to the discovery of novel CXCR7 ligands. *J. Med. Chem.* 56 (11), 4236–4251.
- (36) Luker, K. E., Gupta, M., Steele, J. M., Foerster, B. R., and Luker, G. D. (2009) Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia* 11 (10), 1022–1035.
- (37) Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., Hirose, M., Maeda, Y., Takahashi, H., Terashima, Y., Matsushima, K., and Shimada, I. (2009) Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 284 (50), 35240–35250.
- (38) Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., and Babu, M. M. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494 (7436), 185–194.

(39) Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., and Lagane, B. (2009) CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113 (24), 6085–6093.

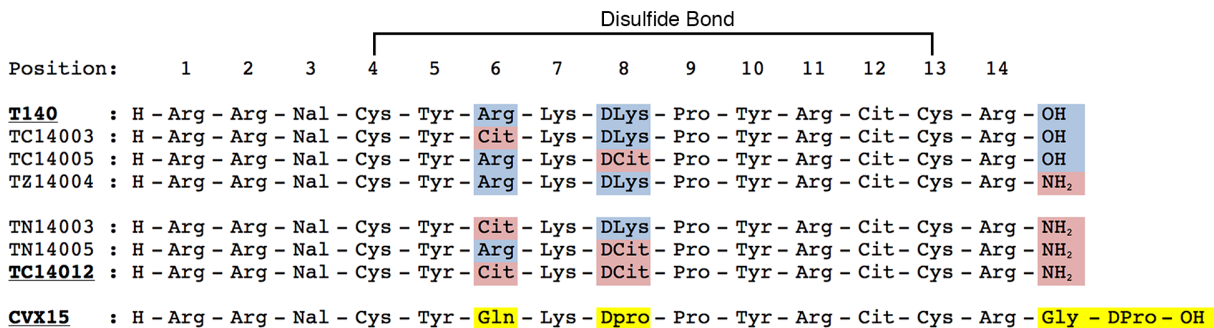
(40) Odemis, V., Lipfert, J., Kraft, R., Hajek, P., Abraham, G., Hattermann, K., Mentlein, R., and Engele, J. (2012) The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia* 60 (3), 372–381.

(41) Hoover, W. G. (1985) Canonical Dynamics: Equilibrium Phase- Space Distributions. *Phys. Rev. A* 31 (3), 1695–1697.

Table 2.1: EC₅₀ Value of the TC14012 derivatives

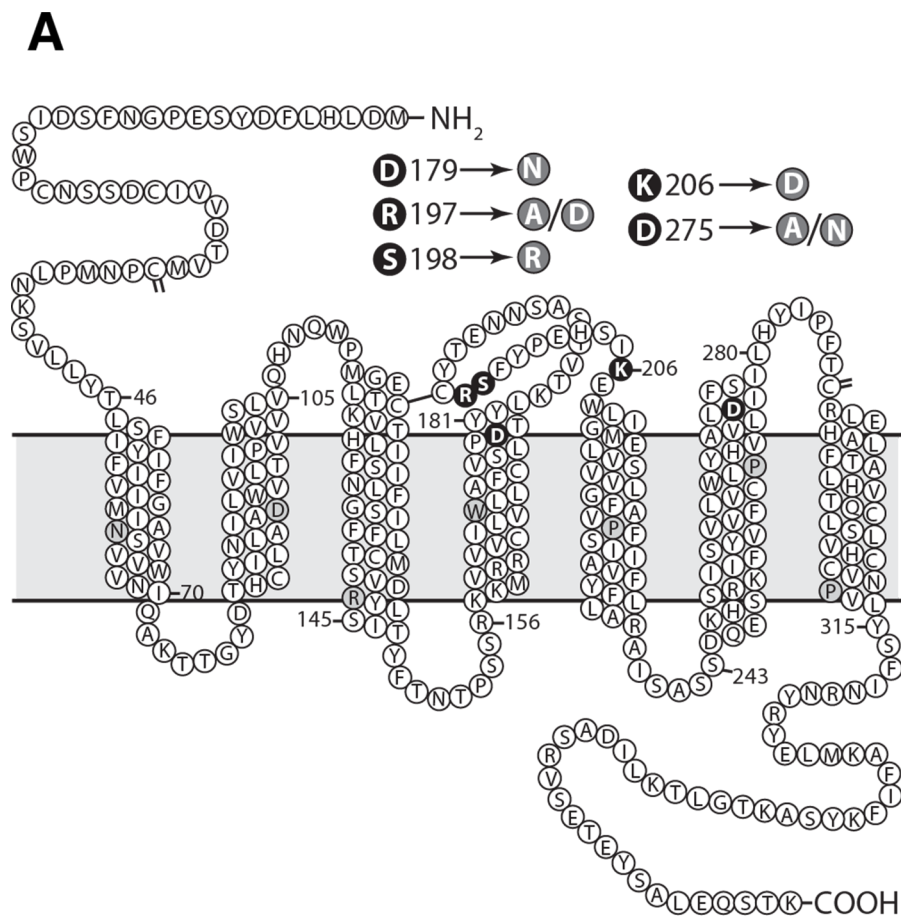
	TC14012	TN14003	TN14005	TZ14004	TC14003	TC14005	T140
Log EC ₅₀	-6,41±0.09	-6,33±0.08	-6,11±0.08	-5,85±0.09	-5,54±0.39	5,467±0.39	N/A
EC ₅₀ (nM)	388	469	769	1409	2860	3411	N/A

Scheme 2.1. Sequences of the Parental T140 and the Tested Analogues^a



^aThe Cystine bridge is conserved in all derivatives. The sequence of CVX15, which had been used for cocrystallization with CXCR4, is shown for comparison. Positions diverging between the analogues are highlighted: CVX15 (yellow), T140 (blue) and TC14012 (red).

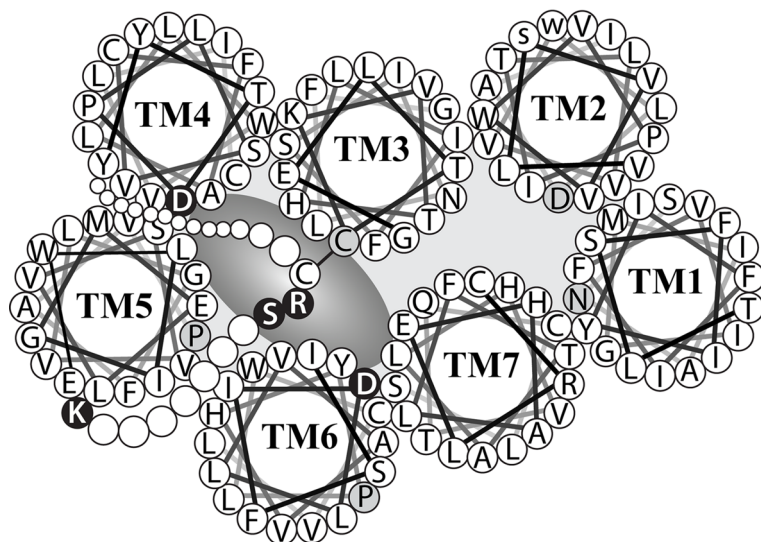
Scheme 2.2. (A) CXCR7 Snakeplot with Residues Mutated in This Study Highlighted in Black and (B) Sequence Alignment of CXCR7 and CXCR4 Extracellular Loop 2 (ECL2)^a



B

^aECL2 residues are represented in bold, the conserved residues in blue and the amino acid of CXCR4 that were shown to interact with CVX15 in the crystal structure in red.

Scheme 2.3. CXCR7 Helical Wheel Diagram Seen from the Extracellular Side of the Receptor, with Parts of ECL2^a



^aResidues highlighted in black were mutated in this study. The grey oval indicates TC14012 positioned in the major binding pocket between TM3 and TM7.

FIGURE 2.1

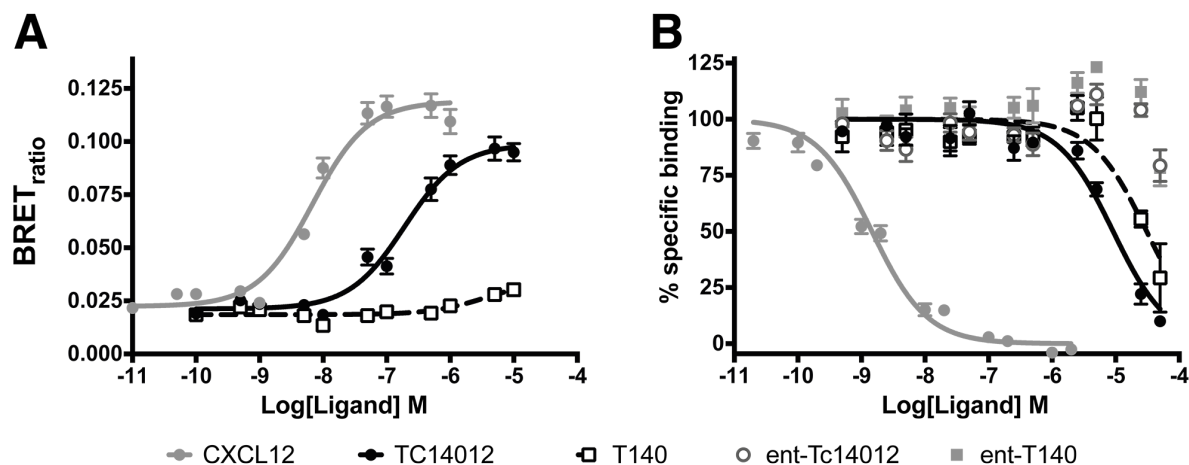


Figure 2.1. T140 is no CXCR7 agonist. (A) Induction of recruitment of arrestin to CXCR7 by TC14012 (black circles), T140 (empty squares), or CXCL12 (gray circles) was measured by the induction of BRET between CXCR7-YFP and β -arrestin2-RLuc. (B) Competition of TC14012 (black circles), T140 (black squares), CXCL12 (gray circles), and corresponding enantiomers [ent-TC14012 (empty circles) and ent-T140 (gray squares)] with radiolabeled CXCL12 for CXCR7 binding. The mean \pm the standard error of the mean of three independent experiments, each conducted in triplicate, is shown.

FIGURE 2.2

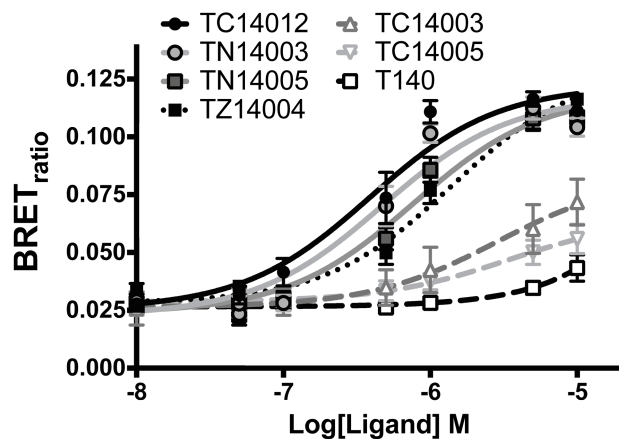


Figure 2.2. Recruitment of β -arrestin to CXCR7 by T140 analogues. Induction of recruitment of arrestin to CXCR7 by the analogues as tested by BRET. TC14012 (black circles) and TZ14004 (black squares), which is identical to the inactive T140 except for its amidated C-terminus, as well as TN14003 (gray circles) and TN14005 (gray squares) efficiently recruit arrestin. The Arg6 to Cit (TC14003, white pyramids) and Δ -Lys8 to Cit (TC14005, white triangles) substitutions have a limited effect, compared to T140 (white squares). The mean \pm the standard error of the mean of three independent experiments, conducted in triplicate, is shown.

FIGURE 2.3

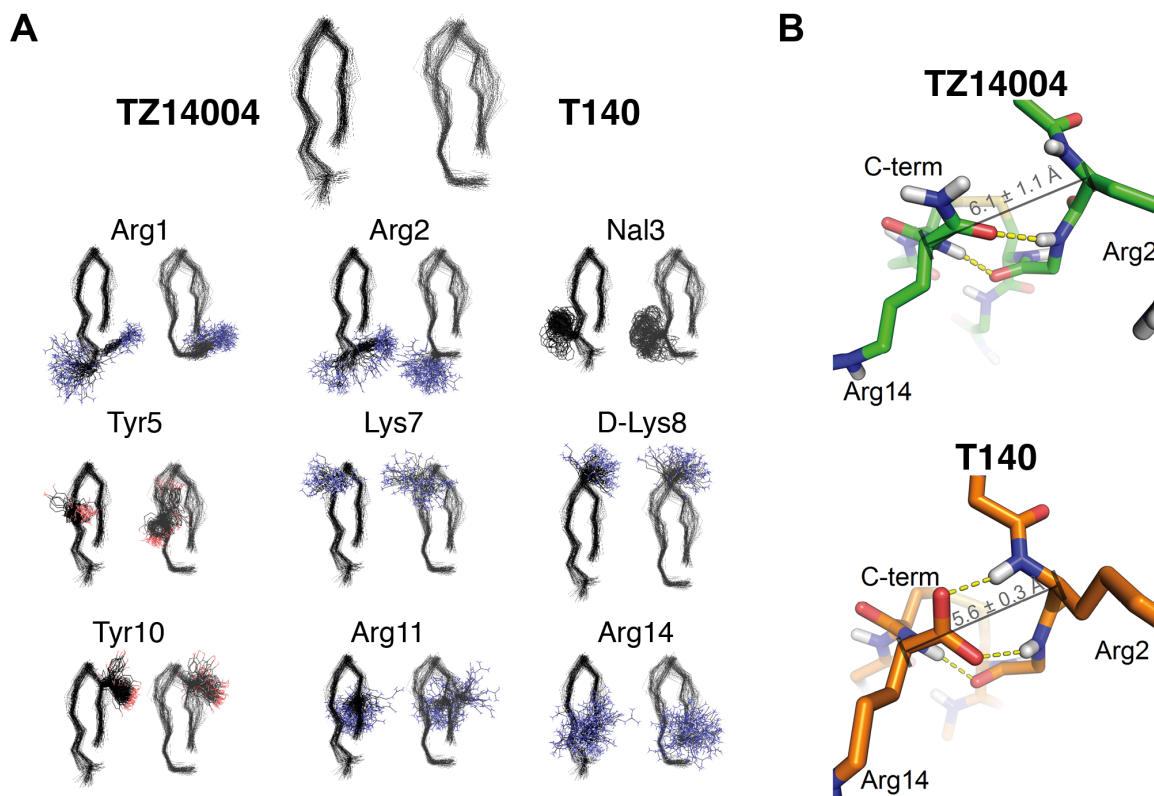


Figure 2.3. Conformations of TZ14004 and T140 in solution during MD simulations. (A) Comparison of the orientation of individual side chains for TZ14004 (black) on the left and T140 (dark gray) on the right. Four hundred structures covering 80 ns of MD simulations are superimposed. (B) Representative snapshots of the MD simulations showing the H-bonds (yellow dashes) formed between the C-terminal moiety of TZ14004 (green) or T140 (orange) and backbone amides. The average distance and standard deviation between the C α atoms of residues Arg14 and Arg2 during the MD simulations are shown. Backbones of ligands are shown as a thin trace and side chains as lines. Oxygen atoms are colored red, nitrogen atoms blue, hydrogen atoms white, and carbon atoms as indicated.

FIGURE 2.4

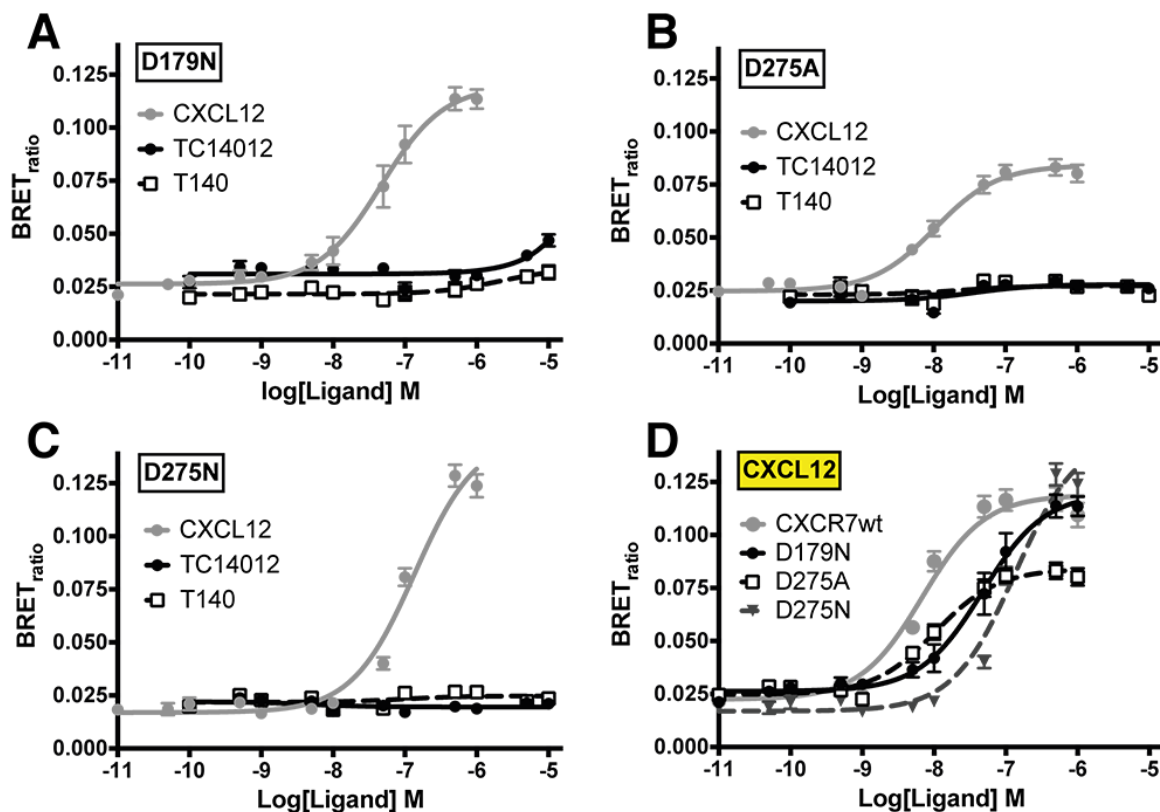


Figure 2.4. Recruitment of β -arrestin to CXCR7 D179A and D275 mutants. (A–C) Induction of recruitment of arrestin to CXCR7 mutants by T140 (white squares) and TC14012 (black circles), using CXCL12 (gray circles) as a control. (D) Differences in CXCL12 activity on mutants D179N (black circles), D275A (black squares), and D275N (gray triangles) compared to that of wild-type CXCR7 (gray circles). While D275N and D179N affect the potency of the response, D275A affects the efficacy. The mean \pm the standard error of the mean of three independent experiments, conducted in triplicate, is shown.

FIGURE 2.5.

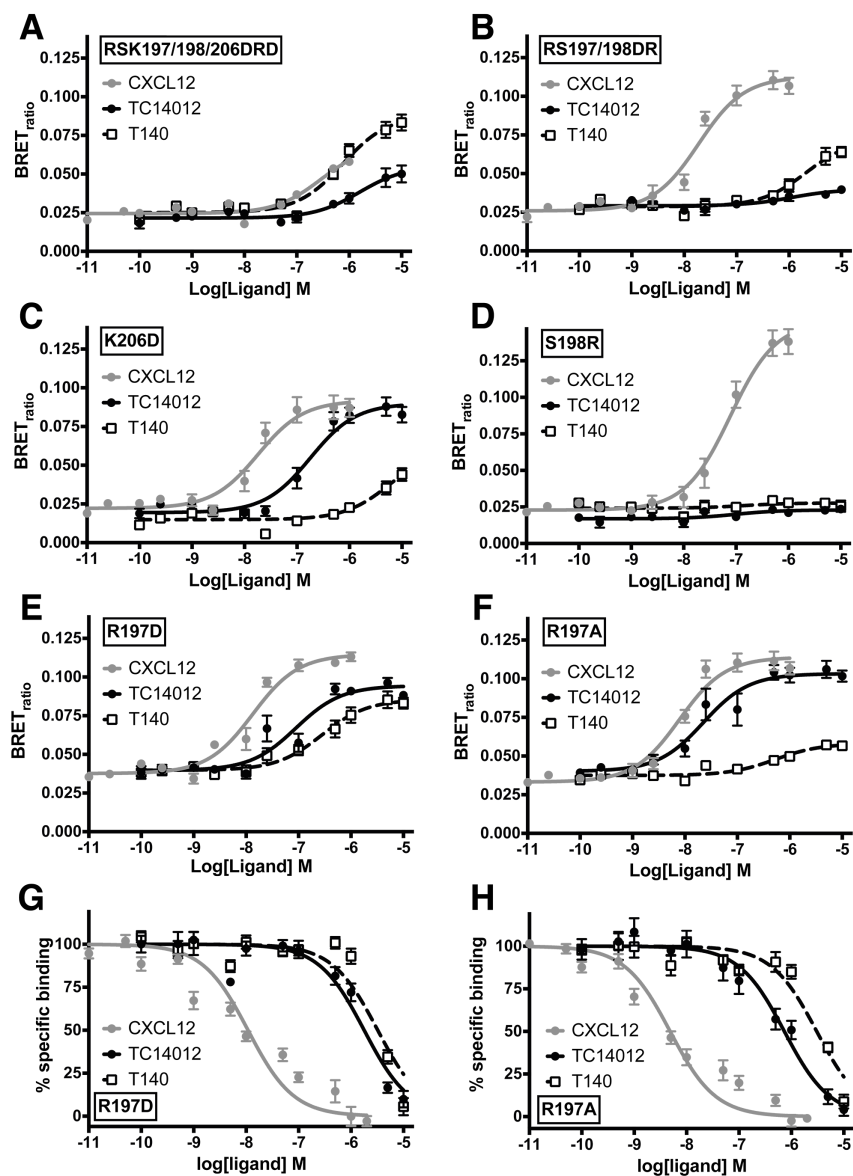


Figure 2.5. Recruitment of β -arrestin to CXCR7 ECL2 mutants. (A–F) Induction of recruitment of arrestin to CXCR7 mutants by T140 (white squares) and TC14012 (black circles), using CXCL12 (gray circles) as a control. Note the efficient response to T140 in panels A, B, and E. (G and H) Binding competition of CXCL12, TC14012, and T140 with radiolabeled CXCL12 for CXCR7 binding. The mean \pm the standard error of the mean of at least three independent experiments, conducted in triplicate, is shown.

FIGURE 2.6.

