

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ALTÉRATION PAR L'EGCG DE LA SIGNATURE MOLÉCULAIRE INFLAMMATOIRE ET
IMMUNOMODULATRICE DES CELLULES LEUCÉMIQUES
PROMYÉLOMONOCYTAIRES HL-60 DIFFÉRENCIÉES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

CELIA KASSOURI

DECEMBRE 2022

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Borhane Annabi, mon directeur de recherche qui m'a donné l'opportunité de faire partie de son équipe de recherche. Je le remercie pour le temps qu'il a consacré à mon encadrement, son soutien, son aide et la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce travail.

Je remercie très chaleureusement tous mes collègues du laboratoire. En particulier, Narjara Gonzalez Suarez et Souad Djedai pour l'apprentissage des différentes techniques, ainsi que leur disponibilité pour répondre à toutes mes questions. Je remercie spécialement Sahily Rodriguez Torres, Loraine Gresseau et Meriem Benhamida pour concrétiser et compléter certaines de mes expériences quand j'avais besoin.

J'exprime ma profonde gratitude à mes très chers parents qui m'ont donné la possibilité de poursuivre mes rêves, pour leur aide inestimable et leurs encouragements tout au long de mon parcours, ainsi que mes petites sœurs, pour leur écoute, leur patience et leur empathie.

Je remercie énormément mon amie Rym, pour tout ce qu'elle a fait pour moi, pour la rigueur des conseils, son amitié et son soutien, je lui serai toujours reconnaissante.

DÉDICACE

À l'être le plus cher à mon cœur, à ma mère
Merci pour l'éducation que tu m'as donnée, ton
amour, et tous les sacrifices que tu as fait pour moi
Je te dédie ma réussite, espérant que tu seras
toujours fière de moi.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Statistiques	1
1.1.3 La cancérogenèse	2
1.1.4 Inflammation et cancer.....	4
1.1.5 Cytokines et chimiokines	7
1.2 Les métalloprotéinases matricielles.....	8
1.2.1 Généralités.....	8
1.2.2 Structure et classification des métalloprotéases	9
1.2.3 Implication des métalloprotéases dans la progression des cancers	13
1.2.4 La MMP-9.....	15
1.3 La leucémie.....	17
1.3.1 Généralités.....	17
1.3.2 Principaux types de leucémies	18

1.3.3	La lignée cellulaire HL-60	21
1.3.4	Cascades de signalisation inductibles par le PMA.....	22
1.4	Diète et chimioprévention.....	23
1.4.1	Les polyphénols	24
1.4.2	Polyphénols du thé vert.....	25
1.4.3	L'épigallocatechine-3-gallate.....	27
1.5	Projet de recherche	29
1.5.1	Problématique	29
1.5.2	Hypothèse.....	30
1.5.3	Objectifs de la recherche.....	30
 CHAPITRE 2 ARTICLE		
	EGCG prevents the transcriptional reprogramming of an inflammatory and immune-suppressive molecular signature in macrophage-like differentiated human HL-60 promyelocytic leukemia cells.....	31
2.1	Résumé	33
2.2	Abstract.....	34
2.3	Introduction.....	34
2.4	Materials and methods.....	36
2.4.1	Materials.....	36
2.4.2	Cell culture	37
2.4.3	Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR	38
2.4.4	Total RNA library preparation	38
2.4.5	RNA sequencing	39
2.4.6	Reads alignment and differential expression analysis	39
2.4.7	Gene set enrichment analysis.....	39
2.4.8	Human cancer inflammation and immunity crosstalk PCR array.....	40

2.4.9 Western blot	40
2.4.10 Gelatin zymography	41
2.4.11 Statistical data analysis	41
2.5 Results.....	42
2.5.1 Unbiased transcriptomic analysis reveals the induction of differentiation and immune activation programs upon macrophage-like differentiation of promyelocytic HL-60 cells	42
2.5.2 EGCG inhibits PMA-mediated human promyelocytic HL-60 cell adhesion and MMP-9 secretion.....	43
2.5.3 The induction of GSK 3 α/β , CREB, ERK1/2, and RSK1/2/3 phosphorylation status upon PMA-mediated human promyelocytic HL-60 cell treatment is inhibited by EGCG	43
2.5.4 EGCG reduces Notch and CBFA2T3 pathways in PMA-differentiated promyelocytic macrophage-like cells.....	44
2.5.5 Impact of EGCG on PMA-mediated transcriptional regulation of immunomodulatory and inflammation biomarkers expression.....	45
2.6 Discussion.....	46
2.7 Conclusion	48
2.8 References.....	54
CHAPITRE 3	64
DISCUSSION	64
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	70
BIBLIOGRAPHIE	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Proportions et causes de décès au Canada en 2019.	2
Figure 1.2 Les différentes phases de la cancérogénèse.	3
Figure 1.3 Activation et polarisation des TAM dans le microenvironnement tumoral.....	6
Figure 1.4 Mécanisme moléculaire de l'inflammation liée au cancer.	7
Figure 1.5 la structure des MMPs.	10
Figure 1.6 Fonctions des MMPs dans le développement du cancer.	14
Figure 1.7 Voies de signalisation impliquées dans l'expression de la MMP-9.	16
Figure 1.8 Description de l'hématopoïèse normale.	20
Figure 1.9 Altérations des cellules souches hématopoïétiques.	20
Figure 1.10 Illustration schématique de la cascade de signalisation du PMA.	23
Figure 1.11 Structure chimique et classification des polyphénols.	25
Figure 1.12 Les principaux constituants des extraits de feuilles de thé.	26
Figure 1.13 Les différentes cibles et effets anticancéreux de l'EGCG.....	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Familles des MMPs, leur expression et leurs fonctions biologiques.**Erreur ! Signet non défini.**

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADH	Cellules adhérentes
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Protéine Kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclase
ATRA	Acide <i>tout-trans</i> rétinolique
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cdk	Kinases dépendantes des cyclines
COX-2	Cyclooxygénase-2
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EC	Épicatéchine
ECG	Épigatéchine gallate
EGC	Épigallocatechine
EGCG	Épigallocatechine-3-gallate
EGF	Facteur de croissance épidermique
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
IL	Interleukine
I κ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
Jak	<i>Janus Kinase</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique

LAM	Leucémie aiguë myéloblastique
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
67LR	67 kDa <i>laminin receptor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MMP	métalloprotéase matricielle
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
P38	Protéine 38
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
P21	Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1A
P27	Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1B
P53	<i>Protéine tumorale 53</i>
Raf	Proto-oncogène serine/threonine-protein kinase
Ras	<i>Rat sarcoma proteins</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
STAT3	Signal Transcription and Activator of Transcription
TAMs	Macrophages associés aux tumeurs
TGF	Facteur de croissance transformant
TGF β	Facteur de croissance transformant β
TIMPs	Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases
TNF	Facteur de nécrose tumorale
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

RÉSUMÉ

Dans le microenvironnement tumoral, les macrophages agissent comme des modulateurs clés lors de la cancérogenèse. Ces macrophages peuvent subir une polarisation phénotypique de type M1 ou M2 avec des propriétés inflammatoires et immunomodulatrices en réponse à des signaux tumoraux ou microenvironnementaux. Les cellules leucémiques promyélomonocytaires HL-60 représentent un excellent modèle pour déterminer les mécanismes de signalisation moléculaires au cours du développement tumoral. Notre étude rapporte l'analyse des biomarqueurs inflammatoires et immunomodulateurs régulés lors du processus de différenciation des cellules HL-60 en « macrophage-like » induit par un promoteur tumorigène le PMA. Nos résultats montrent que le statut de différenciation des HL-60 mène à une adhésion cellulaire et induit une surexpression de la métalloprotéinase matricielle MMP-9. Ceci confirme la différenciation des cellules HL-60 en un phénotype de type « macrophage-like ». La différenciation augmente également le niveau d'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité dans les cellules différenciées. D'autre part, cela s'est accompagné d'une augmentation de l'état de phosphorylation de la kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK), de la glycogène synthasekinase (GSK)-3 β , des kinases S6 ribosomales p90 (RSK) et de la protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc (CREB). Nous avons ensuite investigué le potentiel *in vitro* d'une molécule naturelle dérivée de notre alimentation, l'épigallocatechine -3- gallate (EGCG) sur l'altération du phénotype inflammatoire et immunitaire dans les cellules différenciées. Collectivement, nos résultats montrent que l'EGCG est capable de réduire l'expression de certaines protéines, telles que la MMP-9, et d'inhiber l'expression élevée des gènes de l'inflammation et de l'immunité induite par le PMA entre autres, CCL22, CSF1, CSF2, IL-1 bêta et TNF. En outre, nos données montrent également que l'EGCG est en mesure d'affecter les voies de signalisation activées par le PMA. La mise en évidence du potentiel de l'EGCG à altérer le processus de différenciation des cellules de type macrophage en ciblant l'interrelation signalétique

régulant leur phénotype inflammatoire et immunitaire ouvre ainsi des perspectives de ciblage moléculaire dans la chimioprévention des cancers.

Mots clés : Cellules HL-60, inflammation, EGCG, MMP-9, macrophages

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Le terme cancer s'applique à un groupe de maladies extrêmement complexes. Il est causé par la transformation de cellules saines qui deviennent anormales et prolifèrent de façon désorganisée et excessive à la suite de plusieurs événements mutationnels (Feitelson et al., 2015). Ces cellules peuvent se détacher de leur site d'origine (tumeur primaire) et envahir d'autres organes formant des tumeurs secondaires appelées métastases. Les causes exactes du développement du cancer sont difficiles à cibler (Siegel et al., 2015). Cependant, il existe plusieurs facteurs génétiques et environnementaux bien connus reliés à notre mode de vie comme la qualité de l'alimentation, l'activité physique, et des substances chimiques, peuvent causer l'apparition d'un cancer selon leur degré d'exposition (Oliveira et al., 2007).

1.1.2 Statistiques

Les causes de décès dans le monde sont nombreuses et varient selon plusieurs facteurs liés aux modes de vies et certains facteurs environnementaux (Naghavi M, 2017). Selon les dernières estimations publiées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer figure comme la principale cause de mortalité dans le monde. Au Canada, le cancer demeure ainsi la principale cause de mortalité, où il est responsable d'environ 26,4 % des décès, suivi des maladies cardiovasculaires, cérébrovasculaires et d'autres d'après statistiques Canada en 2021 (figure 1.1). Ce sont donc plus de deux canadiens sur cinq qui souffriront de la maladie et d'un canadien sur

quatre en décédera dont 26 % d'hommes et 22 % de femmes. Les estimations faites par la société canadienne du cancer en 2022 révèlent qu'environ 233 900 nouveaux cas seront diagnostiqués et 85100 décéderont du cancer. Parmi tous les types de cancer, le cancer du sein est le plus répandu au Canada en 2022 chez les femmes, suivi du cancer de la prostate, cancer du poumon et le cancer colorectal. Le taux estimé de survie nette après 5 ans pour tous les cancers combinés est d'environ 64% (<https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types>).

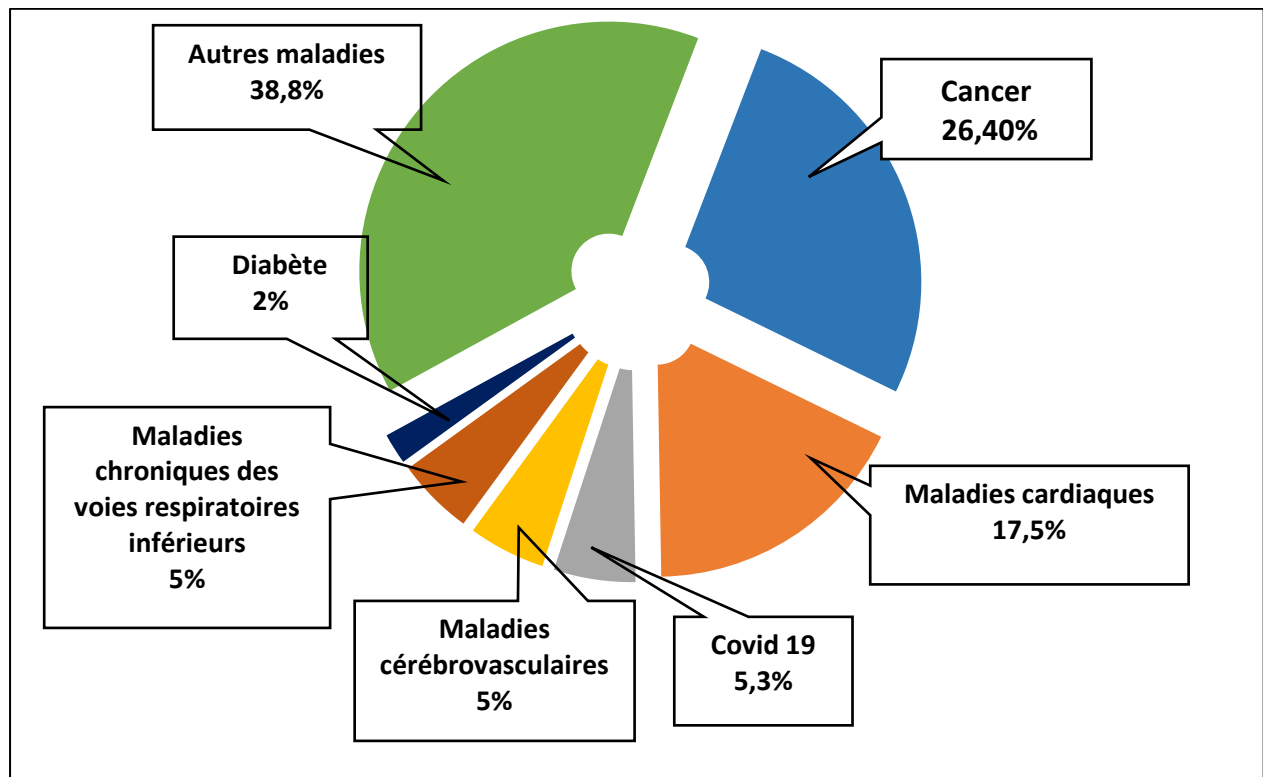


Figure 1.1 Proportions et causes de décès au Canada en 2021. Le cancer est placé au 1^{er} rang des causes de mortalité au Canada en 2021 avec un taux d'environ 30%.

1.1.3 La cancérogenèse

La cancérogenèse apparaît comme un processus complexe en multi-étapes dans lequel les cellules normales progressent à travers une série de phénotypes précancéreux et se transforment en cellules malignes (Tubiana, 2008). Elle se déroule en trois étapes principales, et commence par la phase d'initiation. Celle-ci débute après l'exposition à des agents cancérogènes initiateurs tels que, des

virus, des produits chimiques, ou des irradiations ou même spontanément, causant des modifications génétiques irréversibles et rapides, ce qui produit une lésion définitive du matériel génétique (mutation) de la cellule normale (Oliveira et al., 2007). Les cellules transformées rentrent dans la deuxième étape nommée : promotion. Cette étape se caractérise par l'augmentation de la synthèse d'ADN et une capacité indéfinie de prolifération de cellules. Elle est favorisée par des agents promoteurs qui provoquent un dérèglement du contrôle de la croissance cellulaire avec promotion des cellules initiées et fixation graduelle des mutations pour générer des cellules cancéreuses (Hendrich et al., 1986). Parmi ces agents, on peut citer les hormones, les facteurs de croissance, les radiations et la nutrition (Lutgendorf et Sood, 2011). Cette étape peut être réversible. Si l'exposition aux agents promoteurs est réduite, il y'aura donc un arrêt de la transformation cellulaire (Hendrich et al., 1986). Finalement, la dernière phase de la cancérogenèse est la progression, qui correspond à une instabilité génétique intrinsèque plus élevée des cellules transformées qui prolifèrent continuellement, ce qui va favoriser l'apparition progressive des caractéristiques de cellules cancéreuses malignes, notamment des mécanismes biochimiques de l'invasion tumorale, et de processus angiogéniques et métastatiques (Hanahan et Weinberg, 2011; Loeb et al., 2003) (figure 1.2).

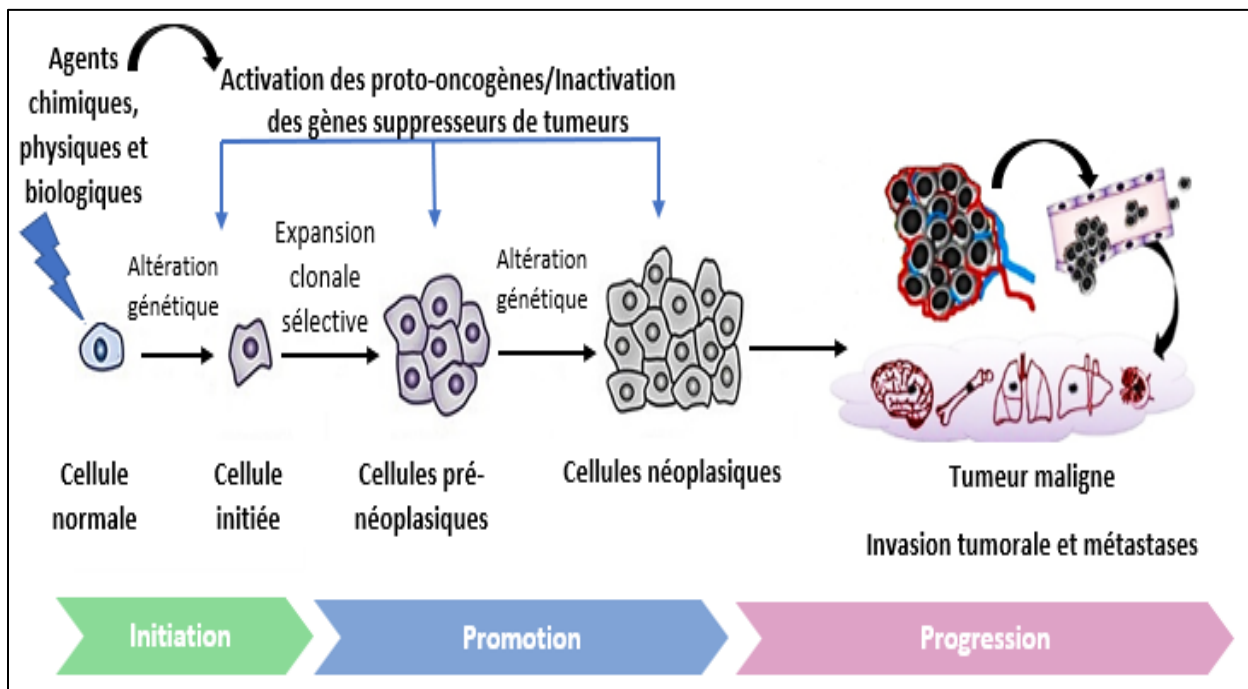


Figure 1.2 Les différentes phases de la cancérogenèse. Lors de la 1^{ère} phase d'initiation et après l'exposition à un cancérigène, des dommages irréversibles et des modifications seront induites sur

l'ADN des cellules normales. La 2^{ème} phase est appelée promotion, elle se caractérise par la prolifération (multiplication anormale) clonale des cellules initiées à cause de promoteurs tumoraux ainsi que l'activation de certains oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ce qui permet la formation de cellules pré-néoplasiques. La 3^{ème} étape est appelée : progression. Au cours de celle-ci, un phénotype néoplasique est acquis via des mécanismes génétiques et épigénétiques. La prolifération cellulaire devient incontrôlée et très rapide avec une capacité d'invasion tumorale et de formation de métastases [Adapté d'après (Liu *et al.*, 2015)].

1.1.4 Inflammation et cancer

L'inflammation est un processus physiologique complexe et l'une des caractéristiques majoritairement associées à la progression des cancers (Piotrowski et al., 2020). C'est une réponse qui fait partie de l'une des deux branches de l'immunité, l'immunité innée (ou naturelle) consistant en un ensemble de mécanismes de lutte et d'élimination des agents pathogènes, alors que la seconde branche immunitaire est l'immunité acquise, ou spécifique. Ce procédé agit généralement en trois étapes qui commence par la reconnaissance des agents nocifs, suivi de la destruction de ces derniers, et une réparation tissulaire rapide des tissus endommagés après l'action de divers facteurs inflammatoires (Mack, 2018). Cette réponse de système immunitaire innée est médiée par une panoplie de types cellulaires. En effet, les principaux leucocytes ou granulocytes polymorphonucléaires prédominants présents sur les sites d'inflammation sont les neutrophiles qui représentent généralement 60 % des leucocytes circulants dans le sang périphérique. Elles sont généralement les premières cellules qui migrent massivement vers le site inflammatoire et agissent pour détruire et éliminer les agents pathogènes grâce à leurs capacités antimicrobiennes et phagocytaires (Nourshargh et Alon, 2014; Summers et al., 2010).

Un autre type de leucocytes est aussi retrouvé au site d'inflammation, il s'agit des macrophages. Ceux-ci sont des cellules phagocytaires de la lignée myéloïde qui dérivent des monocytes et se trouvent dans presque tous les tissus à l'état homéostatique (Serhan et al., 2010). Lorsqu'un agent infectieux pénètre dans l'organisme, les macrophages préactivés agissent immédiatement. Grâce à la sécrétion de chimiokines par les cellules dans l'environnement inflammatoire, le nombre de

macrophages au site de l'inflammation augmente. La présence de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-alpha, l'interféron (IFN)-gamma, l'IL-2 ou de peptides bactériens induit le phénotype pro-inflammatoire M1 (Macrophages activés classiquement) qui est aussi associé à une production importante d'intermédiaires toxiques comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Khandelwal et al., 2011). Les macrophages M1 possèdent donc la capacité de détruire les micro-organismes pathogènes par phagocytose (Sokolova et al., 2017). De plus, la production d'autres cytokines, tels que l'IL-1b, l'IL-6 et le TNF-a permet de propager la réponse inflammatoire. Ce phénotype M1 a des effets globalement pro-inflammatoires et cytotoxiques (Awad et al., 2017 ; Yang et al., 2014). En revanche, le phénotype M2 décrit une activation alternative en raison de son activation par d'autres molécules anti-inflammatoires principalement l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 ou le TGF-beta (Nathan et Ding, 2010). Les macrophages M2, communément appelés TAM (tumor-associated macrophages), jouent un rôle majeur dans le développement des tumeurs, et se caractérisent par une production faible des cytokines et sont toujours associés à l'angiogenèse qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants et à la réparation tissulaire (Boutillier et ElSawa, 2021). Ils possèdent également des effets immunomodulateurs, et de fortes capacités phagocytaires (Mosser et Edwards., 2008; Martinez et al., 2014). L'activation et la différenciation de ces macrophages est régulée ainsi par le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) qui est impliqué dans la polarisation du phénotype M1 et le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF, également CSF-1), fortement exprimé dans de nombreuses tumeurs qui induit une polarisation M2 (Karger et al., 2021) (figure 1.3).

Deux formes cliniques de l'inflammation sont définies : L'inflammation aiguë qui débute après une infection ou un dommage tissulaire, ce qui mène à la sécrétion de médiateurs solubles tels que, les cytokines, les protéines de phase aiguë et les chimiokines pour favoriser la migration des neutrophiles et des macrophages vers les zones d'inflammations. Cependant, si cette inflammation se pérennise après un certain temps, elle provoquera une progression vers une inflammation chronique avec une migration des lymphocytes T et des plasmocytes vers le site de l'inflammation (Hannoodee et al., 2021; Pahwa et al., 2021). Plusieurs évidences ont montré que le risque de développer les cancers est fortement influencé et augmenté par des maladies inflammatoires

chroniques (Piotrowski et al., 2020). L'inflammation liée au cancer a été divisée en deux voies, la première est la voie intrinsèque, qui est en relation avec les événements génétiques provoquant une transformation néoplasique et une inflammation, et une seconde voie extrinsèque qui représente les conditions inflammatoires favorisant la cancérogenèse (Piotrowski et al., 2020). Les cellules et les médiateurs du système inné y compris les cytokines et les chimiokines sont détectés dans presque tous les cancers qu'il s'agisse ou non d'une inflammation extrinsèque. De plus, leur forte prévalence est due aux changements d'oncogènes dans les cellules qui conduisent à l'induction de voies inflammatoires dans les cellules précancéreuses et cancéreuses (figure 1.4). Leur présence dans le microenvironnement tumoral coordonnent un milieu de réponse pro-inflammatoire permettant d'agir de manière autocrine et/ou paracrine dans les tumeurs malignes et non malignes favorisant l'invasion tumorale (Crusz et Balkwill, 2015).

