

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

UN RÔLE POUR LA VOIE JAK2/STAT3 DANS LE MIMÉTISME VASCULOGÉNIQUE DES CELLULES
SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES ADIPOCYTAIRES HUMAINES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

CAROLANE VEILLEUX

JUIN 2025

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.12-2023). 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

Ce mémoire est le point final à mon retour aux études, un projet qui a demandé beaucoup de sacrifices, mais qui en valait la peine. Tout ceci n'aurait jamais été possible sans le soutien financier du Conseil de recherches en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG) et du Fonds de recherches du Québec (FRQ), mais c'est le support des gens autour de moi qui a su faire la vraie différence dans ma réussite.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Professeur Borhane Annabi. Merci d'avoir cru en mon potentiel et de m'avoir offert une place dans votre laboratoire. Ensemble, nous avons su mener de front plusieurs projets passionnants dont je suis fière.

Un énorme merci à tous les scientifiques du laboratoire Annabi que j'ai eu la chance de côtoyer : À Marie-Ève Roy, une amie et mentor exceptionnelle; Au Dre Emmanuelle Boscher, qui, en plus de son amitié, m'a offert son soutien technique et moral; À Alain Zgheib, un véritable modèle de diligence et de rigueur; Au Dr Naoufal Akla, pour son énergie débordante et ses conseils; Au Dre Narjara Gonzalez Suarez, qui a pavé la voie pour mon sujet de recherche et a toujours été là pour répondre à mes questions; À tous mes collègues avec qui j'ai partagé mon quotidien et qui ont rendu mes journées plus agréables : Sarah Kym Pépin, Mazilda Djefel, Rahil Elimam, Souad Djedai, Aleksandra Berenguer, Rosalie Zilinski, Angélique Sabaoth Konan, Prisca Désiré Gnao Kaenon, et Abdallah Fallah.

À mes amis, Maxime, Vickie, Florence, et François, merci de m'avoir encouragée dans mes moments les plus difficiles comme dans les bons.

Merci à ma famille, qui a toujours été présente pour moi : À ma mère Nathalie, qui m'a prêté son oreille attentive à plus d'une reprise. À mon père Patrick et sa femme France, qui m'ont soutenu moralement et financièrement. À ma sœur Daphnée et son conjoint Manuel, qui sont devenus des amis précieux.

Mais, par-dessus tout, à mon conjoint Félix, qui a été un pilier dans ma vie depuis les 5 dernières années. Merci d'avoir cru en moi, parfois plus que moi-même. En latin, *felix* veut dire heureux ou chanceux, et c'est ce que je suis avec toi.

DÉDICACE

Not all those who wander are lost;
The old that is strong does not wither,
Deep roots are not reached by the frost.
From the ashes a fire shall be woken,
A light from the shadows shall spring;
Renewed shall be blade that was broken,
The crownless again shall be king.

J.R.R. Tolkien

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	ix
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 Les caractéristiques communes du cancer	2
1.2 La synergie entre le cancer et l'obésité	5
1.2.1 L'obésité: une maladie pandémique	5
1.2.2 Les types de cancer associés aux tissus adipeux	6
1.2.3 Les rôles des tissus adipeux	6
1.2.3.1 Les différents types de tissus adipeux	6
1.2.3.2 Le tissu adipeux blanc : une réserve énergétique	8
1.2.3.3 Le tissu adipeux blanc : un organe régulateur endocrinien.....	9
1.3 Le microenvironnement tumoral	11
1.3.1 La composition du microenvironnement tumoral dans les tissus adipeux	11
1.3.2 Les cellules immunitaires	13
1.3.2.1 Les cellules immunitaires innées	13
1.3.2.1.2 Les cellules immunitaires adaptatives	14
1.3.2.2 Les cellules souches	14
1.3.2.3 L'implication des cellules souches dans le cancer	15
1.3.3 L'inflammation dans le microenvironnement tumoral.....	16
1.3.3.1 Les rôles paradoxaux de l'inflammation	16
1.3.3.2 Les impacts de l'inflammation chronique sur le cancer	17
1.3.3.3 Les molécules impliquées dans l'inflammation tumorale	17
1.3.3.4 Les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation tumorale	19
1.4 La vascularisation tumorale	22
1.4.1 L'angiogenèse et ses mécanismes alternatifs.....	22
1.4.2 Le mimétisme vasculogénique.....	24
1.5 Projet de recherche.....	27
1.5.1 Problématique	27
1.5.2 Hypothèse	27
1.5.3 Objectifs du projet	28