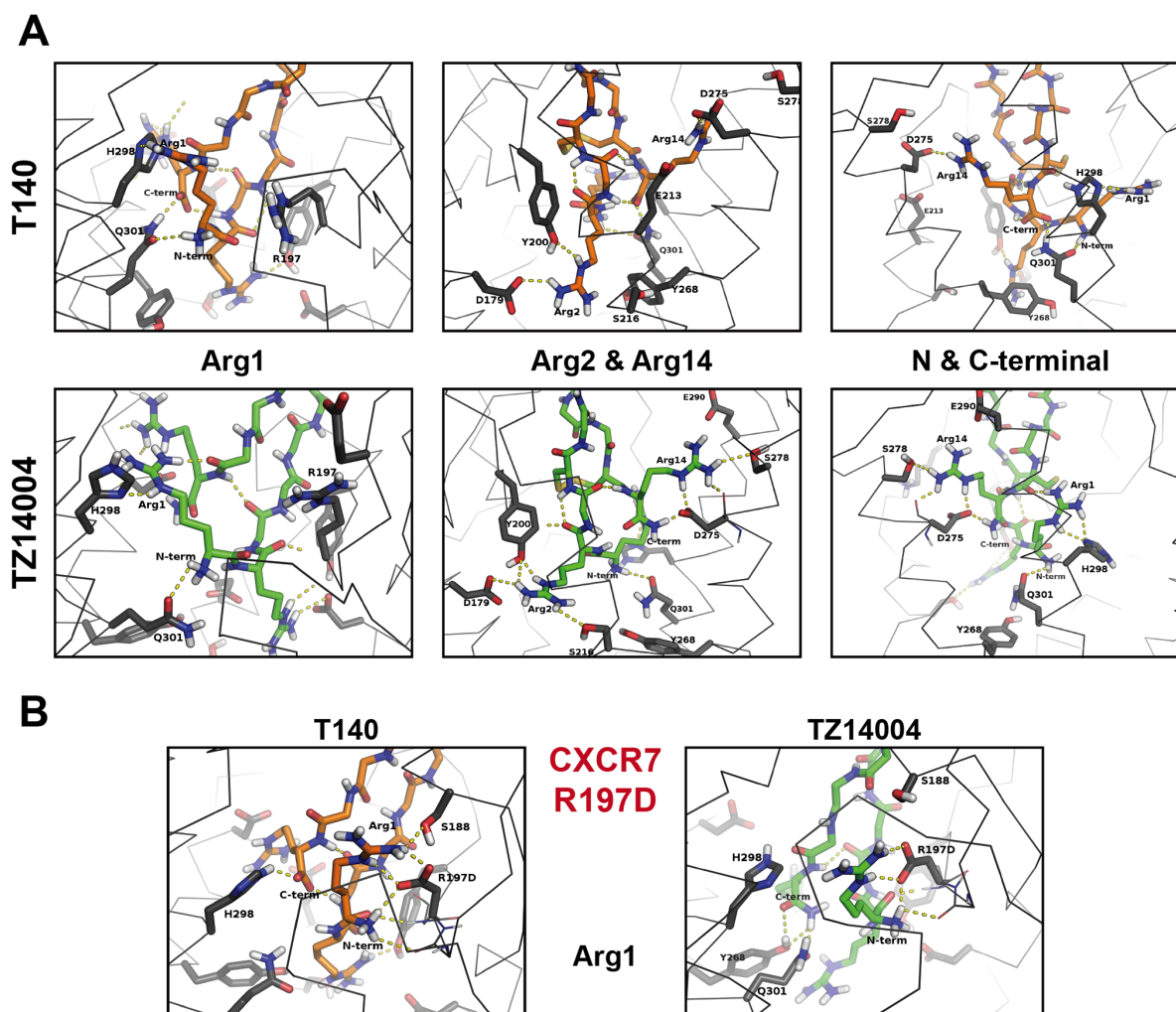
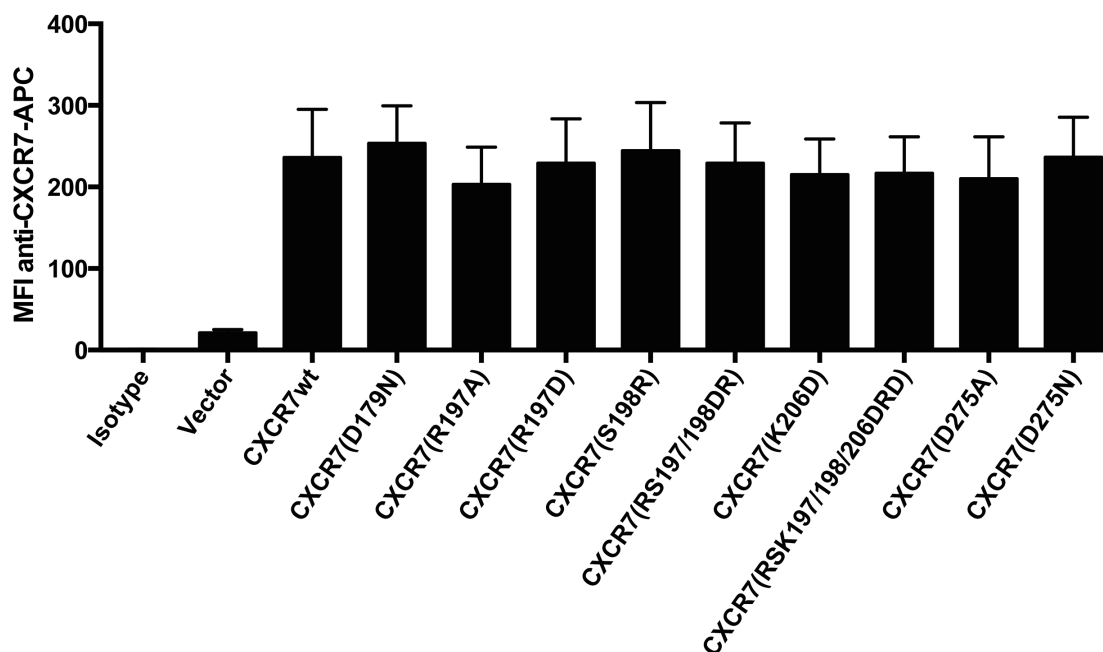


Figure 2.6. H-Bonds formed between ligands and CXCR7. Representative snapshots from MD simulations showing the polar environments and potential H-bond partners of the receptor (gray) stabilizing charged side chains of T140 (orange) and TZ14004 (green). (A) Arg1 and the N-terminal moiety can form H-bonds with H298 and Q301 (in TM7). Arg2 can form H-bonds with D179 (TM4), Y200 (ECL2), S216 (TM5), and Y268 (TM6). Arg14 can form H-bonds with D275 (TM6), S278 (TM6), and E290 (TM7). (B) In the R197D CXCR7 mutant receptor, the N-terminal Arg1 side chain can form H-bonds with D197.

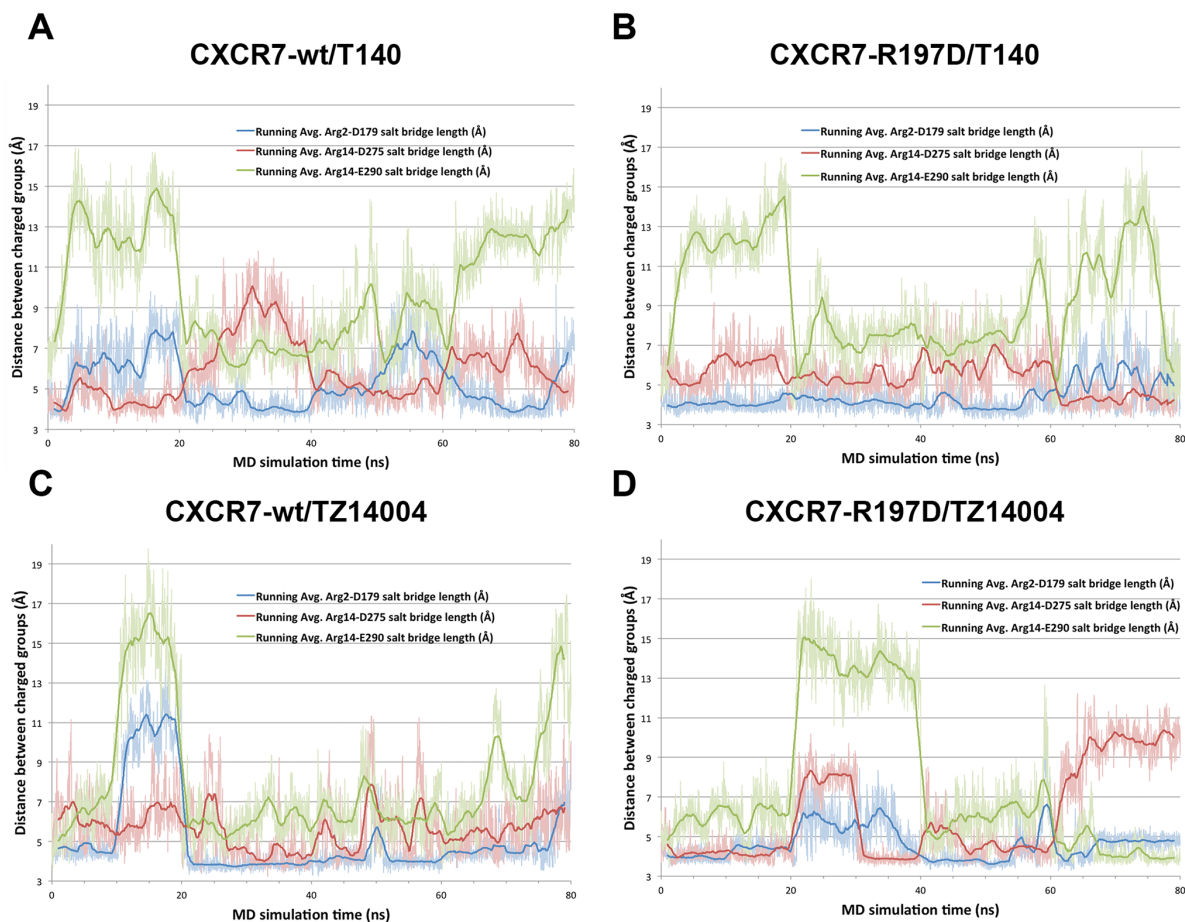
Supplemental data

SUPPLEMENTAL FIGURE 2.S1.



Supplemental Figure 2.S1. Surface expression of the CXCR7 Mutants. Cells were transfected as for BRET assays, and stained with the anti-CXCR7 antibody clone 358426 (R&D systems) directly coupled to allo-phycoyanin (APC). Receptor surface expression was measured by flow cytometry and is represented as mean fluorescence intensity (MFI).

SUPPLEMENTAL FIGURE 2.S2.



Supplemental Figure 2.S2. Salt bridge length during MD simulations. Each MD simulation is composed of four independent 20 ns trajectories with the same initial conformation. On the graphs, new trajectories start at 0 ns, 20 ns, 40 ns and 60 ns. The thin lines show the measured salt bridge length (1000 frames per 20 ns trajectory). The thick lines represent the running average over 100 frames of the trajectory. Red lines designate the length of the Arg14:D275 salt bridge; Blue lines designate the length of the Arg2:D179 salt bridge, and green lines designate the length of the Arg14:E290 salt bridge.

SUPPLEMENTAL TABLE 2.S1

Tables 2.S1. Analysis of salt bridges length during the MD simulations. Column highlighted in green represents the “best” trajectory discussed in the text, as determined by the sum of the length of both critical salt bridges (Arg2-D179 and Arg14-D275).

Trajectory #	WT-T140					R197D-T140					WT-TZ14004					R197D-TZ14004				
	1	2	3	4	All	1	2	3	4	All	1	2	3	4	All	1	2	3	4	All
time on graph (ns)	0-20	20-40	40-60	60-80	0-80	0-20	20-40	40-60	60-80	0-80	0-20	20-40	40-60	60-80	0-80	0-20	20-40	40-60	60-80	0-80
Arg2-D179 SB avg. length (Å)	6,19	4,23	5,83	4,76	5,25	4,05	4,21	4,06	5,21	4,38	7,51	3,87	4,21	4,86	5,11	4,20	5,48	4,21	4,55	4,61
Std dev (Å)	1,50	0,55	1,34	1,09	1,42	0,35	0,48	0,58	1,24	0,89	3,19	0,35	0,66	0,98	2,23	0,38	1,08	1,13	0,50	0,99
Arg14-D275 SB avg. length (Å)	4,49	7,63	5,04	6,21	5,84	5,84	5,30	6,02	4,47	5,41	6,16	4,97	5,70	5,73	5,64	4,21	5,85	4,70	9,21	5,99
Std dev (Å)	0,73	1,66	0,75	1,12	1,65	0,92	0,68	1,15	0,84	1,09	1,15	1,42	1,62	1,16	1,42	0,42	2,07	0,76	1,63	2,39
Sum of both SB length (Å)	10,68	11,86	10,87	10,97	11,10	9,89	9,50	10,08	9,68	9,79	13,67	8,84	9,91	10,59	10,75	8,41	11,33	8,91	13,76	10,60
Std dev (Å)	1,74	1,70	1,38	1,30	1,61	0,99	0,87	1,31	1,39	1,18	3,55	1,46	1,85	1,74	2,92	0,57	2,54	1,24	1,88	2,74
Both Arg2-D179 and Arg14-D275 SB < 5.0 Å (% of time)	25,6	3,4	15,9	7,4	13,1	18,9	33,2	18,5	41,3	28,0	8,6	66,4	45,3	26	36,6	92,3	23,4	61,6	4,1	45,4
Both Arg2-D179 and Arg14-D275 SB < 6.0 Å (% of time)	42,7	18,0	51,9	31,5	36,0	56,6	87,8	49,7	63,6	64,4	26,6	81,3	63,6	58,2	57,4	99,6	38,4	84,4	6,9	57,3
Avg. distance between Arg2-Arg14 carbon alpha atoms	6,69	5,45	5,56	5,60	5,83	6,31	6,02	5,51	6,72	6,14	6,42	6,14	7,69	6,06	6,58	8,98	5,80	7,58	6,86	7,31
Arg14-E290 SB avg. length (Å)	12,38	6,99	8,26	11,85	9,87	11,86	7,36	7,81	9,98	9,25	10,64	6,01	6,49	8,70	7,96	5,96	13,53	6,09	4,31	7,48
Std dev (Å)	2,36	0,92	1,69	1,97	2,92	2,32	1,33	1,61	3,18	2,87	4,52	0,92	1,14	3,08	3,38	0,89	1,79	1,21	0,70	3,77

Chapitre III - 2^e article

3.1 L'expression de CXCR4 et d'ACKR3 dans les B-LAL pédiatriques est prédictif de la survie des souris PDX

3.1.1 Mise en contexte

Dans les B-LAL pédiatriques, la prise en charge des patients est ajustée en fonction d'une multitude de marqueurs de stratification du risque de rechute. Grâce à cette méthode, le taux de survie sans complications sur 5 ans est passé au-delà de 85%. Cependant, le surtraitement des enfants cause des effets secondaires potentiellement mortels chez environ 25% des survivants dans les 25 ans suivant la rémission (Diller 2011; Armstrong et al. 2016; Turcotte et al. 2017). Une meilleure stratification du risque de rechute pourrait permettre la détection de candidats à une réduction de thérapie. Seulement, la découverte de nouveaux marqueurs de stratification dans le contexte où la thérapie guérit la majorité des enfants est difficile. Des évidences publiées récemment laissent croire que l'utilisation du modèle de souris PDX pourrait permettre l'identification des marqueurs de stratification novateurs, et ce, en absence de thérapie.

Dans mon deuxième article, j'ai contribué avec les Drs Helen Trottier, Élie Haddad et Nikolaus Heveker à la conception du projet. La compilation des données cliniques des patients a été accomplie par moi-même, Renée Dicaire, Thomas Sontag, Dr Daniel Sinnett, Dre Caroline Laverdière et Dr Jean-Marie Leclerc. Les données expérimentales ont été produites par moi-même, Kathie Béland et François Fontaine. L'interprétation des données a été effectuée par moi-même, Mohamed Ndongo Sangare, Kathie Béland, Dre Caroline Laverdière, Dre Helen Trottier, Dr Élie Haddad et Dr Nikolaus Heveker. J'ai également contribué à l'analyse statistique des données produites avec l'aide de Mohamed Ndongo Sangare, de la Dre Helen Trottier et du Dr Nikolaus Heveker. Tous les auteurs ont contribué à l'écriture du manuscrit.

CXCR4 and ACKR3 expression predict pediatric B acute lymphoblastic leukemia patient-derived xenograft mouse survival

Running title: Chemokine receptors predict PDX survival

Nicolas Montpas^{1,2}, Mohamed Ndongo Sangare^{1,3}, Kathie Béland¹, François Fontaine¹, Renée Dicaire¹, Thomas Sontag¹, Daniel Sinnett^{1,2,4}, Caroline Laverdière^{1,4}, Jean-Marie Leclerc^{1,4}, Helen Trottier^{1,3}, Élie Haddad^{1,4,5}, and Nikolaus Heveker^{1,2*}

¹Research Centre, Sainte-Justine University Hospital Center, Montréal, Québec, Canada;

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine,

³Department of Social and Preventive Medicine,

⁴Department of Pediatrics, and

⁵Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Québec, Canada

* To whom correspondence should be addressed: N.H.

This manuscript was submitted in Blood Advances.

Key points:

- High surface CXCR4 predicts short survival of childhood B-ALL PDX models, and high ACKR3 expression mitigates this effect
- PDX survival reflects individual risk markers, and may serve in identification of new risk stratification markers

ABSTRACT

Accurate individual risk assessment is required for optimal personalized treatment of pediatric B acute lymphoblastic leukemia. Patient-derived xenograft (PDX) mouse models reflect biological properties of primary leukemia samples, and PDX survival correlates with patient outcome. Here, we tested association of PDX survival with known and new risk stratification markers. Specifically, we tested prediction of PDX survival by genetic features (hyperdiploidy (HD), t(12;21)) or immunophenotypic markers (CD20, CXCR4, ACKR3). 33 diagnostic pediatric B-ALL bone marrow samples were grafted into NSG mice. PDX survival was highly variable (6 to 73 weeks), but reproducible among replicate animals. None of the six samples associated with the shortest survival (<11 weeks) were HD or carried the t(12;21) translocation ($p = 0.0451$). High, intermediate, or low CD20 surface expression identified samples that led to short, intermediate, or long PDX survival, respectively ($p = 0.0002$). Standardized quantification of CXCR4 expression revealed high variability among samples; high surface CXCR4 predicted shorter survival ($p = 0.0083$), while intracellular CXCR4 did not correlate with survival. Most samples also expressed ACKR3, the second receptor of the CXCR4 ligand CXCL12. ACKR3 alone did not predict PDX survival; however, high ACKR3 expression mitigated the association of high surface CXCR4 expression with short survival ($p = 0.0012$). Combination of chemokine receptor expression with genetic markers further improved the identification of samples leading to short PDX survival ($p < 0.0001$). Our results show that PDX models can identify and validate risk stratification markers in the absence of treatment, and thus contribute to optimal personalized treatment.

INTRODUCTION

Childhood B-ALL is the most common pediatric cancer. Despite remarkable outcome improvement, 10-20% of patients relapse within 5 years ¹. Treatment intensification for patients that are highly at risk to relapse can be expected to extend long-term survival rates. On the other hand, long-term sequelae of chemotherapy can profoundly affect the quality of life of childhood B-ALL survivors. Therefore, treatment reduction may be an option for low-risk patients. Precise individual risk-determination is mandatory to avoid undertreatment of high-risk individuals ². Personalized treatment according to individual risk will further improve patient outcomes and quality of life, for patients at both ends of the risk scale. Ever-refined patient risk stratification will thus be pivotal to inform the choice between treatment options.

Specific genetic aberrations have been associated with the clinical outcome. High hyperdiploidy (>50 chromosomes) ^{3,4}, and the t(12;21)[ETV6/RUNX1] rearrangement represent together nearly half of the chromosomal anomalies encountered in pre-B cALL and are associated with a favorable outcome ^{5,6}. Other subtypes, such as t(9;22)[BCR/ABL1] are seen at much lower frequencies (<10%) and are associated with intermediate-to-poor outcomes ^{7,8}. Despite the availability of these chromosomal markers, accurate patient risk stratification is an ongoing challenge. The value of phenotypic markers, such as CD20 in childhood B-ALL, is a matter of debate ⁹⁻¹⁴, and it is probable that therapy improvement and intensification conceal outcome differences between the intrinsically more, or less, aggressive biological properties of individual leukemias. However, this distinction is needed to identify patients that might benefit from therapy reduction versus those that therapy reduction may put at risk ². Contrary to clinical outcome data, which are a function of therapeutic regimens, PDX models may permit risk marker evaluation in the absence of treatment.

Patient-derived xenograft (PDX) mice models have been shown to reflect the biological properties of their respective donor leukemia ¹⁵⁻¹⁹, suggesting they might be useful for risk stratification. Indeed, the excellent correlation of PDX time to overt leukemia (TTL) and survival with patient relapse risk and overall survival in two recent

independent studies using SCID/NOD or NSG PDX models highlights the potential of these models for risk stratification²⁰⁻²². This provides the opportunity to interrogate known and new risk markers as proxies for PDX survival.

Here we present the association of known and new risk markers with PDX survival. Besides specific genetic aberrations and CD20 expression, we test the risk association of receptors for the key chemokine CXCL12, namely CXCR4 and ACKR3 (also known as CXCR7).

We report that the absence of frequent genetic aberrations HD and t(12;21) predicted short PDX survival. Expression of the differentiation marker CD20 identified three risk groups, in which high CD20 expression associated with short PDX survival, and very low CD20 expression with long survival. High surface, but not intracellular, CXCR4 expression associated with short survival. This association was however mitigated by co-expression of high levels of ACKR3, which itself did not predict PDX survival. Finally, combination of genetic markers with chemokine receptor expression defined criteria that further improved the prediction of short PDX survival ($p < 0.0001$).

METHODS

Pediatric B-ALL samples

This study was approved by the institutional review board (protocols CER#3527 & CER#3579). Written informed consent was obtained from the patients and/or their parents. Bone-marrow samples were obtained at initial diagnostic for 33 patients with de novo B-ALL. Initial risk classification was based on the Dana Farber Cancer Institute (DFCI) criteria²³; standard risk (SR) was defined by age < 10 years, white blood cell count $< 50\,000/\mu\text{l}$, no CNS involvement (CNS1-2), and no adverse cytogenetic features. High risk (HR) was defined by age (HR ≥ 10 years) or white blood cell count $> 50\,000/\mu\text{l}$, or CNS involvement (CNS-3 and no adverse cytogenetic features); very high risk (VHR) was defined by high minimal residual disease (MRD) $> 0.001\%$ at the end of induction therapy (day 32) or adverse cytogenetic features (t(9;22), MLL gene rearrangements, hypodiploidy (< 45 chromosomes))²³⁻²⁵. Patients

characteristics are listed in Table 3.1. Cells from the samples were isolated by Ficoll-Paque and frozen in liquid nitrogen until use (FBS, 10% DMSO). On the day of the experiment, the cells were thawed at 37°C and washed twice in PBS before being injected into NSG mice or stained for flow cytometry analysis.

Flow cytometry, CXCR4 and ACKR3 quantification

Ficoll-isolated cells from bone-marrow sample were analyzed by flow cytometry. Prior to staining FC receptors were blocked in PBS 20% FBS at 4°C for 15 minutes. Cells were then washed and stained with 7-AAD to exclude dead cells from the analysis, and labelled with antibodies against CD10 (FITC, clone HI10a, Biolegend), CD19 (HV500, clone HIB19, BD Biosciences) and CD20 (APC, clone 2H7, Biolegend). For CXCR4 and ACKR3 surface expression, anti-CXCR4 (PE, clone 12G5, Biolegend) antibodies or anti-CXCR7 (PE, clone 11G8, R&D systems) were added to that mix. For the analysis of CXCR4 or ACKR3 expression in permeabilized cells, the cells were washed and fixed with CytoFix/Cytoperm™ (BD Biosciences, CA) after the initial surface staining of CD10, CD19 and CD20. Samples were analyzed by flow cytometry (LSR Fortessa, BD Biosciences, CA). CXCR4 mean fluorescence intensity (MFI) was converted to antibodies bound per cell (ABC) using standard curves established with QuantiBRITE™ PE beads (BD Biosciences, CA) at each analysis. Leukemia blast cells were identified by gating CD10⁺CD19⁺ double positive cells.