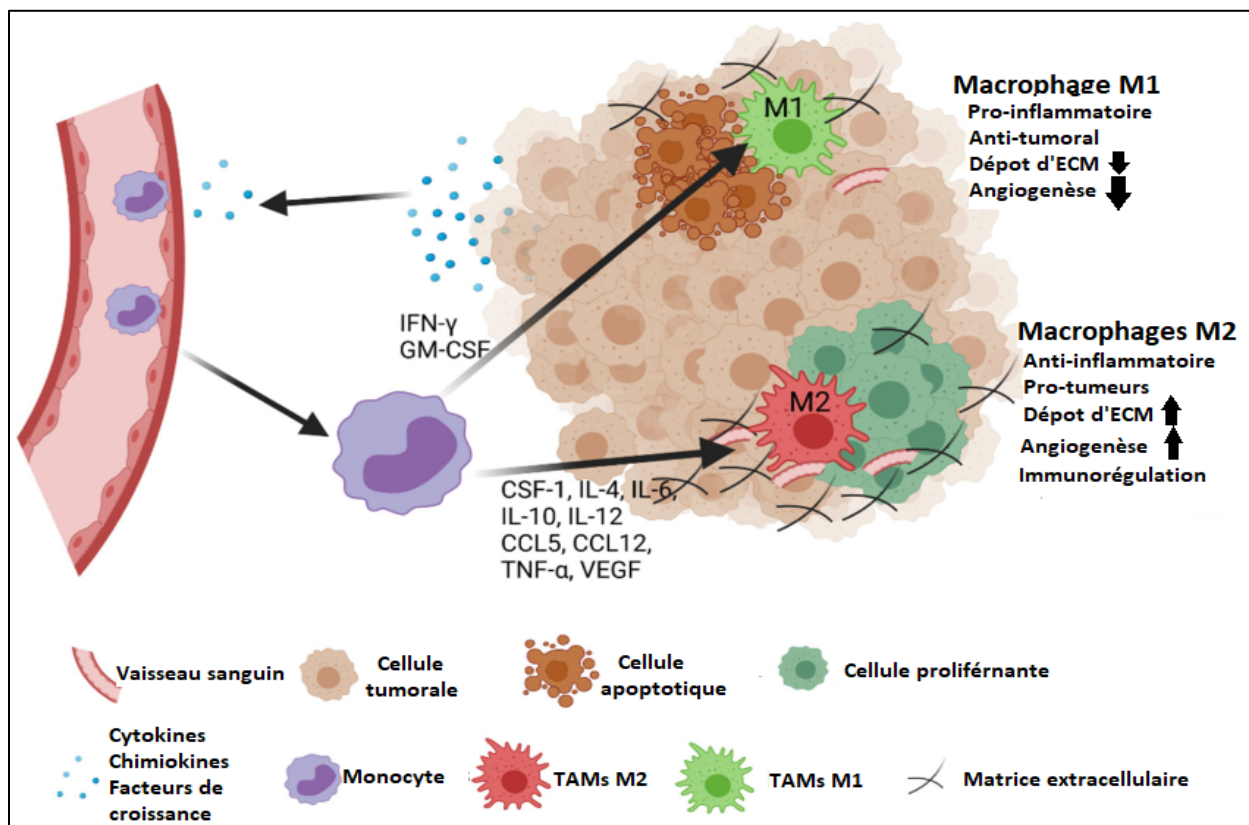


Figure 1.3 Activation et polarisation des TAM dans le microenvironnement tumoral. Plusieurs chimiokines et facteurs de croissances libérés par les cellules tumorales dans le microenvironnement tumoral (TME) activent les monocytes et les macrophages soit de phénotype

pro-tumoral M2 (CSF1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, CCL5, CCL12, TNF- α , VEGF) ou de phénotype antitumoral M1 (GM-CSF, IFN γ). Lors de la libération des facteurs sécrétés, les macrophages M1 peuvent induire l'apoptose, et les macrophages M2 induisent la prolifération des cellules tumorales, et conduisent à l'angiogenèse et la modulation immunitaire. [Adapté d'après Karger et al., 2021].

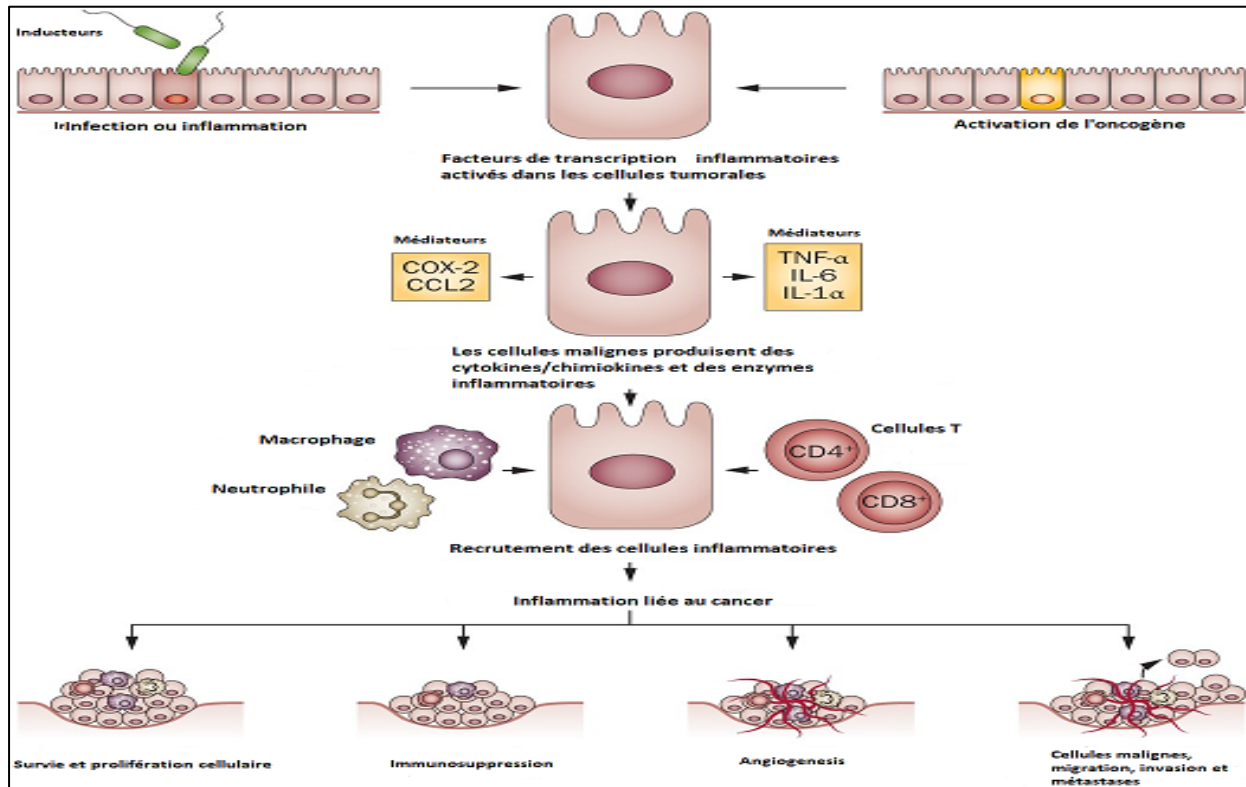


Figure 1.4 Mécanisme moléculaire de l'inflammation liée au cancer. L'inflammation mène à l'expression de facteurs de transcriptions pro-inflammatoires au niveau des cellules néoplasiques (tels que NF- κ B, STAT3, ...). L'activation de ces derniers intervient dans l'expression des cytokines, chimiokines et des enzymes inflammatoires. Ceci permettra la formation d'un réseau inflammatoire riche et complexe dans le TEM. Le recrutement d'une gamme de cellules, dont les macrophages et les lymphocytes par ces médiateurs inflammatoires médie la réponse inflammatoire. Certains enzymes inflammatoires régulent davantage les processus physiologiques impliqués dans l'immunité et l'inflammation liée aux cancers, provoquant ainsi la tumorigenèse. [Adapté d'après (Crusz et Balkwill, 2015)].

1.1.5 Cytokines et chimiokines

Afin de mieux coordonner tous les acteurs du système immunitaire lors d'une réponse inflammatoire, les cellules communiquent entre elles via des contacts directs. Les cytokines et les chimiokines jouent ce rôle de messagers moléculaires intercellulaires (Commins et al., 2010). Les cytokines correspondent à des glycoprotéines de poids moléculaire inférieur à 60 kDa, synthétisées par plusieurs types cellulaires dont les lymphocytes ou les macrophages. Ces médiateurs inflammatoires se caractérisent par différents modes d'actions, et peuvent avoir une fonction autocrine, paracrine ou endocrine (Bunn S J et al., 2012). Leur activité biologique est mise en évidence à de très faibles concentrations, en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques. On distingue plusieurs familles de cytokines qui diffèrent selon leurs fonctions biologiques, parmi celles-ci, les chimiokines. Les cytokines favorisent certains phénotypes à cause de leurs inductions des réponses dans les cellules cibles. En revanche, les chimiokines médient la chimio-attraction entre les cellules et aident les leucocytes à adhérer à l'endothélium vasculaire et permettent leur extravasation ainsi le recrutement de cellules spécifiques au site de l'inflammation (Serhan, 2010). Lors d'une réponse inflammatoire aiguë due à un envahissement par un agent pathogène des cytokines pro-inflammatoires telles que le $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ et IL-6 et des chimiokines comme : Chemokine ligand CCL-2 et CCL-3 sont produites après la détection de la présence des PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) ou de DAMPs (Damage-associated molecular patterns) par des cellules résidentes (Jimenez et al., 2010; Menten et al., 2002).

1.2 Les métalloprotéinases matricielles

1.2.1 Généralités

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) représentent une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes, qui ont été découvertes il y a 60 ans (Bassiouni et al., 2021). Elles sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), jouant ainsi un rôle important dans le remodelage tissulaire associé à divers processus physiologiques, tels que la différenciation

cellulaire, la prolifération, l'apoptose, et l'angiogénèse, et impliquées dans des processus pathologiques comme la cirrhose et les cancers (Page-McCaw et al., 2007). Les MMP sont sécrétées majoritairement à l'extérieur de la cellule sous forme de proenzymes et nécessitent dans des conditions physiologiques un clivage protéolytique post-traductionnel afin de favoriser l'activation et la libération du domaine pro-peptidique avec une génération de MMPs matures (Quintero-Fabián et al., 2019). Les formes actives de MMP peuvent être inhibées par des régulateurs endogènes appelés : TIMP. Quatre TIMP ont été identifiés dans les tissus jusqu'à présent (Hrabec et al., 2007; Shiomi et al., 2010). L'expression des gènes de MMP est observée dans plusieurs cellules telles que les fibroblastes et des cellules immunitaires comme les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les cellules endothéliales (Hrabec et al., 2007) et cette expression peut être régulée par des cytokines, des facteurs de croissance et des hormones (Roupakia et al., 2018).

1.2.2 Structure et classification des métalloprotéases

À ce jour, un total de vingt-huit MMPs ont été identifiées chez les vertébrés, dont vingt-quatre gènes retrouvés dans le génome humain en présence du paralogue du gène MMP-23 dupliqué qui code pour deux formes identiques de MMPs (Quintero-Fabián et al., 2019; Wang et Khalil, 2018). La classification des MMPs est basée sur la spécificité du substrat observée et l'architecture du domaine structurel commun. Elles sont divisées en six groupes et chaque groupe diffère par sa fonction biologique. On distingue les collagénases (MMP-1, 8 et 13), les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), les stromélysines (MMP-3, MMP-10, MMP-11), les matrilysines (MMP-7, MMP-12 et MMP-26), les MMPs de type membranaire (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, et MMP-25) et d'autres MMPs (MMP-12, MMP-18, MMP-19, MMP-20) (Gialeli et al., 2011; Nagase et al., 2006) (Tableau 1.1). La structure de ces différents groupes inclut trois domaines communs : Un domaine propeptide qui se compose généralement d'environ 80 acides aminés, contenant une séquence conservée PRCGVPDV également un groupe thiol qui interagit avec l'ion du zinc incorporé dans le deuxième domaine catalytique (~170 amino-acides) par son résidu d'histidine, permettant de maintenir les MMPs comme zymogènes inactifs (Okazaki et al., 1993).

L'interruption de cette interaction permettra l'accès du substrat au site catalytique. Enfin, le domaine C-terminal de type hémopexine d'environ 200 acides aminés, qui est lié au domaine catalytique par une région charnière flexible (Jabłońska-Trypuć et al., 2016) (Cui et al., 2017). Ce dernier domaine est nécessaire pour les interactions protéines-protéines, et représente un site d'interaction avec TIMP (Nagase et al., 2006). D'autre part, il a été démontré que trois MMPs ne possèdent pas ce domaine. Il s'agit de MMP-7, MMP-23 et MMP-26, et le groupe de gélatinases (MMP-2 et MMP-9) qui est unique par la présence des répétitions de fibronectine de type II incorporées avant la séquence de liaison au zinc (Dufour et al., 2008) (figure 1.5).

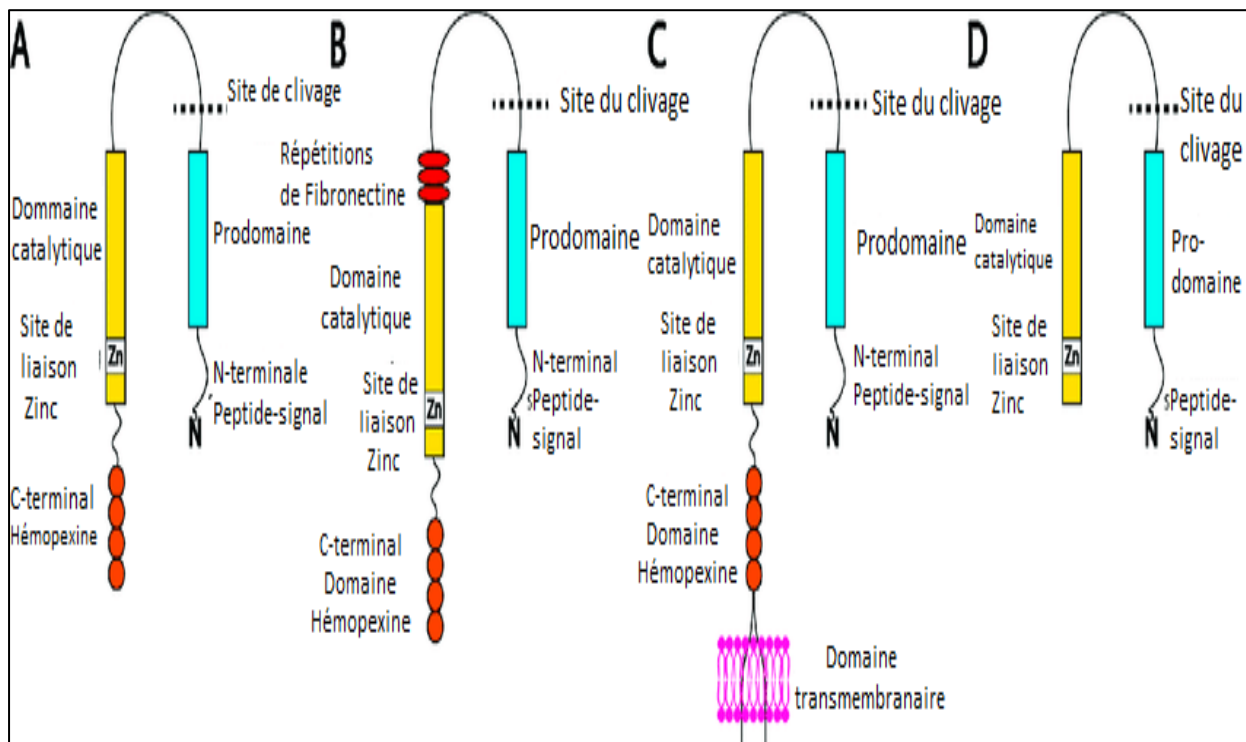


Figure 1.5 La structure des MMPs. A. Structure basique des métalloprotéinases matricielles (MMPs). B. Structure des MMPs contenant des répétitions de type fibronectine (MMP-2 et -9). C. Représentation simplifiée d'une MMP de type membranaire (MT-MMP). D. Structure d'un domaine minimal MMP (MMP-7 et -26). Adapté d'après (Gorter et Baron, 2020).

Tableau 1.1 Familles des MMPs, leur expression et leurs fonctions biologiques [Adapté d'après

Classe	Numérotation MMPs	Expression	Fonctions biologiques
Matrilysines	MMP-7= Matrilysine 1	Cellules épithéliales, glandes de mammifères, foie, pancréas, prostate et peau	Apoptose médiée par les récepteurs Fas, augmentation de l'invasion cellulaire, régulation de la réponse inflammatoire
	MMP-26= Matrilysine 2	Cellules cancéreuses d'origine épithéliale	Remodelage tissulaire et dégradation de la MEC
Collagénases	MMP1= Collagénase interstitielle	Fibroblastes, kératinocytes, cellules endothéliales, macrophages, hépatocytes, plaquettes	Agrégation plaquettaire, migration cellulaire, migration des kératinocytes.
	MMP-8= collagénase neutrophile	Chondrocytes, cellules endothéliales, macrophages activés et cellules musculaires lisses.	Réponse anti-inflammatoire et régulation d'apoptose
	MMP13= collagénase 3	Tissu conjonctif (cartilage et os en développement) Cellules épithéliales et neuronales.	Renouvellement physiologique de la MEC du cartilage, migration endothéliale

(Laronha et Caldeira, 2020; Visse et Nagase, 2003)].

Gélatinases	MMP2= Gélatinase A	Fibroblastes dermiques, kératinocytes, cellules endothéliales, chondrocytes, ostéoblastes, leucocytes, plaquettes et monocytes	La dégradation et le remodelage de la MEC, ostéogenèse et cicatrisation des plaies, développement embryonnaire
	MMP9= Gélatinase B	Neutrophiles, macrophages, leucocytes polymorphonucléaires, ostéoblastes, cellules épithéliales, fibroblastes, cellules dendritiques, granulocytes, LT et kératinocytes.	Migration de neutrophiles, réponse anti et pro-inflammatoire
Stromélysines	MMP-3	Fibroblastes et plaquettes	Le remodelage du tissu conjonctif, la libération de cytokines chimiotactiques Migration cellulaire, différenciation et apoptose des cellules épithéliales mammaires Ontogenèse des organes
	MMP-10	Kératinocytes, macrophages et épithélium	
	MMP-11	Organes : utérus, placenta et glandes mammaires.	
MT-MMPs	MMP-14=MT1-MMP	Fibroblastes, plaquettes et ostéoblastes	Modulation de l'adhésion cellulaire, migration cellulaire Modulation de l'adhésion cellulaire
	MMP15=MT2-MMP	Placenta, cœur et cerveau	Modulation de l'adhésion cellulaire
	MMP16=MT3-MMP	Cellules progénitrices, poumons, placenta, rein, ovaires, intestin, prostate,	Inflammation

	MMP17=MT4 -MMP	rate, cœur et muscle squelettique Leucocytes, cerveau, côlon, ovaires et testicules	Croissance nutritive Développement embryonnaire
	MMP24=MT5 -MMP	Cerveau, rein, pancréas et poumon	
	MMP25=MT6 -MMP	Leucocytes et tissus cancéreux, reins et muscle squelettique	
Autres MMPs	MMP12= Métallo- élastase MMP-18, MMP-19, MMP-20	Macrophages alvéolaires inflammatoires	Chimiotaxie leucocytaire pendant l'inflammation Migration des macrophages

1.2.3 Implication des métalloprotéases dans la progression des cancers

Les MMPs interviennent dans toutes les étapes de la cancérogenèse de l'initiation jusqu'à la formation de métastases selon plusieurs études précédentes (Chambers et Matrisian, 1997; Mannello et al., 2005). Leur expression dans les cancers est étroitement liée à des mécanismes apparentés à l'angiogenèse et à la vasculogenèse (Quintero-Fabián et al., 2019). L'un des processus par lequel les MMPs favorise l'angiogenèse est leur capacité à dégrader les composants de la MEC. Cela permet une migration des cellules de vaisseaux existants via la libération d'un facteur principale de stimulation d'angiogenèse, le VEGF (Vascular endothelial growth factor) dans lequel la MMP-9 joue un rôle majeur. En effet, il a été démontré que la migration et l'invasion des cellules cancéreuses dépendent de certaines MMPs, y compris les MMP solubles, -1, -3, -7, -9, -10, -11, -13, -26 et -28, et les MMPs membranaires -14 et -16 (Niland et al., 2021). Parmi les MMPs les plus étudiées régulant l'angiogenèse par clivage de molécules d'ECM est La MMP-14 (MT1-MMP). D'un autre côté, certains membres des MMPs peuvent limiter le processus angiogénique

par leur libération de l'angiostatine par clivage du plasminogène comme la MMP-7 et MMP-12 (Deryugina et Quigley, 2010). D'autre part, elles sont impliquées dans l'induction et la modulation d'une série de protéines de surface impliquées dans les jonctions cellulaires comme les E-cadhérines des jonctions serrées (Bartlett et Smith, 2013), notamment des médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et les chimiokines et l'activation de certains récepteurs exprimés sur la surface de cellules immunitaires. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sécrètent certaines MMPs telles que MMP-2, MMP-9 et MMP-12 favorisant l'infiltration des vaisseaux sanguins et participant dans la progression des cancers (Quintero-Fabián et al., 2019). Elles peuvent également réguler la prolifération cellulaire et certaines protéines par clivage de la E-cadhérine (Yadav et al., 2014) (Figure 1.6).

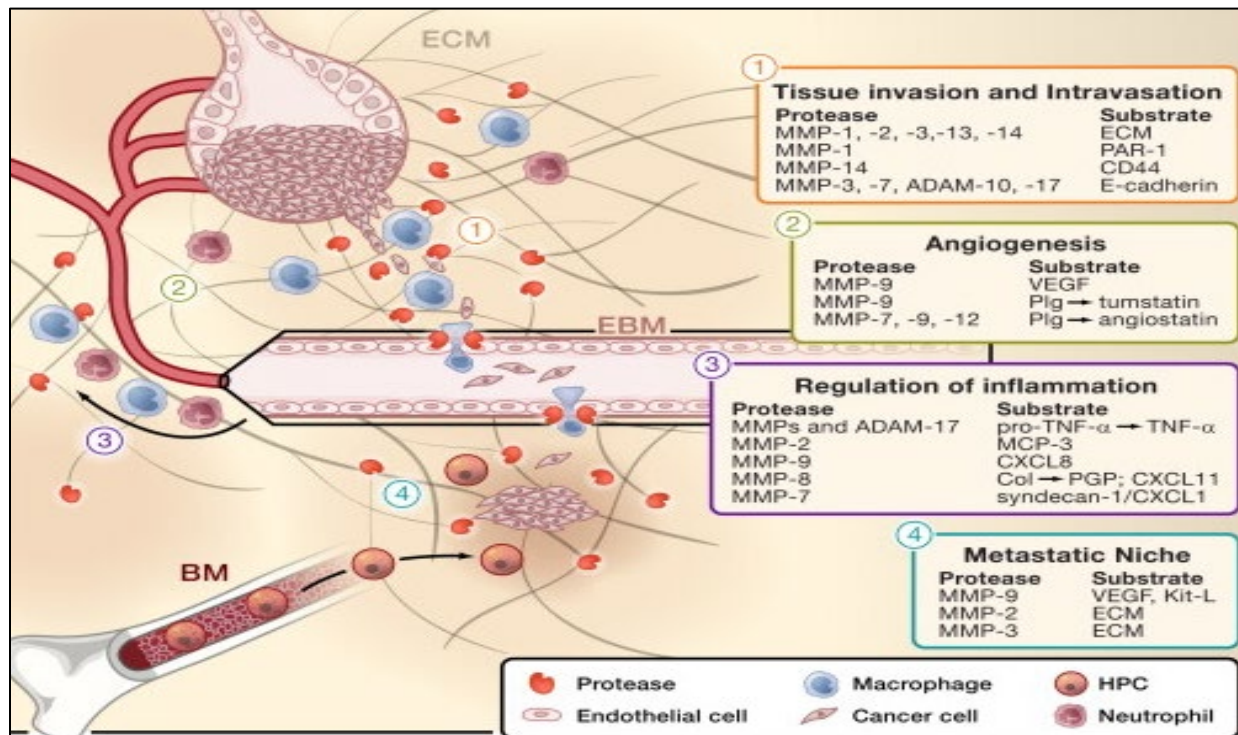


Figure 1.6 Fonctions des MMPs dans le développement du cancer. Les MMPs sont produites par des neutrophiles, des macrophages ou des cellules épithéliales. (1). Elles clivent les composants de la membrane basale et dégradent les composants de la matrice extracellulaire modifiant sa structure et favorisant l'invasion tissulaire de la tumeur avec intravasation dans les vaisseaux sanguins. Les MMPs régulent la migration des cellules cancéreuses en dégradant certaines molécules qui médient l'adhésion cellulaire comme la E-cadhérine. (2). La MMP-2 et MMP-9 facilitent la libération du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) permettant le déclenchement de

l'angiogenèse. Celle-ci peut être régulée par certaines MMPs par clivage du plasminogène à l'aide d'angiostatine. (3). Les MMPs citées participent dans la réponse inflammatoire par leur conversion du TNF- α ou l'interleukine-8 (IL-8) par exemple. Le TNF - α est exprimé sous la forme d'un précurseur lié à la membrane (pro-TNF- α) sur une variété de cellules, y compris les macrophages et les cellules T. La conversion du pro-TNF- α en forme de cytokine soluble nécessite un clivage protéolytique par la principale enzyme de conversion du TNF (TACE), identique à ADAM-17, un membre de la famille des disintégrines, des métalloprotéinases (Manicone et McGuire, 2008) (4). La métastase provoque la propagation des cellules malignes vers des sites secondaires qui peuvent être initiés par des cellules inflammatoires et des cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC) qui forment une niche pré-métastatique.[Adapté d'après (Kessenbrock et al., 2010)].