CHAPITRE 2 ARTICLE : EVIDENCE FOR A JAK2/STAT3 PROINFLAMMATORY AND VASCULOGENIC MIMICRY INTERRELATED MOLECULAR SIGNATURE IN ADIPOCYTE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL/STEM CELLS	29
2.1 Résumé.....	30
2.2 Abstract.....	31
2.3 Background	31
2.4 Materials and methods.....	33
2.4.1 Reagents	33
2.4.2 Cell culture	33
2.4.3 Capillary-like structure formation assay.....	34
2.4.4 Transfection and RNA interference	34
2.4.5 Total RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR.....	34
2.4.6 Human inflammation profiler PCR arrays.....	35
2.4.7 Protein-protein interactions	35
2.4.8 Western blot	35
2.4.9 Real-time cell migration assay	36
2.4.10 Statistical data analysis	36
2.5 Results	37
2.5.1 The formation of 3D capillary-like structures in ADMSCs requires a functional JAK2/STAT3 signaling pathway.....	37
2.5.2 Pharmacological inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway prevents the acquisition of an inflammatory molecular signature upon ADMSC VM.....	39
2.5.3 The JAK2/STAT3 signaling pathway mediates the TNF α -induced inflammatory molecular signature in ADMSCs	42
2.5.4 Pharmacological inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway prevents TNF α -induced inflammatory molecular signature in ADMSCs	44
2.5.5 Towards a shared inflammatory molecular signature between VM-forming and TNF α -treated ADMSC phenotypes.....	46
2.6 Discussion.....	51
2.7 Conclusions	53
2.8 Supporting information.....	54
CHAPITRE 3 DISCUSSION	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	59
APPENDICE A ARTICLE : PROBING INTO THE CHEMOPREVENTIVE PROPERTIES OF SYNTHETIC 1,3,6-TRI-O-GALLOYL- α -D-GLUCOSE (α -TGG) AGAINST GLIOBLASTOMA AND TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER-DERIVED CELL MODELS	61
APPENDICE B ARTICLE : ASSESSING MMP-2/9 PROTEOLYTIC ACTIVITY AND ACTIVATION STATUS BY ZYMOGRAPHY IN PRECLINICAL AND CLINICAL TISSUE SAMPLES.....	80
RÉFÉRENCES	94

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Les caractéristiques communes et facteurs émergents impliqués dans la carcinogenèse.....	2
Figure 1.2. L'indice de masse corporel comme outil de mesure de l'obésité.....	5
Figure 1.3. Les 13 types de cancer associés à l'obésité.....	7
Figure 1.4. Les différentes couleurs de tissus adipeux et leur impact sur l'homéostasie du corps.....	8
Figure 1.5. Les rôles du tissu adipeux blanc dans la carcinogenèse.....	9
Figure 1.6. Les composantes du microenvironnement tumoral dans les tissus adipeux.	12
Figure 1.7. Les impacts des cellules souches mésenchymateuses sur le développement du cancer.....	16
Figure 1.8. Voies de signalisation de l'inflammation et les mécanismes de stimulation du développement tumoral associés aux MSCs.....	20
Figure 1.9. Activation classique et alternative de la voie de signalisation JAK2/STAT3.....	22
Figure 1.10. Les différents mécanismes de vascularisation tumorale par les cellules épithéliales.	24
Figure 1.11. Les différents types de mimétisme vasculogénique.	25
Figure 1.12. Hypothèse et contexte du projet.	28
Figure 2.1. Effect of the JAK2/STAT3 signaling pathway inhibition on the formation of 3D capillary-like structures in ADMSCs.	38
Figure 2.2. Effect of a pharmacological inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway on the chemotactic migration capacity of ADMSCs.	39
Figure 2.3. Transcriptomic analysis of inflammatory molecular signature induced by capillary-like structure formation.....	41
Figure 2.4. Effects of AG490 on inflammation and invasion markers related to capillary-like structure formation.....	42
Figure 2.5. Involvement of the JAK2/STAT3 signaling pathway in TNF α -induced inflammatory molecular signature in ADMSCs.	43
Figure 2.6. Implication of JAK2/STAT3 in the inflammatory molecular signature of ADMSCs stimulated with TNF α	45
Figure 2.7. Towards a shared inflammatory molecular signature between VM-forming and TNF α -treated ADMSC phenotypes.....	46

Supplemental figure 2.8. Efficiency of TNF α to induce a dose-dependent pro-inflammatory and invasive molecular signature in ADMSC monolayers. 54

LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1. Roles of shared inflammation genes upregulated via VM- and TNF α -induction	47
Table 2.2. Roles of shared inflammation genes downregulated via VM- and TNF α -induction	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADMSCs : *Adipocyte-derived mesenchymal stromal/stem cells* (cellules souches mésenchymateuses adipocytaires)

APS : *Ammonium persulfate* (persulfate d'ammonium)

BAT : *Brown adipose tissue* (tissu adipeux brun)

BCA : *Bicinchoninic acid* (acide bicinchoninique)

BMMSCs : *Bone marrow mesenchymal stromal/stem cells* (cellules stromales/souches mésenchymateuses de la moelle osseuse)

CAAs : *Cancer-associated adipocytes* (adipocytes associés au cancer)

CAFs : *Cancer-associated fibroblasts* (fibroblastes associés au cancer)

CCL : *C-C motif chemokine ligand* (chimiokine C-C motif ligand)

CCR : *C-C motif chemokine receptor* (récepteur de chimiokine C-C motif)

CD : *Cluster of differentiation* (cluster de différenciation)

COX-2 : *Cyclooxygenase-2* (cyclooxygénase-2)

CSCs : *Cancer stem cells* (cellules souches cancéreuses)

CXCL : *C-C motif chemokine ligand* (chimiokine C-X-C motif ligand)