NSG xenograft mice model

This work was approved by the institutional animal ethics committee (protocol CIBPAR #485/576) according to Canadian Council on Animal Care. Non-obese diabetic severe compromised immunodeficient (NOD-scidIL2gamma^{null} or NSG) mice were obtained from Jackson Laboratory (Stock #005557). NSG mice aged 8-12 weeks were injected in the lateral tail vein with 0.6 to 5 x 10⁶ cells isolated from bone-marrow sample. One, two or three animals per sample were injected (15, 10, and 8 samples, respectively), depending on the quantity of cells available from the sample. The progression to overt leukemia (time to leukemia, TTL) and survival were highly

reproducible in replicate animals, where available (Figure 3.1B); mean values of replicates were thus used to define TTL or survival for any given sample. TTL was monitored by monthly bleeding and flow cytometry (FACSCanto, BDBiosciences, CA) for up to 73 weeks. Circulating human and mouse cells were identified by labelling with antibodies against human CD45, CD10 and CD19 (hCD45-APC clone HI30, hCD10-PE-Cy7 clone HI10a, hCD19-PE clone HIB19; Biolegend, CA), and murine CD45 (mCD45-FITC clone 30-F11, BD Biosciences, CA). The quantification was performed with CountBright Absolute Counting Beads (Thermo Fisher Scientific, MA) according to manufacturer's instructions. Overt leukemia was defined by the presence of >1% of human circulating cells. Mice were sacrificed upon reaching observational endpoints, and autopsy was carried out to establish the presence of splenomegaly (defined as five-fold spleen enlargement).

Statistical analysis

Kaplan-Meier technique was used to estimate survival time and TTL according to the indicated biomarker. We used the log-rank test to assess the significance of differences in survival time according to risk markers; Wilcoxon test was used when the data did not meet the requirements for a parametric testing. Finally, Student T-test was used for comparison of continuous variables between dichotomised biomarkers, and Pearson r correlation was used to measure the degree of the relationship between time to leukemia and animal survival. Data analysis was performed using GraphPad Prism 7 and STATA 13 software.

RESULTS

Patient characteristics

The characteristics of the patients are presented in Table 3.1. SR classification was met in 22/33 (66.7%) patients. HR classification was met in 8/33 (24.2%) patients; and two patients (6.1%) were classified as VHR: one for the t(9;22) translocation, and one for MRD >0.001% after induction therapy at day 32. Two patients relapsed during

the maintenance phase of therapy; one with high age risk (>10), and one carrying the t(9;22) translocation.

Patient-derived xenograft NSG mice

When injected into the tail vein of NSG mice, samples from 24/33 patients (72.7%) led to overt leukemia, with splenomegaly at autopsy detected in all animals. 3/33 (9.1%) of the samples led to splenomegaly without overt leukemia, while samples from 6/33 (18.2%) patients entailed neither, and thus failed to engraft. Time to overt leukemia and animal survival strongly correlated (Pearson r : 0.9087; $p < 0.0001$) and were highly reproducible between replicates injected with the same sample (Figures 3.1A and 3.1B), but were highly variable between samples (TTL: median 142 days, (interquartile range (IQR) = 74.5-208); survival: median 203 days, (IQR = 125.5-280)). Neither TTL nor survival correlated with demographic factors or risk classification (Figure 3.1C). Given that survival was recorded daily, but TTL only every four weeks, we focused our analyses mainly on PDX survival as the more accurate measure.

Impact of genetic aberrations on PDX survival

We analyzed whether PDX survival reflected the presence of specific genetic aberrations. In our sample, 15/33 (45.5%) carried the t(12;21) translocation, and 9/33 (27%) were hyperdiploid (HD; >50 chromosomes). Average survival of PDX mice from t(12;21) or HD samples was similar to the bulk of the samples (median_{t(12;21)} 203 d, IQR = 168-275 d; median_{HD} 273 d, IQR = 195.5-324.5 d). Accordingly, none of the six samples with the shortest survival were t(12;21) or HD. Rather, all short surviving PDX animals had been injected with samples from the remaining “others” group (non-t(12;21) and non-HD, 9/33 (27%): median 68 d, IQR = 48-287 d), and represented the majority of this group (6/9 (67%)). The “others” group also comprised the highest proportion of HR or VHR samples (6/9, 67%, including the sole t(9;22) sample); compared to 2/15 (13%) in the t(12;21) group, and 2/9 (22%) in the HD group). Inversely, the six samples that failed to engraft were either HD or t(12;21) positive (three of each), but none fell into the “others” group. Therefore, short survival

associated with absence of the t(12;21) translocation and hyperdiploidy (Wilcoxon test with $p=0.0451$, Figure 3.2).

Association of sample CD20 expression with PDX survival

We then tested the impact of the differentiation marker CD20. CD20 expression was heterogeneous between samples and ranged from zero to >80% of positive blasts (Figure 3.3A). We found significant inverse linear correlation between the percentage of CD20⁺ cells and PDX survival (Pearson $r = -0.436$, $p=0.011$; Figure 3.3B), associating a high percentage of CD20⁺ cells with shorter survival. When using the traditional arbitrary cutoff of 20% for analysis, a trend for shorter survival was observed in samples with high CD20 expression, but this was not statistically significant (log-rank test; $p=0.15$, Figure 3.S1). We thus systematically tested all possible cutoffs, and found separate clusters of significance around the cutoffs at 10% and 37% of CD20-positive cells (Table 3.S1). Accordingly, when these cutoffs were used to define three groups, differences in survival were found highly significant ($p=0.0002$) (Figure 3.3C). CD20 expression by <10% of the sample defined a low risk group (median 279 days, IQR=213-397), >37% correlated with high risk (median 87.5 days, IQR =63.5-150.3), and CD20 expression by 10-37% of the cells identified intermediate risk (204 days, IQR =171-280).

Association of chemokine receptor CXCR4 and ACKR3 expression with PDX survival

In most samples, over 95% of the cells expressed the chemokine receptor CXCR4 (29/33); we thus quantified standardized CXCR4 density, expressed as antibodies bound per cell (ABC). CXCR4 density was found indeed highly variable among samples, ranging from <2000 – >20 000 ABC at the cell surface (median 9 581; IQR = 4 900-15 520), and <15 000 - >1 000 000 ABC after permeabilization (median 135 902, IQR = 54 125-300 860) (Figures 3.4A and 3.S2). This suggests that the bulk of CXCR4 is not displayed at the cell surface. CXCR4 surface expression intensity directly correlated with TTL (Pearson $r: -0.3624$, $p=0.0415$, Figure 3.4B). For grouped analysis of survival, we again based cutoffs defining CXCR4^{high} and CXCR4^{low}

samples on systematic cutoff analysis rather than arbitrarily set cutoffs (Table 3.S2 & 3.S3). As shown in Figure 3.4C, high CXCR4 surface expression intensity (>5 100 ABC) associated with significantly shorter PDX survival (median_{CXCR4low} 310 days, IQR = 174.5-397; median_{CXCR4high} 200.5 days IQR = 108-266; log-rank test: p=0.0083). CXCR4 staining intensities after permeabilization did not correlate with survival (Figure 3.S2), consistent with only surface-expressed CXCR4 mediating signals that contribute to short PDX survival.

Expression of the chemokine receptor ACKR3 was detected on the majority of the samples. ACKR3 expression was highly variable among samples, and was thus expressed as the percentage of positive cells. ACKR3 expression did not correlate with CXCR4, but was similarly distributed in CXCR4^{high} and CXCR4^{low} samples (p=0.189 without permeabilization, and p=0.583 with permeabilization, Figure 3.5A). ACKR3 expression alone did not significantly correlate with PDX survival, at any cutoff, regardless whether the receptor was detected on the cell surface or after permeabilization (Tables 3.S4, 3.S5, and 3.S6). However, when systematic threshold determination for ACKR3 expression was limited to the CXCR4^{high} subset of samples, a cluster of significant thresholds was identified in the range of 40-50% ACKR3-positive cells (Table 3.S7). As shown in Figure 3.5B, ACKR3 expression by >40% of the cells identified samples within the CXCR4^{high} population that resulted in significantly longer survival than CXCR4^{high} samples with low ACKR3 expression (median_{ACKR3high} 274 days, IQR = 183-281; median_{ACKR3low} 170 days, IQR=69-203 days; p=0.0269). Therefore, it appeared that high ACKR3 expression was effectively opposing the effect of high surface CXCR4 expression. Accordingly, comparison of survival between the groups (CXCR4^{high} and ACKR3^{low}: median 170 days, IQR=69-203 days) and (CXCR4^{low} or (CXCR4^{high} and ACKR3^{high}): 275 d, IQR=187-334 days) improved the identification of short survivors (p=0.0012) (Figure 3.5C).

To further optimize the prediction of short PDX survival, we then combined these criteria with the previous observation that all short-surviving animals were neither HD, nor had the t(12;21) translocation. Formulated in this way, the criterion (non-t(12;21)

and non-HD and (CXCR4^{high} and ACKR3^{low}) identified five out of the six samples leading to short PDX survival, while none of the samples resulting in intermediate or long survival met this criterion ($p < 0.0001$; Figure 3.6).

DISCUSSION

We here showed that PDX models for childhood B-ALL mirror known associations of molecular markers and risk, and thus may serve as models to evaluate new risk-stratification markers. This is consistent with PDX models as generally reflecting individual patient outcome, as previously suggested for B-ALL²⁰⁻²², as well as for AML^{26,27}.

The t(12;21) translocation and hyperdiploidy (HD) occur frequently in childhood B-ALL and associate with better clinical outcome^{1,28-34}. It was proposed that this favorable prognosis may be in part due to high drug sensitivity^{35,36}. However, our PDX data mirror this favorable prognosis in the absence of treatment, and the absence of both HD and the t(12;21) translocation (i.e. the “others” group) associated with the shortest PDX survival (Figure 3.2). This is in line with a previous report, where t(12;21) leukemias were associated with long time to overt leukemia in PDX²². The favorable outcome in the PDX model thus suggests that excellent drug sensitivity is not the only mechanism underlying the favorable prognosis, but rather that the observed better outcome also reflects treatment-independent properties of t(12;21) and HD B-ALL. Inversely, the sole very high-risk t(9;22) translocation sample in our study, led to PDX models which were among those with shortest survival (51.5 ± 3.5 days); this patient relapsed during the study. Moreover, the sample from the second patient that relapsed during our study also led to short PDX survival (44 days).

The potential of CD20 as a prognostic marker in pediatric B-ALL remains matter of debate, but is widely accepted in adult B-ALL^{37,38}. While an early study with 1231 patients suggested prognostic significance of CD20⁹ also in pediatric B-ALL, this was not confirmed in a number of subsequent smaller studies¹⁰⁻¹⁴. It is possible that the progressive development of highly efficient intensified treatment regimens contributed

to conceal the initially reported difference in patient outcome ^{9,13,39}. However, our systematic cutoff analysis also suggests that arbitrarily set cutoffs may fail to capture substantial effects. Indeed, both lower and higher valid cutoffs at 10% and 30% have been noted before ^{9,37}, but were not used in most studies. In any case, our results suggest that high CD20 expression by B-ALL samples indeed associates with biological properties leading to short PDX survival. High CD20 expression may thus designate a patient subset for which therapy reduction should be approached with much caution.

Our data suggest that PDX model survival reflects the association of high CXCR4 expression with higher risk. The potential of CXCR4 expression as a proxy for clinical outcome has been mainly established in AML. Overall CXCR4 expression is rather weak in AML compared to B-ALL, and not all cells are positive. Indeed, quite a number of studies identify high CXCR4 expression (mostly as defined % of positive cells) in AML as a negative prognostic factor ⁴⁰⁻⁴⁷. With few exceptions, B-ALL samples are 100% positive for CXCR4 ⁴⁸, which renders the quantification as percent of positive cells meaningless. Rather, the standardized quantification of staining intensity is required. Unfortunately, this parameter is reported in very few B-ALL studies. One early study found a link between intense CXCR4 staining and extramedullary infiltration ⁴⁹. Schneider et al reported reduced CXCR4 expression on cells from pediatric patients with prolonged disease-free survival ⁵⁰. Konoplev et al found phosphorylated, but not total surface CXCR4 expression associated with reduced survival ⁵¹, whereas total CXCR4 protein as determined by a reverse phase protein array was reported to be a prognostic marker for pediatric BCP-ALL in a recent study ⁵². Finally, Ko et al found the highly variable surface CXCR4 staining intensities to correlate with patient disease-free and overall survival in adult, but not pediatric B-ALL patients ⁵³. Our data are largely in line with these reports.

Our work is the first to report ACKR3 protein expression by primary lymphoblastic leukemia cells. Recently, ACKR3 expression was reported in AML ^{54,55}. ACKR3 is the second, atypical receptor of the sole CXCR4 chemokine ligand, CXCL12. ACKR3

does not mediate chemotaxis, but scavenges CXCL12 with high efficiency⁵⁶. Our finding that high ACKR3 protein expression counteracts the association of high CXCR4 expression with short survival may be mechanistically explained by its physical and functional interaction with CXCR4, and modulation of CXCR4 activity^{57,58}. Alternatively, CXCL12 scavenging by ACKR3 may attenuate CXCR4 function on B-ALL cells. Similar observations have been made in colorectal cancer, where ACKR3 alone lacked predictive value, but absence of ACKR3 in presence of high CXCR4 identified shorter relapse-free survival⁵⁹. Inversely, either high ACKR3 or high CXCR4 independently associated with shorter survival in renal cell carcinoma⁶⁰.

The combination of markers, i.e. of the absence of the t(12;21) translocation and hyperdiploidy with high CXCR4 and low ACKR3 expression, significantly improved identification of samples that led to short PDX survival. The observation that this algorithm did not designate any of the samples that led to longer survival suggests that the combination of markers may hold promise to increase the accuracy with which high-risk samples can be identified.

Our study carries a few limitations. Clearly, the restricted sample size (n=33) limited the power of analysis when combining different markers. As a perspective, the assessment of multiple markers in combination will require accordingly increasing sample size.

Another limitation of our study is the absence of associated patient outcome data. This is due to the long observational timeframe required to establish clinical outcome in B-ALL, where less than 20% of the patients eventually relapse. Therefore, ideally, future retrospective studies should analyze diagnostic samples of a larger cohort of pediatric B-ALL patients and include patient outcome as a parameter.

Overall, our study illustrates the potential of PDX models for the validation of risk markers in the absence (and, potentially, the presence) of treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by grant MOP123421 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to NH, grant MOP300086 from the CIHR to EH, and by funds from the Charles-Bruneau Foundation. NM acknowledges scholarships from FRQS and the Cole Foundation. MNS holds a PhD scholarship from Islamic Development Bank (IDB) and from the “Réseau maladies infectieuses et Sida” of the Fonds de la Recherche du Québec en Santé (FRQ-S). HT holds a salary award from FRQ-S and New investigator salary award from Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

AUTHORSHIP

Contributions: Designed research: NM, HT, EH, NH; Performed research: NM, KB, FF; Collected data: NM, KB, FF, RD, TS, DS, CL, JML; Analyzed and interpreted data: NM, MNS, KB, CL, HT, EH, NH; performed statistical analysis: NM, MNS, HT, NH; wrote the manuscript with input from all other authors: NH. The authors declare no competing financial interest.

Correspondence: Nikolaus Heveker, Research Centre, Saint-Justine Hospital, 3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal H3T 1C5, Canada.

Tables & figures

Table 3.1. B-ALL patients characteristics

		Total	
		No.	%
Total		33	100
Sex	Female	18	55
	Male	15	45
Age	1 < 9 years	27	82
	<1 or ≥10	6	18
Genetic aberration	t(12;21)	15	46
	HHD	9	27
	t(9;22)	1	3
	Others	8	24
WBC count	<50 (1000/μL)	32	97
	>50 (1000/μL)	1	3
CNS involvement	1 (no WBC in CSF)	29	88
	2 (<5 WBC/μL in CSF)	3	9
	3 (>5 WBC/μL in CSF)	1	3
MRD	MRD-HR	1	3
	MRD-non-HR	0	0
	No	32	97
Relapse	Relapse-HR	2	6
	Relapse-non-HR	0	0
	No relapse	31	94
Final risk groups	Standard	23	70
	HR	8	24
	VHR	2	6

*WBC = White blood cells; CNS = Central nervous system; CSF = Cerebrospinal fluid; MRD = Minimal residual disease; HR = High risk; VHR = Very high risk

FIGURE 3.1

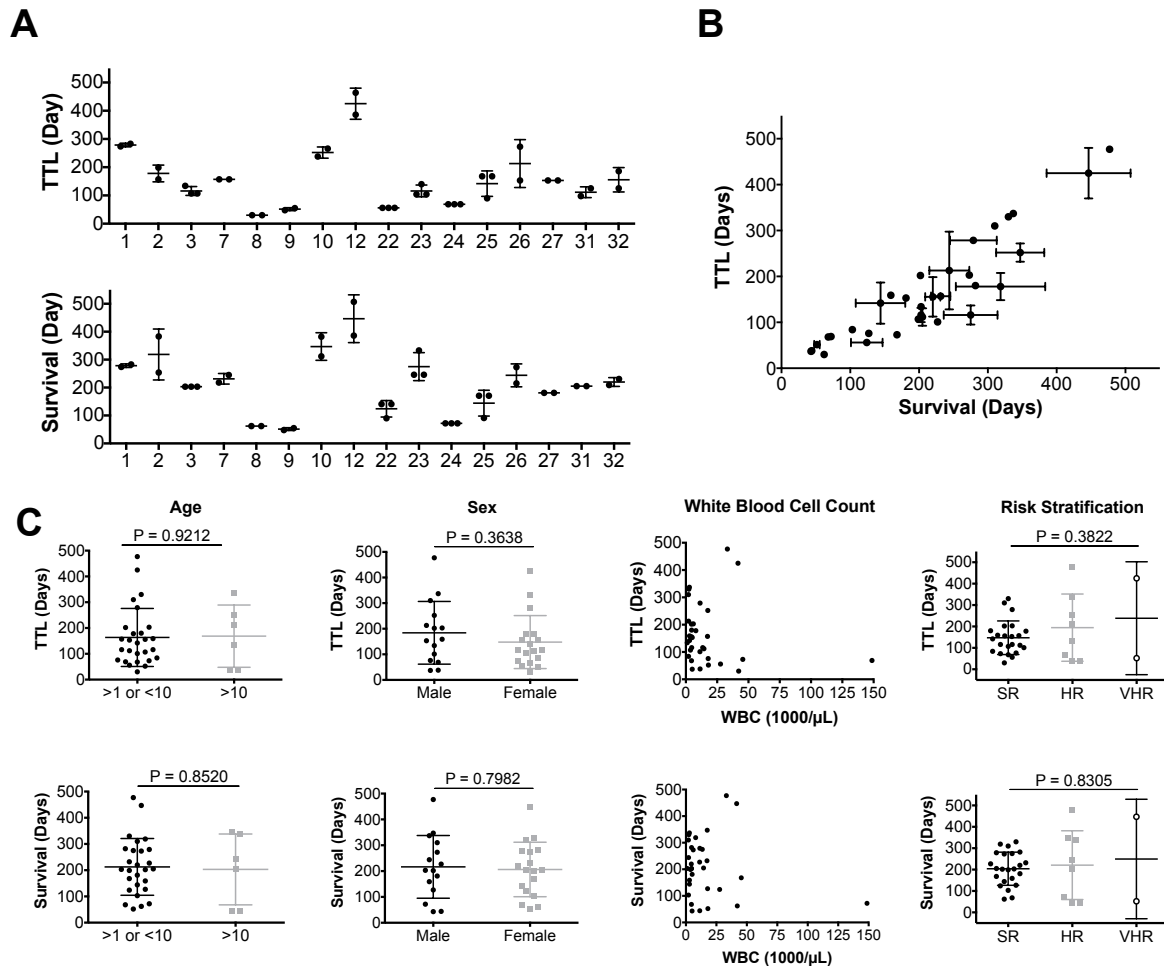


Figure 3.1. Replicates of PDX TTL and survival are highly reproducible and correlate, but do not correlate with demographic or risk factors. A) Mean TTL (upper panel) and survival (lower panel) of replicate recipient mice are highly reproducible (only samples with two or three replicate animals are shown, $n=16$). B) Correlation between TTL and survival (Pearson $r = 0.9087$; Two-tailed p value <0.0001). C) Neither TTL (upper panels) nor survival (lower panels) correlate with the age risk (left; t-test $p_{\text{TTL}} = 0.9212$, $p_{\text{survival}} = 0.8520$), sex (mid-left; $p_{\text{TTL}} = 0.3638$, $p_{\text{survival}} = 0.7982$), WBC count (mid-right; Pearson $r_{\text{TTL}} = -0.1059$, $p_{\text{TTL}} = 0.5576$; Pearson $r_{\text{survival}} = -0.1487$, $p_{\text{survival}} = 0.4090$) or standard risk classification (right; one-way ANOVA $p_{\text{TTL}} = 0.3822$, $p_{\text{survival}} = 0.8305$). Mean \pm SD are shown (WBC, white blood cell; SR, standard risk; HR high risk; VHR very high risk).

FIGURE 3.2

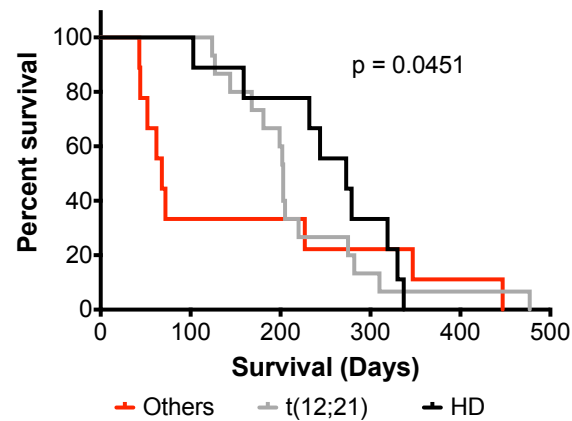


Figure 3.2. Absence of both hyperdiploidy and the t(12;21) translocation predict short PDX survival. Kaplan-Meier plot of HD samples (nine samples, black; median 39 weeks/273 days; IQR = 196-325 days), samples carrying the t(12;21) translocation (fifteen samples, grey; median_{t(12;21)} 29 weeks/203 days; IQR = 168-275 days), and samples that had neither t(12;21) nor were HD (“others”, nine samples, red; median 9 weeks/68 days; IQR = 48-287 days). Analysis was performed using Wilcoxon test (p = 0.0451).

FIGURE 3.3

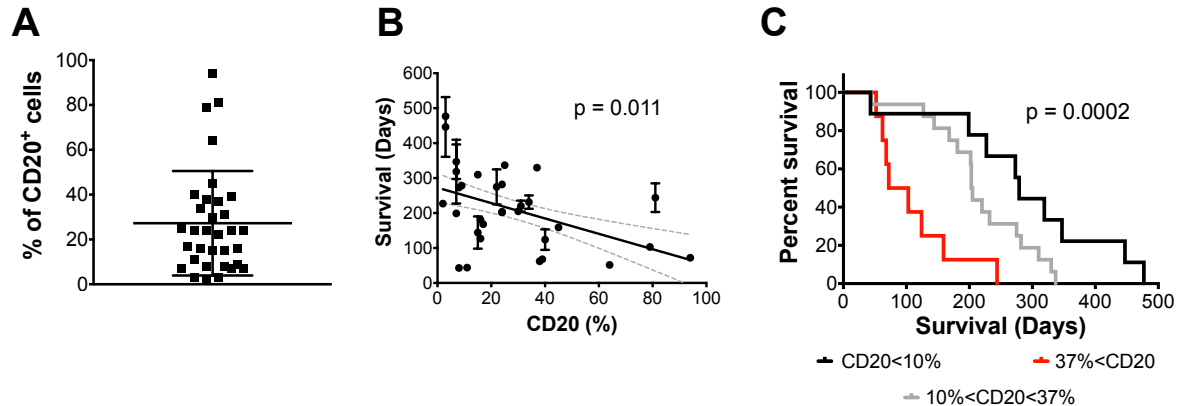


Figure 3.3. CD20 expression predicts PDX survival. A) The proportion of CD20⁺ cells expressed as percentage, measured by flow cytometry, is highly variable among samples. B) The percentage of CD20⁺ cells directly correlates with PDX survival (Pearson $r = -0.436$; two-tailed p value = 0.011). C) Kaplan-Meier plot of PDX survival in groups grafted with CD20^{low} (<10% CD20 positive cells, $n=9$; black; median 39 weeks/279 days; IQR=213-397 days), CD20^{intermediate} (10-37% CD20 positive cells, $n=16$; gray; median 29 weeks/204 days; IQR = 171-280 days) and CD20^{high} (>37% CD20 positive cells, $n=8$; red; median 12 weeks/87.5 days; IQR = 64-150 days) samples. Log-rank test ($p = 0.0002$).