1.2.4 La MMP-9

La MMP-9 est une protéase nécessaire dans de nombreux processus biologiques. Elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire et synthétisée par plusieurs cellules, notamment des neutrophiles, des macrophages, des fibroblastes et des cellules endothéliales sous forme de proenzyme (pro-MMP-9) inactif d'environ 92KDa (Vandooren et al., 2013). Des médiateurs tels que le TNF- α et le complément 5a (C5a) peuvent induire une production de la MMP-9 chez les éosinophiles qui sont considérés comme une source principale (DiScipio et al., 2006; Okada et al., 1997). La génération de MMP-9 actif peut se faire par un clivage de la pro-MMP-9 par d'autres protéases comme la MMP-3 mais également par une collaboration entre plusieurs protéines de façon indirecte comme la plasmine qui active la MMP-3 qui à son tour activera MMP-9 (Huang, 2018). Cette gélatinase possède la capacité de dégrader la majorité des composants de la MEC tels que le collagène (de type I, IV, V, VII et X) et certaines glycoprotéines comme la fibronectine et la laminine. Le gène humain MMP-9 est situé sur le chromosome 20q13.12. Il contient 13 exons et 12 introns (Bruschi et Pinto, 2013; Nagase et al., 2006). Sa structure est composée d'un domaine catalytique qui contient trois domaines fibronectine répétés de type II (FN2) et un site actif avec une région de liaison au zinc, un peptide signal, une région charnière et un domaine de type hémopexine qui interagit majoritairement avec les substrats tels que la gélatine et le collagène (Huang, 2018). Ce domaine hémopexine se lie à certains TIMPs principalement TIMP-1 empêchant l'activation de la MMP-9. Les autres inhibiteurs comme le TIMP-2 et TIMP-3 ont une faible affinité pour cette protéase (Roderfeld et al., 2007). Le prodomaine de la MMP-9 peut être clivé par plusieurs

enzymes, dont la cathepsine G et la trypsine (Van den Steen et al., 2002). Il a été rapporté que la MMP-9 est synthétisée lors d'une stimulation induite par les cytokines (Opdenakker et al., 2001), de même sa sécrétion peut être régulée par d'autres cytokines et facteurs de croissance comme $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ ou GM-CSF, TGF- β , PDGF ou bFGF (Augoff *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2007). Leurs effets synergiques peuvent augmenter ou inhiber la sécrétion de la MMP-9 (Zhou et al., 2009). Plusieurs voies de signalisation déclenchées après des stimulations par des récepteurs de surface peuvent mener à l'expression de la MMP-9. Ce processus comprend principalement la famille des protéines MAPK dont les kinases régulées par le signal extracellulaire (ERK1 et ERK2), ou les kinases c-Jun N-terminales (JNK 1 et JNK 2) qui induisent l'expression des facteurs de transcription c-Fos et c-Jun (Xia et al., 2015). Une autre voie de signalisation qui semble aussi jouer un rôle primordial dans l'expression de la MMP-9 est la voie NF- κB (Facteur Nucléaire- κB) (Bond et al., 2001) (Figure 1.7).

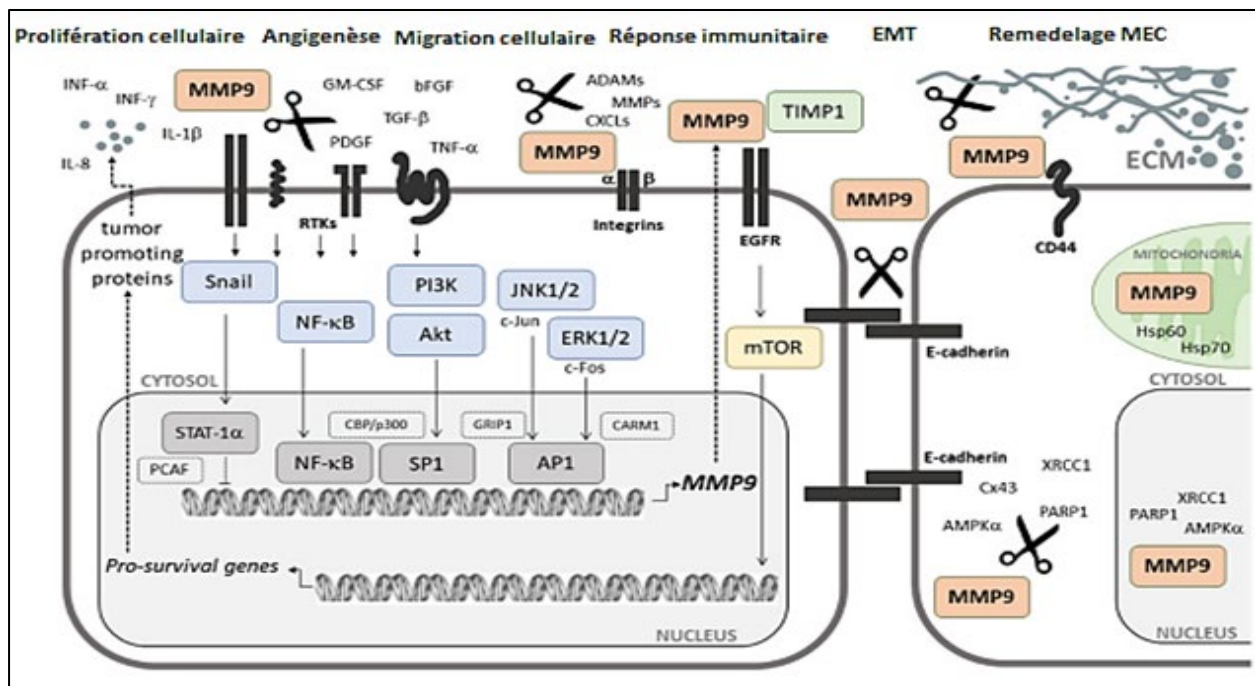


Figure 1.7 Voies de signalisation impliquées dans l'expression de la MMP-9. Une cascade de signalisation est activée par des signaux extracellulaires d'un groupe de cytokine pro-inflammatoire ($\text{TNF-}\alpha$, IL-8 , IL-16) et des facteurs de croissance (TGF- β , PDGF, β FGF) qui se lient à leurs récepteurs spécifiques. Celle-ci est impliquée dans l'activation des facteurs de transcription (NF- κB , SP1, et AP-1) qui déclenche une transcription après leurs liaisons avec des séquences du promoteur du gène MMP-9. La MMP-9 sécrétée dégrade les protéines de la MEC

comme le collagène et l'élastase. Son interaction avec certains récepteurs cellulaires (CD44, E-Cadhérine et intégrines α/β) permet la protéolyse des protéines de surface. TIMP1 régule l'activité de la MMP-9 dans la MEC alors que l'expression de la MMP-9 peut être inhibée par l'IFN γ . De cette façon la MMP-9 régule le remodelage tissulaire, et joue un rôle dans la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse, la réponse immunitaire, l'EMT et le remodelage de la MEC. [Adapté d'après (Augoff *et al.*, 2022)].

1.3 La leucémie

1.3.1 Généralités

La leucémie est une néoplasie touchant le mécanisme de production des cellules du sang dans la moelle osseuse, c'est-à-dire l'hématopoïèse qui fait référence au processus physiologique de différenciation et de génération des cellules sanguines matures, à partir d'une cellule progénitrice dite : cellule souche hématopoïétique (CSH) multipotente. Elle se caractérise par une prolifération clonale de cellules indifférenciées (blastes) (Gluzman *et al.*, 2015). Lors d'un développement normal, les CSH se différencient en deux principaux types de cellules : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Les cellules progénitrices myéloïdes se différencient ensuite en érythrocytes, plaquettes, granulocytes et monocytes, tandis que les cellules précurseurs lymphoïdes se différencient en lymphocytes B et T et en cellules tueuses naturelles (NK) (figure 1.8). Contrairement à l'état de développement normale et lorsque l'hématopoïèse est interrompue, cela va conduire à une expansion clonale de cellules peu différenciées causant la leucémie (Aleem *et Arceci*, 2015). Celle-ci implique également des altérations et des dérégulations du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation d'ADN (Yarbro, 2011). Cette maladie hétérogène fait généralement suite à des réarrangements chromosomiques ou à des mutations de l'ADN, ce qui déstabilise la cellule et empêche la production de cellules matures spécialisée du sang. L'interaction de plusieurs facteurs de risque génétiques et/ou épigénétiques contribuera au développement de la leucémogénèse (Deltour *et al.*, 2005) (figure 1.9). Au Canada, la leucémie fait partie des trois groupes principaux de cancer du sang avec le lymphome (Hodgkinien et non hodgkinien) et le myélome (Société de leucémie et lymphome du CANADA). Le cancer du sang représente environ

10% de tous les cancers diagnostiqués. Au moins 21 000 canadiens sont diagnostiqués par la maladie chaque année (<https://cancer.ca/fr/research/cancer-statistics>).

1.3.2 Principaux types de leucémies

Plusieurs types de leucémies existent et sont classées selon différents critères. Le premier critère repose sur la vitesse et la rapidité du développement et d'évolution de la maladie, tandis que le deuxième est basé sur l'appartenance à une lignée cellulaire dans laquelle la leucémie se développe. Ces critères vont permettre de distinguer quatre types de leucémies : Leucémie Lymphoblastique Chronique (LLC) - Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) - Leucémie Aiguë Lymphoblastique (LAL) - Leucémie Aiguë Myéloblastique (LAM) (Hao et al., 2019).

La leucémie lymphoblastique chronique (LLC) est la plus fréquente au Canada (Owen et al., 2018). Elle se définit comme une hémopathie maligne qui affecte généralement le sujet âgé avec une prédominance masculine et représente environ 12% des leucémies (Scarfò et al., 2016). La LLC se caractérise par une prolifération monoclonale de lymphocytes B matures qui ont un phénotype particulier, exprimant des antigènes de surfaces et de cellules B (CD5+, CD19+, CD20+, et CD23+), soit dans le sang, la moelle osseuse ou les organes lymphoïdes secondaires (Kipps et al., 2017). Le diagnostic de cette hémopathie à évolution hétérogène repose sur l'aspect cytologique et les marqueurs membranaires présents sur les lymphocytes B. L'immunochimiothérapie reste le traitement de référence dans la LLC (Hallek et al., 2008).

La leucémie myéloïde chronique (LMC) représente 15 à 20% des leucémies chez l'adulte. La LCM est un syndrome appartenant aux néoplasies myéloprolifératives clonales affectant les lignées myéloïdes (Telliama., 2016). Elle se caractérise par une prolifération très élevée des granulocytes et est initiée par une activité tyrosine kinase dérégulée codée par le transcrite de fusion BCR-ABL responsable de cette transformation leucémique dans une cellule souche hématopoïétique primitive (Granatowicz et al., 2015; Hsieh et al., 2021). Sur le plan moléculaire, une translocation entre les

bras longs des chromosomes 9 et 22 est observée menant à la génération du chromosome philadelphie (ph1) (Asif et al., 2021; Rowley, 1973). L'étiologie de la maladie et les facteurs de risques restent toujours méconnus (Wick et al., 2008). Le seul traitement existant dans le passé pour la LMC était l'allogreffe des CSH avant que les chimiothérapies avec certains agents alkylants soient mises en place. D'autres progrès dans les traitements comme l'utilisation de l'interféron α ont permis l'amélioration de la survie (Hehlmann et al., 1994).

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est la forme des cancers la plus fréquente au niveau pédiatrique avec 80% des cas. C'est une prolifération maligne incontrôlée caractérisée par un blocage des cellules de la lignée lymphocytaire T et B à un stade précoce de la différenciation cellulaire empêchant leur maturation terminale dans la moelle osseuse (Terwilliger et Abdul-Hay, 2017). La plupart des LAL concerne la lignée lymphocytaire B avec 85% contre 15% seulement pour la lignée T (Smith et al., 1975). L'étiologie de cette leucémie est multifactorielle. Elle résulte de multiples altérations somatiques et des événements de réarrangements chromosomiques ou d'une aneuploïdie (Graux, 2011). Les traitements utilisés actuellement sont la chimiothérapie à long terme chez l'adulte et la greffe de cellules souches. Si la LAL ne disparaît pas avec le premier traitement des doses plus élevées de chimiothérapie seront administrées. L'immunothérapie avec des anticorps monoclonaux est aussi un traitement pour les patients atteints de LAL à cellules B (Kantarjian et Jabbour, 2018).

La leucémie myéloïde aiguë (LMA) est la leucémie la plus abondante dans la population adulte et représente environ 80 % des cas. Elle est rare chez l'enfant et apparaît généralement avant l'âge de 2 ans ou après 15 ans (Doumbia et al., 2016). Elle est caractérisée par une expansion clonale de blastes immatures, entraînant une destruction des érythroïdes en développement dans la moelle osseuse (Dasariraju et al., 2020). Elle résulte dans la plupart du temps d'une série d'altérations chromosomiques et de mutations génétiques. La cause exacte de ces événements n'est toujours pas définie (Vakiti et Mewawalla, 2022). Son diagnostic repose sur la numérotation des blastes dans la moelle osseuse et un examen cyto-morphologique de celle-ci et du sang. Selon la classification basée sur la morphologie la LAM est subdivisée en huit sous-catégories à savoir : M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 (Harjoko et al., 2018; Suryani et al., 2017). Les traitements cliniques de

cette maladie reposent sur la chimiothérapie combinée, la transplantation et l'immunothérapie bien que malgré leur progrès, les résultats du traitement ne sont pas idéaux (Marofi et al., 2021).

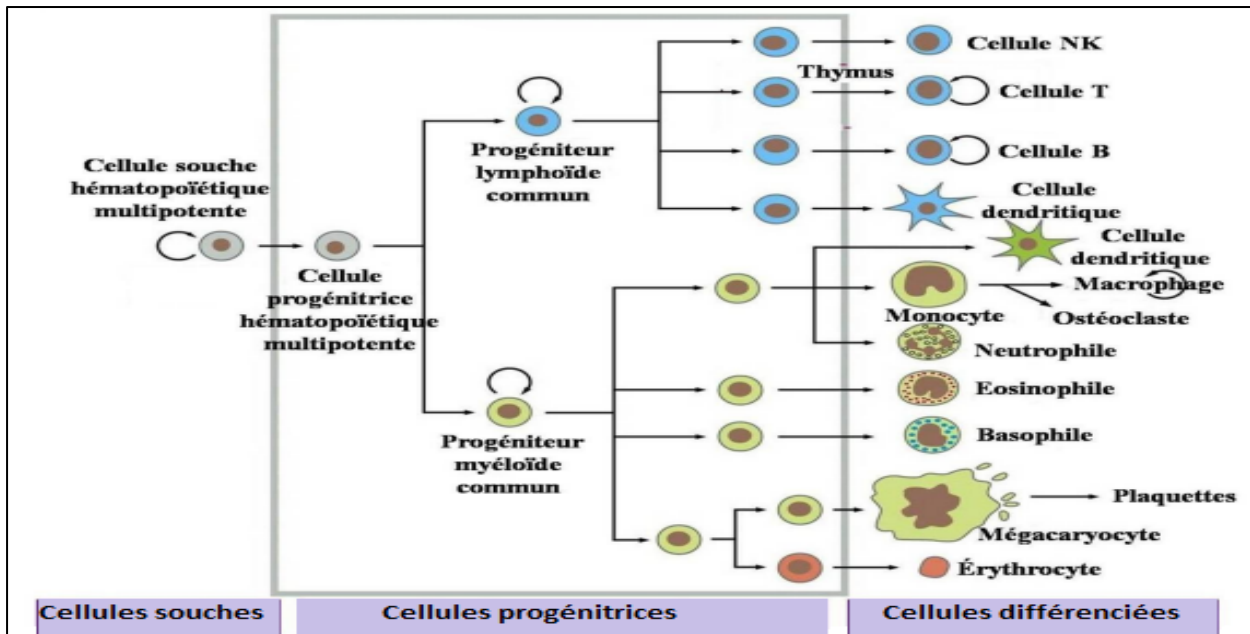


Figure 1.8 Description de l'hématopoïèse normale. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencient en cellules progénitrices qui vont être à l'origine des deux lignées myéloïde et lymphoïde. Des divisions successives aboutiront à des cellules matures différenciées [Adapté d'après (Weinberg, 2007) et (Roy-Tourangea., 2013)].

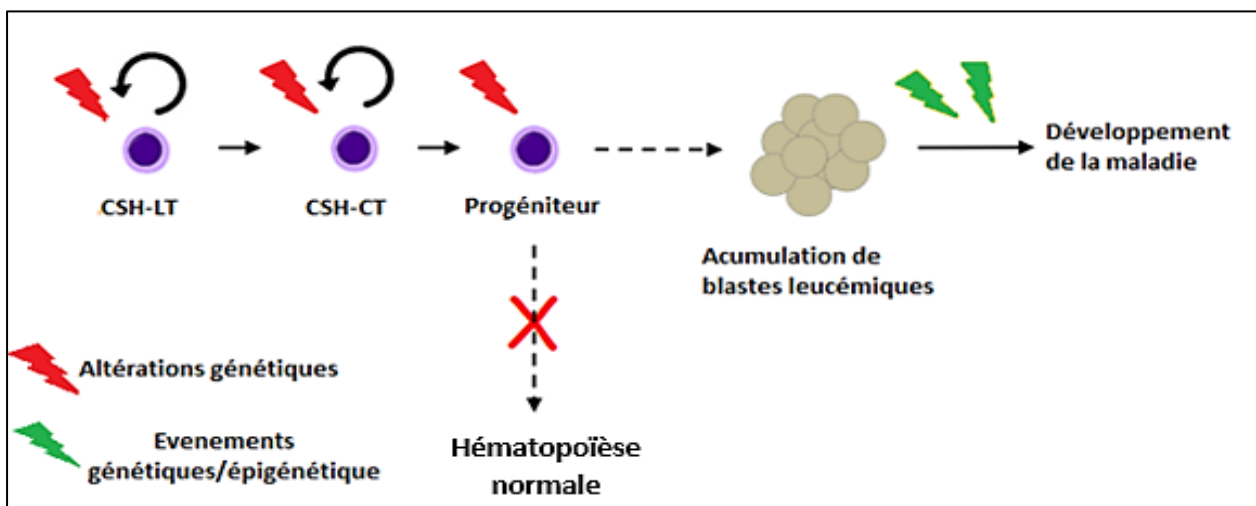


Figure 1.9 Altérations des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches hématopoïétiques à court et à long terme (CSH-CT, CSH-LT) ou les progéniteurs myéloïdes ou

lymphoblastiques peuvent subir des réarrangements chromosomiques tels que la : translocation, délétion, inversion, duplication ou une mutation d'ADN entraînant une accumulation de blastes leucémiques (Hao et al., 2019). Ces cellules instables permettent l'accumulation d'autres événements qui font apparaître la maladie.

1.3.3 La lignée cellulaire HL-60

La lignée cellulaire humaine HL-60 été isolée pour la première fois en 1977 par leucaphérèse à partir des leucocytes du sang périphérique d'une patiente caucasienne de 36 ans souffrant de leucémie promyéloïde aiguë (LPA) qui est une sous famille de la LAM (Birnie, 1988; Fleck et al., 2005). Ce modèle cellulaire est connu pour certaines caractéristiques spécifiques très intéressantes. En culture, les cellules myéloïdes HL-60 sont capables de proliférer rapidement et se multiplier de façon illimitée en suspension dans leur milieu de culture présentant une structure ronde. Cependant, certaines conditions de culture favorisent la différenciation des HL-60. Dépendamment de l'agent de stimulation utilisé comme l'acide rétinoïque, l'hydroxyvitamine D3, le diméthylsulfoxyde, le butyrate, l'hypoxanthine et les esters de phorbol, elles peuvent se différencier spontanément vers une autre lignée de type neutrophile, macrophage, monocyte ou éosinophile (Fleck et al., 2005; McCarthy et al., 1983). En outre, cette différenciation reste toujours moins parfaite car les cellules résultantes ne possèdent pas tous les critères de leurs homologues (Newburger et al., 1979). Cette lignée promyélomonocytaire est la plus utilisée pour les recherches sur la différenciation des cellules leucémiques ainsi que pour les études des événements moléculaires et cellulaires impliquées dans celle-ci (Birnie et al., 1988) ; (Collins, 1987).

Plusieurs études ont rapporté des évidences sur la capacité de différenciation des cellules HL-60 en une multitude de lignées cellulaires citées auparavant. Cependant, l'utilisation du diméthylsulfoxyde (DMSO) et de l'acide rétinoïque tout-trans (ATTR) permettent leur différenciation terminale en granulocytes (Breitman et al., 1980; Collins et al., 1978). D'autres études ont démontré que leur exposition à la forme active de la vitamine D (1.25 dihydroxyvitamine D3) entraînera une différenciation en monocytes (McCarthy et al., 1983). En outre, les HL-60 mises en présence du PMA (Phorbol-12-myristate-13-acétate) permet l'obtention de cellules avec un caractère phénotypique de cellules "macrophages-like". Le PMA connu aussi sous le nom de 12-

O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) est le principal activateur synthétique de la protéine kinase C (PKC) (Ezeamuzie et Taslim, 2004). Outre son activation de la PKC, le PMA activera aussi d'autres kinases telles que la voie des MAPK (mitogen activated protein kinases), ERK 1/2, la kinase P38 et la voie NF- κ B (Jiang et Fleet, 2012).

1.3.4 Cascades de signalisation inductibles par le PMA

La présence du PMA activera la PKC. Cette activation conduira à l'activation de Ras et la famille de protéine Raf 1 qui répond aux stimulations des récepteurs tyrosine kinase et participe à la transduction du signal en activant MEK 1 et MEK 2 par phosphorylation de deux sérines dans leurs domaines d'activation (Ser 217 et Ser 221). Ces deux kinases seront impliquées dans l'activation de la voie MAPK/ERK (ERK 1, ERK 2) par une phosphorylation des résidus de thréonine et de tyrosine en deux positions 202 et 204 (Frémin *et al.*, 2015). Ceci va engendrer une séquestration cytoplasmique de ERK1/2 ou une migration vers le noyau afin d'activer plusieurs gènes et facteurs de transcriptions tels que le NF κ B. ERK contribue également à l'activation de plusieurs substrats y compris des membres de la famille de protéines p90 ribosomal S6 kinase (RSK), CREB, et MSK (Galan *et al.*, 2014). Le MSK peut aussi être activé par la P38. ERK et la famille RSK semblent coopérer à la régulation de plusieurs protéines y compris GSK 3 selon plusieurs études (Hauge et Frödin, 2006). Des recherches récentes ont montré une augmentation significative de ces intermédiaires phosphorylés selon le temps d'exposition au PMA et deviennent de plus en plus actives au fil du temps (Davis *et al.*, 2018) (figure 1.10).

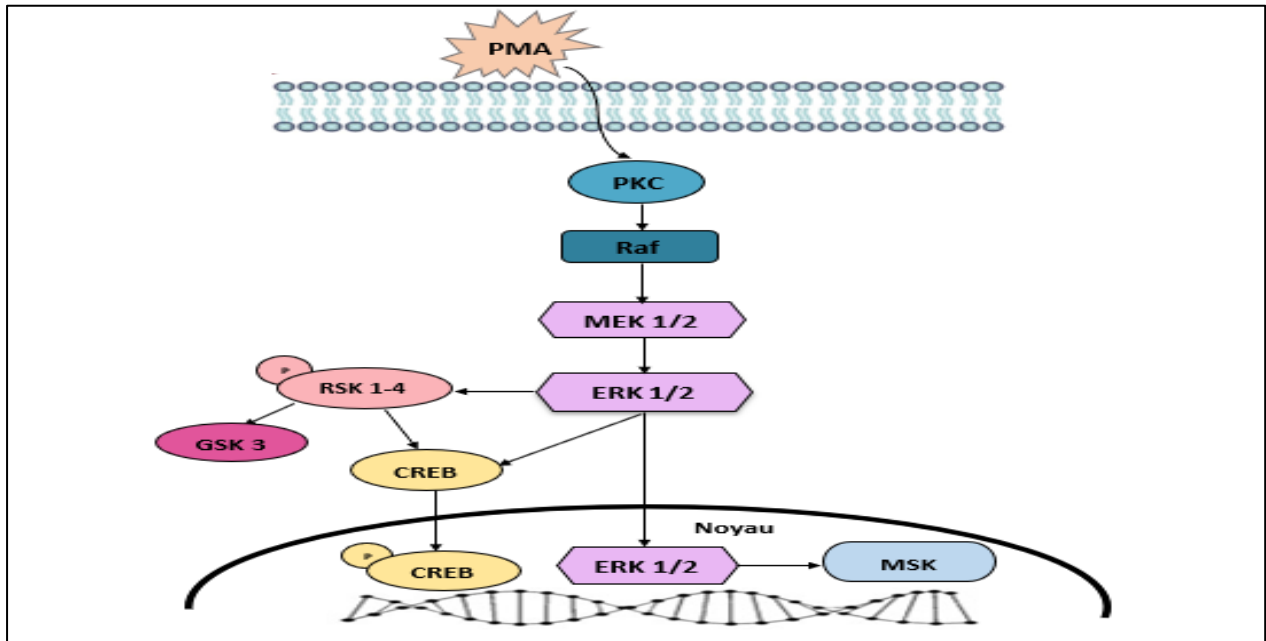


Figure 1.10 Illustration schématique de la cascade de signalisation du PMA. Le PMA active la PKC qui agira par la suite sur les voies de signalisation MAPK et active Raf, MEK et ERK. PMA active également la RSK. Cette cascade va mener par la suite à l'activation du facteur de transcription liant l'AMPc (CREB) et MSK (Davis *et al.*, 2018; Hauge et Frödin, 2006).