CXCR : *C-X-C motif chemokine receptor* (récepteur de chimiokine C-X-C motif)

DCs : *Dendritic cells* (cellules dendritiques)

DMSO : *Dimethyl sulfoxide* (sulfoxyde de diméthyle)

ECL : *Enhanced chemiluminescence* (chimiluminescence renforcée)

ECM : *Extracellular matrix* (matrice extracellulaire)

EMEM : *Eagle's Minimum Essential Medium* (Milieu Minimum Essentiel d'Eagle)

EMT : *Epithelial-mesenchymal transition* (transition épithélio-mésenchymateuse)

EPCs : *Endothelial progenitor cells* (cellules endothéliales progénitrices)

FBS : *Fetal bovine serum* (sérum fœtal bovin)

FFAs : *Free fatty acids* (acides gras libres)

GAPDH : *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase)

HRP : *Horseradish peroxidase* (peroxydase de raifort)

IL : *Interleukin* (interleukine)

JAK : Janus kinase

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase* (protéine kinase activée par des agents mitogènes)

MCP : *Monocyte chemo attractant* (chimio attractant de monocytes)

MDSCs : *Myeloid derived suppressor cells* (Cellules myéloïdes suppressives)

miRNAs : *Micro RNAs* (micro ARNs)

MMPs : *Matrix metalloproteinases* (métalloprotéinases matricielles)

MSCs : *Mesenchymal stromal/stem cells* (cellules stromales/souches mésenchymateuses)

NF- κ B : *Nuclear factor kappa B* (facteur nucléaire kappa B)

NKs : *Natural killer cells* (cellules natural killers)

PAGE : *Polyacrylamide gel electrophoresis* (électrophorèse par gel de polyacrylamide)

PCR : *Polymerase chain reaction* (réaction en chaîne de la polymérase)

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PMA : *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (phorbol 12-myristate 13-acétate)

SDS : *Sodium dodecyl sulfate* (dodécylsulfate de sodium)

siRNA : *Small interfering RNA* (petit ARN interférent)

STAT : *Signal transducer and activator of transcription* (transducteur du signal et activateur de la transcription)

TAMs : *Tumor-associated macrophages* (macrophages associés aux tumeurs)

TBST : *Tris-buffered saline + Tween-20* (solution saline tamponnée au Tris + Tween-20)

TEMED : *Tetramethylenediamine* (tetraméthylènediamine)

TGF β : *Transforming growth factor beta* (facteur de croissance transformant bêta)

Th : *Helper T cell* (cellule T auxiliaire)

TME : *Tumor microenvironment* (microenvironnement tumoral)

TNBC : *Triple-negative breast cancer* (cancer du sein triple négatif)

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha* (facteur de nécrose tumorale alpha)

TNFRSF : *Tumor necrosis factor receptor superfamily* (superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale)

Treg : *Regulatory T cells* (cellules T régulatrices)

ROS : *Reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène)

RPS18 : *Ribosomal protein S 18* (protéine ribosomale S18)

RTCA DP : *Real-time cell analysis dual purpose* (analyse cellulaire en temps réel à double usage)

RT-qPCR : *Real-time quantitative polymerase chain reaction* (réaction en chaîne de la polymérase quantitative en temps réel)

WAT : *White adipose tissue* (tissu adipeux blanc)

VE-cadhérine : *Vascular endothelial cadherin* (cadhérine vasculaire endothéliale)

VM : *Vasculogenic mimicry* (mimétisme vasculogénique)