FIGURE 3.4

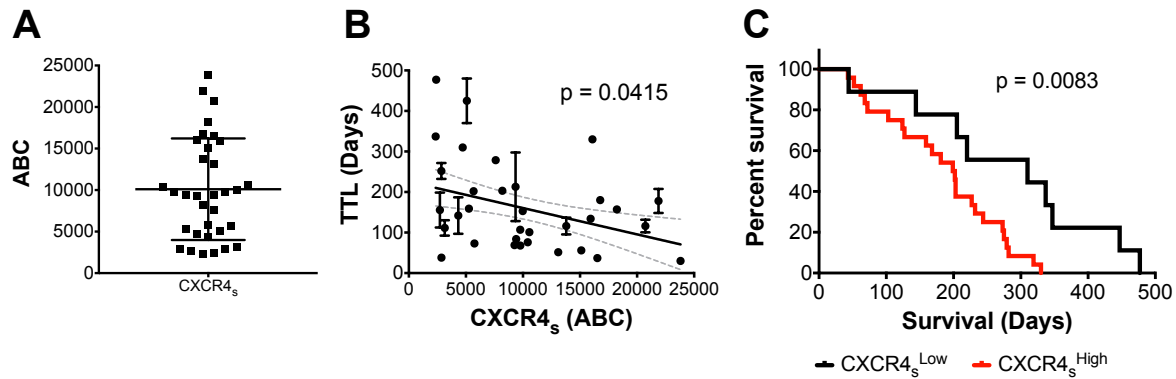


Figure 3.4. Surface expression of CXCR4 predicts survival of PDX mice. A) Variability of CXCR4 surface expression by diagnostic pediatric B-ALL samples as measured by standardized flow cytometry, expressed as antibodies bound per cell (ABC) (n=33). B) Correlation between CXCR4_s expression and PDX TTL (Pearson $r = -0.3624$; Two-tailed p-value = 0.0415). C) Kaplan-Meier plot of PDX survival in CXCR4_s^{low} (n=9; black; median 44 weeks/310 days; IQR = 175-397 days) and CXCR4_s^{high} (n=24; blue; median 28 weeks/201 days; IQR = 108-266 days) groups. Log-rank test (p = 0.0083).

FIGURE 3.5

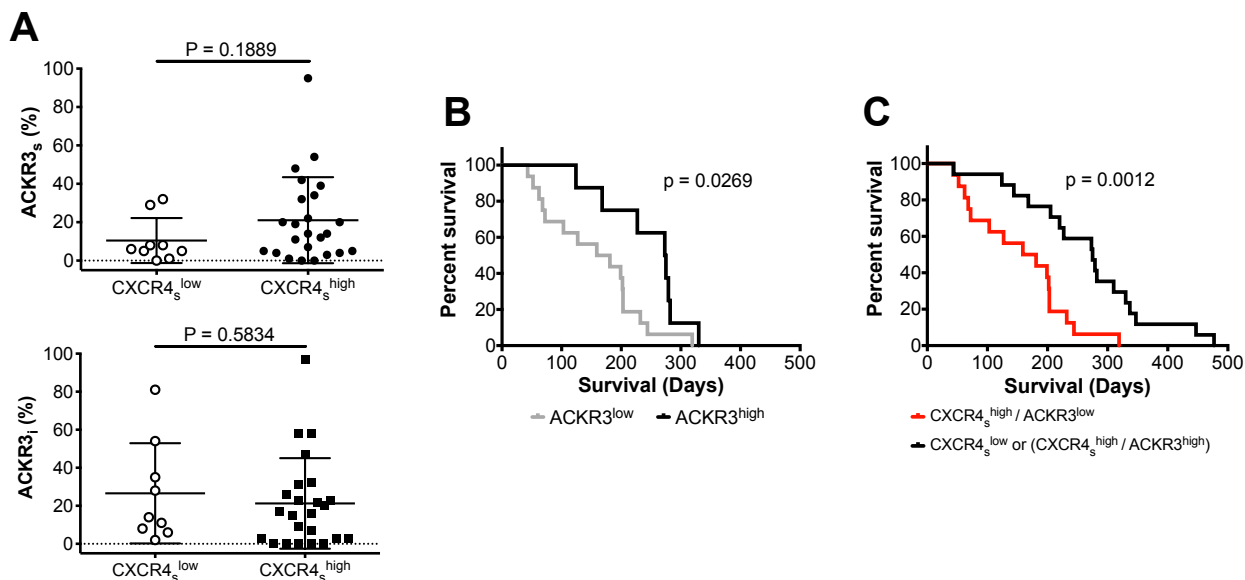


Figure 3.5. ACKR3 expression mitigates the effect of CXCR4. A) ACKR3 expression does not significantly differ between CXCR4_s^{high} and CXCR4_s^{low} groups. The upper panel shows ACKR3 surface staining (T-test, p=0.1889), and the lower panel staining after permeabilization (T-test, p= 0.5834). B) Kaplan-Meier plot of PDX survival of CXCR4_s^{high} samples, dichotomized into CXCR4_s^{high}/ACKR3^{low} (n=16; gray; median 24 weeks/170 days; IQR=69-203) and CXCR4_s^{high}/ACKR3^{high} (n=8; black; median 39 weeks/274 days; IQR = 182.89-281.3) groups. Log-rank test (p=0.0269). C) Kaplan-Meier plot of PDX survival of (CXCR4_s^{high} and ACKR3^{low}) (n=16; red; median 24 weeks/170 days; IQR=69-203), and (CXCR4_s^{low} or (CXCR4_s^{high} and ACKR3^{high})) (n=17; black; median 39 weeks/275 days; IQR=187-334). Log-rank test (p=0.0012).

FIGURE 3.6

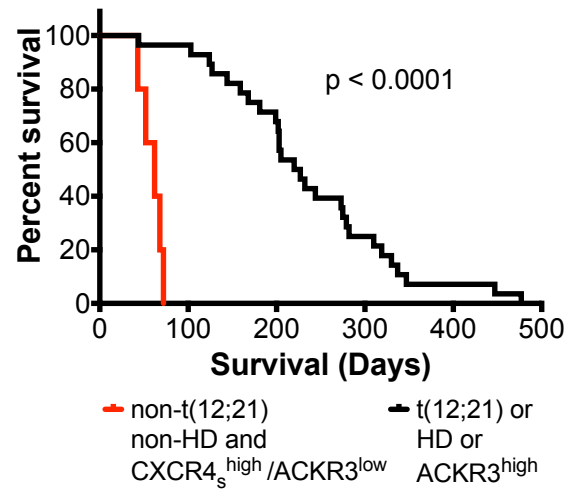


Figure 3.6. PDX survival using combined risk markers. Kaplan-Meier plot of PDX survival of (non- t(12;21) and non-HD and (CXCR4_s^{high} and ACKR3^{low})) samples (red; n=5; median 8 weeks/62 days; IQR = 47.5-70), compared to all other samples (black; n=28; median 32 weeks/223.5 days; IQR = 171.3-303). Log-rank test ($p < 0.0001$).

REFERENCES

1. Pui CH, Pei D, Raimondi SC, et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. *Leukemia*. 2017;31(2):333-339.
2. Kato M, Ishimaru S, Seki M, et al. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia*. 2017;31(3):580-584.
3. Kaneko Y, Hayashi Y, Sakurai M. Chromosomal findings and their correlation to prognosis in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1981;4(3):227-235.
4. Paulsson K, Lilljebjorn H, Biloglav A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2015;47(6):672-676.
5. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350(15):1535-1548.
6. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(5):429-438.
7. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3407-3415.
8. Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Exp Hematol Oncol*. 2014;3:16.
9. Borowitz MJ, Shuster J, Carroll AJ, et al. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 1997;89(11):3960-3966.
10. Solano-Genesta M, Tarin-Arzaga L, Velasco-Ruiz I, et al. CD20 expression in B-

cell precursor acute lymphoblastic leukemia is common in Mexican patients and lacks a prognostic value. *Hematology*. 2012;17(2):66-70.

11. Naithani R, Asim M, Abdelhaleem M, Punnett A. CD20 has no prognostic significance in children with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2012;97(9):e31-32.

12. Mannelli F, Gianfaldoni G, Intermesoli T, et al. CD20 expression has no prognostic role in Philadelphia-negative B-precursor acute lymphoblastic leukemia: new insights from the molecular study of minimal residual disease. *Haematologica*. 2012;97(4):568-571.

13. Jeha S, Behm F, Pei D, et al. Prognostic significance of CD20 expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;108(10):3302-3304.

14. Cezar RS, Cerqueira BA, da Paz Sde S, et al. Outcome of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazilian Children: Immunophenotypical, Hematological, and Clinical Evaluation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(6):423-428.

15. Schmitz M, Breithaupt P, Scheidegger N, et al. Xenografts of highly resistant leukemia recapitulate the clonal composition of the leukemogenic compartment. *Blood*. 2011;118(7):1854- 1864.

16. Morisot S, Wayne AS, Bohana-Kashtan O, et al. High frequencies of leukemia stem cells in poor-outcome childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia*. 2010;24(11):1859-1866.

17. Lock RB, Liem N, Farnsworth ML, et al. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002;99(11):4100- 4108.

18. Uckun FM, Sather H, Reaman G, et al. Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995;85(4):873-878.

19. Uckun FM, Sather HN, Waurzyniak BJ, et al. Prognostic significance of B-lineage leukemic cell growth in SCID mice: a Children's Cancer Group Study. *Leuk Lymphoma*. 1998;30(5-6):503- 514.
20. Queudeville M, Seyfried F, Eckhoff SM, et al. Rapid engraftment of human ALL in NOD/SCID mice involves deficient apoptosis signaling. *Cell Death Dis*. 2012;3:e364.
21. Woiterski J, Ebinger M, Witte KE, et al. Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid leukemias into NOD/SCID/IL2R γ manull mice reflects individual leukemogenicity and highly correlates with clinical outcome. *Int J Cancer*. 2013;133(7):1547- 1556.
22. Meyer LH, Eckhoff SM, Queudeville M, et al. Early relapse in ALL is identified by time to leukemia in NOD/SCID mice and is characterized by a gene signature involving survival pathways. *Cancer Cell*. 2011;19(2):206-217.
23. Place AE, Stevenson KE, Vrooman LM, et al. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1677-1690.
24. Silverman LB, Stevenson KE, O'Brien JE, et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). *Leukemia*. 2010;24(2):320-334.
25. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):18-24.
26. Tavor S, Petit I, Porozov S, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res*. 2004;64(8):2817-2824.
27. Monaco G, Konopleva M, Munsell M, et al. Engraftment of acute myeloid leukemia in NOD/SCID mice is independent of CXCR4 and predicts poor patient

survival. *Stem Cells*. 2004;22(2):188-201.

28. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995;9(12):1985-1989.

29. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(8):637-660.

30. Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT, et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia*. 2012;26(2):265-270.

31. Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2008;26(13):2186-2191.

32. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin- Frankfurt-Munster Study Group. *Blood*. 1997;90(2):571-577.

33. Horibe K, Yumura-Yagi K, Kudoh T, et al. Long-term Results of the Risk-adapted Treatment for Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Report From the Japan Association of Childhood Leukemia Study ALL-97 Trial. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017;39(2):81-89.

34. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007;109(3):926-935.

35. Frost BM, Forestier E, Gustafsson G, et al. Translocation t(12;21) is related to in vitro cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004;104(8):2452-2457.

36. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96(3):1094-1099.
37. Thomas DA, O'Brien S, Jorgensen JL, et al. Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;113(25):6330-6337.
38. Maury S, Huguet F, Leguay T, et al. Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010;95(2):324-328.
39. Chang H, Jiang A, Brandwein J. Prognostic relevance of CD20 in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010;95(6):1040-1042; author reply 1042.
40. Konoplev S, Lin P, Yin CC, et al. CXCR4 chemokine receptor 4 expression, CXCR4 chemokine receptor 4 activation, and wild-type nucleophosmin are independently associated with unfavorable prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13(6):686-692.
41. Konoplev S, Rassidakis GZ, Estey E, et al. Overexpression of CXCR4 predicts adverse overall and event-free survival in patients with unmutated FLT3 acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Cancer*. 2007;109(6):1152-1156.
42. Matsuo H, Nakamura N, Tomizawa D, et al. CXCR4 Overexpression is a Poor Prognostic Factor in Pediatric Acute Myeloid Leukemia With Low Risk: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(8):1394-1399.
43. Mannelli F, Cutini I, Gianfaldoni G, et al. CXCR4 expression accounts for clinical phenotype and outcome in acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(5):340-349.
44. Brault L, Rovo A, Decker S, Dierks C, Tzankov A, Schwaller J. CXCR4-SERINE339 regulates cellular adhesion, retention and mobilization, and is a marker

for poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28(3):566-576.

45. Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;104(2):550-557.

46. Spoo AC, Lubbert M, Wierda WG, Burger JA. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2007;109(2):786-791.

47. Tavernier-Tardy E, Cornillon J, Campos L, et al. Prognostic value of CXCR4 and FAK expression in acute myelogenous leukemia. *Leuk Res*. 2009;33(6):764-768.

48. Bradstock KF, Makrynika V, Bianchi A, Shen W, Hewson J, Gottlieb DJ. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. *Leukemia*. 2000;14(5):882-888.

49. Crazzolara R, Kreczy A, Mann G, et al. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;115(3):545-553.

50. Schneider P, Vasse M, Al Bayati A, Lenormand B, Vannier JP. Is high expression of the chemokine receptor CXCR-4 of predictive value for early relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia? *Br J Haematol*. 2002;119(2):579-580.

51. Konoplev S, Jorgensen JL, Thomas DA, et al. Phosphorylated CXCR4 is associated with poor survival in adults with B-acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2011;117(20):4689-4695.

52. van den Berk LC, van der Veer A, Willems ME, et al. Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2014;166(2):240-249.

53. Ko SY, Park CJ, Park SH, et al. High CXCR4 and low VLA-4 expression predicts poor survival in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2014;38(1):65-70.

54. Maiga A, Lemieux S, Pabst C, et al. Transcriptome analysis of G protein-coupled receptors in distinct genetic subgroups of acute myeloid leukemia: identification of potential disease- specific targets. *Blood Cancer J.* 2016;6(6):e431.
55. Kim HY, Lee SY, Kim DY, et al. Expression and functional roles of the chemokine receptor CXCR7 in acute myeloid leukemia cells. *Blood Res.* 2015;50(4):218-226.
56. Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, et al. Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration. *Cell.* 2008;132(3):463-473.
57. Decaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem.* 2011;286(37):32188-32197.
58. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood.* 2009;113(24):6085-6093.
59. D'Alterio C, Avallone A, Tatangelo F, et al. A prognostic model comprising pT stage, N status, and the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 powerfully predicts outcome in neoadjuvant resistant rectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2014;135(2):379-390.
60. Wang L, Chen W, Gao L, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2012;10:212.

Supplemental data

FIGURE 3.S1

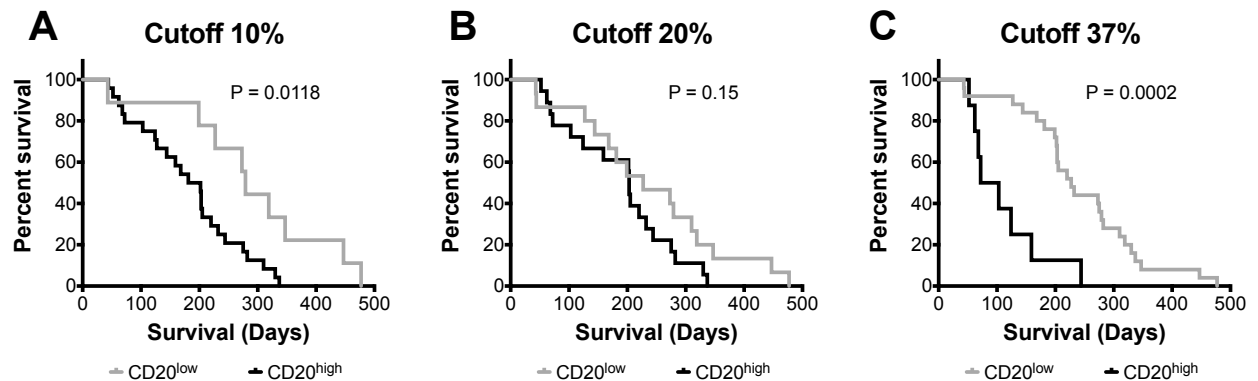


Figure 3.S1. Kaplan-Meier plots of PDX survival using cutoffs that were determined in table S1 (10%, S1A; and 37%, S1C), and the common arbitrary cutoff (20%, S1B) for CD20 expression. Comparison between groups was performed using log-rank test.

FIGURE 3.S2

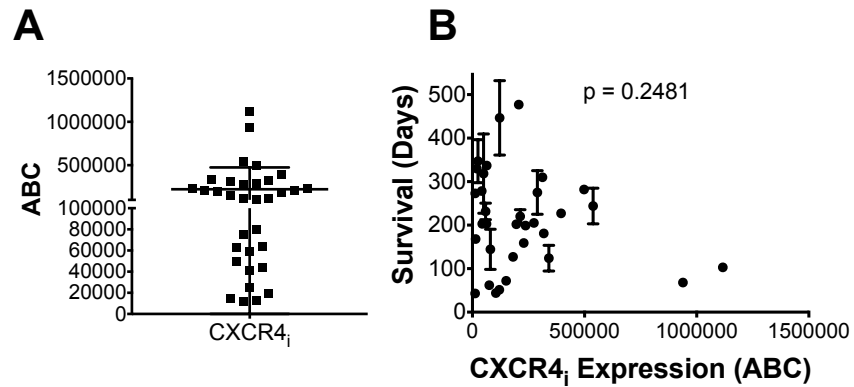


Figure 3.S2 Intracellular CXCR4 does not predicts survival of PDX mice. A) Variability of the intensity of CXCR4 staining after cell permeabilization, expressed as antibodies bound per cell (ABC) (n=33). B) Correlation between CXCR4_i expression and PDX survival (Pearson $r = -0.2068$; Two-tailed P-value = 0.2481).

Table 3.S1. CD20 threshold determination. Samples were ranked according to the proportion of CD20-positive cells, in ascending order. Log-rank test was performed for every possible threshold. Significant cutoffs were considered only when significant cutoffs clustered. As shown in the table, two clusters of significant cutoffs were identified at 3% - 15% and 25% - 45% of CD20 positive cells. The cutoffs used for analysis in Figure 3.3C (10% and 37%) are indicated by red lines.

Patient ID	CD20 (%)	Survival (Days)	P Value	
#15	2%	227	0.9185	n.s.
#12	3%	447	-	-
#13	3%	477	0.0153	*
#02	7%	319	-	-
#10	7%	347	-	-
#11	7%	199	0.0043	**
#18	8%	43	-	-
#19	8%	273	0.0149	*
#01	9%	279	0.0118	*
#20	11%	44	0.0313	*
#28	15%	310	-	-
#25	15%	144	0.0340	*
#21	16%	127	-	-
#27	16%	181	0.0989	n.s.
#04	17%	168	0.1504	n.s.
#23	22%	275	0.1224	n.s.
#03	24%	203	-	-
#05	24%	203	-	-
#29	24%	282	-	-
#33	24%	202	0.1507	n.s.
#06	25%	337	0.0323	*
#31	30%	205	0.0347	*
#32	31%	220	0.0323	*
#07	34%	232	0.0211	*
#17	37%	330	0.0002	***
#08	38%	62	0.0014	**
#16	39%	68	0.0076	**
#22	40%	124	0.0237	*
#30	45%	159	0.0456	*
#09	64%	52	0.2006	n.s.
#14	79%	103	0.4976	n.s.
#26	81%	244	0.0661	n.s.
#24	94%	72	-	-

Table 3.S2. CXCR4 surface expression cutoff determination. Samples were ranked according to the intensity of surface CXCR4 expression (expressed as ABC) in ascending order. log-rank test was performed for every possible threshold. Significant cutoffs were considered only when significant cutoffs clustered. The cutoff at 5082–5670 ABC (red line) was used to define CXCR4_s^{low} and CXCR4_s^{high} groups for analyses shown in Figures 3.4, 3.5, and 3.6.

Patient ID	CXCR4 _s (ABC)	Survival (Days)	p-value	
#06	2348	337	0.3750	n.s.
#13	2399	477	0.0291	*
#32	2719	220	0.0514	n.s.
#10	2846	347	0.0140	*
#20	2855	44	0.0405	*
#31	3145	205	0.0609	n.s.
#25	4335	144	0.1134	n.s.
#28	4717	310	0.0791	n.s.
#12	5082	447	0.0083	**
#30	5264	159	0.0177	*
#33	5670	202	0.0289	*
#04	5748	168	0.0509	n.s.
#01	7611	279	0.0377	*
#19	8192	273	0.0329	*
#24	9261	72	0.0678	n.s.
#26	9350	244	0.0625	n.s.
#14	9403	103	0.1160	n.s.
#11	9759	199	0.1603	n.s.
#16	9771	68	0.2782	n.s.
#27	9978	181	0.3701	n.s.
#21	10415	127	0.5259	n.s.
#15	10565	227	0.5420	n.s.
#09	13088	52	0.8030	n.s.
#23	13795	275	0.7141	n.s.
#22	15108	124	0.9484	n.s.
#05	15932	203	0.9509	n.s.
#17	16085	330	0.6728	n.s.
#18	16521	43	0.9572	n.s.
#29	16772	282	0.8281	n.s.
#07	18233	232	0.8118	n.s.
#03	20729	203	0.9575	n.s.
#02	21876	319	0.0129	*
#08	23807	62	-	-

Table 3.S3. Intracellular CXCR4 expression, threshold determination. Samples were ranked according to CXCR4 staining after permeabilization (ABC) in ascending order. log-rank test was performed for every possible threshold. Significant cutoffs were considered only when significant cutoffs clustered; no such cluster was observed using CXCR4_i expression.

Patient ID	CXCR4 _i (ABS)	Survival (Days)	p-value	
#18	12134	43	<0.0001	****
#19	12467	273	0.4409	n.s.
#04	14375	168	0.2642	n.s.
#17	19749	330	0.8358	n.s.
#10	24795	347	0.5788	n.s.
#01	41490	279	0.5019	n.s.
#05	43984	203	0.5974	n.s.
#02	49474	319	0.4158	n.s.
#07	58776	232	0.4312	n.s.
#03	62913	203	0.5061	n.s.
#06	63565	337	0.2653	n.s.
#08	75010	62	0.4289	n.s.
#25	79835	144	0.5812	n.s.
#20	104744	44	0.8341	n.s.
#09	119873	52	0.9042	n.s.
#12	121428	447	0.5218	n.s.
#24	150375	72	0.7284	n.s.
#21	181008	127	0.9231	n.s.
#33	195620	202	0.9588	n.s.
#13	206607	477	0.2344	n.s.
#32	212899	220	0.2546	n.s.
#30	228728	159	0.3680	n.s.
#11	237148	199	0.4706	n.s.
#31	274141	205	0.5313	n.s.
#23	289409	275	0.4250	n.s.
#28	312310	310	0.2194	n.s.
#27	318231	181	0.3133	n.s.
#22	340943	124	0.5270	n.s.
#15	395514	227	0.5162	n.s.
#29	497646	282	0.1853	n.s.
#26	538294	244	0.0086	**
#16	938484	68	0.1077	n.s.
#14	1116368	103	-	-

Table 3.S4. ACKR3 surface expression, threshold determination. Samples were ranked according to ACKR3 surface expression (expressed as % of positive cells) in descending order. Log-rank test was performed for every possible threshold. Significant cutoffs were considered only when significant cutoffs clustered; no such cluster was observed using ACKR3 surface expression.