1.4 Diète et chimioprévention

La chimioprévention fait l'objet d'une attention considérable depuis plusieurs années, et elle est considérée comme une stratégie potentielle visant à réduire le risque d'apparition des cancers (Umezawa *et al.*, 2019). Elle implique l'utilisation de composés biologiquement actifs naturels ou synthétiques afin de prévenir ou d'inverser la progression du cancer. Ces molécules sont généralement contenues dans notre alimentation comme les légumes crucifères, et les légumes allium comme l'ail, le gingembre, le soja, le curcuma, les tomates (Walczak *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2011). Récemment, des études basées sur les facteurs alimentaires et la nutrition ont pu démontrer un lien entre l'alimentation, la formation du cancer et la prévention de la carcinogenèse (Cao *et al.*, 2018). D'ailleurs il a été observé que l'incidence de certains cancers tel que : le cancer du sein, gastro-intestinal, et de la prostate était négativement corrélée aux habitudes et aux régimes alimentaires variés, riche en fibres végétales, en légumes et faible en gras de la population de l'Asie du sud-Est, contrairement aux sociétés de l'Ouest où l'incidence était très élevée (Walczak

et al., 2017). En effet, les légumes appartenant à la famille des alliacées comme l'ail et l'oignon possèdent des propriétés médicinales et de fortes activités antibactériennes et antioxydantes grâce à leur richesse en composés organosulfurés qui préviennent l'apparition des cancers de l'estomac, du sein, du cerveau et du poumon, tel que montré dans de nombreuses études épidémiologiques par leur capacité d'inhibition de la mutagenèse, et leurs effets antiprolifératif (Bastaki *et al.*, 2021). Le composé caroténoïde insaturé contenu dans les tomates appelé lycopène module également la prolifération, la différenciation et l'apoptose grâce à son une activité antioxydante élevée exerçant un effet chimio-préventif (Wang *et al.*, 2010). Les résultats de (Zhou *et al.*, 2016) ont soutenu les propriétés antitumorales du lycopène sur l'hépatocarcinogenèse. La curcumine qui est un dérivé polyphénolique produit à partir du curcuma a aussi été impliqué dans la prévention du cancer (Esatbeyoglu *et al.*, 2012). En effet, elle présente de fortes activités antioxydantes et anti-inflammatoires. Elle peut moduler le moduler le NF- κ B et certaines voies de signalisation (Wu *et al.*, 2020). L'effet bénéfique de l'utilisation des molécules naturelles dérivées de notre diète sur le risque de cancer pourrait être en partie responsable du bénéfice sur la mortalité.

1.4.1 Les polyphénols

Les polyphénols constituent un groupe varié de molécules organiques du règne végétale. Ils sont définis comme des métabolites secondaires des végétaux de structures multiples largement distribués dans toutes les parties de la plante, de la racine jusqu'au fruit (Brglez Mojzer et al., 2016). Les polyphénols sont nécessaires pour la croissance et la survie de la plante et impliqués dans sa protection et sa résistance contre les microorganismes. Ils se caractérisent par une grande diversité structurelle (Wan et al., 2021). Leur squelette chimique de base est caractérisé par la présence d'au moins un cycle benzoïque phénolique (aromatique) auquel se lie un groupement fonctionnel hydroxyle (Singla et al., 2019). Leur classification est basée non seulement sur leurs structures mais également sur leur origine et leur fonction biologique (König, H., 2009). Ils sont communément subdivisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes et les lignanes. Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs sous-classes y compris : les

flavanones, les flavones, les isoflavonoïdes, les flavonols et les anthocyanes (Tapas et al., 2008) (Tapas et al., 2008) (figure 1.11). Leur grand intérêt est lié à leur fort potentiel d'application dans la conservation des aliments et leurs utilisations thérapeutiques bénéfiques. La relation entre l'apport en polyphénols et la santé humaine a été beaucoup explorée (Durazzo et al., 2019).

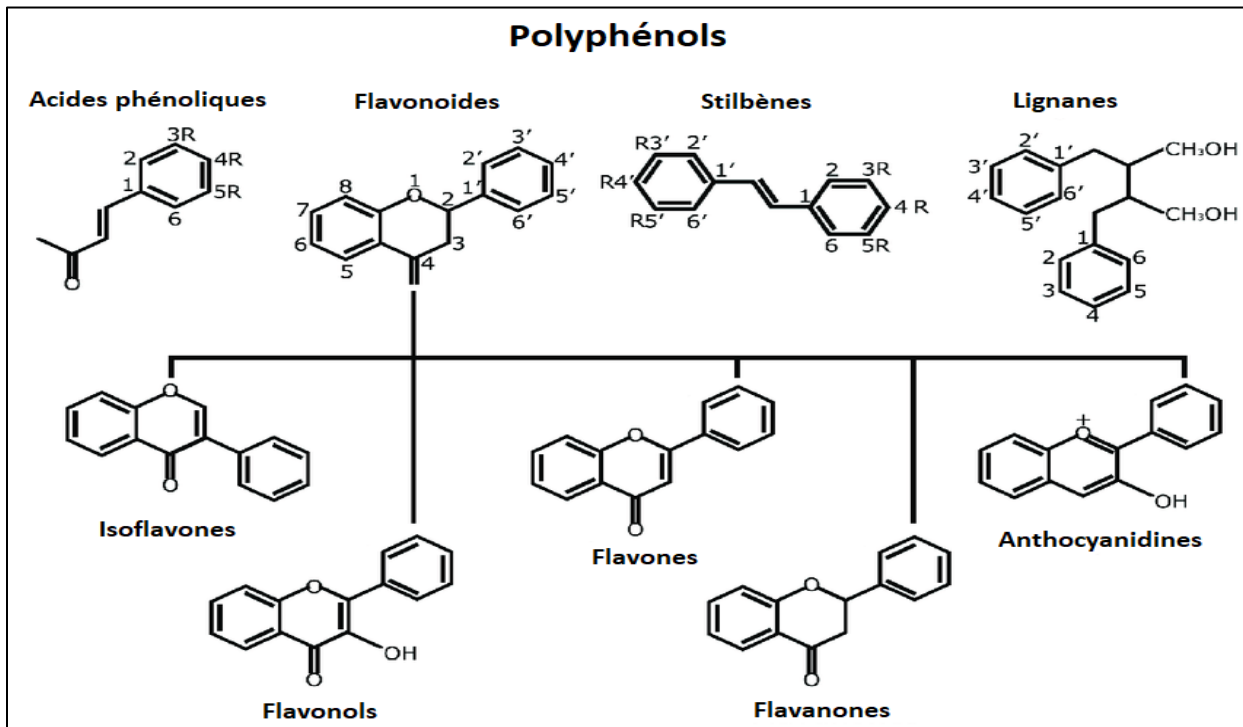


Figure 1.11 Structure chimique et classification des polyphénols. Il existe plusieurs catégories de polyphénols : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes (Losada Echeberria *et al.*, 2017).

1.4.2 Polyphénols du thé vert

Le thé est une boisson d'origine chinoise obtenue par infusion des feuilles de théier *Camellia Sinensis* (Wang, 2006). Il existe plusieurs types de thé qui diffèrent seulement dans leurs modes de préparations. On distingue : les thés non fermentés (vert), partiellement fermentés (oolong), et fermentés (noir) (Cooper, 2012; McKay et Blumberg, 2002). En effet, une feuille de thé vert est composée de plusieurs constituants comme : les glucides, les lipides, des matières minérales, des

vitamines et des pigments (Nookabkaew et al., 2006). Les éléments les plus abondants restent les polyphénols appartenant à la classe des flavonoïdes représentés majoritairement par les catéchines (Prasanth et al., 2019). Ces derniers sont des composés incolores et hydrosolubles et leur quantité est d'environ 420mg par litre de thé (Yilmaz, 2006). Les principales catéchines du thé sont au nombre de quatre : l'épicatéchine (EC), l'épigallocatechine (EGC), l'épicatéchine-3-gallate (ECG) ainsi que l'épigallocatechine gallate (EGCG) (Musial et al., 2020) (Figure 1.12).

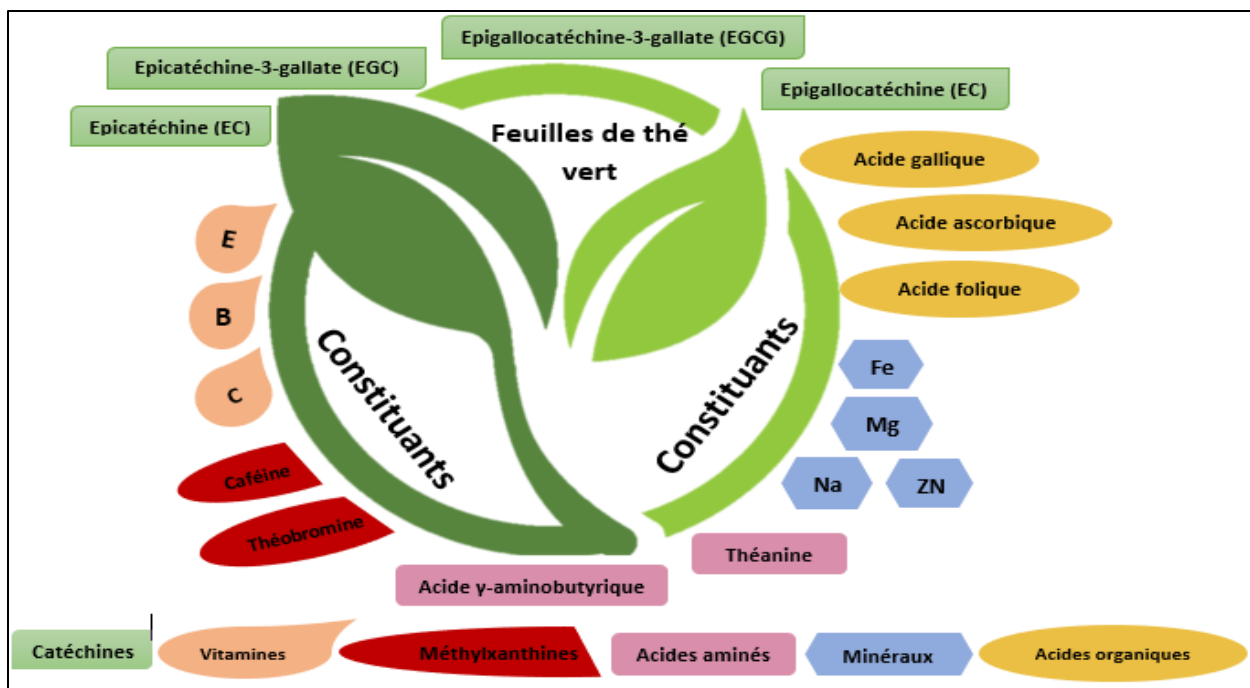


Figure 1.12 Les principaux constituants des extraits de feuilles de thé. Les feuilles du thé sont composées de nombreuses molécules. Les catéchines restent les composés prédominants.

Plusieurs intérêts et effets bénéfiques sont associés à la consommation du thé vert et le responsable principal de ces bénéfices serait l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG). Récemment, plusieurs études menées sur la consommation du thé ont montré son potentiel de réduction et diminution des risques d'apparition de maladies chroniques. D'autres études ont rapporté ses effets anti-inflammatoires et antioxydants puissants en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires et limitant la quantité des radicaux libres dans les troubles cardiovasculaires, notamment, le diabète et l'obésité (Chatterjee et al., 2012; Rai et al., 2012). Il a été montré que la

consommation du thé améliore le taux du cholestérol, stimule la sécrétion de l'insuline, et améliore son statut (Fu et al., 2017). Il s'est avéré également que les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes du thé protègent les neurones grâce aux métabolites du thé vert qui traversent la barrière hémato-encéphalique (Faria *et al.*, 2011). Outre les propriétés anti-inflammatoires, l'action chimio-protectrice et les activités de prévention du cancer des catéchines du thé vert ont été largement démontrées dans un grand nombre d'études en laboratoires. Fait intéressant, les catéchines du thé vert ont montré des effets thérapeutiques importants contre plusieurs types des cancers tels que : le cancer colorectal, gastrique, cancer du sein, de la prostate et de la thyroïde (Cheng *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2021). En effet, il a été prouvé que les composés phytochimiques présents dans le thé possèdent un grand potentiel d'inhibition de survie de cellules cancéreuses et suppression de la prolifération cellulaire par régulation de leur croissance, augmentation de l'apoptose et inhibition de l'angiogenèse qui présente une stratégie de suppression de croissance tumorale par modulation de différents facteurs de stimulation du cancer et certaines voies de signalisations notamment, TNF α , P53, COX-2, NF-kB, EGFR et les caspases (Chen *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2020).

1.4.3 L'épigallocatechine-3-gallate

L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) est le principal antioxydant actif et la catéchine polyphénolique prédominante présente dans le thé vert (Wu *et al.*, 2021). Cette composante a reçu beaucoup d'intérêts ces dernières années en raison de ses multiples propriétés biologiques et nutraceutiques notamment antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales et antitumorales qui lui sont attribuées grâce à sa structure chimique qui se caractérise par la présence d'un groupe gallate et d'une fraction hydroxyle (Tallei *et al.*, 2021). D'après les recherches une tasse de thé peut contenir environ 25 à 30 mg d'EGCG (Botten *et al.*, 2015). Son activité anti-radicalaire est supérieure par rapport à d'autres catéchines comme l'épicatéchine (EC) et les stilbènes (Boulmouk *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2011). D'ailleurs, il peut piéger les radicaux libres et réduire la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) grâce à ses caractéristiques efficaces de chélation (Piechocka et al., 2021).

L'EGCG possède plusieurs activités antivirales contre les agents pathogènes viraux. L'activité antivirale de l'EGCG contre le virus de l'hépatite B (VHB) qui est extrêmement contagieux a été démontrée (Huang et al., 2014). En effet, il est capable de supprimer sa réplication et son expression par inhibition de la transcription du promoteur du VHB de même que la réplication d'ADN (Wang et al., 2021). D'autres études ont montré que l'EGCG exerce un effet antiviral inhibiteur sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En outre, il empêche l'entrée du VIH-1 dans les cellules hôtes par blocage de la fusion membranaire médiée par la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (Liu et al., 2005). D'autre part, des études récentes sur le SARS-CoV-2 ont pu montrer que l'EGCG aurait un effet antiviral sur ce dernier et certaines infections à coronavirus en bloquant l'entrée de SARS-CoV-2 et les vecteurs lentiviraux avec le spicule de pseudotypés MERS et SARS-CoV-1 (Henss L et al., 2021) (Zhao *et al.*, 2022).

Hormis, ces effets pléiotropiques, plusieurs études ont revendiqué l'EGCG comme un agent précieux de chimioprévention contre plusieurs cancers, et ont pu présenter ses nombreux mécanismes d'activités anticancéreuses dans le développement et la progression tumorales grâce à ses interactions avec son récepteur, le récepteur à la laminine 67LR (Umeda *et al.*, 2008). En effet, l'EGCG est impliqué dans l'inhibition de l'angiogenèse qui est étroitement liée à la croissance tumorale via une diminution de l'expression du principal facteur angiogénique, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), et une modulation de ces récepteurs principalement : EGFR et PDGFR (Jung *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 1997). Ces modulations de l'EGCG se font par la régulation d'un large éventail de voies de signalisations telle-que : MAPK/ERK et JAK/STAT (Hussain et Ashafaq, 2018). En outre, de nombreuses études ont démontré que l'EGCG réduit l'expression de la MMP-2 et de la MMP-9 pour inhiber l'invasion et la formation de métastases (Koh *et al.*, 2011). Il module également les protéines Rac et Rho pour supprimer la migration cellulaire (Hwang *et al.*, 2013). L'EGCG est impliqué aussi dans le mécanisme d'induction d'apoptose selon différentes recherches grâce à sa capacité à moduler l'expression de plusieurs protéines pro-apoptotiques telles BCL et BAX (Zhao *et al.*, 2004). D'autre part, il peut induire l'apoptose par une inhibition de la voie PI3K/AKT dans certains cancers (Liu *et al.*, 2013) (figure1.13). Le rôle de l'EGCG dans la régulation des protéines du cycle

cellulaires a beaucoup été montré (Thakur *et al.*, 2012). Bien que l'EGCG présente de puissants effets anticancéreux *in vitro*, d'autres études seront nécessaires pour déterminer l'utilité de l'EGCG en thérapie clinique.

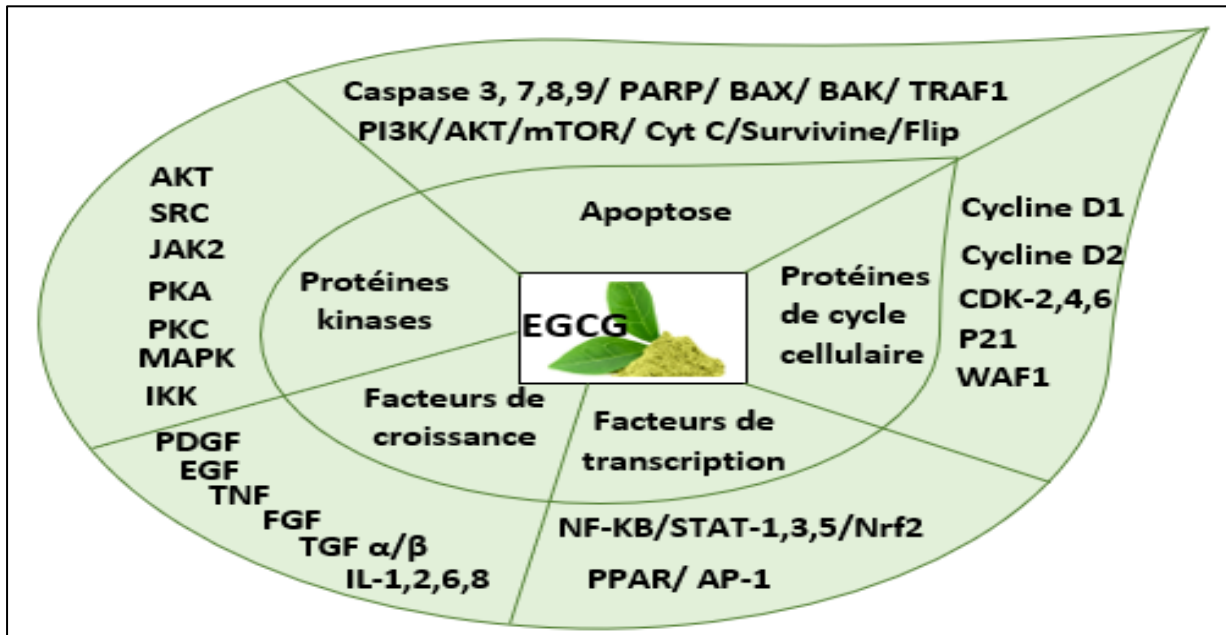


Figure 1.13 les différentes cibles et effets anticancéreux de l'EGCG. L'EGCG possède un pouvoir anticancéreux en inhibant un vaste éventail de processus moléculaires et cellulaires liés aux cancers.

1.5 Projet de recherche

1.5.1 Problématique

Le statut de différenciation des cellules leucémiques promyélocytopaires HL-60 peut être associé à un phénotype de type macrophage M1 ou M2 polarisé avec des propriétés inflammatoires et immunomodulatrices. Il a été déjà démontré par plusieurs études que lorsque les cellules HL-60 sont exposées à l'ester de phorbol PMA, elles se différencient en macrophages avec une acquisition des marqueurs de surface associés aux macrophages d'où l'appellation « macrophages-like ». Ces cellules ont été utilisées largement dans des recherches qui s'intéressaient aux différents processus moléculaires reliés à la différenciation cellulaire. Le PMA est connu pour favoriser la signalisation

intracellulaire à travers diverses cibles et cascades de signalisation, principalement la voie des MAPK et régule ainsi à la hausse plusieurs marqueurs liés à la différenciation. Dans cette étude, nous cherchons à identifier les déterminants associés à la différenciation des cellules HL-60 sur la signature moléculaire inflammatoire et immunomodulatrice lors de ce processus. Notre intérêt de recherche se focalise donc sur la chimioprévention en utilisant une molécule phytochimique dérivée du thé vert et dont les propriétés anticancéreuses ont été démontrées dans de nombreuses recherches.

1.5.2 Hypothèse

Nous émettons l'hypothèse que l'EGCG pourrait altérer le processus de différenciation des cellules de type macrophage en ciblant l'interrelation signalétique entre le phénotype inflammatoire et immunitaire.

1.5.3 Objectifs de la recherche

Les objectifs de notre étude reposent sur la différenciation de la lignée cellulaire promyélomonocytaire HL-60 monocytes/macrophages et sont comme suit :

- Caractérisation des biomarqueurs associés à la différenciation des HL-60 en macrophages
- Détermination des voies de signalisations associées à la différenciation
- Étude de l'effet de l'EGCG dans les divers processus induits par le PMA

CHAPITRE 2

ARTICLE

EGCG prevents the transcriptional reprogramming of an inflammatory and immune-suppressive molecular signature in macrophage-like differentiated human HL-60 promyelocytic leukemia cells

Celia Kassouri and Borhane Annabi*

Manuscrit soumis dans le journal scientifique *Cancers*

Kassouri C, Rodriguez Torres S, Gonzalez Suarez N, Duhamel S, Annabi B. EGCG Prevents the Transcriptional Reprogramming of an Inflammatory and Immune-Suppressive Molecular Signature in Macrophage-like Differentiated Human HL60 Promyelocytic Leukemia Cells. *Cancers*. 2022; 14(20):5065. <https://doi.org/10.3390/cancers14205065>

Contributions des co-auteurs :

Celia Kassouri : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction de manuscrit

Borhane Annabi : Analyse des résultats, rédaction du manuscrit, financement et Conceptualisation du projet

EGCG prevents the transcriptional reprogramming of an inflammatory and immune-suppressive molecular signature in macrophage-like differentiated human HL-60 promyelocytic leukemia cells

Celia Kassouri and Borhane Annabi*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, and CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada

Running title: EGCG targets the immune and inflammatory phenotype

Key words: EGCG, Inflammation, Immunity, Leukemia, Macrophage

** To whom correspondence and reprint requests should be directed*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 ext. 7610

E-mail: annabi.borhane@uqam.ca

Abbreviations

AML, Acute myeloid leukemia; CDK, Cyclin-dependent kinase; CREB, cAMP response element-binding protein; EGCG, Epigallocatechin-3-gallate; FC, Fold change; FDR, False discovery rate; GO, Gene ontology; GSEA, Gene set enrichment analysis; GSK, Glycogen synthase kinase; HuR, Human antigen R; MMP-9, Matrix metalloproteinase-9; MSK, Mitogen and stress activated protein

kinase; PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate; PKC, Protein kinase C; RSK, Ribosomal s6 kinase; TAM, Tumor-associated macrophage

2.1 Résumé

Contexte : Le processus de différenciation des cellules leucémiques promyélocytopaires permet la récapitulation d'un phénotype de type macrophage M1 ou M2 polarisé avec des propriétés inflammatoires et immunomodulatrices. Les évidences *in vitro* de l'impact anti-inflammatoire de l'épigallocatechine-3-gallate d'origine alimentaire (EGCG) sont bien reconnues, mais l'interrelation avec la signature moléculaire d'un phénotype immunitaire reste incertaine. Méthodologie : Des cellules promyélocytopaires humaines HL-60 cultivées en suspension ont été différenciées en macrophages adhérents CD11b^{High}/CD14^{Low} par traitement à l'ester de phorbol (PMA). La zymographie sur gélatine a été utilisée pour évaluer les niveaux de MMP-9 et l'ARN total a été isolé pour l'évaluation par RNAseq et RT-qPCR des niveaux de gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité dans les cellules différenciées. Des lysats de protéines ont été utilisés pour évaluer l'impact de l'EGCG sur l'état de phosphorylation des intermédiaires de signalisation. Résultats : L'adhésion cellulaire et l'induction de la MMP-9 confirment la différenciation des cellules HL-60 en un phénotype de type macrophage. Cela s'est accompagné d'une augmentation de l'état de phosphorylation de la kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK), de la glycogène synthase kinase (GSK)-3 β , des kinases S6 ribosomales p90 (RSK) et de la protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc (CREB), tous inhibés par l'EGCG. Les augmentations des gènes de l'inflammation et de l'immunité comprenaient, entre autres, CCL22, CSF1, CSF2, IL1B et TNF, dont l'induction a été inhibée par l'EGCG. Ceci était corroboré par une analyse transcriptomique qui a encore mis en évidence la capacité de l'EGCG pour réguler négativement le régulateur des cellules souches hématopoïétiques CBFA2T3. Conclusion : Les fonctions immunomodulatrices de l'EGCG semblent altérer le processus de différenciation des cellules de type macrophage en ciblant l'interrelation signalétique régulant leur phénotype inflammatoire et immunitaire.