v/v : volume/volume

α -TGG : 1,3,6-tri-O-galloyl- α -D-glucose

β -TGG : 1,3,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose

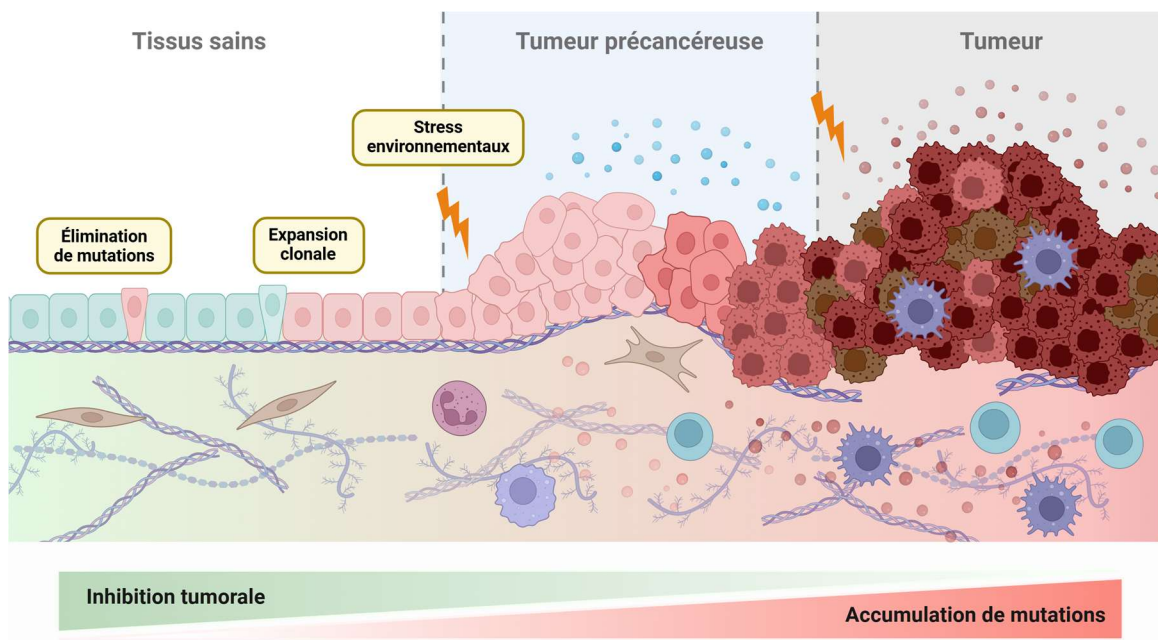
RÉSUMÉ

Le cancer et l'obésité sont associés à l'inflammation chronique et la dérégulation de l'homéostasie hormonale et cytokinique. Le sécrétome des adipocytes matures, des cellules graisseuses présentes en excès dans l'obésité, favorise la vascularisation tumorale, par un processus appelé angiogenèse. Beaucoup de traitements visent l'angiogenèse, mais des mécanismes alternatifs augmentent la chimiorésistance. C'est le cas du mimétisme vasculogénique (VM). Récemment, de nouvelles études ont proposé que les cellules stromales/souches mésenchymateuses (MSCs) peuvent également participer au VM, mais le rôle des MSCs adipocytaires humaines (ADMSCs) reste inconnu. Notre hypothèse est que les ADMSCs peuvent contribuer au VM et à l'inflammation tumorale via une régulation de la voie de signalisation JAK2/STAT3. Pour ce faire, nous avons testé la formation de VM sur une matrice tridimensionnelle imitant le microenvironnement tumoral et comparé le phénotype inflammatoire avec celui classiquement induit en monocouches par le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF α), une cytokine pro-inflammatoire. Nos résultats ont révélé que les ADMSCs forment des structures capillaires similaires au VM *in vitro* sur matrice tridimensionnelle. Les cellules formant du VM acquièrent une signature moléculaire pro-inflammatoire complexe ayant plusieurs similarités avec celle induite par le TNF α . Toutes deux montrent une surexpression de *COX2*, *CCL2*, *CCL5*, *CXCL5*, *CXCL8*, *IL-6*, *SNAI1*, et *MMP9*, des gènes associés avec des adipocytes matures associés au cancer (CAAs). De plus, l'inhibition de la voie JAK2/STAT3 a mis en lumière son rôle dans la régulation de la formation de VM *in vitro*, de la migration cellulaire chimiotactique, et de l'expression de biomarqueurs pro-inflammatoires et invasifs. Notre conclusion est que l'inhibition du VM régulé par JAK2/STAT3 peut également modifier l'acquisition d'une signature pro-inflammatoire et empêcher la contribution des ADMSCs au développement tumoral. Nous renforçons donc l'importance de JAK2/STAT3 comme cible thérapeutique contre le cancer.

Mots clés : cancer, mimétisme vasculogénique, cellules souches mésenchymateuses adipocytaires humaines, inflammation, obésité

INTRODUCTION

Le cancer regroupe différentes maladies caractérisées par la transformation anormale de cellules d'un tissu ou d'un organe qui prolifèrent de façon incontrôlée. L'évolution constante de ces cellules mène ensuite à la formation de tumeurs et à leur propagation par métastase (Brown *et al.*, 2023; World Health Organization, 2025). Bien que le cancer soit connu depuis l'Antiquité (Galassi *et al.*, 2024), il reste l'une des causes principales de décès dans le monde (World Health Organization, 2025). Il devient donc impératif de mieux le caractériser pour mieux le soigner.



Les étapes de la formation d'une tumeur à partir de tissus sains.

L'accumulation de mutations malgré les mécanismes d'inhibition tumorale cause la transformation progressive des tissus sains à un stade de tumeur précancéreuse. Les stress environnementaux déclenchent la prolifération de ces cellules anormales et enclenchent la réponse inflammatoire. Les cellules évoluent constamment et deviennent cancéreuses, présentant des phénotypes hétérogènes et attirant davantage de cellules immunitaires (Figure créée via Biorender, adaptée de (Zhang *et al.*, 2024), sous licence CC BY).

Le cancer est hétérogène et dynamique : il existe plus d'une centaine de types de cancers, chacun avec plusieurs sous-types en fonction des tissus atteints (Hanahan et Weinberg, 2000). Certaines tumeurs sont plus agressives que d'autres, comme le cancer du cerveau (glioblastome) ou le cancer du sein triple négatif (TNBC); elles sont associées, entre autres, à des risques plus élevés de métastaser (Nussinov *et al.*, 2025). Il existe aussi malheureusement de multiples différences intra- et inter-tumorales qui peuvent conférer une résistance aux traitements anticancéreux actuellement disponibles (Zhang *et al.*, 2022).