Patient ID	ACKR3 _s (%)	Survival (Days)	P value
#01	95%	279	0.7446 n.s.
#04	54%	168	0.8837 n.s.
#17	48%	330	0.6527 n.s.
#19	42%	273	0.6502 n.s.
#05	39%	203	0.7508 n.s.
#18	34%	43	0.8898 n.s.
#06	32%	337	0.6897 n.s.
#09	32%	52	0.9831 n.s.
#10	29%	347	0.5280 n.s.
#22	22%	124	0.7282 n.s.
#02	20%	319	0.5226 n.s.
#07	20%	232	0.5329 n.s.
#08	19%	62	0.7630 n.s.
#16	14%	68	0.9949 n.s.
#33	14%	202	0.8775 n.s.
#15	12%	227	0.8510 n.s.
#24	11%	72	0.6324 n.s.
#13	8%	477	0.5188 n.s.
#25	8%	144	0.6820 n.s.
#27	7%	181	0.8225 n.s.
#31	6%	205	0.8885 n.s.
#29	5%	310	0.6958 n.s.
#30	5%	282	0.5402 n.s.
#32	5%	159	0.7093 n.s.
#28	5%	220	0.7523 n.s.
#03	4%	203	0.8441 n.s.
#26	4%	244	0.8079 n.s.
#11	3%	199	0.9803 n.s.
#12	1%	447	0.1015 n.s.
#23	1%	275	0.0015 **
#14	0%	103	0.0066 **
#20	0%	44	0.2111 n.s.
#21	0%	127	- -

Table 3.S5. Intracellular ACKR3 expression, threshold determination. Samples were ranked according to ACKR3 staining after permeabilization (expressed as % of positive cells) in descending order. Log-rank test was performed for every possible threshold. Significant cutoffs were considered only when significant cutoffs clustered; no such cluster was observed using intracellular ACKR3 staining.

Patient ID	ACKR3 _i (%)	Survival (Days)	P value
#22	97%	124	0.1566 n.s.
#31	81%	205	0.3302 n.s.
#29	58%	275	0.6242 n.s.
#23	58%	282	0.9064 n.s.
#10	54%	347	0.5379 n.s.
#15	47%	227	0.5848 n.s.
#28	35%	310	0.4425 n.s.
#27	32%	181	0.5796 n.s.
#07	31%	232	0.5934 n.s.
#20	28%	44	0.8627 n.s.
#26	26%	244	0.8456 n.s.
#09	23%	52	0.8834 n.s.
#08	23%	62	0.6355 n.s.
#04	22%	168	0.4973 n.s.
#11	20%	199	0.3976 n.s.
#16	17%	68	0.2476 n.s.
#24	16%	72	0.1462 n.s.
#05	15%	203	0.1185 n.s.
#25	14%	144	0.0714 n.s.
#13	11%	477	0.5246 n.s.
#21	9%	127	0.3754 n.s.
#06	8%	337	0.6576 n.s.
#02	7%	319	0.8771 n.s.
#32	6%	220	0.8236 n.s.
#01	3%	279	0.9330 n.s.
#03	3%	103	0.6877 n.s.
#14	3%	203	0.5867 n.s.
#12	2%	447	0.6638 n.s.
#17	0%	159	0.9042 n.s.
#19	0%	202	0.9098 n.s.
#18	0%	273	0.9808 n.s.
#33	0%	330	<0.0001 n.s.
#30	0%	43	- -

Table 3.S6. ACKR3 expression, threshold determination. Given that ACKR3 cycles rapidly between surface and intracellular compartments in the absence of ligand, we ranked samples according to the proportion of ACKR3 positive cells, regardless whether this was detected with or without permeabilization. Log-rank test performed for every possible threshold revealed no clusters of significant cutoffs.

Patient ID	ACKR3 _s (%)	ACKR3 _i (%)	Survival (Days)	P value
#22	22%	97%	124	0.1566 n.s.
#01	95%	3%	279	0.7705 n.s.
#31	6%	81%	205	0.6869 n.s.
#29	5%	58%	282	0.9562 n.s.
#23	1%	58%	275	0.9380 n.s.
#10	29%	54%	347	0.4644 n.s.
#04	54%	22%	168	0.6258 n.s.
#17	48%	0%	330	0.3975 n.s.
#15	12%	47%	227	0.4285 n.s.
#19	42%	0%	273	0.4025 n.s.
#05	39%	15%	203	0.4712 n.s.
#28	5%	35%	310	0.3426 n.s.
#18	34%	0%	43	0.5528 n.s.
#09	32%	23%	52	0.7938 n.s.
#06	32%	8%	337	0.4698 n.s.
#27	7%	32%	181	0.5920 n.s.
#07	20%	31%	232	0.5921 n.s.
#20	0%	28%	44	0.8519 n.s.
#26	4%	26%	244	0.8291 n.s.
#08	19%	23%	62	0.9074 n.s.
#11	3%	20%	199	0.7685 n.s.
#02	20%	7%	319	0.9877 n.s.
#16	14%	17%	68	0.7428 n.s.
#24	11%	16%	72	0.5084 n.s.
#25	8%	14%	144	0.3473 n.s.
#33	14%	0%	202	0.2539 n.s.
#13	8%	11%	477	0.8371 n.s.
#21	0%	9%	127	0.9002 n.s.
#32	5%	6%	220	0.8232 n.s.
#30	5%	0%	159	0.5708 n.s.
#03	4%	3%	203	0.4197 n.s.
#14	0%	3%	103	0.1840 n.s.
#12	1%	2%	447	- -

Table 3.S7. ACKR3 expression, threshold determination limited to CXCR4_s^{high} samples. Only CXCR4_s^{high} samples as defined by Table 3.S2 were ranked for the proportion of ACKR3 staining as in Table 3.S6. A cluster of significant cutoffs is observed at 39%-48% of ACKR3 expression. The red line indicates the cutoff used for analyses shown in Figures 3.5 and 3.6.

Patient ID	ACKR3 _s (%)	ACKR3 _i (%)	Survival (Days)	P value	
#22	22%	97%	124	0.2408	n.s.
#01	95%	3%	279	0.8472	n.s.
#29	5%	58%	282	0.4011	n.s.
#23	1%	58%	275	0.2726	n.s.
#04	54%	22%	168	0.4051	n.s.
#17	48%	0%	330	0.0419	*
#15	12%	47%	227	0.0455	*
#19	42%	0%	273	0.0269	*
#05	39%	15%	203	0.0294	*
#18	34%	0%	43	0.0788	n.s.
#09	32%	23%	52	0.1750	n.s.
#27	7%	32%	181	0.2379	n.s.
#07	20%	31%	232	0.1977	n.s.
#26	4%	26%	244	0.1310	n.s.
#08	19%	23%	62	0.2704	n.s.
#11	3%	20%	199	0.3297	n.s.
#02	20%	7%	319	0.0155	*
#16	14%	17%	68	0.0547	n.s.
#24	11%	16%	72	0.1462	n.s.
#33	14%	0%	202	0.1426	n.s.
#21	0%	9%	127	0.2734	n.s.
#30	5%	0%	159	0.4563	n.s.
#03	4%	3%	203	0.1645	n.s.
#14	0%	3%	103	-	-

Chapitre IV – Discussion

Jusqu'en 2006/2007, on croyait à tort que CXCR4 et CXCL12 formaient un couple exclusif et plus de 1400 études ont été réalisées sur le sujet durant l'ère pré-ACKR3 (Balabanian et al. 2005; Burns et al. 2006). Depuis, Levoye, Décaillot et leur groupe respectif ont démontré que la présence simultanée d'ACKR3 et de CXCR4 dans une cellule a le potentiel de créer une signalisation différente par rapport aux récepteurs seuls (Levoye et al. 2009; Décaillot et al. 2011). Ainsi, l'interprétation des études ne prenant pas en compte les deux récepteurs doit être faite avec prudence. Encore aujourd'hui, un certain nombre d'études fonctionnelles font abstraction de l'existence même d'ACKR3 et présentent une analyse incomplète des résultats produits.

Dans ce contexte, les études présentées dans cette thèse traitent de deux aspects du système CXCL12/CXCR4/ACKR3. Dans un premier temps, nous avons décrit le mode de liaison d'une classe d'antagoniste de CXCR4 sur ACKR3 et l'avons comparé à leur mode de liaison sur CXCR4. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'association entre différents biomarqueurs, dont CXCR4 et ACKR3, et la survie de souris xénogreffées avec des échantillons de patients atteints d'une B-LAL. Par souci de clarté, la présente discussion est séparée en deux sous-chapitres présentant d'abord l'aspect pharmacologique, suivi de l'aspect fonctionnel du système CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans les B-LAL pédiatriques.

4.1 Première section : Détermination du mode de liaison du TC14012 sur ACKR3

Étant donné le rôle central du récepteur CXCR4 dans la dissémination métastatique et dans l'attraction et le maintien des cellules souches dans les niches de la moelle osseuse, ce dernier constitue une cible pharmacologique attrayante (Peled et al. 1999; Broxmeyer et al. 2005; Sugiyama et al. 2006; Ishikawa et al. 2007; Tesfai et al. 2012; Duan et al. 2014). Précédemment, il a été montré que l'AMD3100 et le TC14012, deux inhibiteurs de la liaison CXCL12-CXCR4, peuvent agir comme

agoniste pour ACKR3 (Kalatskaya et al. 2009; Gravel et al. 2010). Comme le manque de sélectivité peut être associé à un risque accru d'effets adverses, comprendre le mode de liaison du TC14012 sur sa cible secondaire ACKR3 est primordial pour la synthèse future de molécules plus sélectives à CXCR4 ou à ACKR3.

Au début de mon doctorat, il était connu que le TC14012 est capable d'activer le récepteur ACKR3 alors que le T140, un dérivé de ce dernier, en est incapable (Gravel et al. 2010). Ainsi, dans cet article, nous cherchions à identifier les déterminants clés de la liaison du TC14012 sur ACKR3.

4.1.1 Comparaison du mode de liaison du TC14012 entre ACKR3 et CXCR4

Malgré une forte homologie de séquence entre le TC14012 et le T140, seul le TC14012 est capable d'activer ACKR3. Les essais fonctionnels réalisés avec tous les peptides intermédiaires entre le T140 et le TC14012 ont permis d'établir que c'est l'amidation du C-terminal du TC14012 qui est en grande partie responsable de ce changement d'activité. Les modélisations structurales réalisées mettent en évidence deux phénomènes. D'une part, la présence d'un amide en C-terminal affecte la rigidité moléculaire du peptide. En effet, l'amidation fragilise le pont salin intramoléculaire observé pour le T140 et qui unit le C-terminal au squelette peptidique de l'Arg2. L'élimination de ce pont salin permet ainsi plus de flexibilité aux deux premières arginines du peptide. D'autre part, l'amide en C-terminal permet également de consolider l'interaction peptide-récepteur en permettant de nouveaux ponts hydrogènes entre l'Arg14 du peptide et le résidu D275 du récepteur. Au final, cette simple modification sur le peptide permet une interaction à deux points d'attache en simultané sur ACKR3 (Arg2-D179 et Arg14-D275) alors que le T140 et ses dérivés qui ne sont pas amidés en sont incapables.

À partir des données cristallographiques de CXCR4 lié au CVX15, on note que 4 des 8 acides aminés engagés dans la liaison sont conservés pour ACKR3 soit : l'H113^{3,29} (ACKR3 = H121), le D171^{4,60} (ACKR3 = D179), le Y190 (ACKR3 = Y200) et le D262^{6,58} (ACKR3 = D275)(B. Wu et al. 2010). Connaissant maintenant l'importance

de l'engagement simultané des deux acides aspartiques (D^{4.60} et D^{6.58}) dans l'activation du récepteur ACKR3 et l'inhibition de CXCR4, il est permis de se demander comment le T140 arrive à engendrer une activité inhibitrice sur CXCR4 alors qu'il n'a aucun effet antagoniste sur ACKR3. Trois des quatre acides aminés (CXCR4/ACKR3 = D187/R197; R188/S198 : D193/K206) qui diffèrent entre CXCR4 et ACKR3 sont situés dans l'ECL2 des récepteurs. Nos données nous permettent de spéculer que la liaison du T140 avec l'ECL2 de CXCR4 via le D187 provoque le déplacement du TM4 vers la pochette de liaison majeure du récepteur. Ce déplacement permettrait ainsi la liaison simultanée du peptide avec les résidus D171 et D262 de CXCR4.

Ainsi, les modalités de liaison du TC14012 avec CXCR4 et ACKR3 sont similaires. D'un point de vue moléculaire, la rigidité intrinsèque du T140 et l'absence d'interaction de ce dernier avec l'ECL2 l'empêchent d'engager simultanément les TM4 et 6 d'ACKR3.

4.1.2 La flexibilité moléculaire des petits peptides

Les informations cumulatives recueillies par nos données de simulation de dynamique moléculaire (MD) et de BRET illustrent bien la problématique derrière les molécules flexibles comme le TC14012 : plus une molécule est souple, plus elle aura de cibles secondaires (Bowes et al. 2012). Afin de limiter ces interactions non désirées, les chimistes médicaux ont recours à la restriction conformationnelle des molécules (Johnston et al. 1974). Ce concept consiste à créer une espèce moléculaire plus simple et plus rigide. La simplification de la molécule se fait généralement en retirant les sections qui ne font pas partie du pharmacophore (région responsable de l'interaction peptide/cible). Cette manœuvre a pour but de diminuer les chances que la molécule puisse se lier à une cible secondaire via les sections retirées (Veber et al. 1979). De son côté, la rigidification de la molécule se fait par la cyclisation du peptide et/ou par l'incorporation de ponts disulfures et de groupements rigidifiants tels que les acides aminés non naturels (Freidinger et al. 1980). Ce dernier processus permet d'une part d'augmenter le temps de demi-vie de

la molécule *in vivo* en la protégeant des métalloprotéases (Veber et al. 1979). D'autre part, la rigidification force la molécule dans une conformation favorisant sa liaison vers sa cible principale. Il en résulte ainsi une diminution de la barrière entropique de la liaison ligand-cible et une diminution potentielle des interactions avec d'autres cibles utilisant le même pharmacophore (Khan et al. 1998).

Il est intéressant de noter que le groupe du Dr Fujii a utilisé le principe de restriction conformationnelle avec le T140 afin de créer 2 entités moléculaires cycliques, le FC131 et le FC313 (voir figure 4.1.) (Oishi et al. 2015). Porteuses du même pharmacophore que le TC14012 (Arg2 – Arg3 – Nal4), ces dernières sont respectivement sélectives pour CXCR4 (FC131) ou ACKR3 (FC313) (Hirokazu Tamamura et al. 2004; Oishi et al. 2015). Le changement de sélectivité entre ces deux molécules repose essentiellement sur le remplacement de la Gly5 du FC131 par une proline. Cette modification change la conformation de la molécule à cause de la torsion découlant de la présence d'une proline. Ainsi, même avec des séquences très similaires, les organisations tridimensionnelles adoptées par le FC131 et le FC313 sont différentes, ce qui les rend sélectives pour des récepteurs différents. Les

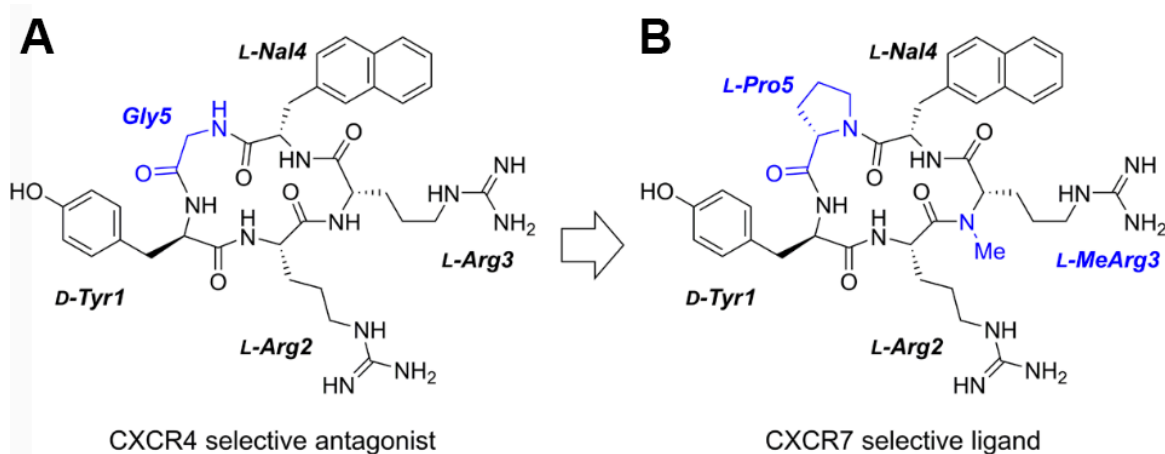


Figure 4.1. Schématisation de la structure moléculaire des composés FC131 et FC313. A. Structure du FC131 spécifique à CXCR4. B. Structure du FC313 spécifique à ACKR3 (CXCR7) (tiré de (Oishi et al. 2015))

modes de liaison prédits de ces molécules sont similaires à ceux des peptides mères T140/TC14012. De manière similaire aux composés mères, le FC131 engage CXCR4 via le D171^{4.60} du TM4, le D187 et le R188 de l'ECL2 (Yoshikawa et al. 2012). Tout comme le FC131, le FC313 interagit avec D179^{4.60} du TM4 de l'ACKR3, mais il n'a aucune interaction directe avec l'ECL2. Cela dit, étant donné la nature cyclique de la molécule et le fait que les 2 arginines soient adjacentes, il n'y a pas d'interaction simultanée possible avec le D275 du TM6 comme c'est le cas pour le TC14012. Cependant, la modélisation montre que la Pro5 du FC313 interagit avec une poche hydrophobe située près du TM7 comprenant les résidus F294^{7.32} et le L297^{7.35} ce qui compenserait pour la perte de liaison du TM6.

4.1.3 Limites et perspectives de l'étude

4.1.3.1 Agoniste ou antagoniste, les deux facettes du TC14012

Étant donné que son mode de liaison est similaire sur CXCR4 et ACKR3, il peut paraître contre-intuitif de penser que le TC14012 est un antagoniste de l'un (CXCR4) et un agoniste sur l'autre (ACKR3). Notre étude ne permet pas de définir spécifiquement pourquoi on observe cette différence d'activité. Précédemment, notre groupe a montré par des protéines chimères que le C-terminal de CXCR4 et d'ACKR3 n'affecte pas la réponse au TC14012 (Gravel et al. 2010). En combinant nos observations à celles de Gravel et al, la différence d'activité ne peut être expliquée que par des divergences au niveau de l'organisation tridimensionnelle des récepteurs eux-mêmes.

4.1.3.2 La pharmacologie *in silico*

Les premières utilisations des mathématiques dans l'établissement d'une relation entre la structure moléculaire d'une entité et sa fonction biologique remontent au milieu des années 60 (Hansch & Fujita 1964). Jusqu'alors marginale, la démocratisation de l'informatique dans les années 1990 et le développement de logiciels spécialisés ont permis à la recherche *in silico* de s'établir comme un outil

largement utilisé en pharmacologie. De l'étude plus simple de la relation structure-fonction – comme dans le premier article de cette thèse – au criblage virtuel (« virtual screening » - VS), la pharmacologie *in silico* représente une voie d'avenir dans le développement du médicament (Bowes et al. 2012).

La pharmacologie *in silico* comporte plusieurs avantages sur les essais pharmacologiques traditionnels : plus rapide, sans contrainte physique du nombre de molécules testées contre une cible, infrastructure minimaliste et moins dispendieuse. Malgré tout le potentiel de cette technologie, les résultats produits ne sont pas toujours aussi précis que les essais expérimentaux (Mysinger et al. 2012; Kufareva et al. 2011). Comme la méthode repose essentiellement sur la disponibilité et la résolution de la structure protéique de la cible, deux problèmes se posent. D'abord, malgré les progrès en biologie structurale, un nombre restreint de structures de 7TMR ont été résolues (Palczewski et al. 2000; Rosenbaum et al. 2007; Rasmussen et al. 2007; J. H. Park et al. 2008; Scheerer et al. 2008; Jaakola et al. 2008; B. Wu et al. 2010; Manglik et al. 2012; Qin et al. 2015; Kang et al. 2015; Hua et al. 2016; Shao et al. 2016; Zhang et al. 2017). Cette problématique oblige souvent l'investigateur à recourir à une approche alternative consistant soit à : 1- modéliser la protéine à partir du cristal d'une protéine de la même famille, 2- utiliser une approche basée sur le pharmacophore du ligand lorsque l'information est disponible ou 3- recourir à une approche expérimentale traditionnelle (Ekins et al. 2007).

Dans notre article, comme le cristal d'ACKR3 n'a jamais été produit, le modèle de ce dernier a été construit par homologie avec le cristal de CXCR4. Si nous avons bien décrit la pochette de liaison du TC14012 sur ACKR3 *in silico* et expérimentalement, nous n'arrivons pas à montrer si l'ECL2 est engagé ou non dans cette liaison. Ce constat nous amène à la seconde problématique de la pharmacologie *in silico* qui découle du fait que les structures cristallographiques fournissent généralement une image fixe de la protéine. Or, les protéines sont dynamiques, et ce dynamisme doit être simulé *in silico* ce qui peut affecter la fiabilité des résultats. Par exemple, pour les RCPG, s'il y a relativement peu de problèmes à prédire la conformation des

domaines transmembranaires et de la pochette de liaison, la diversité des conformations possibles que peuvent adopter les boucles extracellulaires rend la prédiction de leur conformation pratiquement impossible (Kufareva et al. 2011). Sans une étude extensive utilisant des récepteurs mutants ou la résolution du cristal d'ACKR3 avec le TC14012, on ne peut statuer sur l'engagement ou l'absence d'engagement de l'ECL2 dans la liaison de ce peptide au récepteur.

Malgré les nombreux progrès réalisés dans le domaine de la pharmacologie *in silico*, la fiabilité des données ne surpasse pas encore celles provenant des essais pharmacologiques traditionnels. Ainsi, les données produites doivent encore et toujours être vérifiées par des essais en laboratoire. Cela dit, avec l'accroissement constant du nombre de structures protéiques disponibles, le recours à la construction de modèle par homologie de structure est vouée à être de moins en moins utilisée. En augmentant sa fiabilité et sa précision, la pharmacologie *in silico* est appelée à devenir une méthode de pointe ne dépendant d'aucun autre essai.

4.1.3.3 *Le mode de liaison d'ACKR3 avec son ligand naturel CXCL12*

Dans notre étude, nous avons démontré que certains des mutants testés affectent le recrutement de la β -arrestine découlant d'une stimulation du récepteur par son ligand naturel CXCL12 (voir figure 2.4D de l'article 1). Deux études ont fait suite à la nôtre et ont présenté un portrait plus global des modalités de liaison et d'activation du récepteur par CXCL12 (Benredjem et al. 2016; Gustavsson et al. 2017). Il est intéressant de constater que, tout comme pour le TC14012, les résidus D179 et D275 sont au cœur de la liaison du récepteur avec ses ligands naturels. Si nous avons déjà présenté l'augmentation de l' EC_{50} (et donc une diminution de l'affinité) du recrutement de la β -arrestine pour ces mutants, Benredjem et al. montrent également que ces résidus affectent la dégradation des chimiokines inhérentes à l'activation d'ACKR3. L'accumulation de données concernant l'implication de ces deux résidus dans l'activation du récepteur ajoute à la compréhension des modalités menant à l'activation du récepteur ACKR3.