2.2 Abstract

BACKGROUND: The promyelocytic leukemia cell differentiation process enables recapitulation of the polarized M1 or M2 macrophage-like phenotype with inflammatory and immune-suppressive properties. While evidence supports the anti-inflammatory effect of dietary-derived epigallocatechin-3-gallate (EGCG), its impact on the onset of the molecular signature of an immune phenotype remains unclear. **METHODS:** Human HL-60 promyelocytic cells grown in suspension were differentiated into CD11b^{High}/CD14^{Low} adherent macrophages with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Gelatin zymography was used to assess the levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9, and total RNA was isolated for RNAseq and RT-qPCR assessment of differentially expressed gene levels involved in inflammation and immunity. Protein lysates were used to assess the phosphorylation status of signaling intermediates involved in macrophage-like cell differentiation. **RESULTS:** Cell adhesion and induction of MMP-9 were indicative of HL-60 cell differentiation into a macrophage-like phenotype. This was accompanied by increased phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK), glycogen synthase kinase (GSK)-3 α / β , p90 ribosomal S6 kinases (RSK), and cAMP-response-element-binding protein (CREB), which was all inhibited by EGCG. Increases in inflammation and immunity genes included, among others, CCL22, CSF1, CSF2, IL1B, and TNF, which inductions were prevented by EGCG. This was corroborated by unbiased transcriptomic analysis which further highlighted the capacity of EGCG to downregulate the hematopoietic stem cell regulator CBFA2T3. **CONCLUSION:** EGCG inhibits the inflammatory signaling crosstalk and prevents the onset of an immune phenotype in macrophage-like differentiated cells.

2.3 Introduction

Chronic inflammatory processes affect all stages of tumor development and therapy efficacy [1, 2]. The signaling crosstalk that coordinates the tumor-promoting and tumor-antagonizing effects of inflammation, and the molecular signature linking immune and inflammatory processes unfortunately, still require a better understanding [3]. To add up, crosstalk between cancer and immune cells and the role of tumor-associated macrophages (TAMs) in the tumor

microenvironment is also complex [4]. Among the multiple immune cells, TAMs are particularly abundant and play an important role throughout the tumor progression process in the tumor microenvironment [5, 6]. Inflammatory responses induced by TAMs are crucial to tumor development at different stages. Many kinds of cytokines from TAMs and other immune cells in the tumor niche are involved in the linkage of inflammation, immunity, and tumorigenesis [7, 8].

Leukemia is a cancer of the blood-forming tissues that affects the blood and bone marrow, where acute myeloid leukemia (AML) comprises nearly 80 percent of all adult acute leukemias [9]. Despite significant improvements in leukemia management and diagnosis, inflammatory response mediating its crosstalk with immune function reveals clinical features in AML, which still require new therapeutic options [10]. The tumorigenic HL-60 cell line was isolated from the peripheral blood tissue of a 36-year-old female patient [11] and has proven to be a potent model for studies of human myeloid cell differentiation and differentiation in general [12]. In addition, the HL-60 xenograft model is also a relevant preclinical model enabling screening studies of AML chemotherapeutics and anticancer prodrugs [13].

HL-60 promyelocytic cells can be induced to differentiate into functional neutrophils. Studies show that genes associated with the immune and inflammatory response, e.g. chemokines and cytokines genes responsible for neutrophil recruitment and activation in physiological as well as pathological conditions, can be regulated by estrogens [14, 15]. The differentiation of HL-60 cells into a macrophage-like phenotype is also classically achieved upon treatment with protein kinase C (PKC) activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) [16, 17]. Interestingly, PMA-mediated HL-60 differentiation is reflected by an increase in the matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression, which is linked to myeloid cell differentiation, inflammation, and angiogenesis processes [18]. The expression of MMP-9 gene and protein and of the mRNA stabilizing factor Human antigen R (HuR) were inhibited upon epigallocatechin-3-gallate (EGCG) treatment, and such transcriptional regulation is also observed in the inhibition of human brain microvascular endothelial cells' three-dimensional *in vitro* tubulogenesis [19].

Recently, the anti-inflammatory activity of plant and diet-derived compounds, most belonging to the chemical groups of alkaloids, coumarins, flavonoids, polyphenols, and terpenoids, was

demonstrated [20]. Although flavonoids have been used in inflammatory pathway targeting [21], it is unknown how these compounds may modulate the recruitment and infiltration of macrophages into the tumor, where the microenvironment subsequently activates them to support the malignant progression of cancer cells. EGCG was reported to indirectly inhibit infection by regulating immune inflammation and anti-oxidation [3]. Given the selective biomarker-targeting of EGCG, we first questioned at the transcriptomic level how pro-oncogenic-mediated differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells into a macrophage-like phenotype could impact their immune and inflammatory phenotype. Then, we explored the capacity of diet-derived EGCG to prevent protein phosphorylation intermediate status in adherent HL-60 cells upon differentiation by PMA and how this subsequently alter the immune and inflammatory phenotype of macrophage-like cells.

In the present study, we characterized the responsive genes involved in the crosstalk between immune and inflammation processes in macrophage-like terminally differentiated human HL-60 promyelocytic leukemia cells and evidenced how EGCG alters such molecular signature. The phosphorylation status of signal transducing intermediates was also analyzed in adherent macrophage-like cells and supports the molecular rationale for pleiotropic diet-derived chemoprevention strategies.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Materials

Sodium dodecyl sulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich Corp (St Louis, MO, USA). Cell culture media was from Life Technologies Corp (Carlsbad, CA, USA). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). The HyGLO™ Chemiluminescent HRP (horseradish peroxidase) Antibody Detection Reagents were from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ, USA). Micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagents were from Pierce (Micro BCA™ Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The polyclonal antibodies against extracellular signal-regulated kinase (ERK), phosphorylated (P)-ERK, Glycogen synthase kinase-3 alpha and beta (GSK3- α/β),

phosphorylated (P)-GSK3- α/β (Ser21/9), C-AMP Response Element-binding protein (CREB), phosphorylated (P)-CREB (Ser133), and the monoclonal antibody against the 90 kDa ribosomal S6 kinases (RSK1/RSK2/RSK3), phosphorylated p90RSK (ser380) were all purchased from Cell Signaling Technology Inc (Danvers, MA, USA). Monoclonal Antibody against Human mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK 1), phosphorylated (P)-MSK1 and MSK2 (MSK1 S376, MSK2 S360) were purchased from R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, USA). HRP-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin (Ig) G secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). EGCG was from MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Corp.

2.4.2 Cell culture

The HL60 promyelocytic cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and maintained in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Life Technologies Corp) containing 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone™; Thermo Fisher Scientific), 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (WISSENT Inc., Québec, QC, Canada), and were cultured at 37°C, under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Upon thawing/resuscitating the HL60 cells from frozen vials, they were then passaged two times prior to treatments. The induction of macrophage differentiation was accomplished using the tumor-promoting phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) [22, 23]. We wish to emphasize that, throughout the text, the “HL60 macrophage differentiation” condition represents the adherent subpopulation of HL60 cells that are immediately harvested after PMA treatment. This is important since numerous protocols can be found in the literature that use PMA to differentiate resting HL60 cells into “macrophage-like cells” (upon 2 and 8 days with various PMA concentrations, alone or in combination with other molecules). These adherent cells were then kept in culture for an additional 24–48 h and are referred to as “terminally differentiated macrophages” in this study. Treatments of the cells with PMA or EGCG in a media from which FBS was withdrawn are referred to as cell starvation.

2.4.3 Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cell monolayers using 1 mL of TriZol reagent for a maximum of 3×10^6 cells as recommended by the manufacturer (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1-2 μg of total RNA was reverse-transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) or, in the case of the gene array: R2 First Strand kit (QIAGEN, Valencia, CA). The cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (Bio-Rad) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were from QIAGEN: CSF-1 (Hs_CSF1_1_SG, QT00035224), CSF-2 (Hs_CSF2_1_SG, QT00000896), MMP-9 (Hs_MMP9_1_SG, QT00040040), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247) and Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA were normalized against internal housekeeping genes PPIA and GAPDH. The RNA was measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of the target gene and the housekeeping genes was calculated with the CFX manager Software version 2.1 (Bio-Rad) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta\text{C}_\text{T}}$.

2.4.4 Total RNA library preparation

Total RNA (500 ng) was extracted from HL-60 cell cultures and used for library preparation. RNA quality control was assessed with the Bioanalyzer RNA 6000 Nano assay on the 2100 Bioanalyzer system (Agilent technologies, Mississauga, ON), and all samples had an RNA integrity number (RIN) above eight. Library preparation was carried out with the KAPA mRNA-Seq HyperPrep kit (KAPA, Cat no. KK8581). Ligation was made with Illumina dual-index UMI, and 10 PCR cycles were required to amplify cDNA libraries. Libraries were quantified by QuBit and BioAnalyzer DNA1000. All libraries were diluted to 10 nM and normalized by qPCR using the KAPA library

quantification kit (KAPA; Cat no. KK4973). Libraries were pooled to equimolar concentrations. Three biological replicates were generated.

2.4.5 RNA sequencing

High RNA quality was validated as above, and samples were sequenced using the Illumina NextSeq500 sequencer at the Genomics Core Facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC, Montreal, QC).

2.4.6 Reads alignment and differential expression analysis

Reads were aligned and sorted by coordinates to the human genome build 38 (GRCh38.p13) with version 37 of Gencode gene annotations, using the STAR aligner (STAR_2.7.1a) [24, 25]. Quantification of genes was performed during alignment by STAR. Differentially expressed genes among groups were identified using the R packages DESeq2 (v 1.30.1) [26]. After analysis, only genes with adjusted p -values (adjp) < 0.05 , and \log_2 fold change ≥ 1.0 were considered significant. Hierarchical clustering of differentially expressed genes was used to represent the results (R package ggplot2) and generated heatmaps [27]. For all statistical analyses, differences were considered statistically significant if the adjp calculated by Student's t -test with Bonferroni correction were < 0.05 . RNA-Sequencing of the HL-60 cell lines.

2.4.7 Gene set enrichment analysis

The gene set enrichment analysis (GSEA) was performed with the GSEA software version 4.2.3 [28] with the complete set of normalized input values, using the Hallmark, canonical pathway gene sets (chemical and genetic perturbations, BioCarta, Reactome, and Kegg), and Gene Ontology (GO) gene sets (Biological process). Molecular Signatures Database (MSig-DB), version 7.5.1 was applied to genes modulated in differentiated cells treated with EGCG (HL-60 co-treated with PMA and EGCG) compared to undifferentiated cells (HL-60 cultured in suspension) (values (adjp) < 0.05 , and \log_2 fold change (FC) ≥ 1.0 were considered as significant) to generate a signature list of the top modulated genes from the following Curated gene sets (C2CP and C2CGP) and Gene Ontology (C5). Software used for the analysis of data during this project included GraphPad Prism

and R (version >3.4). For all statistical analyses, differences were considered statistically significant if the *adjp* calculated by Student's t-test with Bonferroni correction were <0.05. RNA-Sequencing of the HL-60 cell lines.

2.4.8 Human cancer inflammation and immunity crosstalk PCR array

The RT² Profiler™ PCR Array for Human Cancer Inflammation and Immunity Crosstalk (PAHS-181Z) was used according to the manufacturer's protocol (QIAGEN). The detailed list of the key genes assessed can be found on the manufacturer's website (<https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/rt2-profiler-pcr-arrays>; accessed on January 13th, 2022). Using real-time quantitative PCR, we reliably analyzed the expression of a selected panel of genes related to the inflammatory response, including some of the cancer-associated adipocyte markers already published. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method ("delta-delta" method), in which C_T indicates the fractional cycle number where the fluorescent signal crosses the background threshold. This method normalizes the ΔC_T value of each sample using five housekeeping genes (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, and ACTB). The normalized FC values are then presented as average $FC=2$ (average $\Delta\Delta C_T$). The resulting raw data were then analyzed using the PCR Array Data Analysis Template (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>; accessed on June 5th, 2022). This integrated web-based software package automatically performs $\Delta\Delta C_T$ -based FC calculations from the uploaded raw thresholded cycle data.

2.4.9 Western blot

Cells were lysed in a buffer containing 1 mM each of NaF and Na₃VO₄, and proteins (10-20 μg) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Next, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, and blocked for 1 hour at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST; Bioshop, TWN510-500). Membranes were washed in TBST and incubated overnight with the appropriate primary antibodies (1/1000 dilution) in TBST

containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) at 4°C and in a shaker. After three washes with TBST, the membranes were incubated 1 hour with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG at 1/2500 dilutions in TBST containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized by ECL.

2.4.10 Gelatin zymography

Gelatin zymography was used to assess the extent of pro-MMP-9 gelatinolytic activity, as previously described [18]. Briefly, an aliquot (20 μ L) of the culture medium was subjected to SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in a gel containing 0.1 mg/mL gelatin, a substrate that is efficiently hydrolyzed by MMP-9. The gels were then incubated in 2.5% Triton™ X-100 and rinsed in nanopure distilled H₂O. The gels were further incubated at 37°C for 20 hours in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij®-35, and 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid and 30% methanol in H₂O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

2.4.11 Statistical data analysis

Data and error bars were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of three or more independent experiments unless otherwise stated. Hypothesis testing was conducted using the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn Tukey's post-test (data with more than three groups) or a Mann-Whitney test (two-group comparisons). Probability values of less than 0.05 (*) or 0.01 (**) were considered significant and denoted in the figures. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7 software (San Diego, CA).

2.5 Results

2.5.1 Unbiased transcriptomic analysis reveals the induction of differentiation and immune activation programs upon macrophage-like differentiation of promyelocytic HL-60 cells

In order to gain insight into the differential transcriptomic regulation which occurs upon PMA-mediated HL-60 differentiation into adherent macrophage-like cells, total RNA was isolated from suspension and adherent cell cultures and RNA-Sequencing was performed as described in the Methods section. Unsupervised hierarchical clustering revealed that PMA-differentiated adherent macrophage-like cells clearly displayed a gene expression signature distinct from that of undifferentiated HL-60 cells cultured in suspension (Fig.2. 1A). To gain further insight into these differences, we performed GSEA by comparing transcript expression levels from the differentiated macrophage-like cells to HL-60 cell suspension cultures. Among those processes found to be significantly induced in terminally differentiated adherent cells, these included macrophage and monocyte differentiation, B cell regulation, inflammatory response, immune response to tumor cells, apoptosis, and senescence (Fig.2. 1B, red dots). This was associated, among other genes, with a significant increase in the levels of differentiation genes *CSF1*, *CSF2*, and *ID2* (Fig.2. 1C).

PMA treatment of HL-60 cells also induced an inflammatory transcriptional program associated with an enhanced complement activation signature (Fig.2. 1B). This was corroborated by the increase in Granzyme B (*GZMB*) and the induction of the pro-inflammatory cytokines *TNFSF15*, *TNFRSF9*, and *CCL2*, and by the chemokine *CXCL8* transcripts (Fig.2. 1C). In addition, GSEA showed significant enhancement for PPAR and p53 pathways, as well as apoptosis and senescence gene signatures. In agreement, increased levels of Caspases (*CASP7* and *CASP8*) and of the Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors *CDKN2B* and *CDKN1A* were observed in the PMA-differentiated HL-60 cells (Fig.1C). Of particular interest, the *CDKN2B* gene encoding the tumor suppressor p15^{INK4B} is a critical regulator of senescence and apoptosis by acting as an inhibitor of the CDK that regulates progression through the G1 phase of the cell cycle [29, 30]. *CDKN2B* is also essential for hematopoietic stem cell renewal [31].

Negative enrichment in SKP2/E2F gene signature was observed upon cell differentiation (Fig.2. 1B, blue dot). This was corroborated with the repression of the transcription factor E2F which is an essential regulator of cell cycle progression from G1 into the S phase, and which is regulated through phosphorylation by the CDK [32]. Accordingly, E2F1 and CyclinA2 and E1 (*CCNA2* and *CCNE1*) transcripts were significantly reduced in the PMA-treated cells (Fig.2. 1C). In conclusion, PMA-mediated differentiation into a macrophage-like phenotype appears to reduce the cell proliferation index and supports the induction of a differentiation program accompanied by increased immune functions.

2.5.2 EGCG inhibits PMA-mediated human promyelocytic HL-60 cell adhesion and MMP-9 secretion.

The human HL-60 promyelocytic differentiation process into an adherent macrophage-like phenotype was further validated. PMA treatment of serum-starved HL-60 cells cultured in suspension efficiently led to an adherent cell phenotype (Fig.2. 2A). This was associated with the induction of pro-MMP-9 secretion, in agreement with previous studies [16, 17], where the acquisition of a CD11b^{High}/CD14^{Low} macrophage phenotype was confirmed [33]. Interestingly, the co-treatment with increasing concentrations of EGCG was found to both inhibit PMA-induced pro-MMP-9 secretion (Fig.2. 2B) and to reverse the adhesive phenotype of the cells (Fig.2. 2C). Altogether, this confirms that our cell differentiation protocol is functional and prompts for the subsequent investigation on the cell signaling intermediates involved in the acquisition of the macrophage/monocyte-like phenotype.

2.5.3 The induction of GSK 3 α/β , CREB, ERK1/2, and RSK1/2/3 phosphorylation status upon PMA-mediated human promyelocytic HL-60 cell treatment is inhibited by EGCG

A screen of the potential phosphorylated signal transducing intermediate status was next performed using PathScan pathway as described in the Methods section. Protein lysates from human HL-60 cells either in suspension, treated with PMA or with a combination of PMA and EGCG were harvested and processed. Autoradiograms from a representative experiment are shown (Fig.3. 3A), and the intensity of significantly modulated phosphorylated intermediates was identified and

quantified by scanning densitometry (Fig.3. 3B). The signaling pathways which appeared to be both induced by PMA and which induction was prevented by EGCG in the screen were the cAMP-response-element-binding protein (CREB), the glycogen synthase kinase-3 (GSK3) α/β , the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2, the mitogen- and stress-activated protein kinases (MSK) 1/2, and the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) 1/2/3. Among those signaling intermediates whose phosphorylation status was not induced upon PMA treatment were FGR, mitogen-activated protein kinase 14 (P38- α), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1/2/3, platelet-derived growth factor receptor β , Signal transducer and activator of transcription 5 α/β , P-53, heat shock protein 60 (not shown). To further validate the respective inductions and EGCG inhibition observed, the HL-60 suspension cells were either untreated, treated with PMA, or treated with PMA and increasing doses of EGCG. Protein lysates were harvested, and representative autoradiograms were shown for the indicated total or phosphorylated signaling intermediates (Fig.3. 3C). Finally, the EGCG-mediated inhibition of the phosphorylation status of MSK, RSK, ERK, and GSK was confirmed, however, only very modest inhibition by EGCG was observed for CREB (Fig.3. 3D).

2.5.4 EGCG reduces Notch and CBFA2T3 pathways in PMA-differentiated promyelocytic macrophage-like cells

We next conducted additional RNA-Sequencing analysis and profiled HL-60 cells upon co-treatment with PMA and EGCG. We assessed the up- and down-regulated genes using Molecular Signatures DB (MSig-DB; Fig.2. 4A and 4B) and found that EGCG-treated macrophage-like cells were inversely associated with stem-like features. Indeed, pluripotency (Plurinet) and embryonic stem cells gene signatures were decreased, while cell differentiation was significantly enriched (Fig.2. 4A and 4B). Accordingly, reduced levels of key regulatory genes involved in the promotion of stemness and pluripotency (*LSM4*, *LSM5*, and *HSPE1*), and enhanced levels of differentiation genes (*BMP10* and *SLIT2*) were observed in the EGCG-treated macrophage-like cells (Fig.2. 5C). This was accompanied by reduced Notch signaling, a critical regulating pathway of hematopoietic stem cells [34] (Fig.2. 4A). This was corroborated with the repression of the transcript level of histones (*H4C8*, *H4C9*, *H2BC5*, and *H2BC21*) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) activator/regulator complex LAMTOR4 (Fig.2. 4C).

Surprisingly, we also observed a reduction in the CBFA2T3 pathway upon EGCG treatment. The CBFA2/RUNX1 partner transcriptional corepressor 3 (CBFA2T3, also known as MTG16 or ETO2) acts as a transcriptional corepressor to regulate hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and lineage allocation [36] (Fig.2. 4A). To our knowledge, the capacity of EGCG to downregulate *CBFA2T3* has never been described before. Negative enrichment for the CBFA2T3 pathway, associated with the transcriptional reduction of *CBFA2A3*, *MS4A3*, *PRG2*, and *PRTN3* transcripts, was observed in the EGCG-treated promyelocytic macrophage-like cells (Fig.2. 4C).

EGCG treatment of macrophage-like cells was also found to increase apoptosis and response to stress gene signatures (Fig.2. 4B). Positive enrichment in immune function, including induced natural killer T cells, as characterized by increased *CCL5*, *CSTB*, and *IFIT3* transcripts levels, was also observed in EGCG-treated macrophage-like cells (Fig.2. 4C). These results indicate that EGCG induces a transcriptomic program characterized by reduced proliferative and stem-like features, including the downregulation of Notch and CBFA2T3 pathways.

2.5.5 Impact of EGCG on PMA-mediated transcriptional regulation of immunomodulatory and inflammation biomarkers expression

Finally, the transcriptional crosstalk between immunomodulatory and inflammatory genes reflecting the molecular signature of PMA-differentiated promyelocytic macrophage-like cells was explored. Total RNA was isolated from human HL-60 cells in suspension or adherent cells resulting from PMA treatment in the absence or presence of 30 μ M EGCG. Reverse transcription was performed to generate cDNA as described in the Methods section and results from gene arrays were presented for the top 30 genes that were downregulated (Fig.2. 5A, top) or upregulated (Fig.2. 5A, bottom). The extent of EGCG inhibitory impact was also plotted. Interestingly, *CCL22*, *CSF1*, *CSF2*, *CCL4*, *IL1B*, *CCL2*, *TNF*, among other genes, were found to be induced from 10-10,000 times and efficiently inhibited by EGCG (Fig.2. 5B).

2.6 Discussion

The mutual interactions between infiltrating macrophages, tumor cells, and stromal microenvironment contribute to phenotypic polarization of TAM and tumor progression [4]. Whereas M1 phenotype macrophages are tumor-resistant due to their enhanced antitumor inflammatory reactions [36], M2 macrophages are commonly deemed TAM and endowed with a repertoire of tumor-promoting capabilities involving, among others, immuno-suppression, angiogenesis, as well as stromal activation and remodeling [37]. Here, we show that diet-derived anti-inflammation and anticancer EGCG prevents the PMA-mediated signaling that triggers macrophage-like differentiation. Interestingly, such chemopreventive effects were recently found to block macrophage polarization from M1 to M2 in bone marrow-derived macrophages [38] and to modulate polarized macrophages by suppressing M1 phenotype and promoting M2 polarization *in vitro* and *in vivo* [39].

Here, we exploited the well-established PMA-mediated HL-60 macrophage-like differentiation model to explore the phenotypic crosstalk that could link immune-suppressive and inflammatory molecular signatures [12]. Most importantly, we also addressed whether diet-derived polyphenol-mediated intervention may prevent the acquisition of such phenotype. Polyphenols found abundantly in plants are known to display many anticarcinogenic properties, including inhibitory effects on cancer cell proliferation, tumor growth, angiogenesis, metastasis, and inflammation as well as trigger apoptosis. In addition, they can modulate immune system response and protect normal cells against free radical damage [40]. Evidence strongly supports the fact that the immune system has both positive and negative effects on tumorigenesis, and the inflammatory microenvironment is an essential component of tumors [41-43]. Given its documented capacity to target chronic inflammation process, by regulating many molecules such as inflammatory cytokines, chemokines, growth factors, reactive oxygen, and nitrogen species, it becomes reasonable to hypothesize that EGCG may consequently also alter transcriptomic programs involved in immune phenotype and which could then also contribute to triggering the tumor angiogenesis and inflammation. PMA-triggered cell differentiation induces cell-cycle arrest as well as elevated expression of macrophage markers CD11b, CD13, CD14, CD45, EGR1, CSF1R, and

IL-8. PMA also increased nuclear translocation of autophagy transcription factors TFEB, FOXO1, and FOXO3, as well as the expression of several autophagy-related (ATG) genes in HL-60 cells [44].

EGCG is the primary polyphenol present in green tea. It has been shown to inhibit the production of pro-inflammatory mediators including NO, and PGE2, by downregulating iNOS and COX-2 gene expression [10, 45]. Besides EGCG, immunomodulatory therapeutic effects of other diet-derived molecules such as curcumin on M1/M2 macrophage polarization in inflammatory diseases have been reported. In addition, and similarly to EGCG, curcumin inactivation of FoxM1 was found to impact its downstream genes, including MMP-9 and vascular endothelial growth factor, leading to the reduction of survival and angiogenesis, and enhanced chemosensitivity in AML [46]. Pathologic inflammatory conditions are frequently correlated with dynamic alterations in macrophage activation with curcumin anti-tumor immunity properties to shift macrophage polarization status and to act as a potential modulator of M1 and M2 macrophages [47, 48]. While macrophages isolated from primary tumors display an anti-inflammatory M2 phenotype and/or M2 polarized by the tumor cells, diet-derived intervention may prevent their capacity to escape their destruction by the immune system possibly by inducing apoptosis or cell senescence [49].