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les caractéristiques communes du cancer

Malgré cette hétérogénéité, pour devenir cancéreuses les cellules doivent acquérir un phénotype commun, et ce, par un processus progressif et multifactoriel appelé carcinogenèse (Brown *et al.*, 2023; Hanahan et Weinberg, 2000). Hanahan et Weinberg ont décrit dix caractéristiques communes à toutes les tumeurs ainsi que quatre facteurs émergents (Figure 1.1), ce qui a profondément transformé le paradigme de la recherche oncologique (Hanahan, 2022; Hanahan et Weinberg, 2000; Hanahan et Weinberg, 2011).

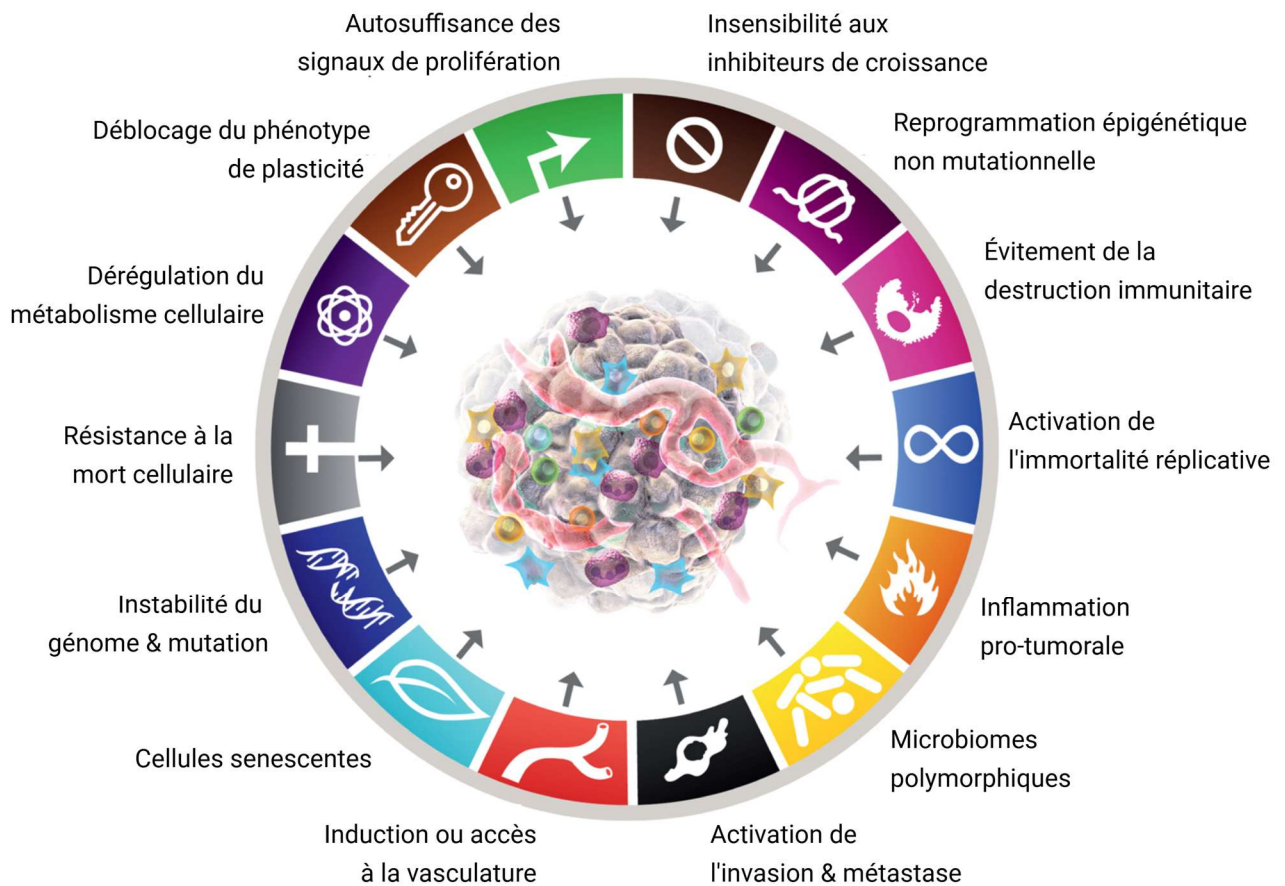


Figure 1.1. Les caractéristiques communes et facteurs émergents impliqués dans la carcinogenèse.

Dix caractéristiques communes à tous les cancers et nécessaires à l'acquisition d'un phénotype cancéreux ainsi que quatre facteurs émergents pouvant possiblement favoriser ce développement (Figure adaptée de (Hanahan, 2022), avec la permission de l'Association américaine pour la recherche sur le cancer (AACR)).

Premièrement, les cellules cancéreuses ont un génome instable. Cette caractéristique est due à la défaillance de leurs systèmes de surveillance et de réparation de l'ADN. Les cellules cancéreuses vont ainsi accumuler des mutations plus rapidement que les cellules saines, dont des gains de fonction oncogènes ou des pertes de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs (Hanahan et Weinberg, 2000; Hanahan et Weinberg, 2011). Environ 140 gènes ont été identifiés pour leurs mutations contribuant à la carcinogenèse et entraînant la dérégulation de trois principaux processus cellulaires : l'entretien du génome, la différenciation et la survie cellulaire (Vogelstein *et al.*, 2013).