4.2 Deuxième section : L'expression de CXCR4 et d'ACKR3 dans les B-LAL pédiatriques est prédictif de la survie des souris NSG xéno greffées

Pour la B-LAL pédiatrique, le régime de chimiothérapie est maîtrisé de manière inégalée au point où la survie sans complication des patients sur 5 ans atteint plus de 85% indépendamment du sous-type de la maladie (Place et al. 2015). Cependant, ce taux de succès repose essentiellement sur l'agressivité de la thérapie conjuguant minimalement une longue durée de traitement (2 ans minimum) et de hautes doses d'agents carcinogènes (méthotrexate, asparaginase, doxorubicine, etc.). Récemment, des études ont rapporté que plus du quart des survivants des leucémies pédiatriques développent une néoplasie grave, incapacitante ou mortelle dans les 25 ans suivant leur rémission (Diller 2011; Armstrong et al. 2016; Turcotte et al. 2017).

Pour lutter contre ces effets à long terme, l'une des voies envisageables serait de procéder à une réduction de thérapie pour les patients se qualifiant pour les meilleurs pronostics. Actuellement, il n'existe que très peu de marqueurs cytogénétiques ou phénotypiques permettant aux cliniciens de procéder à une telle séparation des patients. Comme le taux de succès du traitement chimiothérapique est élevé pour les B-LAL pédiatriques, l'identification de nouveaux biomarqueurs ne peut plus reposer uniquement sur les données de survie sans complication des patients.

Récemment, plusieurs groupes ont montré que la TTL suite à une greffe xénogénique de cellules malignes primaires dans des souris NSG reflétait le pronostic des patients (Nijmeijer 2001; Lock et al. 2002; Meyer et al. 2011; Woiterski et al. 2013; Patel et al. 2014). L'avantage de ce modèle pour l'identification de biomarqueurs est que, contrairement aux patients, les souris ne sont pas soumises au traitement chimiothérapique. Il est alors possible d'étudier le risque relatif individuel – reflété par le TTL et la survie – en absence de traitement. Ainsi, dans la deuxième section de cette thèse, nous avons utilisé le modèle de souris NSG afin d'identifier des marqueurs de risque relatif sur des cellules malignes primaires provenant d'enfants

atteints d'une B-LAL. Dans un premier temps, nous avons validé le modèle en mesurant l'impact de 3 marqueurs cytogénétiques et un marqueur phénotypique connus (t(12;21), t(9;22), l'HD et CD20). Nous avons ensuite testé la valeur prédictive des marqueurs phénotypiques CXCR4 et ACKR3 sur la survie des souris greffées.

4.2.1 La validation du modèle murin

Malgré une forte association entre le TTL et le pronostic des patients, le modèle de xéno greffe de cellules malignes de patients dans des souris NSG (PDX – « *Patient-derived xenograft* ») n'a, à notre connaissance, jamais été utilisé pour l'identification de marqueurs pronostics. Ainsi, le premier objectif de cet article consistait à démontrer la validité des PDX pour l'identification de marqueurs de stratification dans les B-LAL pédiatriques. Pour ce faire, nous devons choisir des marqueurs de risque connus corrélant fortement vers un bon ou un mauvais pronostic. C'est ainsi que nous avons retenu 3 marqueurs cytogénétiques – comprenant les translocations t(12;21) et t(9;22) ainsi que les HD – et le marqueur phénotypique CD20.

Avant de débiter la discussion de la validation du modèle murin, il convient de justifier notre choix d'avoir présenté les résultats avec le paramètre de la survie plutôt que de la TTL. Comme l'état général – reflété par la survie – des souris était suivi sur une base quotidienne, mais que la présence de cellules leucémiques en circulation dans le sang – la TTL – n'était observée que mensuellement, nous considérons que la survie est un paramètre plus précis que la TTL. De plus, s'il est vrai que ces paramètres corrélaient fortement et ne diffèrent que de quelques jours dans la majorité des cas, il est à noter que pour quelques greffons, les souris survivaient avec une leucémie ouverte pendant plusieurs semaines (voir figure 3.1. Du chapitre III). Nous considérons que ces observations font partie des caractéristiques intrinsèques des cellules greffées. Pour ces raisons, nous avons préféré concentrer notre analyse sur la survie en gardant la TTL que comme paramètre secondaire.

4.2.1.1 La validation du modèle par les marqueurs cytogénétiques

L'HD et la translocation t(12;21) sont les aberrations cytogénétiques les plus fréquentes dans les B-LAL pédiatriques. À elles seules, elles englobent plus de 40% (73% dans notre étude) de tous les sous-types de leucémies (Paulsson et al. 2008). Dans la classification du risque initial du patient, elles font partie des marqueurs associés aux meilleurs pronostics chez le patient en pédiatrie avec une survie globale sur 10 ans de 97,6% pour les patients t(12;21) et de 96,8% pour les patients HD (Pui et al. 2017). Ces aberrations cytogénétiques constituent donc un bon test pour valider notre modèle. Dans notre étude, tout comme pour le pronostic des patients, ce sont les souris greffées par les biopsies porteuses de ces aberrations génétiques qui ont la meilleure survie moyenne.

Quoique représentant moins de 3% des cas de B-LAL pédiatriques, la translocation t(9;22) (BCR-ABL/chromosome de Philadelphie) représente l'une des aberrations cytogénétiques associée à un mauvais pronostic (Schultz et al. 2007). Grâce à la thérapie ciblée, la survie sans complication sur 5 ans atteint maintenant entre 63 et 71% en pédiatrie (Schultz et al. 2014), ce qui est nettement moins que pour les patients t(12;21) ou HD. Dans notre étude, on répertorie uniquement 1 patient porteur de cette translocation. Si c'est nettement insuffisant pour faire des statistiques, il est tout même intéressant de noter que les souris greffées par les cellules de ce patient ont été dans les premières à mourir (Patient #09, survie moyenne de 52 jours).

En séparant les souris selon les marqueurs cytogénétiques des cellules greffées, nos résultats démontrent qu'il y a une association causale entre ces marqueurs – associés au pronostic projeté des patients – et la survie des souris. La relation est d'autant plus forte que nous arrivons à montrer cette association entre les groupes tout en ayant une taille d'échantillon relativement limitée (n=33).

4.2.1.2 Validation du modèle par le marqueur phénotypique CD20

CD20 est un marqueur de différenciation exprimé à la surface des cellules B. Contrairement à CD10 et CD19 qui sont tous deux exprimés dès l'engagement des leucocytes dans la lignée B (Galy et al. 1995; Krop et al. 1996; Rolink et al. 1996; Sato et al. 1996; Imamura et al. 2005), l'expression de CD20 apparaît progressivement durant la phase pré-B de la différenciation (Van Lochem et al. 2004). Ainsi, tel qu'observé dans notre article, le pourcentage de cellules CD20⁺ est très variable d'une biopsie à l'autre. Dans la littérature, plusieurs équipes ont tenté de montrer une corrélation entre le pourcentage de cellules CD20⁺ et le risque relatif individuel de patients avec une B-LAL adulte ou pédiatrique (Borowitz et al. 1997; Jeha et al. 2006; Naithani et al. 2012; M Kamazani et al. 2014; Mannelli et al. 2012; Solano-Genesta et al. 2013; Thomas et al. 2009; Maury et al. 2010; Chang et al. 2010; Thomas et al. 2010; Maury et al. 2016). Pour la B-LAL adulte, les études ont démontré qu'une forte présence de cellules CD20⁺ est associée à un mauvais pronostic (Thomas et al. 2009; Maury et al. 2010; Thomas et al. 2010; Maury et al. 2016). Cependant, la grande majorité des résultats en pédiatrie présentent des données non concluantes.

Récemment, les études portant sur l'effet pronostic de CD20 en pédiatrie ont fait l'objet d'une méta-analyse (Ou et al. 2015). Dans cette dernière, les auteurs concluent qu'il y a absence d'association entre CD20 et le pronostic des patients et soulignent que la discordance entre les études pouvait découler de la variation dans la thérapie reçue par les enfants. Une analyse similaire avait été proposée par Chang et al soulignant que la thérapie avait fait bien du progrès entre l'étude de Borowitz (1997) et celle de Jeha (2006) (Borowitz et al. 1997; Jeha et al. 2006; Chang et al. 2010). Ces propos suggèrent que CD20 a probablement déjà été un marqueur de risque relatif, mais que la thérapie employée actuellement ne permet plus de discriminer les patients à partir de ce facteur. Comme notre modèle reflète le risque relatif des individus en absence de thérapie, nous avons mis à l'épreuve ces propos en testant l'impact de CD20 sur la survie des souris xéno greffées. Tel que rapporté

dans notre article, la séparation des souris selon le pourcentage de cellules CD20⁺ des cellules greffées présente une différence fortement significative ($p = 0,0002$) de la survie entre les groupes. Ce résultat suggère que CD20 est effectivement un marqueur de risque relatif de la B-LAL pédiatrique. Ainsi, nos résultats appuient l'idée que la divergence d'observation dans la littérature soit attribuable à l'amélioration de la thérapie (Chang et al. 2010; Ou et al. 2015).

Une autre des observations rapportées par notre étude concerne le seuil à utiliser pour délimiter les groupes. Si toutes les études ayant tenté de montrer un lien causal entre CD20 et le pronostic des patients l'ont fait avec un seuil arbitraire de 20% de cellules positives (Borowitz et al. 1997; Jeha et al. 2006; Naithani et al. 2012; M Kamazani et al. 2014; Mannelli et al. 2012; Solano-Genesta et al. 2013; Thomas et al. 2009; Maury et al. 2010; Chang et al. 2010; Thomas et al. 2010; Maury et al. 2016), nos résultats suggèrent plutôt l'existence de deux seuils de séparation que nous avons établis à 10% et à 37%. Encore une fois, malgré une taille d'échantillon relativement limitée, la différence entre les survies moyennes de chaque groupe [courte (>37%), intermédiaire (>10% & <37%) ou longue (<10%)] est fortement significative ($p = 0,0002$). Dans les B-LAL pédiatriques, on note une tendance souvent non significative montrant une survie globale supérieure chez les patients CD20⁻ par rapport aux patients CD20⁺ (Borowitz et al. 1997; Jeha et al. 2006; M Kamazani et al. 2014; Mannelli et al. 2012; Solano-Genesta et al. 2013). Cette observation suggère qu'une réanalyse des données de ces articles en utilisant nos seuils pourrait potentiellement améliorer la discrimination entre les groupes.

Au final, nos données valident que notre modèle permet l'identification de marqueurs phénotypiques ainsi que de leur(s) seuil(s). De plus, la démonstration des capacités de notre méthode pour l'identification d'un marqueur phénotypique tel que CD20, qui est difficilement discernable chez les patients sous thérapie, justifie l'utilisation du modèle PDX dans la recherche de nouveaux marqueurs de risque cytogénétiques et phénotypiques.

4.2.1.3 *Le Rituximab, un anti-CD20*

Le Rituximab (Rituxan®) – un anticorps monoclonal ciblant CD20 – est approuvé depuis 1997 pour différentes indications dont les leucémies chroniques lymphoblastiques CD20⁺, les lymphomes non Hogkinien CD20⁺ (FDA 2012) et plus récemment pour la B-LAL adulte CD20⁺/t(9;22)⁻ (Alvarnas et al. 2016). Malgré des résultats concluants de l'essai clinique de phase III de ce médicament chez la B-LAL adulte, Maury et al se questionnent sur le seuil arbitraire sélectionné de 20%, mentionnant que de descendre le seuil à 10% tel que suggéré par Thomas et al pourrait être encore plus bénéfique (Thomas et al. 2010; Maury et al. 2016). Les résultats de notre étude vont également dans le sens de cette suggestion.

Étant donné le taux de succès du régime chimiothérapique actuel en pédiatrie et l'absence d'association entre le marqueur CD20 et le pronostic des patients, l'utilisation du Rituximab n'est présentement pas considéré pour les patients de moins de 15 ans. (Alvarnas et al. 2016). Le prochain défi dans le traitement des B-LAL pédiatriques est de se diriger vers une réduction de thérapie pour les patients considérés à faible risque de rechute dans le but de diminuer les effets secondaires à long terme. Dans ce contexte, la valeur pronostic de CD20 pourrait devenir intéressante à utiliser. On peut penser que, par exemple, les patients CD20⁺ ne se qualifieraient pas pour un traitement réduit sans l'apport d'une thérapie ciblée tel que le Rituximab.

4.2.2 **Le système CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans la prédiction du pronostic**

La chimiokine CXCL12 est impliquée dans plusieurs aspects fonctionnels des cancers, dont la dissémination métastatique, la résistance à la chimiothérapie, la prolifération et l'angiogenèse (Murakami et al. 2002; Darash-Yahana et al. 2004; Li et al. 2004; Smith et al. 2004; Zeng et al. 2009). Récemment, plusieurs études ont montré l'existence d'un lien causal entre l'expression des récepteurs CXCR4 et ACKR3 et le pronostic de différents cancers solides et hématologiques (Scala et al. 2005; Jiang et al. 2006; Andre et al. 2006; Koishi et al. 2006; Spoo et al. 2007;

D'Alterio et al. 2010; Konoplev et al. 2011; Wang et al. 2012; He et al. 2013; An et al. 2014; D'Alterio et al. 2014; van den Berk et al. 2014; Sterlacci et al. 2016; Matsuo et al. 2016). Dans la B-LAL, on note cependant une certaine disparité des conclusions à travers les études quant à la valeur pronostique de CXCR4 (S. Wu et al. 2006; Konoplev et al. 2011; van den Berk et al. 2014). De plus, à notre connaissance, aucune étude n'a vérifié l'apport d'ACKR3 sur le pronostic des B-LAL. Ainsi, dans notre travail, nous avons utilisé notre modèle murin afin de vérifier si l'expression des récepteurs CXCR4 et d'ACKR3 sont des prédicteurs potentiels du risque individuel chez les enfants atteints d'une B-LAL.

4.2.2.1 CXCR4 comme marqueur de risque des B-LAL pédiatriques

Le récepteur de chimiokine CXCR4 contrôle la domiciliation et la rétention des CSH vers des niches spécifiques de la moelle osseuse (Peled et al. 1999; Broxmeyer et al. 2005; Sugiyama et al. 2006). Ces niches procurent un microenvironnement plaçant les cellules résidentes dans un état de quiescence (phase G₀) (Kunisaki et al. 2013). Seulement, les cellules malignes de différents cancers, dont les cancers hématologiques, sont capables de répondre aux signaux de CXCL12 et de migrer dans ces niches (Murakami et al. 2002; Darash-Yahana et al. 2004; Li et al. 2004; Smith et al. 2004). Comme le microenvironnement de ces dernières procure un effet anti-apoptotique et anti-prolifératif aux cellules résidentes, elles sont considérées par plusieurs comme étant les grandes responsables de l'échec au traitement chimiothérapique (Ishikawa et al. 2007; Tesfai et al. 2012; Duan et al. 2014). Un des points mis de l'avant pour le projet était donc de tester l'association entre l'expression de CXCR4 et la survie des souris greffées par des cellules malignes de patients.

Si, la majorité des précurseurs des cellules B, saines et malignes, expriment le récepteur CXCR4, il a été montré que son expression sur les cellules malignes est variable (Crazzolara et al. 2001; Schneider et al. 2002; Dürig et al. 2001; Corcione et al. 2006; Konoplev et al. 2011; van den Berk et al. 2014). Dans leur étude, Van Den Berk et al démontrent une association significative entre le niveau d'expression de CXCR4 et la probabilité de rechute de patients souffrant d'une B-LAL soulignant ainsi

l'importance de la précision de la quantification de CXCR4 (van den Berk et al. 2014). Les données acquises par cytométrie en flux sont sujettes à une variation de l'indice de fluorescence moyenne (MFI) détectée. S'il est évident que les MFI peuvent grandement varier d'un appareil à un autre, cette dernière varie également légèrement d'un jour à l'autre sur un même appareil. Pour contrer ces variations, dans notre étude, nous avons utilisé des billes de quantification permettant la création, pour chaque jour d'acquisition, d'une courbe standard. Cette dernière nous a permis de transformer les MFI en *anticorps liés aux cellules* (ABC), une unité standardisée éliminant la discrimination entre appareils et la variation de lecture sur un même appareil. De plus, cette transformation d'unité rend nos données transférables d'un centre à un autre (Pannu et al. 2001).

Comme montré précédemment par d'autres groupes, l'expression de CXCR4 en surface cellulaire dans nos échantillons varie aussi d'un patient à l'autre. De plus, dans notre modèle, nous trouvons la présence d'un seuil permettant une séparation significative entre les groupes CXCR4^{faible} et CXCR4^{élevé}, montrant une association entre la survie des souris et l'expression de CXCR4 à la surface des cellules greffées. Nos résultats diffèrent légèrement de ceux présentés dans une étude publiée précédemment (van den Berk et al. 2014). En effet, dans cette dernière, les auteurs présentent plutôt la présence de 2 seuils de séparation. Dans notre modèle, la présence de ce second seuil, délimitant la population CXCR4^{intermédiaire} n'est pas discernable, possiblement dû à la taille de notre population (n=33). Avec notre modèle de prédiction, 25% des souris greffées avec des cellules CXCR4^{élevé} survivent moins de 15 semaines, des résultats similaires au pourcentage de rechute des patients CXCR4^{intermédiaire/élevé} de l'étude de Van Den Berk et al (van den Berk et al. 2014). Ainsi, nos résultats montrent que l'expression de CXCR4 en surface des cellules greffées est un marqueur de prédiction du risque associé à la survie des souris recevant ces greffons.

Outre l'expression de CXCR4 en surface, nous avons également mesuré l'expression de ce dernier dans les compartiments intracellulaires de nos échantillons. Dans ces

conditions, nous avons détecté une expression allant de 2 à 120 fois supérieures à l'expression en surface. Cependant, l'association entre la survie des souris et l'expression de CXCR4 intracellulaire n'est pas concluante. Ces résultats soulignent l'importance de quantifier la protéine en surface plutôt que d'avoir recours à des méthodes reflétant l'expression totale comme l'immunohistochimie ou la quantification des ARN messagers (ARNm). Cette conclusion est supportée par les résultats de Wu et al, qui ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'ARNm de CXCR4 et le pronostic des patients B-LAL (Wu et al. 2006). En immunohistochimie, Konoplev et al sont arrivés au même constat où l'expression totale de CXCR4 ne corrèle pas avec le pronostic des patients (Konoplev et al. 2011).

Suite à son activation par CXCL12, CXCR4 subit une série de phosphorylation en C-terminal via les GRK (Busillo et al. 2010). Il a été montré pour la leucémie aigüe myéloïde, le carcinome pulmonaire à grandes cellules et aussi pour la B-LAL que la mesure par immunohistochimie de la phosphorylation en position S339 (pCXCR4) fournissait une valeur pronostique plus précise que la simple quantification de CXCR4 totale (Konoplev et al. 2011; Brault et al. 2014; Sterlacci et al. 2016). À l'aide de greffes de cellules Kasumi-1 exprimant stablement CXCR4 sauvage ou muté sur la S339 dans des souris NSG, Brault et al ont démontré que la phosphorylation de CXCR4 est associée à une rétention accrue des cellules dans la moelle osseuse. Ce constat va de pair avec les résultats démontrant le rôle de la signalisation de CXCR4 dans l'activation des intégrines permettant l'attachement des cellules malignes aux cellules stromales de la moelle osseuse (Burger et al. 2003; Hartmann et al. 2005). Si la mesure de pCXCR4 fournit une alternative à la quantification totale de CXCR4 par immunohistochimie, sa force de prédiction du risque par rapport à la quantification de l'expression en surface de CXCR4 par cytométrie en flux n'a jamais été testée. Il aurait été intéressant de mesurer le niveau de pCXCR4 dans nos échantillons afin de comparer la valeur prédictive de la survie de nos souris par rapport à nos données de CXCR4 en surface.

4.2.2.2 ACKR3 et son interaction fonctionnelle avec CXCR4

Le second récepteur de CXCL12, ACKR3, fait partie des récepteurs de chimiokine atypique. Il participe à l'activité migratoire dépendante de CXCR4 en régulant différents processus dont l'attachement cellulaire, l'orientation de migration des cellules et la migration transendothéliale (Burns et al. 2006; Hartmann et al. 2008; Boldajipour et al. 2008; Zabel et al. 2009; Décaillot et al. 2011; Naumann et al. 2010). Certains groupes ont également montré qu'ACKR3 promeut divers processus liés à la progression des cancers, dont l'angiogenèse, la croissance et la survie des cellules dans des lignées cellulaires et dans les modèles murins (Burns et al. 2006; Zheng et al. 2010; Singh & Lokeshwar 2011). Cependant, des études épidémiologiques ont montré que son expression est parfois associée à un bon, d'autre fois à un mauvais pronostic suggérant que son effet est cancer dépendant (D'Alterio et al. 2010; Yao et al. 2011; L. Wang et al. 2012; Tachezy et al. 2013; D'Alterio et al. 2014; Neve Polimeno et al. 2014). Malgré la présence d'une surexpression d'ACKR3 dans les leucémies myéloïdes et lymphoïdes (Melo et al. 2014; H. Y. Kim et al. 2015), la valeur pronostique de l'expression d'ACKR3 n'a jamais été testée dans les cancers de nature hématologique.

Dans les cellules B et T primaires, ACKR3 est majoritairement exprimé dans des compartiments sous-endothéliaux et cycle de manière transitoire à la surface des cellules (Hartmann et al. 2008; Naumann et al. 2010; Melo et al. 2014). Il a cependant été observé dans des lignées leucémiques que la distribution de l'expression d'ACKR3 pouvait être dérégulée, provoquant l'accumulation de la protéine en surface plutôt que dans les compartiments intracellulaires (Melo et al. 2014). Malgré tout, il semble que cette dérégulation n'affecte pas la fonction d'ACKR3 (Melo et al. 2014). Dans notre étude, nous observons le même phénomène sur nos échantillons primaires de moelle osseuse où la distribution du récepteur sur les blastes varie d'un patient à l'autre. Cependant, contrairement aux données de qPCR montrant une surexpression généralisée d'ACKR3 dans les cellules de moelle osseuse des patients B-LAL (Melo et al. 2014), nos données d'expression sont plus nuancées avec

seulement une portion des cellules qui l'expriment. Ainsi, nous avons tenté de montrer une association entre la survie des souris greffées et le pourcentage de cellules positives pour ACKR3, tous compartiments confondus. Contrairement aux observations rapportées pour les cancers rénaux et colorectaux montrant ACKR3 comme un marqueur pronostic indépendant (D'Alterio et al. 2010; Wang et al. 2012; D'Alterio et al. 2014), nos résultats montrent plutôt une absence d'association entre ACKR3 et la survie de nos souris.

Cela dit, des observations faites précédemment par d'autres groupes montrent qu'ACKR3 a la capacité d'hétérodimériser avec CXCR4 et de moduler la réponse signalétique CXCR4-dépendante (Levoye et al. 2009; Décaillot et al. 2011). De plus, d'Alterio et al ont montré que la prédiction du risque par CXCR4 pour le cancer du côlon était bonifiée lorsque les critères CXCR4^{élevé} et ACKR3^{faible} sont combinés (D'Alterio et al. 2014). La combinaison de ces critères sous-entend qu'ACKR3, modulateur de CXCR4, ne peut agir que s'il y a présence de CXCR4 (D'Alterio et al. 2014). En procédant de cette manière, nous montrons que les souris greffées avec des échantillons combinant une forte présence d'ACKR3 et une expression de CXCR4 élevée en surface ont effectivement une survie similaire au groupe ayant une faible expression de CXCR4.

Ainsi, nos résultats montrent que l'expression de CXCR4 en surface, mais pas ACKR3, est un marqueur de prédiction de la survie dans notre modèle de souris. Nous avons également montré que l'expression d'ACKR3 permet de discriminer les échantillons ayant une forte expression de CXCR4 améliorant ainsi la force de prédiction de la survie de nos souris. Ces résultats suggèrent que CXCR4 et ACKR3 pourraient être des marqueurs de risque de rechute potentiels pour les enfants atteints d'une B-LAL.