Here, we also exploited EGCG's kinase inhibitory activity through a phosphokinase array and found that MSK, RSK, CREB, and GSK phosphorylation status was all triggered upon PMA-mediated differentiation of HL-60 cells into adherent macrophage-like cells. Strategies have been previously employed to modify the macrophage polarization status as the repolarization of M2 TAM would play an essential role in anti-cancer therapy [50, 51]. Among the signaling intermediates identified above, the CREB pathway is known to link PGE2 signaling with macrophage polarization [52]. In fact, a CREB-C/EBP β cascade has been shown to induce M2 macrophage-specific gene expression [53] and was higher in M2 polarized cells [54]. M2 polarization also correlates with a predominant arginase pathway and an increased production of polyamines, which can be responsible for tumor proliferation together with an anti-inflammatory response [55]. Interestingly, EGCG was found to inhibit arginase [56], but whether this contributes to reducing TAM's association with angiogenesis and metastasis in tumors remains unknown [57]. Intriguingly, EGCG was unable to inhibit PMA-induced CREB phosphorylation, which does not

preclude a potential indirect action on downstream arginase activity. However, the pleiotropic capacity of EGCG to inhibit ERK/MSK/RSK/GSK signaling intermediates confirm its multi-kinase targeting and chemopreventive activities.

Here we further report, for the first time to our knowledge, the ability of EGCG to downregulate the CBFA2T3 (MTG16) pathway. CBFA2T3 is a transcriptional corepressor upregulated in hematopoietic stem and progenitor cells [58]. The rapid expansion of short-term stem cells, multipotent progenitor cells, and megakaryocyte-erythroid progenitor cells, which are necessary during hematopoietic stress/emergency, is hampered by Mtg16 gene inactivation [35]. According to a number of studies, CBFA2T3 inhibits differentiation and enhances proliferation in a range of hematopoietic cell types [59-62]. Targeting CBFA2T3 in leukemia, especially acute lymphoblastic leukemia that expresses the E2A-Pbx1 fusion protein, is also supported by an increasing body of evidence [58, 62, 63].

2.7 Conclusion

The present study revealed EGCG's ability to prevent the acquisition of an immunosuppressive and inflammatory phenotype through the inhibition of multiple signal transducing events. Whereas this may cause the decrease in certain polarization markers only, or not a full repolarization from M1 to M2 phenotype or vice versa, this still supports the pleiotropic chemopreventive properties of diet-derived polyphenols.

Authors' contributions

CK performed all the experiments, analyzed the data, and drafted the manuscript. BA designed the study, analyzed the data, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Figure 2.1: Transcriptomic analysis reveals the induction of differentiation and immune function genes upon macrophage-like differentiation of promyelocytic HL-60 cells. Total RNA was extracted from HL-60 cells cultured in suspension or PMA-treated adherent cells from three independent experiments and subjected to RNA-Sequencing. **A)** Unsupervised hierarchical clustering of all the genes differentially expressed in pairwise comparison was tested with adjusted p value ≤ 0.05 and \log_2 fold change ≥ 1.0 . **B)** Dot plot showing changes in the normalized enrichment score for the most enriched pathways in PMA-treated adherent HL-60 cells when compared to HL-60 cultures in suspension. p value ≤ 0.05 and false discovery rate (FDR) p value ≤ 0.25 . The top up- and down-regulated gene signatures of Hallmark, Gene Ontology, Genetic and chemical perturbations, and Canonical pathways. **C)** Heatmap representation of the relative expression of known phenotypic markers for each of the indicated cellular processes.

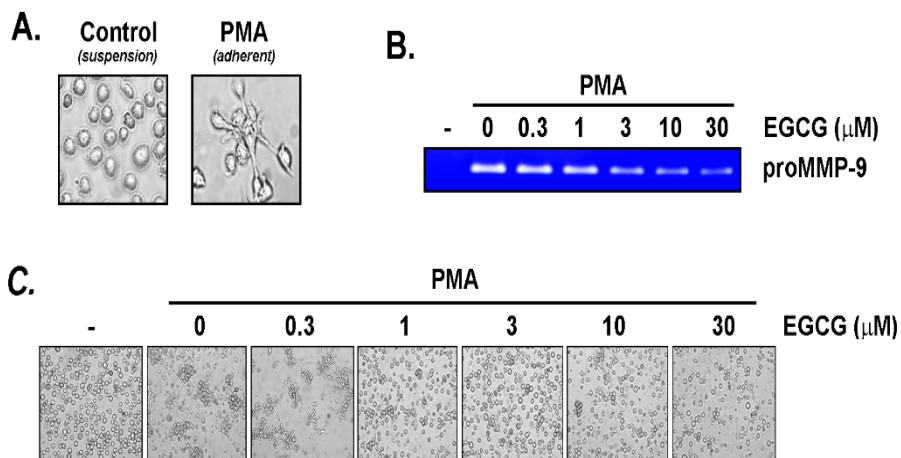


Figure 2.2: EGCG inhibits PMA-mediated human promyelocytic HL-60 cell adhesion and MMP-9 secretion. Human HL-60 cells were passaged in suspension as described in the Methods section, then treated with $0.6 \mu\text{M}$ PMA for 24 hours in serum-free media. **A)** Representative phase contrast pictures were taken of cells in suspension (left) and in adhesion (right). **B)** Conditioned media was collected from serum starved HL-60 cells in suspension and upon PMA treatment in the presence of increasing doses of EGCG. Gelatin zymography was performed to assess the levels of proMMP-9 secretion as described in the Methods section. **C)** Representative phase contrast pictures were taken of cells treated or not with PMA, and in the presence of increasing concentrations of EGCG.

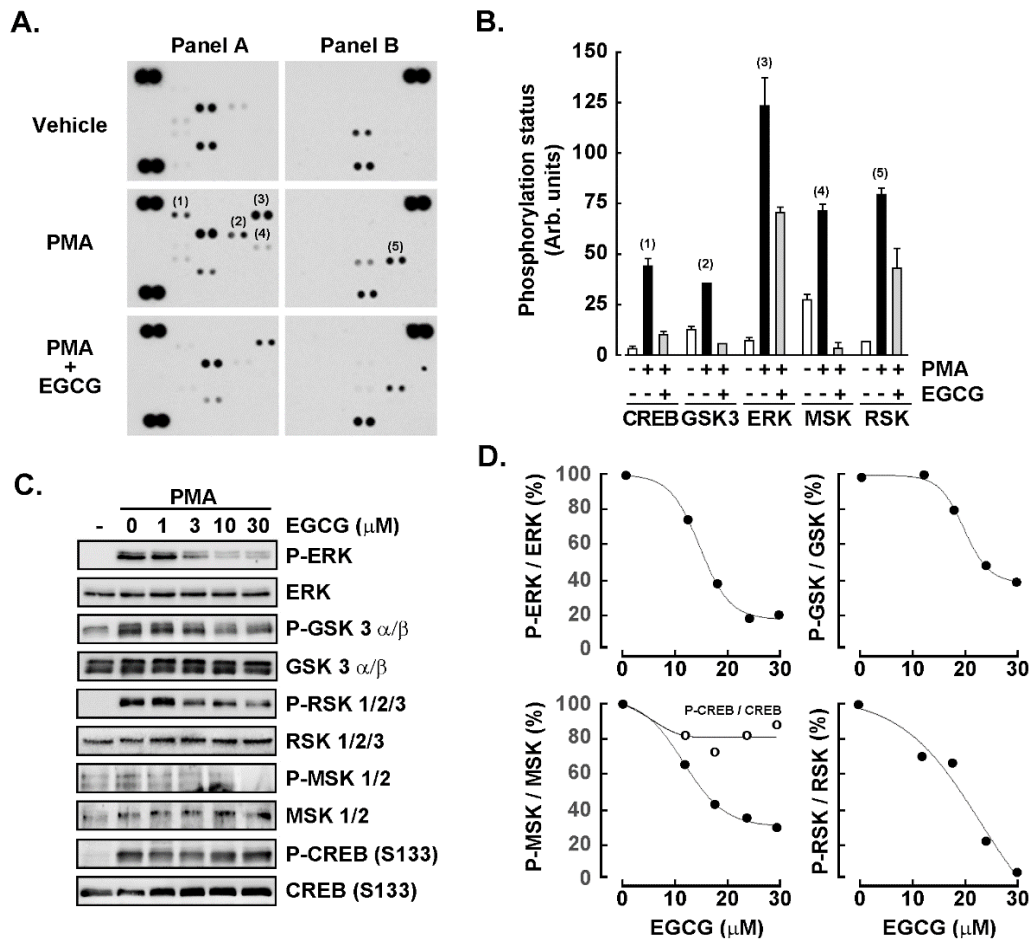


Figure 2.3: The induction of GSK3 α/β , CREB, ERK1/2, and RSK1,2,3 phosphorylation status upon PMA-mediated human promyelocytic HL-60 cell treatment is inhibited by EGCG. Protein lysates from human HL-60 cells, either in suspension or treated with PMA were harvested and processed for **A**) PhosphoScan pathway screening according to the manufacturer's protocol (Representative autoradiograms are presented), and **B**) quantified by scanning densitometry. **C**) Protein lysates were harvested from untreated HL-60 cells in suspension and adherent cells upon PMA treatment in the presence of increasing concentrations of EGCG. Representative autoradiograms are shown for the indicated total or phosphorylated signaling intermediates, whereas **D**) scanning densitometry was performed to quantify each of the phosphorylated status levels.

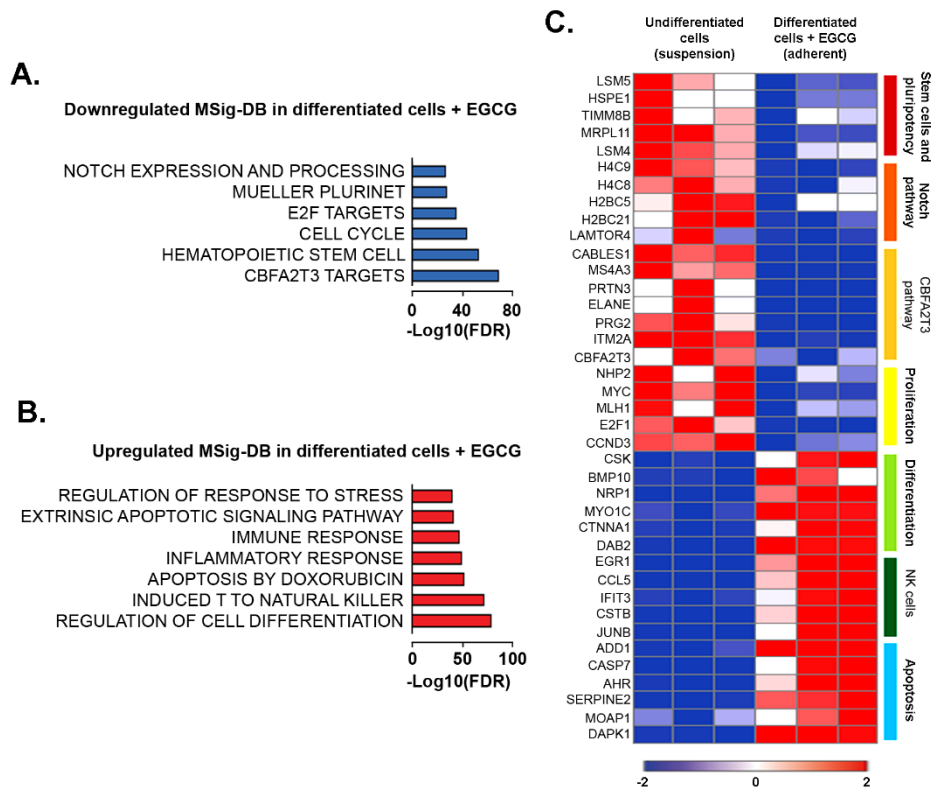


Figure 2.4: *Transcriptomic analysis reveals the reduction of proliferation and stemness properties in macrophage-like promyelocytic HL-60 cells in response to EGCG.* A-B) RNA from HL-60 cells cultured in suspension or treated with PMA and EGCG for 18 hours from 3 independent experiments was extracted and subjected to RNA-Sequencing. All differentially expressed genes in pairwise comparison, tested with adjusted p value ≤ 0.05 and \log_2 fold change ≥ 1.0 , were subjected to MSig-DB analysis. The top up- and down-regulated gene signatures of Hallmark, Gene Ontology, Genetic and chemical perturbations, and Canonical pathways are presented. C) Heatmap representation of the relative expression of known phenotypic markers for each of the indicated cellular processes.

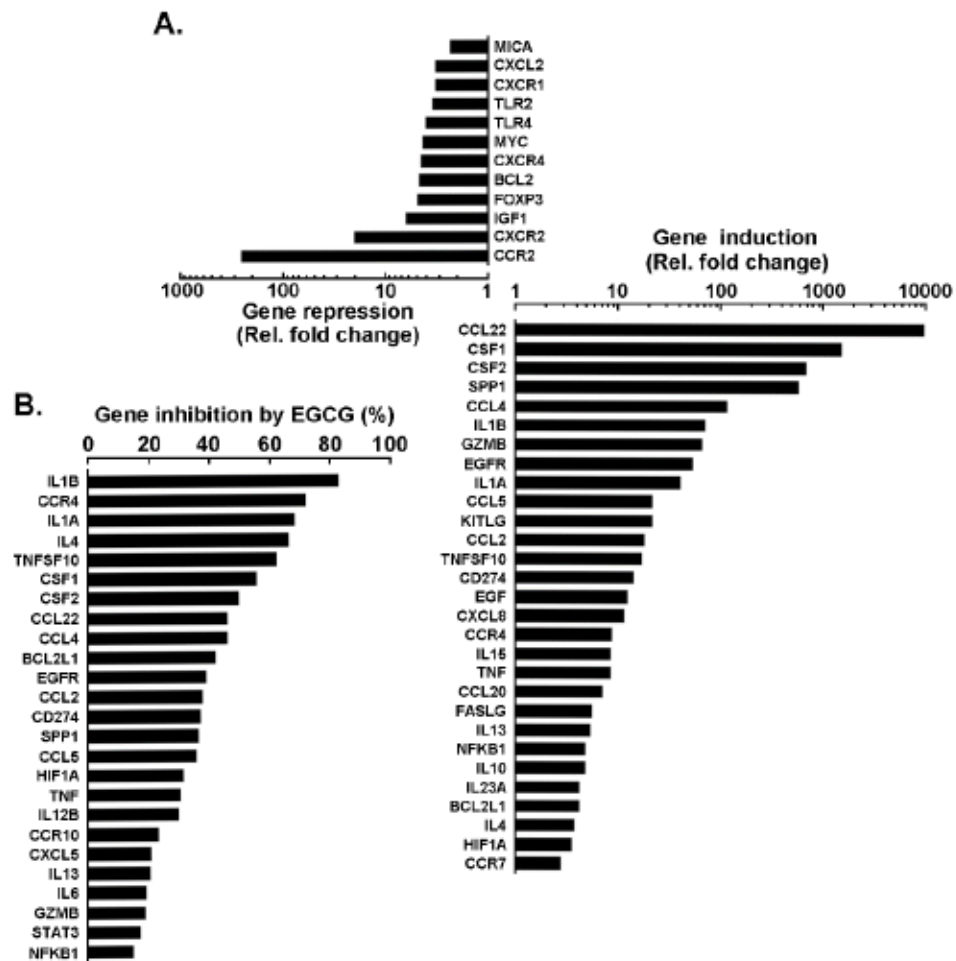


Figure 2.5: Impact of EGCG on PMA-mediated transcriptional regulation of immunity and inflammation biomarkers expression. Total RNA was isolated from human HL-60 cells in suspension or adherent cells resulting from PMA treatment in the absence or presence of 30 μ M EGCG. Reverse transcription was performed to generate cDNA as described in the Methods section and results from gene arrays are presented in A) for the top 30 genes that were downregulated (top) or upregulated (bottom) and in B) for the extent of EGCG inhibition.

2.8 References

1. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322. PMID: 12490959; PMCID: PMC2803035.
2. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2012 Jan 12;2:98. doi: 10.3389/fimmu.2011.00098. PMID: 22566887; PMCID: PMC3342348.
3. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, Li Y. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Jul 12;6(1):263. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5. PMID: 34248142; PMCID: PMC8273155.
4. Wang J, Li D, Cang H, Guo B. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Med*. 2019 Aug;8(10):4709-4721. doi: 10.1002/cam4.2327. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31222971; PMCID: PMC6712467.
5. Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci*. 2019 Oct 20;26(1):78. doi: 10.1186/s12929-019-0568-z. PMID: 31629410; PMCID: PMC6800990.
6. Wang H, Yung MMH, Ngan HYS, Chan KKL, Chan DW. The Impact of the Tumor Microenvironment on Macrophage Polarization in Cancer Metastatic Progression. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 18;22(12):6560. doi: 10.3390/ijms22126560. PMID: 34207286; PMCID: PMC8235734.
7. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. 2013 Nov;13(11):759-71. doi: 10.1038/nrc3611. PMID: 24154716.
8. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025. PMID: 20303878; PMCID: PMC2866629.

9. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J.* 2016 Jul 1;6(7):e441. doi: 10.1038/bcj.2016.50. PMID: 27367478; PMCID: PMC5030376.
10. Zhong Y, Chiou YS, Pan MH, Shahidi F. Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages. *Food Chem.* 2012 Sep 15;134(2):742-8. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.172. Epub 2012 Mar 6. PMID: 23107686.
11. Fleck RA, Romero-Steiner S, Nahm MH. Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Jan;12(1):19-27. doi: 10.1128/CDLI.12.1.19-27.2005. PMID: 15642980; PMCID: PMC540204.
12. Al-Otaibi NAS, Cassoli JS, Slater NKH, Rahmoune H. Molecular Characterization of Human Leukemia 60 (HL-60) Cells as a Model of Acute Myelogenous Leukemia Post Cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:239-247. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_23. PMID: 30535701.
13. Saland E, Boutzen H, Castellano R, Pouyet L, Griessinger E, Larrue C, de Toni F, Scotland S, David M, Danet-Desnoyers G, Vergez F, Barreira Y, Collette Y, Récher C, Sarry JE. A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2015 Mar 20;5(3):e297. doi: 10.1038/bcj.2015.19. PMID: 25794133; PMCID: PMC4382660.
14. Nalbandian G, Kovats S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res.* 2005;31(2):91-106. doi: 10.1385/IR:31:2:091. PMID: 15778508.
15. Cutolo M, Brizzolara R, Atzeni F, Capellino S, Straub RH, Puttini PC. The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic

- diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Apr;1193:36-42. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05383.x. PMID: 20398006.
16. Vézina A, Chokor R, Annabi B. EGCG targeting efficacy of NF- κ B downstream gene products is dictated by the monocytic/macrophagic differentiation status of promyelocytic leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Dec;61(12):2321-31. doi: 10.1007/s00262-012-1301-x. Epub 2012 Jun 16. PMID: 22707304.
 17. Chokor R, Lamy S, Annabi B. Transcriptional targeting of sphingosine-1-phosphate receptor S1P2 by epigallocatechin-3-gallate prevents sphingosine-1-phosphate-mediated signaling in macrophage-differentiated HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Onco Targets Ther.* 2014 May 7;7:667-77. doi: 10.2147/OTT.S62717. PMID: 24855377; PMCID: PMC4019616.
 18. Annabi B, Currie JC, Moghrabi A, Béliveau R. Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG. *Leuk Res.* 2007 Sep;31(9):1277-84. doi: 10.1016/j.leukres.2006.10.001. Epub 2006 Nov 1. PMID: 17081606.
 19. Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laroche M, Lachambre MP, Moundjian R, Béliveau R. The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Jun;52(6):692-700. doi: 10.1002/mnfr.200700434. PMID: 18435488.
 20. Nunes CDR, Barreto Arantes M, Menezes de Faria Pereira S, Leandro da Cruz L, de Souza Passos M, Pereira de Moraes L, Vieira IJC, Barros de Oliveira D. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules.* 2020 Aug 15;25(16):3726. doi: 10.3390/molecules25163726. PMID: 32824133; PMCID: PMC7465135.
 21. Farzaei MH, Singh AK, Kumar R, Croley CR, Pandey AK, Coy-Barrera E, Kumar Patra J, Das G, Kerry RG, Annunziata G, Tenore GC, Khan H, Micucci M, Budriesi R, Momtaz S,

- Nabavi SM, Bishayee A. Targeting Inflammation by Flavonoids: Novel Therapeutic Strategy for Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 8;20(19):4957. doi: 10.3390/ijms20194957. PMID: 31597283; PMCID: PMC6801776.
22. Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol*. 1985 Apr;37(4):407-22. doi: 10.1002/jlb.37.4.407. PMID: 3855947.
 23. Aihara H, Asaoka Y, Yoshida K, Nishizuka Y. Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 15;88(24):11062-6. doi: 10.1073/pnas.88.24.11062. PMID: 1763021; PMCID: PMC53073.
 24. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018 Sep 1;34(17):i884-i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560. PMID: 30423086; PMCID: PMC6129281.
 25. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013 Jan 1;29(1):15-21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23104886; PMCID: PMC3530905.
 26. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8. PMID: 25516281; PMCID: PMC4302049.
 27. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016 Sep 15;32(18):2847-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313. Epub 2016 May 20. PMID: 27207943.
 28. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-

- based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102. Epub 2005 Sep 30. PMID: 16199517; PMCID: PMC1239896.
29. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):667-77. doi: 10.1038/nrm1987. PMID: 16921403.
30. Jang W, Park J, Kwon A, Choi H, Kim J, Lee GD, Han E, Jekarl DW, Chae H, Han K, Yoon JH, Lee S, Chung NG, Cho B, Kim M, Kim Y. CDKN2B downregulation and other genetic characteristics in T-acute lymphoblastic leukemia. *Exp Mol Med*. 2019 Jan 11;51(1):1-15. doi: 10.1038/s12276-018-0195-x. PMID: 30635552; PMCID: PMC6329696.
31. Iwasaki M, Liedtke M, Gentles AJ, Cleary ML. CD93 Marks a Non-Quiescent Human Leukemia Stem Cell Population and Is Required for Development of MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell*. 2015 Oct 1;17(4):412-21. doi: 10.1016/j.stem.2015.08.008. Epub 2015 Sep 18. PMID: 26387756; PMCID: PMC4592469.
32. Morris L, Allen KE, La Thangue NB. Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol*. 2000 Apr;2(4):232-9. doi: 10.1038/35008660. PMID: 10783242.
33. Dao T, Salahuddin S, Charfi C, Sicard AA, Jenabian MA, Annabi B. Pharmacological targeting of neurotensin response by diet-derived EGCG in macrophage-differentiated HL-60 promyelocytic leukemia cells, *PharmaNutrition*, Volume 12, 2020, 100191, ISSN 2213-4344, <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2020.100191>.
34. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:587-613. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154300. PMID: 18039126; PMCID: PMC5934586.

35. Chyla BJ, Moreno-Miralles I, Steapleton MA, Thompson MA, Bhaskara S, Engel M, Hiebert SW. Deletion of Mtg16, a target of t(16;21), alters hematopoietic progenitor cell proliferation and lineage allocation. *Mol Cell Biol.* 2008 Oct;28(20):6234-47. doi: 10.1128/MCB.00404-08.
36. Liu J, Geng X, Hou J, Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int.* 2021 Jul 21;21(1):389. doi: 10.1186/s12935-021-02089-2. PMID: 34289846; PMCID: PMC8296555.
37. Boutilier AJ, ElSawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 29;22(13):6995. doi: 10.3390/ijms22136995. PMID: 34209703; PMCID: PMC8268869.
38. Li C and Kuemmerle J. Phenotypic alterations of macrophage contributes to extracellular matrix deposition in cultured macrophage RAW 264.7, *Gastroenterology*, Volume 160, Issue 3, Supplement, February 2021, Page S49
39. Hu Y, Gu J, Lin J, Wang Y, Yang F, Yin J, Yu Z, Wu S, Lv H, Ji X, Wang S, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates polarized macrophages to suppress M1 phenotype and promote M2 polarization in vitro and in vivo, *Journal of Functional Foods*, Volume 87, 2021, 104743, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104743>.
40. Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients.* 2016 Sep 9;8(9):552. doi: 10.3390/nu8090552. PMID: 27618095; PMCID: PMC5037537.
41. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2017 Sep;17(9):559-572. doi: 10.1038/nri.2017.49. Epub 2017 May 30. PMID: 28555670; PMCID: PMC5731833.

42. Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol*. 2018 May;18(5):309-324. doi: 10.1038/nri.2017.142. Epub 2018 Jan 22. PMID: 29379212.
43. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1182-90. doi: 10.1038/ni1275. PMID: 16369557.
44. Mandic M, Misirkic Marjanovic M, Vucicevic L, Jovanovic M, Bosnjak M, Perovic V, Ristic B, Ciric D, Harhaji-Trajkovic L, Trajkovic V. MAP kinase-dependent autophagy controls phorbol myristate acetate-induced macrophage differentiation of HL-60 leukemia cells. *Life Sci*. 2022 May 15;297:120481. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120481. Epub 2022 Mar 15. PMID: 35304128.
45. Saqib U, Sarkar S, Suk K, Mohammad O, Baig MS, Savai R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget*. 2018 Apr 3;9(25):17937-17950. doi: 10.18632/oncotarget.24788. PMID: 29707159; PMCID: PMC5915167.
46. Zhang JR, Lu F, Lu T, Dong WH, Li P, Liu N, Ma DX, Ji CY. Inactivation of FoxM1 transcription factor contributes to curcumin-induced inhibition of survival, angiogenesis, and chemosensitivity in acute myeloid leukemia cells. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Dec;92(12):1319-30. doi: 10.1007/s00109-014-1198-2. Epub 2014 Sep 3. PMID: 25179295.
47. Momtazi-Borojeni AA, Abdollahi E, Nikfar B, Chaichian S, Ekhlesi-Hundrieser M. Curcumin as a potential modulator of M1 and M2 macrophages: new insights in atherosclerosis therapy. *Heart Fail Rev*. 2019 May;24(3):399-409. doi: 10.1007/s10741-018-09764-z. PMID: 30673930.
48. Abdollahi E, Johnston TP, Ghaneifar Z, Vahedi P, Goleij P, Azhdari S, Moghaddam AS. Immunomodulatory Therapeutic Effects of Curcumin on M1 / M2 Macrophage polarization

- in Inflammatory Diseases. *Curr Mol Pharmacol*. 2022 Mar 24. doi: 10.2174/1874467215666220324114624. Epub ahead of print. PMID: 35331128.
49. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Schioppa T, Saccani A, Allavena P, Sica A. Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Novartis Found Symp*. 2004;256:137-45; discussion 146-8, 259-69. PMID: 15027487.
 50. van Dalen FJ, van Stevendaal MHME, Fennemann FL, Verdoes M, Ilina O. Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. *Molecules*. 2018 Dec 20;24(1):9. doi: 10.3390/molecules24010009. PMID: 30577495; PMCID: PMC6337345.
 51. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):315-22. doi: 10.1007/s10555-006-9001-7. PMID: 16967326.
 52. Luan B, Yoon YS, Le Lay J, Kaestner KH, Hedrick S, Montminy M. CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Dec 22;112(51):15642-7. doi: 10.1073/pnas.1519644112. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26644581; PMCID: PMC4697393.
 53. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, Nerlov C. A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 13;106(41):17475-80. doi: 10.1073/pnas.0908641106. Epub 2009 Sep 24. PMID: 19805133; PMCID: PMC2762675.
 54. Jiang H, Wei H, Wang H, Wang Z, Li J, Ou Y, Xiao X, Wang W, Chang A, Sun W, Zhao L, Yang S. Zeb1-induced metabolic reprogramming of glycolysis is essential for macrophage polarization in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2022 Mar 4;13(3):206. doi: 10.1038/s41419-022-04632-z. PMID: 35246504; PMCID: PMC8897397.

55. Nath N, Kashfi K. Tumor associated macrophages and 'NO'. *Biochem Pharmacol.* 2020 Jun;176:113899. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113899. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32145264.
56. Carter NS, Stamper BD, Elbarbry F, Nguyen V, Lopez S, Kawasaki Y, Poormohamadian R, Roberts SC. Natural Products That Target the Arginase in Leishmania Parasites Hold Therapeutic Promise. *Microorganisms.* 2021 Jan 28;9(2):267. doi: 10.3390/microorganisms9020267. PMID: 33525448; PMCID: PMC7911663.
57. Diskin C, Pålsson-McDermott EM. Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Front Immunol.* 2018 Feb 19;9:270. doi: 10.3389/fimmu.2018.00270. PMID: 29520272; PMCID: PMC5827535.
58. Steinauer N, Guo C, Zhang J. Emerging Roles of MTG16 in Cell-Fate Control of Hematopoietic Stem Cells and Cancer. *Stem Cells Int.* 2017;2017:6301385. doi: 10.1155/2017/6301385.
59. Engel ME, Nguyen HN, Mariotti J, Hunt A, Hiebert SW. Myeloid translocation gene 16 (MTG16) interacts with Notch transcription complex components to integrate Notch signaling in hematopoietic cell fate specification. *Mol Cell Biol.* 2010 Apr;30(7):1852-63. doi: 10.1128/MCB.01342-09.
60. Salaverria I, Akasaka T, Gesk S, Szczepanowski M, Burkhardt B, Harder L, Damm-Welk C, Oshlies I, Klapper W, Dyer MJ, Siebert R. The CBFA2T3/ACSF3 locus is recurrently involved in IGH chromosomal translocation t(14;16)(q32;q24) in pediatric B-cell lymphoma with germinal center phenotype. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012 Apr;51(4):338-43. doi: 10.1002/gcc.21919.PMID: 22420028.
61. Thirant C, Ignacimouttou C, Lopez CK, Diop M, Le Mouël L, Thiollier C, Siret A, Dessen P, Aid Z, Rivière J, Rameau P, Lefebvre C, Khaled M, Leverger G, Ballerini P, Petit A, Raslova H, Carmichael CL, Kile BT, Soler E, Crispino JD, Wichmann C, Pflumio F, Schwaller J,

- Vainchenker W, Lobry C, Droin N, Bernard OA, Malinge S, Mercher T. ETO2-GLIS2 Hijacks Transcriptional Complexes to Drive Cellular Identity and Self-Renewal in Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2017 Mar 13;31(3):452-465. doi: 10.1016/j.ccell.2017.02.006.
- Ulgen E, Ozisik O, Sezerman OU. pathfindR: An R Package for Comprehensive Identification of Enriched Pathways in Omics Data Through Active Subnetworks. *Front Genet*. 2019 Sep 25;10:858. doi: 10.3389/fgene.2019.00858. PMID: 31608109; PMCID: PMC6773876.
62. Steinauer N, Guo C, Zhang J. The transcriptional corepressor CBFA2T3 inhibits all-*trans*-retinoic acid-induced myeloid gene expression and differentiation in acute myeloid leukemia. *J Biol Chem*. 2020 Jul 3;295(27):8887-8900. doi: 10.1074/jbc.RA120.013042. Epub 2020 May 20. PMID: 32434928; PMCID: PMC7335779.
63. Gow CH, Guo C, Wang D, Hu Q, Zhang J. Differential involvement of E2A-corepressor interactions in distinct leukemogenic pathways. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(1):137-52. doi: 10.1093/nar/gkt855. Epub 2013 Sep 24. PMID: 24064250

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Le cancer est l'une des causes majeures de décès dans le monde. Actuellement, beaucoup de Recherches fondamentales et cliniques progressent afin de lutter contre cette maladie complexe par différentes façons thérapeutiques. Des recherches ont mentionné que les cellules tumorales interagissent avec les cellules immunitaires locales ou émergentes à tous les stades du développement tumoral (Mittal *et al.*, 2014). Il a été indiqué que la réponse immunitaire puisse d'une manière protéger l'hôte de la progression tumorale, ou encore favoriser la transformation maligne par le biais de l'inflammation chronique qui se définit comme une infiltration continue des leucocytes dans la tumeur (Coussens et Werb, 2002). Cette inflammation est observée dans la majorité des sites néoplasiques et causée partiellement par une forte présence des macrophages provenant des leucocytes appelés TAMs (Tumor-associated-macrophages) dans le microenvironnement tumoral. Les TAMs favorisent la croissance des tumeurs par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires acquérant ainsi un phénotype M1 (Mantovani *et al.*, 2004). D'un autre côté, leur acquisition d'un phénotype particulier pro-tumoral (M2) facilite l'angiogenèse et le remodelage tissulaire. Ces macrophages polarisés en type M2 sont les plus présents dans les tumeurs et constituent une source importante de facteurs angiogéniques (VEGF), des facteurs de croissances (FGF, EGF), des protéines qui dégradent la matrice extracellulaire (MMP-9), des cytokines immunosuppressives mais également possèdent une fonction cytotoxique réduite voir absente (Bingle *et al.*, 2002).

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une hémopathie hétérogène rare mais très agressive, qui se caractérise par une accumulation de blastes leucémiques immatures dans la moelle osseuse (Watts et Nimer, 2018). Bien que les progrès thérapeutiques réalisés ces dernières années qui visent à cibler les cellules en prolifération à l'aide des agents chimiothérapeutiques pour augmenter le taux de survie des personnes âgées souffrant de cette néoplasie, aucune amélioration significative n'a été aperçue dans plusieurs études, et le pronostic des sujets touchés de LAM reste toujours sombre

(Roboz *et al.*, 2014). Plusieurs preuves ont suggéré que les macrophages jouent un rôle crucial dans cette pathogenèse, en effet l'interaction entre les cellules leucémiques et les macrophages polarisés M2 favorise la pro-survie et active la signalisation anti-apoptotique dans ces dernières, ce qui empêchera l'amélioration de survie des patients (Miari *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2018). La forme la plus maligne de la LAM est la leucémie promyélocytaire aiguë se caractérisant par une translocation réciproque aboutissant à un transcrite du gène de fusion PML-RAR-alpha (Retinoic-acid-alpha). Cette oncoprotéine fusionnée bloque la différenciation myéloïde normale induisant une leucémie. Cependant les découvertes de Sachs et al., ont révélé que les cellules leucémiques pouvaient être incitées à se différencier. En effet, des études approfondies durant les dernières années ont fourni des informations importantes portant sur l'efficacité d'introduction de l'acide rétinoïque tout trans (ATRA), et du trioxyde d'arsenic (ATO) pour le traitement de la LPA en ciblant leur différenciation (Kulkarni et Mathews, 2021; Sanz *et al.*, 2019). ATRA cible le gène PML-RAR α en engendrant un changement conformationnel des transcrits de fusion PML-RAR α menant à une différenciation myéloïde terminale des cellules APL et finalement l'activation d'apoptose. Une synergie significative entre l'ATRA et l'ATO a été rapportée dans des études précliniques pour ce processus de différenciation et d'apoptose (Yilmaz *et al.*, 2021). Des cellules d'APL comme les HL-60 peuvent être amenées à se différencier grâce à des agents autres que l'ATRA et ATO. D'ailleurs, il a été rapporté que leur différenciation peut être induite par la 1,25-dihydroxy vitamine D₃, des esters de phorbol et récemment par un dérivé de La sécurinine, qui fait référence à un alcaloïde présent dans les feuilles des genres *Securinega*, *Phyllanthus* et *Flueggea* (Hou *et al.*, 2020).

Puisque le cancer prend de l'ampleur dans la société, il semble que la lutte contre cette maladie nécessitera une approche pluridisciplinaire toujours liée à la prévention, raison pour laquelle la compréhension des interactions entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses est nécessaire. L'inhibition des macrophages polarisés associés aux tumeurs et l'inflammation pourrait donc s'avérer être une stratégie très utile pour ralentir la progression tumorale (Li *et al.*, 2022). Ainsi, une bonne repolarisation des TAMs peut être considérée comme une approche antitumorale favorable (Gao *et al.*, 2022). Dans ce contexte, l'utilisation des substances aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires issus principalement de notre alimentation peut être une des

stratégies efficaces.

Dans le présent travail, nous suggérons que l'épigallocatechine-3-gallate, un polyphénol dérivé du thé vert reconnu pour ses propriétés anticancéreuses (Chen *et al.*, 2020) pourrait moduler le phénotype inflammatoire et immunosuppresseur lors de processus de différenciation des cellules leucémiques HL-60. Dans notre étude, nous avons utilisées des cellules promyéломonocytaires HL-60 qui représentent un excellent modèle de différenciation par leur capacité à se différencier en d'autres types cellulaires sous l'effet de certains agents chimiques comme il a été démontré auparavant dans plusieurs études ce qui nous a incité à les utiliser. Notre intérêt s'est focalisé sur l'utilisation d'un promoteur de tumeur le PMA pour induire la différenciation des cellules HL-60 en cellules de types *macrophage-like*. Nous avons pu constater que les cellules HL-60 en suspension traitées avec du PMA et incubées pendant 24 heures adhèrent au flacon de culture et perdent leur capacité de prolifération. Les cellules adhérentes différenciées sont effectivement de type macrophage, ce qui concorde avec les observations des études antérieures. Dans un autre temps, nous avons procédé à analyser l'impact qu'avait l'état de différenciation des HL-60 en macrophages adhérents médiée par le PMA sur la régulation de l'activité transcriptionnelle de l'expression génique de l'ensemble des gènes. Nous avons observé grâce à l'analyse transcriptomique que l'induction de la différenciation s'accompagne par une large dissimilitude de signature génique (figure 2.1.a). L'ensemble de ces données nous a confirmé que cette différenciation induit l'expression de plusieurs gènes acteurs dans certains processus dont l'inflammation, la différenciation, l'apoptose, la réponse immunitaire et la sénescence, parmi lesquels, on retrouve des cytokines, chimiokines et des facteurs de croissances (figure 2.1). En outre, Les résultats de la présente étude s'alignent bien avec les données rapportées dans d'autres études de la littérature qui ont pu illustrer le lien entre ce processus délicat de différenciation des HL-60 stimulée avec le PMA et le déclenchement de nombreuses voies pro-inflammatoires conduisant au phénotype macrophage adhérent et à son profil immunologique (Gatto *et al.*, 2017; Riddy *et al.*, 2018). D'autre part, nous avons observé que le traitement au PMA a entraîné une réduction de la prolifération cellulaire avec une répression du gène SKP2E2F lors de la différenciation (figure 2. 1.B et 1.C) en accord avec d'autres études qui ont noté que le PMA

diminue l'activité et l'expression d'E2F1 qui est un facteur de transcription critique impliqué dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, tels que la cycline A, la cycline E, *CDC2* (*CDK1*) et connu pour être impliqué dans la prolifération cellulaire (Cartee *et al.*, 2001; Cozzi *et al.*, 2006; Itsumi *et al.*, 2014). Parallèlement, dans ces mêmes cellules nous étions capables de vérifier l'effet de la différenciation des cellules HL-60 en macrophages sur un biomarqueur, MMP-9. La MMP-9 est l'une des métalloprotéases matricielles et une enzyme métastatique clé qui contribue à la dégradation et au remodelage de la MEC (Annabi *et al.*, 2007; Chokor *et al.*, 2014). La régulation à la hausse de son expression est corrélée à la progression tumorale, à l'invasion et aux métastases dans différentes études de divers cancers (Marecko *et al.*, 2014). On était en mesure de prouver une autre fois la très forte induction de l'expression génique et protéique de la MMP-9 dans les macrophages adhérents (figure 2.A et 2.B).

Compte tenu de ces résultats, il nous a semblé très pertinent de savoir quel était l'effet de l'EGCG tout au long du processus de différenciation. Il a été rapporté d'ailleurs que ce polyphénol prédominant dans le thé vert est l'un des éléments phytochimiques chimiopréventifs les plus étudiés (Khan *et al.*, 2014). Il peut bloquer plusieurs étapes de la cancérogenèse par modulation de différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'inflammation, l'apoptose et la métastase (Na et Surh, 2006). De ce fait, et afin d'explorer le rôle de l'EGCG, nous avons procédé à un co-traitement avec du PMA et des doses croissantes d'EGCG. Nous avons observé le potentiel de l'EGCG à réduire l'expression de la MMP-9 induite par le PMA (figure 2. 2.B). Similairement à nos résultats, une étude avait démontré que parmi quatre catéchines, l'EGCG et l'ECG entraînent une inhibition des activités de la MMP-9 dans le surnageant de culture de cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire (Sarkar *et al.*, 2016). Nous étions aussi capables de voir que l'EGCG avait la possibilité d'inverser le phénotype adhésif de nos cellules (figure 2. 2.C). Une étude précédente dans notre laboratoire avait confirmé que l'action du PMA en présence de l'EGCG n'affectait pas l'adhérence des cellules mais affectait par réduction leur phénotype CD11b+ acquis (Dao et Annabi, 2019). Ces résultats suggèrent que l'EGCG pourrait freiner le pouvoir invasif dans certains cancers par le contrôle de l'expression de la MMP-9 (Vézina *et al.*, 2012). Auparavant, l'effet inhibiteur de cette catéchine sur les niveaux d'expression des MMPs et principalement MMP-9 a été élucidé dans un certain nombre de lignées cellulaires cancéreuses (Roomi *et al.*, 2010).

De plus, l'EGCG a été qualifié d'inhibiteur de métastases des cancers de l'hypopharynx, de la prostate et du pancréas en régulant négativement les MMPs (Chen *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2008; Shankar *et al.*, 2008). Des recherches précédentes ont pu affirmer que la majorité des effets anticancéreux de l'EGCG sont observés dans un grand nombre de voies de signalisations permettant de bloquer la cancérogenèse, notamment en jouant un rôle dans la modulation des cascades de transduction de signaux à grande échelle de manière mécaniste notamment JAK/STAT, Wnt/ β -caténine, TGF/SMAD, SHH/GLI, VEGF/VEGFR et NOTCH (Farooqi *et al.*, 2020).

Dans le but de tenter l'identification du mode d'action de l'EGCG, nous avons commencé tout d'abord par explorer les voies de signalisations activées lors de la stimulation par le PMA. D'après nos résultats obtenus, nous avons remarqué que le PMA a déclenché dans les cellules différenciées une cascade de signalisation d'ERK1/2, GSK 3 α/β , MSK1/2, RSK 1/2/3 et CREB (figure 2. 3.A et 3.B) Dans d'autres études le PMA induisait l'activation d'ERK dans les macrophages et dans les cellules endothéliales (Chokor *et al.*, 2014; Verin *et al.*, 2000). De façon similaire, une étude récente a rapporté des résultats avec l'induction que nous avons obtenue pour la voie PKC-MAPK-CREB, sur des cellules gliales humaines (Davis *et al.*, 2018). En ce qui concerne l'effet de l'EGCG sur ces voies, nous avons observé dans les cellules co-traitées que l'EGCG provoque une baisse significative de ces phosphorylations avec une préférence et un profil d'inhibition significatif sur la phosphorylation des voies ERK, GSK, MSK et RSK (figure 2. 2.B et 2.C). Contrairement à cela, nous n'avons pas constaté une forte inhibition de phosphorylation CREB par l'EGCG (figure 2. 2.C). Dans les macrophages, l'EGCG était capable de réduire les propriétés de prolifération et de souches (figure 2. 4) ce qui concorde avec les observations d'une étude précédente, qui démontre l'activité préventive, anticancéreuse de l'EGCG par son inhibition d'expression des gènes marqueurs de la souche et l'auto-renouvellement dans les cellules souches cancéreuses humaines (CSC) (Namiki *et al.*, 2020). De nos expérimentations nous avons également constaté que l'EGCG réduit de 40 à 80 % l'induction de l'expression de la plupart des gènes liés à l'inflammation et libérées par nos cellules, et de plus de 50% ceux de différenciation, tout en augmentant l'apoptose (figure 2. 4.B). Nous avons pu clairement démontrer la capacité de l'EGCG à empêcher l'acquisition d'un phénotype immunosuppresseur et inflammatoire lié à l'état de différenciation des

cellules HL-60 par une variation de mécanismes anti-inflammatoires, d'induction d'apoptose ou encore d'inhibition des voies de kinases. Ces résultats nous permettent de conclure que l'EGCG empêche les TAMs à acquérir le phénotype M1 par inhibition de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et bloque ainsi l'acquisition de phénotype pro-tumoral M2 responsable de la commodité de l'angiogenèse et le remodelage tissulaire. Les résultats de notre travail corrélerent et confirment les travaux antérieurs qui englobent les activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses de l'EGCG par inhibition de plusieurs événements de transduction de signaux faisant de l'EGCG une molécule naturelle chimiopréventive (Cheng *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2022).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La compréhension des mécanismes par lesquels les cellules immunitaires, en particulier les macrophages, favorisent la formation des tumeurs, et le rôle des voies de signalisation qui contribuent au phénotype pro-tumorigène des macrophages pose des défis pour la recherche clinique et fondamentale. Nos travaux de recherche ont participé à la mise en évidence d'une cible moléculaire de certains phénotypes des cellules immunitaires qui s'avère efficace dans la prévention des cancers. Dans notre étude, nous avons choisi le composant majeur des catéchines du thé vert, l'EGCG comme agent nutraceutique grâce à ces effets bénéfiques bien documentés dans l'inhibition de plusieurs événements dans la cancérogenèse permettant sa prévention. Nos découvertes soulèvent que l'EGCG inhibe certaines caractéristiques associées à l'invasion tumorale dans notre modèle de différenciation cellulaire HL-60. Cette inhibition est multiforme, en raison d'un certain nombre de propriétés, telles que des propriétés anticancéreuses, anti-inflammatoires et antiprolifératives. Nos résultats ont démontré que l'EGCG joue un rôle très important étant donné son implication dans l'inhibition d'acquisition d'un caractère invasif. De plus, l'EGCG à travers son renversement de plusieurs événements moléculaires dans les « macrophages-like » issues de la différenciation des HL-60 par le PMA empêchera l'acquisition des phénotypes inflammatoires et immunosuppresseurs. De ce fait, il peut entraîner une diminution de certains marqueurs de polarisation ou une repolarisation incomplète d'un des phénotype M1 ou M2. Ces résultats soutiennent les diverses propriétés de l'EGCG et l'importance cruciale de l'utilisation des composés phytochimiques dont la plus grande majorité provient naturellement de notre alimentation afin de promouvoir l'apparition des cancers.

En perspective, et puisque la catéchine principale du thé vert, l'EGCG exerce plusieurs propriétés chimio-préventives régulant surtout les phénotypes invasifs dans les cellules leucémiques promyélocyaires aigues différenciées, il serait pertinent de tester d'autres catéchines portant le groupement gallate autre que l'EGCG afin de confirmer leur implication dans l'inhibition des événements de transduction des signaux lors de processus de différenciation des cellules HL-60. D'autre part, et dans le but de mieux définir la cascade de signalisation lié au renversement du

phénotype invasif, il serait très intéressant d'effectuer une comparaison d'effet de l'EGCG à des inhibiteurs pharmacologiques connues pour leur empêchement de certaines voies de signalisation surtout celles des MAPK. Par ailleurs, et comme nous étions capables de déterminer la signature moléculaire acquise lors de la différenciation des HL-60. Une analyse par cytométrie en flux pour mieux définir le modèle de polarisation M1 ou M2 à qui nos cellules correspondent est nécessaire. Finalement, de même que plusieurs études ont mentionné que l'activation de l'EGCG requiert la présence de son récepteur à laminine 67LR, il serait envisageable d'étudier les niveaux d'expression du récepteur à l'EGCG lors de la différenciation cellulaire des HL-60.

BIBLIOGRAPHIE

- Aleem E et Arceci RJ (2015) Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front Cell Dev Biol* 3: 16.
- Annabi B, Currie JC, Moghrabi A et Béliveau R (2007) Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG. *Leuk Res* 31: 1277-1284.
- Asif M, Hussain A, Wali A, Ahmed N, Ali I, Iqbal Z, Amir M, Shafiq M et Rasool M (2021) Molecular, Cytogenetic, and Hematological Analysis of Chronic Myeloid Leukemia Patients and Discovery of Two Novel Translocations. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2021: 4909012.
- Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R et Stach K (2022) MMP9: A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer. *Cancers (Basel)* 14:
- Bartlett JD et Smith CE (2013) Modulation of cell-cell junctional complexes by matrix metalloproteinases. *J Dent Res* 92: 10-17.
- Bassiouni W, Ali MAM et Schulz R (2021) Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *The FEBS Journal* 288: 7162-7182.
- Bastaki SMA, Ojha S, Kalasz H et Adeghate E (2021) Chemical constituents and medicinal properties of Allium species. *Mol Cell Biochem* 476: 4301-4321.
- Bingle L, Brown NJ et Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196: 254-265.
- Birnie GD (1988) The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl* 9: 41-45.
- Bond M, Chase AJ, Baker AH et Newby AC (2001) Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 50: 556-565.
- Botten D, Fugallo G, Fraternali F et Molteni C (2015) Structural Properties of Green Tea Catechins. *J Phys Chem B* 119: 12860-12867.

- Boulmouk Y, Belguidoum K, Meddour F et Amira-Guebailia H (2021) Investigation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate and epicatechin as compared to resveratrol and ascorbic acid: experimental and theoretical insights. *Structural Chemistry* 32:
- Boutillier AJ et ElSawa SF (2021) Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 22:
- Breitman TR, Selonick SE et Collins SJ (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2936-2940.
- Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž et Bren U (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* 21:
- Bruschi F et Pinto B (2013) The significance of matrix metalloproteinases in parasitic infections involving the central nervous system. *Pathogens* 2: 105-129.
- Cao S-Y, Li Y, Meng X, Zhao C, Li S, Gan R-Y et Li H-B (2018) Dietary natural products and lung cancer: Effects and mechanisms of action. *Journal of Functional Foods* 52: 316-331.
- Cartee L, Wang Z, Decker RH, Chellappan SP, Fusaro G, Hirsch KG, Sankala HM, Dent P et Grant S (2001) The cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) flavopiridol disrupts phorbol 12-myristate 13-acetate-induced differentiation and CDKI expression while enhancing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cancer Research* 61: 2583-2591.
- Chambers AF et Matrisian LM (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-1270.
- Chatterjee P, Chandra S, Dey P et Bhattacharya S (2012) Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative in vitro study. *J Adv Pharm Technol Res* 3: 136-138.
- Chen B-H, Hsieh C-H, Tsai S-Y, Wang C-Y et Wang C-C (2020) Anticancer effects of epigallocatechin-3-gallate nanoemulsion on lung cancer cells through the activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Scientific Reports* 10: 5163.
- Chen L, Mo H, Zhao L, Gao W, Wang S, Cromie MM, Lu C, Wang JS et Shen CL (2017) Therapeutic properties of green tea against environmental insults. *J Nutr Biochem* 40: 1-13.
- Chen SJ, Yao XD, Peng BO, Xu YF, Wang GC, Huang J, Liu M et Zheng JH (2016) Epigallocatechin-3-gallate inhibits migration and invasion of human renal carcinoma cells by downregulating matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Exp Ther Med* 11: 1243-1248.