Deuxièmement, les cellules cancéreuses deviennent indépendantes des signaux de prolifération, entre autres, en sécrétant leurs propres facteurs de croissance ou en surexprimant les récepteurs associés. Parallèlement, elles développent aussi une insensibilité aux inhibiteurs de croissance. En réactivant également l'entretien de leurs télomères, les cellules cancéreuses perdent leur limitation de nombre de cycles cellulaires et acquièrent une relative immortalité répliative. Finalement, elles deviennent résistantes à l'apoptose, la mort cellulaire programmée. Collectivement, il en découle une prolifération aberrante des cellules, limitée uniquement par le manque de nutriments et d'oxygène (hypoxie). Pour contrer ce problème, l'angiogenèse, un processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins bourgeonnent à partir de ceux déjà existants, est induite, donnant ainsi accès à la vasculature (Hanahan et Weinberg, 2000; Hanahan et Weinberg, 2011).

Cette proximité du système vasculaire facilite l'invasion de tissus adjacents et de sites distants, permettant aux cellules cancéreuses de trouver une nouvelle niche idéale (Hanahan et Weinberg, 2000). Il s'agit d'une caractéristique clé des tumeurs puisqu'environ deux tiers des décès suite au cancer sont attribuables aux métastases (Dillekås *et al.*, 2019). La migration est facilitée par la surexpression de protéases dégradant la matrice extracellulaire (ECM) et par l'inhibition des protéines d'adhérence affaiblissant ainsi les liens cellules-cellules et cellules-ECM (Hanahan et Weinberg, 2000; Hanahan et Weinberg, 2011). De plus, les cellules cancéreuses peuvent aussi acquérir un phénotype invasif en se différenciant de manière réversible, un processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), ce qui leur confère une plus grande motilité et plasticité (Fan *et al.*, 2013; Hanahan et Weinberg, 2011). La dérégulation du métabolisme cellulaire est un processus hétérogène et fluctuant dans le temps, selon les niveaux d'oxygénation, le degré de vascularisation, et l'environnement de la tumeur (Hanahan et Weinberg, 2011). Les cellules peuvent, par exemple, augmenter leur absorption de glucose, privilégier la glycolyse anaérobie et la production de métabolites intermédiaires (Attané et Muller, 2020), favoriser la

production de macromolécules et d'organites (Hanahan et Weinberg, 2011), ou encore changer à un métabolisme préférentiel des acides gras (Iwamoto *et al.*, 2018).

L'inflammation est une caractéristique qui a pour effet d'en exacerber plusieurs autres (Hanahan et Weinberg, 2011); elle favorise la suppression de l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'invasion, l'angiogenèse, l'évitement de la destruction immunitaire et l'instabilité génétique (Rajput et Wilber, 2010; Turizo-Smith *et al.*, 2024). Elle peut non seulement promouvoir mais aussi initier la carcinogenèse par le recrutement de cellules immunes qui sécrètent elles-mêmes des cytokines, de petites protéines de signalisation, pro-inflammatoires (Piotrowski *et al.*, 2020). Malgré la présence accrue de cellules immunes dans la tumeur, les cellules cancéreuses arrivent à éviter la destruction immunitaire, que ce soit par la survie sélective des phénotypes faiblement immunogènes, la sécrétion de molécules immunosuppressives ou le recrutement de cellules régulatrices aidant à la tolérance immune (Hanahan et Weinberg, 2011).

Finalement, Hanahan rajoute quatre facteurs émergents : la reprogrammation épigénétique, comme la méthylation de l'ADN ou la modification des histones, qui permettent la régulation de gènes sans changer leur séquence ADN; les microbiomes polymorphiques, composés de différentes espèces de microorganismes peuvent avoir des effets antitumoraux ou protumoraux; les cellules sénescents, impliquant soit la dormance des tumeurs qui peuvent causer la résistance aux traitements, soit l'arrêt prolifératif irréversible des cellules qui favorise la carcinogenèse par stimulation paracrine; et le déblocage du phénotype de plasticité, où les cellules cancéreuses se dédifférencient et deviennent similaires à des cellules souches (Hanahan, 2022).

L'acquisition de toutes ces caractéristiques peut se faire dans un ordre varié, et de différentes manières, mais elles restent communes à toutes les tumeurs (Hanahan et Weinberg, 2000). Plusieurs facteurs influencent ce processus tels que l'âge, le sexe, l'ethnicité et le mode de vie du patient (Hwee et Bougie, 2021). En effet, on estime que 30 à 50% des cancers sont dû à des habitudes de vie modifiables comme la consommation d'alcool et de tabac, une mauvaise diète, la sédentarité, et l'obésité (Stein et Colditz, 2004; World Health Organization, 2025).