4.2.3 La combinaison des marqueurs pronostics

Lors de la stratification du risque pour la B-LAL pédiatrique, le classement des patients repose sur une liste de marqueurs cytogénétiques (voir section 1.4.5) où

chaque marqueur est indépendant des autres. Autrement dit, la présence d'un seul marqueur hors norme est suffisant pour faire changer le classement du patient d'un risque standard à un risque élevé. Récemment, il a été montré dans la lignée cellulaire Ba/F3 (cellules pro-B murines) et dans des cellules murines pré-B primaires que la présence de la translocation t(12;21) empêchait la migration découlant de l'activation de CXCR4 (Palmi et al. 2014). Cette observation soulève la possibilité que CXCR4 soit un marqueur pronostic, mais uniquement pour un sous-groupe de patients.

Pour tester cette hypothèse, nous avons tenté une analyse en combinant les différents marqueurs pour stratifier les échantillons dans notre modèle. La séparation des groupes s'est faite sur la base de plusieurs critères. D'abord, nous avons stratifié les échantillons selon les critères combinés de CXCR4 et d'ACKR3 décrits dans la section précédente (CXCR4^{élevé}ACKR3^{faible} vs (CXCR4^{faible} ou ACKR3^{élevé})). Ensuite, étant donné que les patients porteurs de la translocation t(12;21) ou d'une HD sont généralement associés à un bon pronostic (Place et al. 2015; Pui et al. 2017), les souris greffées avec les échantillons porteurs de ces anomalies cytogénétiques ont automatiquement été relayées dans le groupe (CXCR4^{faible} ou ACKR3^{élevé}). Avec cet algorithme (CXCR4^{élevé}ACKR3^{faible}, non-t(12;21) et non-HD versus CXCR4^{faible}, ACKR3^{élevé}, t(12;21) ou HD), nous arrivons à cibler adéquatement 6 des 7 échantillons ayant mené à une survie de moins de 12 semaines. Ces résultats supportent la thèse selon laquelle l'analyse du profil combiné de plusieurs marqueurs pronostics permet une augmentation de la précision dans l'identification des échantillons à haut risque d'échec au traitement.

4.2.4 Perspectives & limitations

4.2.4.1 CXCL12 et la maladie résiduelle

Le lien est très fort entre la MRD et la rechute leucémique. Ainsi, si on avait un moyen de prédire la réponse au traitement, on serait en mesure de prédire la rechute. Nous avons décrit précédemment que le microenvironnement des niches de la

moelle osseuse procure aux CSH un état de quiescence et une protection contre les stress myélotoxiques (Broxmeyer et al. 2003). Outre les CSH, les cellules tumorales se domiciliant dans la moelle osseuse semblent acquérir une chimiorésistance. Ce phénomène de chimiorésistance sous-tend que le microenvironnement ne profite pas uniquement aux CSH, mais à toutes les cellules résidentes des niches. Sachant que la chimiokine CXCL12 est responsable de la domiciliation et de la rétention des CSH dans les niches artériolaires de la moelle osseuse, la question est : quel rôle joue-t-elle dans la chimiorésistance de la B-LAL pédiatrique?

Dans le modèle PDX utilisé dans cette thèse, nous avons montré que l'utilisation des données d'expression de CXCR4 et d'ACKR3 en combiné (CXCR4^{élevé}ACKR3^{faible} versus (CXCR4^{faible} ou CXCR4^{élevé}/ACKR3^{élevé})) est prédicteur de la survie des souris. Si nos données rapportent le potentiel derrière l'utilisation des données d'expression de CXCR4 et d'ACKR3 comme marqueurs de risque, ils ne donnent aucune indication sur la chimiorésistance potentiellement associée à leur expression. Pour vérifier l'effet de la chimiorésistance dans notre modèle, il faudrait maintenant réaliser des essais de PDX en souris en présence de chimiothérapie. Un tel essai permettrait de mieux cerner le rôle de CXCR4 et d'ACKR3 dans la réponse au médicament et renforcerait notre découverte.

4.2.4.2 La validation de l'algorithme de prédiction du pronostic des B-LAL

Dans la deuxième section de cette thèse, nous avons identifié une combinaison de marqueurs de risque potentiels pouvant prédire la survie dans notre modèle de souris. Quoique prometteur, la puissance statistique de cet algorithme reste relativement limitée dû à la taille restreinte de notre échantillonnage (n=33). Parmi la diversité d'anomalies cytogénétiques touchant les B-LAL, seules la translocation t(12;21) (n=15) et la HD (n=9) étaient assez bien représentées pour les utiliser lors de l'analyse combinée des marqueurs. Les résultats de cette thèse constituent ainsi un point de départ à une étude rétrospective sur une population nettement plus grande (n ≥ 100) vérifiant d'une part la validité des facteurs d'inclusion (CXCR4^{élevé}ACKR3^{faible}) et d'exclusion (t(12;21) et HD) de notre algorithme. Avec un

meilleur échantillonnage, il serait possible d'étendre le nombre de marqueurs phénotypiques (comme CD20) et cytogénétiques (MLL et t(9;22)) inclus dans notre algorithme augmentant ainsi potentiellement la fiabilité de ce dernier.

4.2.4.3 Validation de notre modèle sur le pronostic des patients

Les rechutes prennent souvent plus de 5 ans avant de survenir. Dans notre étude, nous n'avons pas assez de recul pour vérifier si l'algorithme proposé est effectivement associé au pronostic des patients qui eux, contrairement à notre modèle murin, sont sous traitement. Ainsi, d'ici quelques années, il sera possible de valider la valeur pronostique de notre algorithme sur les patients présentement à l'étude. Tout comme pour l'algorithme, une augmentation de l'échantillonnage sera également possiblement nécessaire pour atteindre une puissance statistique intéressante.

4.2.4.4 L'algorithme et la réduction de thérapie pour les B-LAL en pédiatrie

Récemment, plusieurs groupes ont montré que les enfants ayant été soumis à un traitement chimiothérapique ont un risque accru de développer une néoplasie sévère, incapacitante ou mortelle dans les 25 ans suivant la rémission du cancer (Diller 2011; Armstrong et al. 2016; Saultier et al. 2016). Pour éviter ces complications, une des approches présentement considérées est la réduction de thérapie. Le principe consiste à diminuer le temps de la thérapie de maintenance (présentement = 24 mois) pour les patients considérés comme ayant un faible risque afin de diminuer leur chance de développer une néoplasie. Dans cette optique, des oncologues japonais ont tenté de diminuer le temps de maintenance de 24 à 6 mois pour des enfants volontaires atteints d'une B-LAL (Kato et al. 2017). Dans ces conditions, la survie sans effets adverses sur 10 ans est assez basse comparativement aux standards (66% vs 88%) (Pui et al. 2017). Cela dit, il est intéressant de noter que la survie sans effets adverses du traitement réduit pour les patients porteurs de la translocation t(12;21) (93%) et t(1;19) (90%) est similaire à celles du traitement standard (95,8% et 89,3% respectivement) (Kato et al. 2017; Pui et al. 2017). Ainsi, ces résultats

suggèrent que la stratification plus fine du risque de rechute individuel, comme l'utilisation de notre algorithme par exemple, pourrait permettre l'identification de patients se qualifiant pour une réduction de thérapie.

4.2.4.5 CXCR4, un marqueur pronostic ou une cible thérapeutique?

Le Plerixafor (AMD3100 ou Mozobil®) – un agoniste partiel de CXCR4 inhibant la fonction migratoire du récepteur – est présentement utilisé pour mobiliser les CSH dans la périphérie en vue de leur greffe autologue pour les patients souffrant de lymphome non-Hodgikien ou de myélome multiple (Zhang et al. 2002; DiPersio et al. 2007; DiPersio et al. 2009). Avec la démonstration que CXCR4 est un marqueur indépendant de mauvais pronostic pour plusieurs formes de cancers hématologiques et épithéliaux, différents groupes s'intéressent maintenant à savoir si CXCR4 serait également une cible thérapeutique (Scala et al. 2005; Jiang et al. 2006; Andre et al. 2006; Koishi et al. 2006; Spoo et al. 2007; L. Wang et al. 2012; He et al. 2013; An et al. 2014; D'Alterio et al. 2014; Sterlacci et al. 2016; Matsuo et al. 2016).

En bloquant CXCR4, le but est de cibler le phénomène de chimiorésistance découlant de la relocalisation des cellules malignes dans le microenvironnement des niches de la moelle osseuse. Selon le concept, en l'inhibant, les cellules malignes devraient se mobiliser et sortir de leur état de quiescence ce qui les sensibiliserait au traitement chimiothérapique. Récemment, plusieurs groupes ont fait la démonstration qu'en utilisant des inhibiteurs de CXCR4 dans des modèles de souris transgéniques ou greffées avec des lignées tumorales, le phénomène de sensibilisation est bel et bien observé (Zeng et al. 2009; Parameswaran et al. 2011; Hassan et al. 2011; Weisberg et al. 2012; Domanska et al. 2012; Welschinger et al. 2013; Chen et al. 2015; Reinholdt et al. 2016; Gravina et al. 2017).

Faisant suite à ces résultats encourageants, plusieurs essais cliniques de phase I et II se sont organisés et sont présentement en cours notamment dans les leucémies aigües (Uy et al. 2012; Cooper et al. 2013; Becker et al. 2014; Ghobrial et al. 2014; Ghobrial et al. 2015; Borthakur et al. 2016; Uy et al. 2017). Si de manière générale

les résultats rapportés dans les rapports de progression des études sont positifs, il est à noter que l'un des essais de phase II portant sur l'effet adjuvant du Plerixafor avant la chimiothérapie sur les patients souffrant d'une leucémie aigüe myéloïde a dû être arrêté prématurément à cause de la futilité du traitement (Uy et al. 2012; Uy et al. 2017). Dans leur conclusion, les auteurs de cet essai clinique rapportent cependant que l'absence d'effet bénéfique de CXCR4 découlait possiblement de la molécule choisie pour l'étude. Il a déjà été montré que l'activation partielle de CXCR4 par le Plerixafor induisait une augmentation d'expression de CXCR4 en surface, un phénomène également observé dans leur étude. Comme la demi-vie du Plerixafor est relativement courte (4 à 5h), il est possible que l'utilisation du Plerixafor induise l'effet inverse à celui recherché. Ainsi, Uy et al recommandent l'utilisation d'inhibiteur alternatif de CXCR4 (Uy et al. 2017). Dans la seule étude (phase I) incluant des patients LAL pédiatriques, quoique limitée par la taille de la population (n=6), une absence d'amélioration fut également observée avec le Plerixafor (Cooper et al. 2013).

Malgré les résultats positifs des inhibiteurs de CXCR4 en phase préclinique, les résultats préliminaires des essais cliniques sont, pour l'instant, mitigés comme en témoigne le retrait de l'essai de Uy et al (Uy et al. 2012; Uy et al. 2017). Avant de pouvoir mesurer adéquatement s'il y a un bénéfice à tirer de cette approche thérapeutique, il faudra attendre la fin des études cliniques utilisant des inhibiteurs alternatifs de CXCR4 tel le BL-8040 (antagoniste de CXCR4) ou l'Ulocuplumab (un anti-CXCR4) (Becker et al. 2014; Ghobrial et al. 2014; Ghobrial et al. 2015; Borthakur et al. 2016). Au final, si l'association entre l'expression de CXCR4 et le pronostic des patients souffrant de divers cancers soulève peu de doute, il n'est pas encore clair si ce marqueur pronostic se transformera un jour en cible thérapeutique exploitable.

Chapitre V – Conclusion

Dans cette thèse, nous avons appliqué l'expertise en pharmacologie des récepteurs de chimiokines de notre laboratoire pour adresser deux problématiques liées au rôle pharmacologique et clinique de CXCL12 et de ses récepteurs CXCR4 et ACKR3. Dans un premier temps, nous avons décrit le mode de liaison d'un inhibiteur de CXCR4, le TC14012, sur ACKR3.

Nos résultats complètent les observations publiées précédemment par notre laboratoire et montrent que le manque de spécificité du TC14012 découle principalement de la flexibilité intrinsèque de la molécule. De plus, nos données suggèrent que le mode de liaison du TC14012 est similaire sur ACKR3 et sur CXCR4. Également, nos résultats présentent quelques résidus importants à l'activation du récepteur ACKR3. Les résultats de notre étude pourront servir au développement futur de molécules plus spécifiques à CXCR4 ou à ACKR3. D'ailleurs, des collaborateurs ont utilisé nos données afin de synthétiser la molécule FC313, spécifique à ACKR3 (Oishi et al. 2015).

Dans un deuxième temps, nous avons décrit le potentiel des PDX pour la recherche de nouveaux marqueurs de stratification de la rechute des enfants atteints d'une B-LAL. Nos résultats montrent une association entre l'expression de CXCR4 et d'ACKR3 sur les cellules leucémiques primaires et la survie des souris greffées. Nous présentons également que l'utilisation d'un algorithme combinant plusieurs marqueurs de stratification prédit avec une meilleure précision la survie des souris.

L'algorithme présenté dans cette deuxième section devra être validé dans une étude rétrospective subséquemment. Néanmoins, il pourra être utile pour orienter les prochaines études épidémiologiques visant l'identification de marqueurs de stratification du risque chez les patients atteints d'une B-LAL. Éventuellement, ce type d'algorithme pourrait être utilisé pour la stratification des individus atteints d'une B-LAL afin d'identifier ceux qui pourraient bénéficier d'une réduction de thérapie.

Références

- Agliano, A. et al., 2008. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2R γ null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, 123(9), pp.2222–2227.
- Aiuti, A. et al., 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *The Journal of experimental medicine*, 185(1), pp.111–120.
- Aiuti, A., Taviani, M., et al., 1999. Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. *European journal of immunology*, 29(6), pp.1823–1831.
- Aiuti, A., Turchetto, L., et al., 1999. Human CD34(+) cells express CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor-1. Implications for infection by T-cell tropic human immunodeficiency virus. *Blood*, 94(1), pp.62–73.
- Alvarnas, J.C. et al., 2016. NCCN Guidelines Version 2.2016 Panel Members Acute Lymphoblastic Leukemia. *nccn.org*. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf [Accessed April 28, 2017].
- An, H. et al., 2014. High CXCR4 chemokine receptor 4 expression is an adverse prognostic factor in patients with clear-cell renal cell carcinoma. *British journal of cancer*, 110(9), pp.2261–2268.
- Andre, F. et al., 2006. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Annals of oncology*, 17(6), pp.945–951.
- Angers, S., Salahpour, A. & Bouvier, M., 2002. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42(1), pp.409–435.
- Arai, F. et al., 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118(2), pp.149–161.
- Aricò, M. et al., 2016. Clinical Outcome of Children With Newly Diagnosed Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Treated Between 1995 and 2005. *Journal of Clinical Oncology*, 28(31), pp.4755–4761.
- Armstrong, G.T. et al., 2016. Reduction in Late Mortality among 5-Year Survivors of Childhood Cancer. *The New England journal of medicine*, 374(9), pp.833–842.

- Ayoub, M.A. et al., 2007. Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galphai1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Molecular pharmacology*, 71(5), pp.1329–1340.
- Babcock, G.J., Farzan, M. & Sodroski, J., 2003. Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *The Journal of biological chemistry*, 278(5), pp.3378–3385.
- Bachelier, F. et al., 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacological reviews*, 66(1), pp.1–79.
- Balabanian, K. et al., 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, 280(42), pp.35760–35766.
- Bassan, R. & Hoelzer, D., 2011. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology*, 29(5), pp.532–543.
- Becker, P.S. et al., 2014. Targeting the CXCR4 Pathway: Safety, Tolerability and Clinical Activity of Ulocuplumab (BMS-936564), an Anti-CXCR4 Antibody, in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, 124(21), pp.386–386.
- Belkov, V.M. et al., 1999. Reduced Folate Carrier Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia: A Mechanism for Ploidy but not Lineage Differences in Methotrexate Accumulation. *Blood*, 93(5), pp.1643–1650.
- Benovic, J.L. et al., 1987. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 84(24), pp.8879–8882.
- Benredjem, B. et al., 2016. Mutational Analysis of Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3/CXCR7) Interaction with its Chemokine Ligands CXCL11 and CXCL12. *The Journal of biological chemistry*, p.jbc.M116.762252.
- Berahovich, R.D. et al., 2010. CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes. *Journal of immunology*, 185(9), pp.5130–5139.
- Berahovich, R.D. et al., 2014. Endothelial expression of CXCR7 and the regulation of systemic CXCL12 levels. *Immunology*, 141(1), pp.111–122.
- Berger, E.A., Murphy, P.M. & Farber, J.M., 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology*, 17, pp.657–700.

- Bhojwani, D. & Pui, C.-H., 2013. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The lancet oncology*, 14(6), pp.e205–17.
- Bleul, C.C. et al., 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), pp.1925–1930.
- Bleul, C.C., Schultze, J.L. & Springer, T.A., 1998. B Lymphocyte Chemotaxis Regulated in Association with Microanatomic Localization, Differentiation State, and B Cell Receptor Engagement. *The Journal of experimental medicine*, 187(5), pp.753–762.
- Boldajipour, B. et al., 2008. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*, 132(3), pp.463–473.
- Borgmann, A. et al., 2000. CHILDHOOD ALL BLASTS RETAIN PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS UPON LONG-TERM SERIAL PASSAGE IN NOD/SCID MICE. *Pediatric Hematology-Oncology*, 17(8), pp.635–650.
- Borowitz, M.J. et al., 1997. Prognostic Significance of Fluorescence Intensity of Surface Marker Expression in Childhood B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood*, 89(11), pp.3960–3966.
- Borthakur, G. et al., 2016. Final Phase IIa Study Results Evaluating the CXCR4 Antagonist BL-8040 in Combination with Cytarabine (Ara-C) for the Treatment of Relapsed/Refractory AML Patients. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 16, p.S28.
- Bowes, J. et al., 2012. Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(12), pp.909–922.
- Brault, L. et al., 2014. CXCR4-SERINE339 regulates cellular adhesion, retention and mobilization, and is a marker for poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 28(3), pp.566–576.
- Broxmeyer, H.E. et al., 2005. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *The Journal of experimental medicine*, 201(8), pp.1307–1318.
- Broxmeyer, H.E. et al., 2003. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *Journal of leukocyte biology*, 73(5), pp.630–638.
- Burger, M. et al., 2003. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene*, 22(50), pp.8093–8101.

- Burns, J.M. et al., 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine*, 203(9), pp.2201–2213.
- Busillo, J.M. et al., 2010. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *The Journal of biological chemistry*, 285(10), pp.7805–7817.
- Cai, H. & Devreotes, P.N., 2011. Moving in the right direction: how eukaryotic cells migrate along chemical gradients. *Seminars in cell & developmental biology*, 22(8), pp.834–841.
- Canals, M. et al., 2012. Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking. *PLoS one*, 7(3), p.e34192.
- Chang, H., Jiang, A. & Brandwein, J., 2010. Prognostic relevance of CD20 in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 95(6), pp.1040–1042.
- Chen, Y. et al., 2015. CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*, 61(5), pp.1591–1602.
- Cheng, T. et al., 2000. Hematopoietic Stem Cell Quiescence Maintained by p21cip1/waf1. *Science*, 287(5459), pp.1804–1808.
- Cheshier, S.H. et al., 1999. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), pp.3120–3125.
- Chung, K.Y. et al., 2011. Conformational changes in the G protein Gs induced by the β_2 adrenergic receptor. *Nature*, 477(7366), pp.611–615.
- Cooper, T.M. et al., 2013. Chemosensitization and Mobilization Of AML/ALL/MDS With Plerixafor (AMD 3100), a CXCR4 Antagonist: A Phase I Study Of Plerixafor + Cytarabine and Etoposide In Pediatric Patients With Acute Leukemia and MDS. *Blood*, 122(21), pp.2680–2680.
- Corcione, A. et al., 2006. Chemokine receptor expression and function in childhood acute lymphoblastic leukemia of B-lineage. *Leukemia research*, 30(4), pp.365–372.
- Crazzolaro, R. et al., 2001. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 115(3), pp.545–553.

- D'Alterio, C. et al., 2014. A prognostic model comprising pT stage, N status, and the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 powerfully predicts outcome in neoadjuvant resistant rectal cancer patients. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, 135(2), pp.379–390.
- D'Alterio, C. et al., 2010. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Current cancer drug targets*, 10(7), pp.772–781.
- D'Apuzzo, M. et al., 1997. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *European journal of immunology*, 27(7), pp.1788–1793.
- Darash-Yahana, M. et al., 2004. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB journal*, 18(11), pp.1240–1242.
- DeWire, S.M. et al., 2007. β -Arrestins and Cell Signaling. *Annual review of physiology*, 69(1), pp.483–510.
- Décaillot, F.M. et al., 2011. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 286(37), pp.32188–32197.
- Di Marzio, P., Tse, J. & Landau, N.R., 1998. Chemokine receptor regulation and HIV type 1 tropism in monocyte-macrophages. *AIDS research and human retroviruses*, 14(2), pp.129–138.
- Di Salvo, J. et al., 2000. The CXCR4 agonist ligand stromal derived factor-1 maintains high affinity for receptors in both G α (i)-coupled and uncoupled states. *European journal of pharmacology*, 409(2), pp.143–154.
- Diller, L., 2011. Clinical practice. Adult primary care after childhood acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 365(15), pp.1417–1424.
- Ding, L. & Morrison, S.J., 2013. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 495(7440), pp.231–235.
- DiPersio, J. et al., 2007. A Phase III, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Comparative Trial of AMD3100 (Plerixafor)+G-CSF vs. G-CSF+Placebo for Mobilization in Multiple Myeloma (MM) Patients for Autologous Hematopoietic Stem Cell (aHSC) Transplantation. *Blood*, 110(11), pp.445–445.
- DiPersio, J.F. et al., 2009. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology*, 27(28), pp.4767–4773.

- Domanska, U.M. et al., 2012. CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia*, 14(8), pp.709–718.
- Donovan, J.W. et al., 2000. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 95(8), pp.2651–2658.
- Drury, L.J. et al., 2011. Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), pp.17655–17660.
- Duan, C.-W. et al., 2014. Leukemia propagating cells rebuild an evolving niche in response to therapy. *Cancer cell*, 25(6), pp.778–793.
- Dürig, J., Schümcker, U. & Dührsen, U., 2001. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. *Leukemia*, 15(5), pp.752–756.
- Ekins, S., Mestres, J. & Testa, B., 2007. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *British journal of pharmacology*, 152(1), pp.21–37.
- FDA, 2012. *FULL PRESCRIBING INFORMATION OF RITUXIMAB*, Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/103705s5367s53881bl.pdf.
- Feng, Y. et al., 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272(5263), pp.872–877.
- Freidinger, R.M. et al., 1980. Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone: evidence from a conformationally constrained analog. *Science*, 210(4470), pp.656–658.
- Freitas, C. et al., 2017. Lymphoid differentiation of hematopoietic stem cells requires efficient Cxcr4 desensitization. *The Journal of experimental medicine*, 118, p.jem.20160806.
- Galés, C. et al., 2006. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nature structural & molecular biology*, 13(9), pp.778–786.
- Galy, A. et al., 1995. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*, 3(4), pp.459–473.
- Ghobrial, I.M. et al., 2015. Final Results of the Phase I/II Study of Chemosensitization Using the CXCR4 Inhibitor Plerixafor in Combination with Bortezomib in Patients with Relapsed or Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood*, 126(23), pp.4256–4256.