- Cheng Z, Zhang Z, Han Y, Wang J, Wang Y, Chen X, Shao Y, Cheng Y, Zhou W, Lu X, et al. (2020) A review on anti-cancer effect of green tea catechins. *Journal of Functional Foods* 74: 104172.
- Chokor R, Lamy S et Annabi B (2014) Transcriptional targeting of sphingosine-1-phosphate receptor S1P2 by epigallocatechin-3-gallate prevents sphingosine-1-phosphate-mediated signaling in macrophage-differentiated HL-60 promyelomonocytic leukemia cells. *Onco Targets Ther* 7: 667-677.
- Collins SJ (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70: 1233-1244.
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE et Gallo RC (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 2458-2462.
- Commins SP, Borish L et Steinke JW (2010) Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 125: S53-72.
- Cooper R (2012) Green tea and theanine: health benefits. *Int J Food Sci Nutr* 63 Suppl 1: 90-97.
- Coussens LM et Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867.
- Cozzi SJ, Parsons PG, Ogbourne SM, Pedley J et Boyle GM (2006) Induction of senescence in diterpene ester-treated melanoma cells via protein kinase C-dependent hyperactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Research* 66: 10083-10091.
- Crusz SM et Balkwill FR (2015) Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol* 12: 584-596.
- Cui N, Hu M et Khalil RA (2017) Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 147: 1-73.
- Dao T et Annabi B (2019) Impact of diet-derived polyphenol EGCG on neurotensin response upon HL-60 promyelocytic leukemia cells acquisition of a macrophage-like phenotype. *The FASEB Journal* 33: lb96-lb96.
- Dasariraju S, Huo M et McCalla S (2020) Detection and Classification of Immature Leukocytes for Diagnosis of Acute Myeloid Leukemia Using Random Forest Algorithm. *Bioengineering* 7: 120.

- Davis JB, Calvert V, Roberts S, Bracero S, Petricoin E et Couch R (2018) Induction of nerve growth factor by phorbol 12-myristate 13-acetate is dependent upon the mitogen activated protein kinase pathway. *Heliyon* 4: e00617.
- Deltour S, Chopin V et Leprince D (2005) [Epigenetics and cancer]. *Med Sci (Paris)* 21: 405-411.
- Deryugina EI et Quigley JP (2010) Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta* 1803: 103-120.
- DiScipio RG, Schraufstatter IU, Sikora L, Zuraw BL et Sriramarao P (2006) C5a mediates secretion and activation of matrix metalloproteinase 9 from human eosinophils and neutrophils. *Int Immunopharmacol* 6: 1109-1118.
- Doumbia M, Uwingabiye J, Bissan A, Rachid R, Benkirane S et Masrar A (2016) [Epidemiological, clinical, cytologic and immunophenotypic aspects of acute leukemia in children: the experience at the hematology laboratory of IBN SINA University Hospital Center]. *Pan Afr Med J* 23: 258.
- Dufour A, Sampson NS, Zucker S et Cao J (2008) Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. *J Cell Physiol* 217: 643-651.
- Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, Novellino E et Santini A (2019) Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res* 33: 2221-2243.
- Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE et Rimbach G (2012) Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl* 51: 5308-5332.
- Ezeamuzie CI et Taslim N (2004) Protein kinase C activation inhibits eosinophil degranulation through stimulation of intracellular cAMP production. *Br J Pharmacol* 143: 725-732.
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Couraud PO, Romero I, Weksler B, de Freitas V, Mateus N et Calhau C (2011) Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food Funct* 2: 39-44.
- Farooqi AA, Pinheiro M, Granja A, Farabegoli F, Reis S, Attar R, Sabitaliyevich UY, Xu B et Ahmad A (2020) EGCG Mediated Targeting of Deregulated Signaling Pathways and Non-Coding RNAs in Different Cancers: Focus on JAK/STAT, Wnt/ β -Catenin, TGF/SMAD, NOTCH, SHH/GLI, and TRAIL Mediated Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* 12:

- Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, Marino M, Martinez-Chantar ML, Nawroth R, Sanchez-Garcia I, et al. (2015) Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 35 Suppl: S25-s54.
- Fleck RA, Romero-Steiner S et Nahm MH (2005) Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 19-27.
- Frémin C, Saba-El-Leil MK, Lévesque K, Ang SL et Meloche S (2015) Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell Rep* 12: 913-921.
- Fu QY, Li QS, Lin XM, Qiao RY, Yang R, Li XM, Dong ZB, Xiang LP, Zheng XQ, Lu JL, et al. (2017) Antidiabetic Effects of Tea. *Molecules* 22:
- Galan JA, Geraghty KM, Lavoie G, Kanshin E, Tcherkezian J, Calabrese V, Jeschke GR, Turk BE, Ballif BA, Blenis J, et al. (2014) Phosphoproteomic analysis identifies the tumor suppressor PDCD4 as a RSK substrate negatively regulated by 14-3-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2918-2927.
- Gao J, Liang Y et Wang L (2022) Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 13: 888713.
- Gatto F, Cagliani R, Catelani T, Guarnieri D, Moglianetti M, Pompa PP et Bardi G (2017) PMA-Induced THP-1 Macrophage Differentiation is Not Impaired by Citrate-Coated Platinum Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)* 7:
- Gialeli C, Theocharis AD et Karamanos NK (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *Febs j* 278: 16-27.
- Gluzman DF, Sklyarenko LM, Zavelevich MP, Koval SV et Ivanovskaya TS (2015) Leukemic blast cells and controversies in models of hematopoiesis. *Exp Oncol* 37: 2-4.
- Gorter RP et Baron W (2020) Matrix metalloproteinases shape the oligodendrocyte (niche) during development and upon demyelination. *Neurosci Lett* 729: 134980.
- Granatowicz A, Piatek CI, Moschiano E, El-Hemaidi I, Armitage JD et Akhtari M (2015) An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians. *Korean J Fam Med* 36: 197-202.
- Graux C (2011) Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 44 2: 183-189.

- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, et al. (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111: 5446-5456.
- Han YP, Yan C, Zhou L, Qin L et Tsukamoto H (2007) A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem* 282: 12928-12939.
- Hanahan D et Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hao T, Li-Talley M, Buck A et Chen W (2019) An emerging trend of rapid increase of leukemia but not all cancers in the aging population in the United States. *Scientific Reports* 9: 12070.
- Harjoko A, Ratnaningsih T, Suryani E, Wiharto W, Palgunadi S et Prakisyana N (2018) Classification of acute myeloid leukemia subtypes M1, M2 and M3 using active contour without edge segmentation and momentum backpropagation artificial neural network. *MATEC Web of Conferences* 154: 01041.
- Hauge C et Frödin M (2006) RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119: 3021-3023.
- Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queisser W, Löffler H, Hochhaus A, Heinze B, et al. (1994) Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 84: 4064-4077.
- Hendrich S, Glauert HP et Pitot HC (1986) The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital. *Carcinogenesis* 7: 2041-2045.
- Hou W, Wang ZY, Lin J et Chen WM (2020) Induction of differentiation of the acute myeloid leukemia cell line (HL-60) by a securinine dimer. *Cell Death Discov* 6: 123.
- Hrabec E, Naduk J, Strek M et Hrabec Z (2007) [Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates--intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors]. *Postepy Biochem* 53: 37-45.
- Hsieh YC, Kirschner K et Copland M (2021) Improving outcomes in chronic myeloid leukemia through harnessing the immunological landscape. *Leukemia* 35: 1229-1242.
- Huang H (2018) Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)* 18:

- Huang HC, Tao MH, Hung TM, Chen JC, Lin ZJ et Huang C (2014) (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Antiviral Res* 111: 100-111.
- Hussain S et Ashafaq M (2018) Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications in cervical cancer. *J Cancer Prev Curr Res* 9: 178-182.
- Hwang YS, Park KK et Chung WY (2013) Epigallocatechin-3 gallate inhibits cancer invasion by repressing functional invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol* 715: 286-295.
- Itsumi M, Shiota M, Yokomizo A, Takeuchi A, Kashiwagi E, Dejima T, Inokuchi J, Tatsugami K, Uchiumi T et Naito S (2014) PMA induces androgen receptor downregulation and cellular apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 53: 31-41.
- Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M et Rosochacki S (2016) Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem* 31: 177-183.
- Jiang S, Huang C, Zheng G, Yi W, Wu B, Tang J, Liu X, Huang B, Wu D, Yan T, et al. (2022) EGCG Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis Through Downregulation of SIRT1 in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Front Nutr* 9: 851972.
- Jiang Y et Fleet JC (2012) Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate activated signaling pathways on 1α , 25 dihydroxyvitamin D3 regulated human 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase gene expression in differentiated Caco-2 cells. *J Cell Biochem* 113: 1599-1607.
- Jiang Y, Jiang Z, Ma L et Huang Q (2021) Advances in Nanodelivery of Green Tea Catechins to Enhance the Anticancer Activity. *Molecules* 26:
- Jimenez F, Quinones MP, Martinez HG, Estrada CA, Clark K, Garavito E, Ibarra J, Melby PC et Ahuja SS (2010) CCR2 plays a critical role in dendritic cell maturation: possible role of CCL2 and NF-kappa B. *J Immunol* 184: 5571-5581.
- Jung YD, Kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W, Bucana CD, Gallick GE et Ellis LM (2001) EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer* 84: 844-850.
- Kantarjian H et Jabbour E (2018) Incorporating Immunotherapy Into the Treatment Strategies of B-Cell Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Blinatumomab and Inotuzumab Ozogamicin. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 574-578.

- Kessenbrock K, Plaks V et Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52-67.
- Khan N, Bharali DJ, Adhami VM, Siddiqui IA, Cui H, Shabana SM, Mousa SA et Mukhtar H (2014) Oral administration of naturally occurring chitosan-based nanoformulated green tea polyphenol EGCG effectively inhibits prostate cancer cell growth in a xenograft model. *Carcinogenesis* 35: 415-423.
- Khandelwal PJ, Herman AM et Moussa CE (2011) Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol* 238: 1-11.
- Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, O'Brien S, Gribben J et Rai K (2017) Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* 3: 16096.
- Koh YW, Choi EC, Kang SU, Hwang HS, Lee MH, Pyun J, Park R, Lee Y et Kim CH (2011) Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits HGF-induced progression in oral cavity cancer through suppression of HGF/c-Met. *J Nutr Biochem* 22: 1074-1083.
- Kulkarni U et Mathews V (2021) Evolving Chemotherapy Free Regimens for Acute Promyelocytic Leukemia. *Front Oncol* 11: 621566.
- Laronha H et Caldeira J (2020) Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* 9: 1-14.
- Li M, He L, Zhu J, Zhang P et Liang S (2022) Targeting tumor-associated macrophages for cancer treatment. *Cell & Bioscience* 12: 85.
- Liang YC, Lin-shiau SY, Chen CF et Lin JK (1997) Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J Cell Biochem* 67: 55-65.
- Lim YC, Park HY, Hwang HS, Kang SU, Pyun JH, Lee MH, Choi EC et Kim CH (2008) (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits HGF-induced invasion and metastasis in hypopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* 271: 140-152.
- Liu S, Lu H, Zhao Q, He Y, Niu J, Debnath AK, Wu S et Jiang S (2005) Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1723: 270-281.
- Liu S, Wang XJ, Liu Y et Cui YF (2013) PI3K/AKT/mTOR signaling is involved in (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Am J Chin Med* 41: 629-642.

- Liu W, Kovacevic Z, Peng Z, Jin R, Wang P, Yue F, Zheng M, Huang ML, Jansson PJ, Richardson V, et al. (2015) The molecular effect of metastasis suppressors on Src signaling and tumorigenesis: new therapeutic targets. *Oncotarget* 6: 35522-35541.
- Loeb LA, Loeb KR et Anderson JP (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 776-781.
- Losada Echeberria M, Herranz Lopez M, Micol V et Barrajón-Catalán E (2017) Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. *Antioxidants* 6: 88.
- Lutgendorf SK et Sood AK (2011) Biobehavioral factors and cancer progression: physiological pathways and mechanisms. *Psychosom Med* 73: 724-730.
- Mack M (2018) Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol* 68-69: 106-121.
- Manicone AM et McGuire JK (2008) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 19: 34-41.
- Mannello F, Tonti G et Papa S (2005) Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 5: 285-298.
- Mantovani A, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M et Sica A (2004) Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol* 14: 155-160.
- Marecko I, Cvejic D, Selemetjev S, Paskas S, Tatic S, Paunovic I et Savin S (2014) Enhanced activation of matrix metalloproteinase-9 correlates with the degree of papillary thyroid carcinoma infiltration. *Croat Med J* 55: 128-137.
- Marofi F, Rahman HS, Al-Obaidi ZMJ, Jalil AT, Abdelbasset WK, Suksatan W, Dorofeev AE, Shomali N, Chartrand MS, Pathak Y, et al. (2021) Novel CAR T therapy is a ray of hope in the treatment of seriously ill AML patients. *Stem Cell Res Ther* 12: 465.
- McCarthy DM, San Miguel JF, Freake HC, Green PM, Zola H, Catovsky D et Goldman JM (1983) 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation of human promyelocytic leukaemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells. *Leuk Res* 7: 51-55.
- McKay DL et Blumberg JB (2002) The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr* 21: 1-13.

- Menten P, Wuyts A et Van Damme J (2002) Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 455-481.
- Miari KE, Guzman ML, Wheadon H et Williams MTS (2021) Macrophages in Acute Myeloid Leukaemia: Significant Players in Therapy Resistance and Patient Outcomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9:
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD et Smyth MJ (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27: 16-25.
- Musial C, Kuban-Jankowska A et Gorska-Ponikowska M (2020) Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *Int J Mol Sci* 21:
- Na HK et Surh YJ (2006) Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Mol Nutr Food Res* 50: 152-159.
- Nagase H, Visse R et Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562-573.
- Naghavi M AA, Abbafati C, et al (2017) Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390: 1151-1210.
- Namiki K, Wongsirisin P, Yokoyama S, Sato M, Rawangkan A, Sakai R, Iida K et Suganuma M (2020) (-)-Epigallocatechin gallate inhibits stemness and tumorigenicity stimulated by AXL receptor tyrosine kinase in human lung cancer cells. *Scientific Reports* 10: 2444.
- Nathan C et Ding A (2010) Nonresolving inflammation. *Cell* 140: 871-882.
- Newburger PE, Chovaniec ME, Greenberger JS et Cohen HJ (1979) Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. *J Cell Biol* 82: 315-322.
- Niland S, Riscanevo AX et Eble JA (2021) Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Int J Mol Sci* 23:
- Nookabkaew S, Rangkadilok N et Satayavivad J (2006) Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. *J Agric Food Chem* 54: 6939-6944.
- Nourshargh S et Alon R (2014) Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41: 694-707.

- Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ et Leiferman KM (1997) Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 519-528.
- Okazaki I, Arai M, Wada N et Maruyama K (1993) [Gene expression of MMPs and TIMPs in the process of hepatic fibrosis]. *Nihon Rinsho* 51: 428-434.
- Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz PL et Lopes C (2007) Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc* 79: 593-616.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P et Van Damme J (2001) Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 69: 851-859.
- Owen C, Gerrie AS, Banerji V, Assouline S, Chen C, Robinson KS, Lye E et Fraser G (2018) Canadian evidence-based guideline for the first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Oncol* 25: e461-e474.
- Page-McCaw A, Ewald AJ et Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 221-233.
- Piechocka J, Gramza-Michałowska A et Szymandera-Buszka K (2021) The Changes in Antioxidant Activity of Selected Flavonoids and Caffeine Depending on the Dosage and Form of Thiamine. *Molecules* 26:
- Piotrowski I, Kulcenty K et Suchorska W (2020) Interplay between inflammation and cancer. *Rep Pract Oncol Radiother* 25: 422-427.
- Prasanth MI, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C et Tencomnao T (2019) A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Antiphotodaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy. *Nutrients* 11:
- Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, Ramírez-Camacho MA et Alvarez-Sánchez ME (2019) Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol* 9: 1370.
- Rahman SU, Huang Y, Zhu L, Chu X, Junejo SA, Zhang Y, Khan IM, Li Y, Feng S, Wu J, et al. (2020) Tea polyphenols attenuate liver inflammation by modulating obesity-related genes and down-regulating COX-2 and iNOS expression in high fat-fed dogs. *BMC Vet Res* 16: 234.

- Rai N, Anand J, Kumar N et Gautam P (2012) Green tea: A magical herb with miraculous outcomes. *International Research Journal Of Pharmacy* 3: 139-148.
- Riddy DM, Goy E, Delerive P, Summers RJ, Sexton PM et Langmead CJ (2018) Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. *PLoS One* 13: e0197177.
- Roboz GJ, Rosenblat T, Arellano M, Gobbi M, Altman JK, Montesinos P, O'Connell C, Solomon SR, Pigneux A, Vey N, et al. (2014) International randomized phase III study of elacytarabine versus investigator choice in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 32: 1919-1926.
- Roderfeld M, Graf J, Giese B, Salguero-Palacios R, Tschuschner A, Müller-Newen G et Roeb E (2007) Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol Chem* 388: 1227-1234.
- Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M et Niedzwiecki A (2010) Comparative effects of EGCG, green tea and a nutrient mixture on the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines. *Oncol Rep* 24: 747-757.
- Roupakia E, Markopoulos GS et Kolettas E (2018) IL-12-mediated transcriptional regulation of matrix metalloproteinases. *Biosci Rep* 38:
- Rowley JD (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293.
- Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, Estey EH, Löwenberg B, Naoe T, Lengfelder E, Döhner H, Burnett AK, Chen SJ, et al. (2019) Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood* 133: 1630-1643.
- Sarkar J, Nandy SK, Chowdhury A, Chakraborti T et Chakraborti S (2016) Inhibition of MMP-9 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking analysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84: 340-347.
- Scarfò L, Ferreri AJ et Ghia P (2016) Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 104: 169-182.
- Serhan CN, Ward, P.A. and Gilroy, D.W (2010) Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press, Cambridge* .
- Shankar S, Ganapathy S, Hingorani SR et Srivastava RK (2008) EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Front Biosci* 13: 440-452.

- Shiomi T, Lemaître V, D'Armiento J et Okada Y (2010) Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int* 60: 477-496.
- Siegel RL, Miller KD et Jemal A (2015) Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65: 5-29.
- Singh BN, Shankar S et Srivastava RK (2011) Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 82: 1807-1821.
- Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, Haddad MA et Al-Hiary M (2019) Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *J AOAC Int* 102: 1397-1400.
- Smith MA, Gurney JG et Ries LAG (1975) Cancer among adolescents 15–19 years old. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1995*: 157-164.
- Sokolova S, Lamy C, Peixoto J et Lepoivre M (2017) [The loss of SCRIB ignites the macrophages]. *Med Sci (Paris)* 33: 849-851.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM et Chilvers ER (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31: 318-324.
- Suryani E, Wiharto, Palgunadi S et Nurcahya Pradana T (2017) *Classification of Acute Myelogenous Leukemia (AML M2 and AML M3) using Momentum Back Propagation from Watershed Distance Transform Segmented Images*.
- Tallei TE, Fatimawali, Niode NJ, Idroes R, Zidan B, Mitra S, Celik I, Nainu F, Ağagündüz D, Emran TB, et al. (2021) A Comprehensive Review of the Potential Use of Green Tea Polyphenols in the Management of COVID-19. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021: 7170736.
- Tapas DA, Sakarkar DM et Kakde R (2008) Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research (ISSN: 1596-5996) Vol 7 Num 3*.
- Terwilliger T et Abdul-Hay M (2017) Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 7: e577.
- Thakur VS, Gupta K et Gupta S (2012) Green tea polyphenols increase p53 transcriptional activity and acetylation by suppressing class I histone deacetylases. *Int J Oncol* 41: 353-361.

- Tubiana M (2008) Généralités sur la cancérogenèse☆☆Ce texte est très largement inspiré par l'appendice sur la cancérogenèse rédigé par R. Monier et moi-même pour le rapport sur les causes du cancer en France. L'auteur remercie beaucoup R. Monier pour les nombreuses et fructueuses discussions qu'il a eues avec lui. *Comptes Rendus Biologies* 331: 114-125.
- Umeda D, Yano S, Yamada K et Tachibana H (2008) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem* 283: 3050-3058.
- Umezawa S, Higurashi T, Komiya Y, Arimoto J, Horita N, Kaneko T, Iwasaki M, Nakagama H et Nakajima A (2019) Chemoprevention of colorectal cancer: Past, present, and future. *Cancer Sci* 110: 3018-3026.
- Vakiti A et Mewawalla P (2022) Acute Myeloid Leukemia. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC. Treasure Island (FL).
- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA et Opdenakker G (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 375-536.
- Vandooren J, Van den Steen PE et Opdenakker G (2013) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48: 222-272.
- Verin AD, Liu F, Bogatcheva N, Borbiev T, Hershenson MB, Wang P et Garcia JGN (2000) Role of Ras-dependent ERK activation in phorbol ester-induced endothelial cell barrier dysfunction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279: L360-L370.
- Vézina A, Chokor R et Annabi B (2012) EGCG targeting efficacy of NF- κ B downstream gene products is dictated by the monocytic/macrophagic differentiation status of promyelocytic leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother* 61: 2321-2331.
- Visse R et Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839.
- Walczak K, Marciniak S et Rajtar G (2017) Cancer chemoprevention - selected molecular mechanisms. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 71: 149-161.
- Wan MLY, Co VA et El-Nezami H (2021) Dietary polyphenol impact on gut health and microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61: 690-711.

- Wang D (2006) Founding Family Ownership and Earnings Quality. *Journal of Accounting Research* 44: 619-656.
- Wang X et Khalil RA (2018) Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol* 81: 241-330.
- Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM et Wang XD (2010) Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer* 126: 1788-1796.
- Wang YQ, Li QS, Zheng XQ, Lu JL et Liang YR (2021) Antiviral Effects of Green Tea EGCG and Its Potential Application against COVID-19. *Molecules* 26.
- Watts J et Nimer S (2018) Recent advances in the understanding and treatment of acute myeloid leukemia. *F1000Res* 7.
- Weinberg RA (2007) The Biology of Cancer. *Garland Science*.
- Wick RR, Nekolla EA, Gaubitz M et Schulte TL (2008) Increased risk of myeloid leukaemia in patients with ankylosing spondylitis following treatment with radium-224. *Rheumatology (Oxford)* 47: 855-859.
- Wu Q, Li Z, Lu X, Song J, Wang H, Liu D, Guo D et Bi H (2021) Epigallocatechin gallate protects the human lens epithelial cell survival against UVB irradiation through AIF/endo G signalling pathways in vitro. *Cutan Ocul Toxicol* 40: 187-197.
- Wu R, Wang L, Yin R, Hudlikar R, Li S, Kuo HD, Peter R, Sargsyan D, Guo Y, Liu X, et al. (2020) Epigenetics/epigenomics and prevention by curcumin of early stages of inflammatory-driven colon cancer. *Mol Carcinog* 59: 227-236.
- Xia Y, Lian S, Khoi PN, Yoon HJ, Joo YE, Chay KO, Kim KK et Do Jung Y (2015) Chrysin inhibits tumor promoter-induced MMP-9 expression by blocking AP-1 via suppression of ERK and JNK pathways in gastric cancer cells. *PLoS One* 10: e0124007.
- Yadav SS, Mandal RK, Singh MK, Usman K et Khattri S (2014) Genetic variants of matrix metalloproteinase (MMP2) gene influence metabolic syndrome susceptibility. *Genet Test Mol Biomarkers* 18: 88-92.
- Yang X, Feng W, Wang R, Yang F, Wang L, Chen S, Ru Y, Cheng T et Zheng G (2018) Repolarizing heterogeneous leukemia-associated macrophages with more M1 characteristics eliminates their pro-leukemic effects. *Oncoimmunology* 7: e1412910.

Yarbro C, D. Wujcik, and B. Holmes-Gobel (2011) *Cancer Nursing: Principles and Practice*.

Yilmaz M, Kantarjian H et Ravandi F (2021) Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. *Blood Cancer Journal 11*: 123.

Yilmaz Y (2006) Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology 17*: 64-71.

Zhao T, Li C, Wang S et Song X (2022) Green Tea (*Camellia sinensis*): A Review of Its Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology. *Molecules 27*.

Zhao Y, Yang LF, Ye M, Gu HH et Cao Y (2004) Induction of apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via mitochondrial signal transduction pathway. *Prev Med 39*: 1172-1179.

Zhou L, Yan C, Gieling RG, Kida Y, Garner W, Li W et Han Y-P (2009) Tumor necrosis factor-alpha induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated Kinase-1. *BMC Immunology 10*: 15.

Zhou Y, Li Y, Zhou T, Zheng J, Li S et Li HB (2016) Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. *Nutrients 8*: 156.

Zhou Y, Zhuang W, Hu W, Liu GJ, Wu TX et Wu XT (2011) Consumption of large amounts of Allium vegetables reduces risk for gastric cancer in a meta-analysis. *Gastroenterology 141*: 80-89.