1.2 La synergie entre le cancer et l'obésité

1.2.1 L'obésité: une maladie pandémique

L'obésité est définie comme étant « l'accumulation anormale ou excessive de graisse présentant un risque pour la santé » (Lauby-Secretan *et al.*, 2016). Elle est en hausse fulgurante depuis plus d'une cinquantaine d'années (Mukherjee *et al.*, 2022) : depuis seulement 1990, l'incidence d'obésité mondiale a plus que doublé chez les adultes et quadruplé chez les adolescents. En 2022, une personne sur huit était obèse (World Health Organization, 2024), ce qui en fait une véritable pandémie moderne. Plus concrètement, toute personne ayant un indice de masse corporelle (IMC) au-dessus de 30 kg/m² est considérée comme obèse (Figure 1.2) (Centre Léon Bérard, 2025; Lauby-Secretan *et al.*, 2016). Cependant, l'indice de masse corporelle n'est pas un outil parfait et plusieurs experts recommandent de rajouter d'autres mesures, comme le ratio taille-hanche et les index d'adiposité, puisque le type et la localisation du gras peut avoir des impacts différents sur la santé (Després, 2017; Ebadi *et al.*, 2017; Lauby-Secretan *et al.*, 2016). En effet, l'obésité est une maladie multifactorielle et hétérogène qui, en plus des complications biomécaniques due directement à l'augmentation de la masse adipeuse, amène beaucoup de problèmes de santé concomitants. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, les maladies du foie, le syndrome métabolique, et plusieurs types de cancers (Garvey et Mechanick, 2020; Kolb *et al.*, 2016; Sakers *et al.*, 2022).

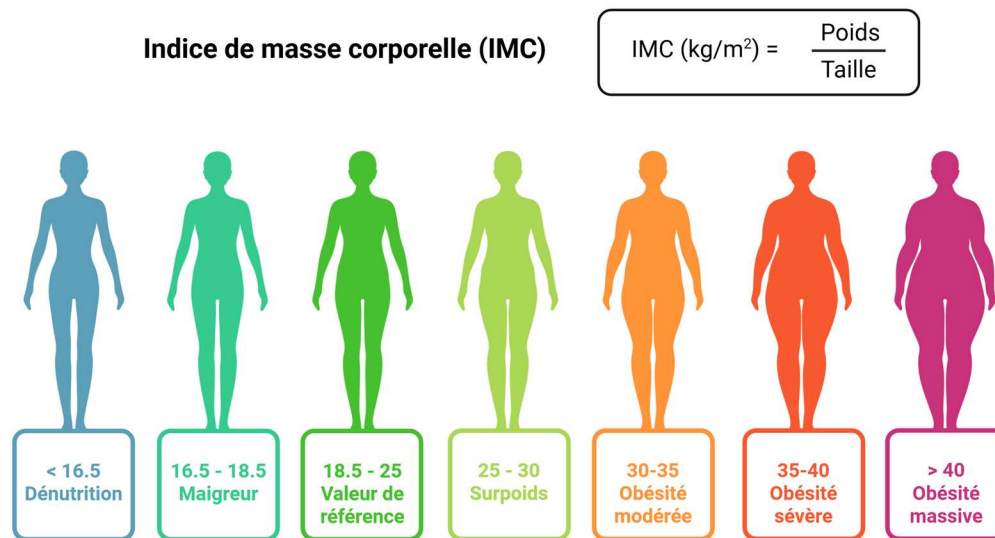


Figure 1.2. L'indice de masse corporelle comme outil de mesure de l'obésité.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a établi 7 catégories basées sur les valeurs d'IMC allant de la dénutrition à l'obésité massive, avec la valeur de référence se trouvant entre 18.5 et 25 kg/m² (Figure créée avec Biorender, adaptée de l'infographie de (Centre Léon Bérard, 2025) avec leur permission).

1.2.2 Les types de cancer associés aux tissus adipeux

Plusieurs études ont démontré que l'obésité augmente l'incidence d'au moins 13 types de cancer. Ceux-ci touchent l'œsophage, l'estomac, le colon et le rectum, le foie, la vésicule biliaire, le pancréas, les seins chez les femmes ménopausées, l'endomètre de l'utérus, les ovaires, les reins, les méninges (tissus couvrant le cerveau et la moëlle épinière), la thyroïde, et les cellules sanguines (myélome multiple) (Figure 1.3) (Brown et Scherer, 2023; Lauby-Secretan *et al.*, 2016). Les risques de mortalité sont augmentés de 40% à 80% selon le type de cancer (Gallagher et LeRoith, 2015). En 2003, aux États-Unis, une étude a reporté 14% des morts dues aux cancers chez les hommes, et 20% chez les femmes, comme étant attribuables à l'obésité (Calle *et al.*, 2003). En effet, de nombreuses tumeurs ont tendance à se développer dans ou près des tissus adipeux, ces derniers étant également une niche idéale pour les métastases (Brown et Scherer, 2023). De plus, les patients obèses ont beaucoup plus de risques de développer un deuxième cancer indépendant durant leur vie (Park et Colditz, 2021). Le lien entre le cancer et l'obésité est l'instauration d'une inflammation chronique dans les tissus adipeux par l'accumulation excessive de graisse (Kolb *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2021). Cependant, les différents types de tissus adipeux n'affectent pas les cancers de la même façon (Brown et Scherer, 2023; Ebadi *et al.*, 2017; Zwick *et al.*, 2018).