- Ghobrial, I.M. et al., 2014. Phase Ib Study of the Novel Anti-CXCR4 Antibody Ulocuplumab (BMS-936564) in Combination with Lenalidomide Plus Low-Dose Dexamethasone, or with Bortezomib plus Dexamethasone in Subjects with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Blood*, 124(21), pp.3483–3483.
- Ginaldi, L. et al., 1998. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of clinical pathology*, 51(5), pp.364–369.
- Golan, K. et al., 2012. S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release. *Blood*, 119(11), pp.2478–2488.
- Gökbuget, N. & Hoelzer, D., 2006. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, 2006(1), pp.133–141.
- Gravel, S. et al., 2010. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *The Journal of biological chemistry*, 285(49), pp.37939–37943.
- Gravina, G.L. et al., 2017. The brain-penetrating CXCR4 antagonist, PRX177561, increases the antitumor effects of bevacizumab and sunitinib in preclinical models of human glioblastoma. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), p.5.
- Greenbaum, A. et al., 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*, 495(7440), pp.227–230.
- Gustavsson, M. et al., 2017. Structural basis of ligand interaction with atypical chemokine receptor 3. *Nature communications*, 8, p.14135.
- Hamada, T. et al., 1998. Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *The Journal of experimental medicine*, 188(3), pp.539–548.
- Hansch, C. & Fujita, T., 1964. ρ - σ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), pp.1616–1626.
- Hantschel, O. & Superti-Furga, G., 2004. Regulation of the c-Abl and Bcr[ndash]Abl tyrosine kinases. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(1), pp.33–44.
- Hartmann, T.N. et al., 2008. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *Journal of leukocyte biology*, 84(4), pp.1130–1140.

- Hartmann, T.N. et al., 2005. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling cooperate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene*, 24(27), pp.4462–4471.
- Hassan, S. et al., 2011. CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 129(1), pp.225–232.
- Hatse, S. et al., 2002. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS letters*, 527(1-3), pp.255–262.
- Hattermann, K. et al., 2010. The Chemokine Receptor CXCR7 Is Highly Expressed in Human Glioma Cells and Mediates Antiapoptotic Effects. *Cancer research*, 70(8), pp.3299–3308.
- He, H. et al., 2013. Upregulated expression of C-X-C chemokine receptor 4 is an independent prognostic predictor for patients with gastric cancer. *PloS one*, 8(8), p.e71864.
- Hernandez, P.A. et al., 2003. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nature genetics*, 34(1), pp.70–74.
- Hidalgo, A. et al., 2001. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology*, 29(3), pp.345–355.
- Hiebert, S.W. et al., 1996. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 16(4), pp.1349–1355.
- Hirokazu Tamamura et al., 2004. Stereoselective Synthesis of [l-Arg-l/d-3-(2-naphthyl)alanine]-Type (E)-Alkene Dipeptide Isosteres and Its Application to the Synthesis and Biological Evaluation of Pseudopeptide Analogues of the CXCR4 Antagonist FC131. *Journal of medicinal chemistry*, 48(2), pp.380–391.
- Hu, X. et al., 2007. Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis. *Circulation*, 116(6), pp.654–663.
- Hua, T. et al., 2016. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell*, 167(3), pp.750–762.e14.
- Humpert, M.-L. et al., 2012. Complementary methods provide evidence for the expression of CXCR7 on human B cells. *Proteomics*, 12(12), pp.1938–1948.

- Hunger, S.P. et al., 2016. Improved Survival for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Between 1990 and 2005: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology*, 30(14), pp.1663–1669.
- Iglesias, P.A. & Devreotes, P.N., 2008. Navigating through models of chemotaxis. *Current opinion in cell biology*, 20(1), pp.35–40.
- Imamura, R. et al., 2005. Mobilization of Human Lymphoid Progenitors after Treatment with Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Immunology*, 175(4), pp.2647–2654.
- Infantino, S., Moepps, B. & Thelen, M., 2006. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *The Journal of Immunology*, 176(4), pp.2197–2207.
- Ishikawa, F. et al., 2007. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature biotechnology*, 25(11), pp.1315–1321.
- Itkin, T. et al., 2016. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*, 532(7599), pp.323–328.
- Ito, K. et al., 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature medicine*, 12(4), pp.446–451.
- Jaakola, V.-P. et al., 2008. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science*, 322(5905), pp.1211–1217.
- Jeha, S. et al., 2006. Prognostic significance of CD20 expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 108(10), pp.3302–3304.
- Jiang, Y.-P. et al., 2006. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecologic oncology*, 103(1), pp.226–233.
- Johnston, G.A. et al., 1974. Spinal interneurone excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid. *Nature*, 248(5451), pp.804–805.
- Kajiyama, H. et al., 2008. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 122(1), pp.91–99.
- Kalatskaya, I. et al., 2009. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Molecular pharmacology*, 75(5), pp.1240–1247.
- Kang, Y. et al., 2015. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*, 523(7562), pp.561–567.

- Katayama, Y. et al., 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 124(2), pp.407–421.
- Kato, M. et al., 2017. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia*, 31(3), pp.580–584.
- Khan, A.R. et al., 1998. Lowering the entropic barrier for binding conformationally flexible inhibitors to enzymes. *Biochemistry*, 37(48), pp.16839–16845.
- Khoury, E. et al., 2014. Differential regulation of endosomal GPCR/ β -arrestin complexes and trafficking by MAPK. *The Journal of biological chemistry*, 289(34), pp.23302–23317.
- Kim, H.K. et al., 2006. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood*, 108(3), pp.812–820.
- Kim, H.Y. et al., 2015. Expression and functional roles of the chemokine receptor CXCR7 in acute myeloid leukemia cells. *Blood research*, 50(4), pp.218–226.
- Koishi, K. et al., 2006. Persistent CXCR4 expression after preoperative chemoradiotherapy predicts early recurrence and poor prognosis in esophageal cancer. *World journal of gastroenterology*, 12(47), pp.7585–7590.
- Konoplev, S. et al., 2011. Phosphorylated CXCR4 is associated with poor survival in adults with B-acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 117(20), pp.4689–4695.
- Krop, I. et al., 1996. Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19. *European journal of immunology*, 26(1), pp.238–242.
- Kufareva, I. et al., 2011. Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment. *Structure*, 19(8), pp.1108–1126.
- Kunisaki, Y. et al., 2013. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 502(7473), pp.637–643.
- Labrosse, B. et al., 1998. Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *Journal of virology*, 72(8), pp.6381–6388.
- Levoye, A. et al., 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113(24), pp.6085–6093.
- Li, Y.M. et al., 2004. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer cell*, 6(5), pp.459–469.
- Lock, R.B. et al., 2002. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals

- intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. *Blood*, 99(11), pp.4100–4108.
- Lohse, M.J. et al., 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, 248(4962), pp.1547–1550.
- Luker, K.E. et al., 2010. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene*, 29(32), pp.4599–4610.
- Luker, K.E., Gupta, M. & Luker, G.D., 2009. Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation. *FASEB journal*, 23(3), pp.823–834.
- Luker, K.E., Gupta, M., Steele, J.M., et al., 2009. Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia*, 11(10), pp.1022–1035.
- Luttrell, L.M. et al., 1999. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 283(5402), pp.655–661.
- M Kamazani, F. et al., 2014. The Expression and Prognostic Impact of CD95 Death Receptor and CD20, CD34 and CD44 Differentiation Markers in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Iranian Journal of Pediatrics*, 24(4), pp.371–380.
- Madden, S.L. et al., 2004. Vascular gene expression in nonneoplastic and malignant brain. *The American journal of pathology*, 165(2), pp.601–608.
- Maiga, A. et al., 2016. Transcriptome analysis of G protein-coupled receptors in distinct genetic subgroups of acute myeloid leukemia: identification of potential disease-specific targets. *Blood cancer journal*, 6(6), p.e431.
- Maishi, N. et al., 2012. CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathology international*, 62(5), pp.309–317.
- Manglik, A. et al., 2012. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485(7398), pp.321–326.
- Mannelli, F. et al., 2012. CD20 expression has no prognostic role in Philadelphia-negative B-precursor acute lymphoblastic leukemia: new insights from the molecular study of minimal residual disease. *Haematologica*, 97(4), pp.568–571.
- Marchese, A. & Benovic, J.L., 2001. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *The Journal of biological chemistry*, 276(49), pp.45509–45512.
- Marchesi, F. et al., 2004. Increased Survival, Proliferation, and Migration in Metastatic Human Pancreatic Tumor Cells Expressing Functional CXCR4. *Cancer research*, 64(22), pp.8420–8427.

- Matsuo, H. et al., 2016. CXCR4 Overexpression is a Poor Prognostic Factor in Pediatric Acute Myeloid Leukemia With Low Risk: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatric Blood & Cancer*, 63(8), pp.1394–1399.
- Maury, S. et al., 2010. Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 95(2), pp.324–328.
- Maury, S. et al., 2016. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 375(11), pp.1044–1053.
- McCudden, C.R. et al., 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*, 62(5), pp.551–577.
- Meads, M.B., Hazlehurst, L.A. & Dalton, W.S., 2008. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clinical cancer research*, 14(9), pp.2519–2526.
- Melo, R. de C.C. et al., 2014. CXCR7 Is Highly Expressed in Acute Lymphoblastic Leukemia and Potentiates CXCR4 Response to CXCL12. *PLoS one*, 9(1), p.e85926.
- Meyer, L.H. et al., 2011. Early relapse in ALL is identified by time to leukemia in NOD/SCID mice and is characterized by a gene signature involving survival pathways. *Cancer cell*, 19(2), pp.206–217.
- Méndez-Ferrer, S. et al., 2008. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, 452(7186), pp.442–447.
- Miao, Z. et al., 2007. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), pp.15735–15740.
- Miyamoto, K. et al., 2007. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell stem cell*, 1(1), pp.101–112.
- Morrison, S.J. & Spradling, A.C., 2008. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell*, 132(4), pp.598–611.
- Muller, A. et al., 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), pp.50–56.
- Mullighan, C.G., 2012. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation*, 122(10), pp.3407–3415.

- Murakami, T. et al., 2002. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer research*, 62(24), pp.7328–7334.
- Murphy, P.M., 2001. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *New England Journal of Medicine*, 345(11), pp.833–835.
- Mysinger, M.M. et al., 2012. Structure-based ligand discovery for the protein-protein interface of chemokine receptor CXCR4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), pp.5517–5522.
- Nagasawa, T. et al., 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382(6592), pp.635–638.
- Naithani, R. et al., 2012. CD20 has no prognostic significance in children with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 97(9), pp.e31–e32.
- Naumann, U. et al., 2010. CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PloS one*, 5(2), p.e9175.
- Nervi, B. et al., 2009. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood*, 113(24), pp.6206–6214.
- Neve Polimeno, M. et al., 2014. CXCR4 expression affects overall survival of HCC patients whereas CXCR7 expression does not. *Cellular & molecular immunology*, 12(4), pp.474-482.
- Nie, Y., Han, Y.-C. & Zou, Y.-R., 2008. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(4), pp.777–783.
- Nijmeijer, B., 2001. Monitoring of engraftment and progression of acute lymphoblastic leukemia in individual NOD/SCID mice. *Experimental hematology*, 29(3), pp.322–329.
- Nobles, M., Benians, A. & Tinker, A., 2005. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), pp.18706–18711.
- North, T.E. et al., 2004. Runx1 Is Expressed in Adult Mouse Hematopoietic Stem Cells and Differentiating Myeloid and Lymphoid Cells, But Not in Maturing Erythroid Cells. *Stem Cells*, 22(2), pp.158–168.

- Oishi, S. et al., 2015. Development of Novel CXC Chemokine Receptor 7 (CXCR7) Ligands: Selectivity Switch from CXCR4 Antagonists with a Cyclic Pentapeptide Scaffold. *Journal of medicinal chemistry*, 58(13), pp.150604173117008–5225.
- Ou, D.-Y., Luo, J.-M. & Ou, D.-L., 2015. CD20 and Outcome of Childhood Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 37(3), pp.e138–e142.
- Paget, S., 1889. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*, 133(3421), pp.571–573.
- Palczewski, K. et al., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289(5480), pp.739–745.
- Palmi, C. et al., 2014. Cytoskeletal regulatory gene expression and migratory properties of B-cell progenitors are affected by the ETV6-RUNX1 rearrangement. *Molecular cancer research*, 12(12), pp.1796–1806.
- Pan, J. et al., 2006. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Molecular cancer*, 5(1), p.56.
- Pannu, K.K., Joe, E.T. & Iyer, S.B., 2001. Performance evaluation of quantiBRITE phycoerythrin beads. *Cytometry Part A*, 45(4), pp.250–258.
- Parameswaran, R. et al., 2011. Combination of drug therapy in acute lymphoblastic leukemia with a CXCR4 antagonist. *Leukemia*, 25(8), pp.1314–1323.
- Park, D. et al., 1993. Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *The Journal of biological chemistry*, 268(7), pp.4573–4576.
- Park, J.H. et al., 2008. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*, 454(7201), pp.183–187.
- Parker, C. et al., 2010. Effect of mitoxantrone on outcome of children with first relapse of acute lymphoblastic leukaemia (ALL R3): an open-label randomised trial. *The Lancet*, 376(9757), pp.2009–2017.
- Patel, B. et al., 2014. Mouse xenograft modeling of human adult acute lymphoblastic leukemia provides mechanistic insights into adult LIC biology. *Blood*, 124(1), pp.96–105.
- Paulsson, K. et al., 2008. Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer*, 47(1), pp.26–33.
- Peled, A. et al., 1999. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 283(5403), pp.845–848.

- Percherancier, Y. et al., 2005. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *The Journal of biological chemistry*, 280(11), pp.9895–9903.
- Phillips, R.J. et al., 2003. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167(12), pp.1676–1686.
- Place, A.E. et al., 2015. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* l-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *The lancet oncology*, 16(16), pp.1677–1690.
- Pui, C.-H., Campana, D., et al., 2009. Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia without Cranial Irradiation. *New England Journal of Medicine*, 360(26), pp.2730–2741.
- Pui, C.-H., Relling, M.V. & Downing, J.R., 2009. Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 350(15), pp.1535–1548.
- Pui, C.-H., Robison, L.L. & Look, A.T., 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 371(9617), pp.1030–1043.
- Pui, C.H. et al., 2017. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. *Leukemia*, 31(2), pp.333–339.
- Qin, L. et al., 2015. Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. *Science*, p.1261064.
- Quoyer, J. et al., 2013. Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(52), pp.e5088–e5097.
- Rajagopal, S. et al., 2010. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), pp.628–632.
- Rasmussen, S.G.F. et al., 2007. Crystal structure of the human β 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), pp.383–387.
- Rehe, K. et al., 2013. Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO molecular medicine*, 5(1), pp.38–51.

- Reinholdt, L. et al., 2016. The CXCR4 antagonist plerixafor enhances the effect of rituximab in diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Biomarker research*, 4(1), p.12.
- Reiter, E. & Lefkowitz, R.J., 2006. GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology & metabolism*, 17(4), pp.159–165.
- Retz, M.M. et al., 2005. CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 114(2), pp.182–189.
- Rolink, A. et al., 1996. A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *The Journal of experimental medicine*, 183(1), pp.187–194.
- Rosenbaum, D.M. et al., 2007. GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into β 2-Adrenergic Receptor Function. *Science*, 318(5854), pp.1266–1273.
- Rosenkilde, M.M. et al., 2004. Molecular Mechanism of AMD3100 Antagonism in the CXCR4 Receptor TRANSFER OF BINDING SITE TO THE CXCR3 RECEPTOR. *The Journal of biological chemistry*, 279(4), pp.3033–3041.
- Roussos, E.T., Condeelis, J.S. & Patsialou, A., 2011. Chemotaxis in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), pp.573–587.
- Sato, S. et al., 1996. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 157(10), pp.4371–4378.
- Saultier, P. et al., 2016. Metabolic syndrome in long-term survivors of childhood acute leukemia treated without hematopoietic stem cell transplantation: an L.E.A. study. *Haematologica*, 101(12), pp.1603–1610.
- Scala, S. et al., 2005. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clinical cancer research*, 11(5), pp.1835–1841.
- Scheerer, P. et al., 2008. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, 455(7212), pp.497–502.
- Schioppa, T. et al., 2003. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *The Journal of experimental medicine*, 198(9), pp.1391–1402.
- Schmiegelow, K. et al., 2010. Long-term results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 24(2), pp.345–354.

- Schneider, P. et al., 2002. Is high expression of the chemokine receptor cxcr-4 of predictive value for early relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia? *British Journal of Haematology*, 119(2), pp.579–580.
- Schultz, K.R. et al., 2014. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia*, 28(7), pp.1467–1471.
- Schultz, K.R. et al., 2007. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*, 109(3), pp.926–935.
- Shao, Z. et al., 2016. High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. *Nature*, 540, pp.602–606.
- Shen, W. et al., 2001. The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Experimental hematology*, 29(12), pp.1439–1447.
- Shenoy, S.K. et al., 2006. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry*, 281(2), pp.1261–1273.
- Shi, C. et al., 2013. Interaction of motility, directional sensing, and polarity modules recreates the behaviors of chemotaxing cells. J. M. Haugh, ed. *PLoS computational biology*, 9(7), p.e1003122.
- Shultz, L.D. et al., 2005. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R γ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *The Journal of Immunology*, 174(10), pp.6477–6489.
- Shultz, L.D., Ishikawa, F. & Greiner, D.L., 2007. Humanized mice in translational biomedical research. *Nature reviews. Immunology*, 7(2), pp.118–130.
- Sierro, F. et al., 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 104(37), pp.14759–14764.
- Singh, R.K. & Lokeshwar, B.L., 2011. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer research*, 71(9), pp.3268–3277.
- Smith, M.C.P. et al., 2004. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer research*, 64(23), pp.8604–8612.

- Solano-Genesta, M. et al., 2013. CD20 expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is common in Mexican patients and lacks a prognostic value. *Hematology*, 17(2), pp.66–70.
- Spoer, A.C. et al., 2007. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 109(2), pp.786–791.
- Stacer, A.C. et al., 2016. Endothelial CXCR7 regulates breast cancer metastasis. *Oncogene*, 35(13), pp.1716–1724.
- Statistics, C.C.S.A.C.O.C. ed., 2014. Blood cancer facts. *Leukemia & Lymphoma Society of Canada*. Available at: <http://www.llscanada.org/sites/default/files/National/CANADA/Pdf/Blood%20Cancer%20Facts%202014.pdf> [Accessed January 1, 2017].
- Sterlacci, W. et al., 2016. Expression of the CXCR4 ligand SDF-1/CXCL12 is prognostically important for adenocarcinoma and large cell carcinoma of the lung. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 468(4), pp.463–471.
- Sugiyama, T. et al., 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), pp.977–988.
- Sun, Y. et al., 2002. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *The Journal of biological chemistry*, 277(51), pp.49212–49219.
- Tachezy, M. et al., 2013. CXCR7 expression in esophageal cancer. *Journal of translational medicine*, 11(1), p.238.
- Taichman, R.S. et al., 2002. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer research*, 62(6), pp.1832–1837.
- Tallen, G. et al., 2016. Long-Term Outcome in Children With Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia After Time-Point and Site-of-Relapse Stratification and Intensified Short-Course Multidrug Chemotherapy: Results of Trial ALL-REZ BFM 90. *Journal of Clinical Oncology*, 28(14), pp.2339–2347.
- Tamamura, H. et al., 2003. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS letters*, 550(1-3), pp.79–83.
- Tamamura, H., Omagari, A., et al., 2001. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(14), pp.1897–1902.

- Tamamura, H., Sugioka, M., et al., 2001. Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(3), pp.359–362.
- Tarasova, N.I., Stauber, R.H. & Michejda, C.J., 1998. Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, 273(26), pp.15883–15886.
- Tesfai, Y. et al., 2012. Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy. *Leukemia research*, 36(3), pp.299–306.
- Tesio, M. et al., 2011. Enhanced c-Met activity promotes G-CSF-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. *Blood*, 117(2), pp.419–428.
- Thomas, D.A. et al., 2010. Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology*, 28(24), pp.3880–3889.
- Thomas, D.A. et al., 2009. Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113(25), pp.6330–6337.
- Torossian, F. et al., 2014. CXCR7 participates in CXCL12-induced CD34+ cell cycling through β -arrestin-dependent Akt activation. *Blood*, 123(2), pp.191–202.
- Turcotte, L.M. et al., 2017. Temporal Trends in Treatment and Subsequent Neoplasm Risk Among 5-Year Survivors of Childhood Cancer, 1970-2015. *The Journal of the american medical association*, 317(8), pp.814–824.
- Tzeng, Y.-S. et al., 2011. Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood*, 117(2), pp.429–439.
- Uy, G.L. et al., 2012. A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 119(17), pp.3917–3924.
- Uy, G.L. et al., 2017. A phase 1|2 study of chemosensitization with plerixafor plus G-CSF in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood cancer journal*, 7(3), p.e542.
- van den Berk, L.C.J. et al., 2014. Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 166(2), pp.240–249.

- Van Lochem, E.G. et al., 2004. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 60B(1), pp.1–13.
- van Zelm, M.C. et al., 2005. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *The Journal of Immunology*, 175(9), pp.5912–5922.
- Vardiman, J.W. et al., 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), pp.937–951.
- Veber, D.F. et al., 1979. Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced ring size. *Nature*, 280(5722), pp.512–514.
- Walters, M.J. et al., 2014. Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats. *British journal of cancer*, 110(5), pp.1179–1188.
- Wang, L. et al., 2012. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World journal of surgical oncology*, 10(1), p.212.
- Wang, L.C. et al., 1998. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes & development*, 12(15), pp.2392–2402.
- Weber, M. et al., 2004. The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. *Molecular biology of the cell*, 15(5), pp.2492–2508.
- Weisberg, E. et al., 2012. Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. *Leukemia*, 26(5), pp.985–990.
- Welschinger, R. et al., 2013. Plerixafor (AMD3100) induces prolonged mobilization of acute lymphoblastic leukemia cells and increases the proportion of cycling cells in the blood in mice. *Experimental hematology*, 41(3), pp.293–302.e1.
- Wescott, M.P. et al., 2016. Signal transmission through the CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) transmembrane helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(35), pp.9928–9933.
- Wilson, A. & Trumpp, A., 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology*, 6(2), pp.93–106.
- Woiterski, J. et al., 2013. Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid leukemias into NOD/SCID/IL2Rc γ null mice reflects individual

- leukemogenicity and highly correlates with clinical outcome. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, 133(7), pp.1547–1556.
- Wright, D.E. et al., 2002. Hematopoietic Stem Cells Are Uniquely Selective in Their Migratory Response to Chemokines. *The Journal of experimental medicine*, 195(9), pp.1145–1154.
- Wu, B. et al., 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 330(6007), pp.1066–1071.
- Wu, S. et al., 2006. Chemokine IL-8 and chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 28(4), pp.216–220.
- Yamada, K. et al., 2015. CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, 137(12), pp.2825–2836.
- Yamazaki, S. et al., 2011. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*, 147(5), pp.1146–1158.
- Yao, X. et al., 2011. High expression of CXCR4 and CXCR7 predicts poor survival in gallbladder cancer. *The Journal of international medical research*, 39(4), pp.1253–1264.
- Yasumoto, K. et al., 2006. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer research*, 66(4), pp.2181–2187.
- Yoshikawa, Y. et al., 2012. Molecular modeling study of cyclic pentapeptide CXCR4 antagonists: new insight into CXCR4-FC131 interactions. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(6), pp.2146–2150.
- Yu, L. et al., 2006. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 374, pp.174–179.
- Zabel, B.A. et al., 2009. Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *Journal of immunology*, 183(5), pp.3204–3211.
- Zabel, B.A. et al., 2011. The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Molecular cancer*, 10(1), p.73.
- Zaitseva, M. et al., 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature medicine*, 3(12), pp.1369–1375.

- Zeelenberg, I.S., Ruuls-Van Stalle, L. & Roos, E., 2003. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer research*, 63(13), pp.3833–3839.
- Zeng, Z. et al., 2009. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*, 113(24), pp.6215–6224.
- Zhang, H. et al., 2017. Structure of the full-length glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*, 7, p.339.
- Zhang, W.-B. et al., 2002. A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists. *The Journal of biological chemistry*, 277(27), pp.24515–24521.
- Zheng, K. et al., 2010. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 29(1), p.31.
- Zhou, J. et al., 2007. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood*, 110(5), pp.1607–1611.
- Zou, Y.-R. et al., 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393(6685), pp.595–599.