1.2.3 Les rôles des tissus adipeux

1.2.3.1 Les différents types de tissus adipeux

Les tissus adipeux peuvent être classifiés selon leur localisation, soit sous-cutanée ou viscérale. Les tissus adipeux sous-cutanés (sous la peau) sont associés à des effets bénéfiques pour la santé (Rosen et Spiegelman, 2014; Zwick *et al.*, 2018). Les patients atteints de cancer ayant un ratio plus élevé de gras sous-cutané ont un taux de mortalité plus bas (Ebadi *et al.*, 2017). Au contraire, les tissus adipeux viscéraux servent à protéger les organes (Mukherjee *et al.*, 2022), mais leur accumulation est liée à de mauvais pronostics dû à leur propension à la fibrose, la résistance à l'insuline et l'inflammation (Brown et Scherer, 2023).

Cancers associés au surpoids & à l'obésité

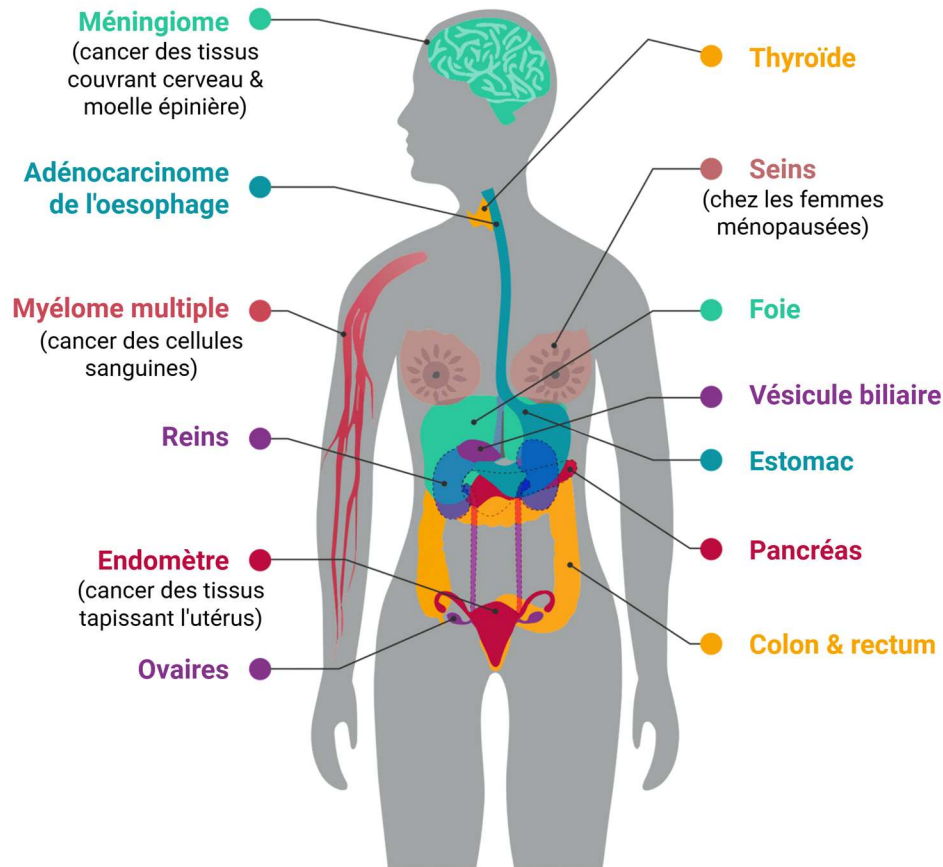


Figure 1.3. Les 13 types de cancer associés à l'obésité.

Il existe 13 types de cancers ayant une incidence plus élevée chez les personnes obèses (Figure adaptée de (National Cancer Institute, 2022), avec leur permission).

Les tissus adipeux peuvent aussi être classifiés par leur couleur associée à des fonctions biologiques différentes, soit brun, beige et blanc (Figure 1.4). Le tissu adipeux brun (BAT) constitue une faible proportion du gras chez les adultes, mais il a un grand impact métabolique (Sakers *et al.*, 2022). Le BAT est caractérisé par une plus grande quantité de mitochondries que le tissu adipeux blanc (WAT). Il sert à produire de la chaleur par le découplage de la production d'énergie du catabolisme, un processus nommé thermogenèse (Chu *et al.*, 2020; Zwick *et al.*, 2018). Récemment, le BAT a été associé à une augmentation des tumeurs, surtout chez les femmes, et un taux de mortalité plus élevé par cachexie, le syndrome du dépérissement (Chu *et al.*, 2020). Le tissu adipeux beige est similaire au BAT, mais se distingue par le fait qu'il peut aussi servir au stockage d'énergie (Rosen et Spiegelman, 2014). Enfin, le tissu adipeux blanc (WAT) constitue la majorité des tissus gras. Ce sont des tissus fortement associés avec l'inflammation,

l'hypoxie et l'angiogenèse dans l'obésité et le cancer. Ils ont un rôle de régulation de l'homéostasie énergétique et endocrinienne (Rosen et Spiegelman, 2014).

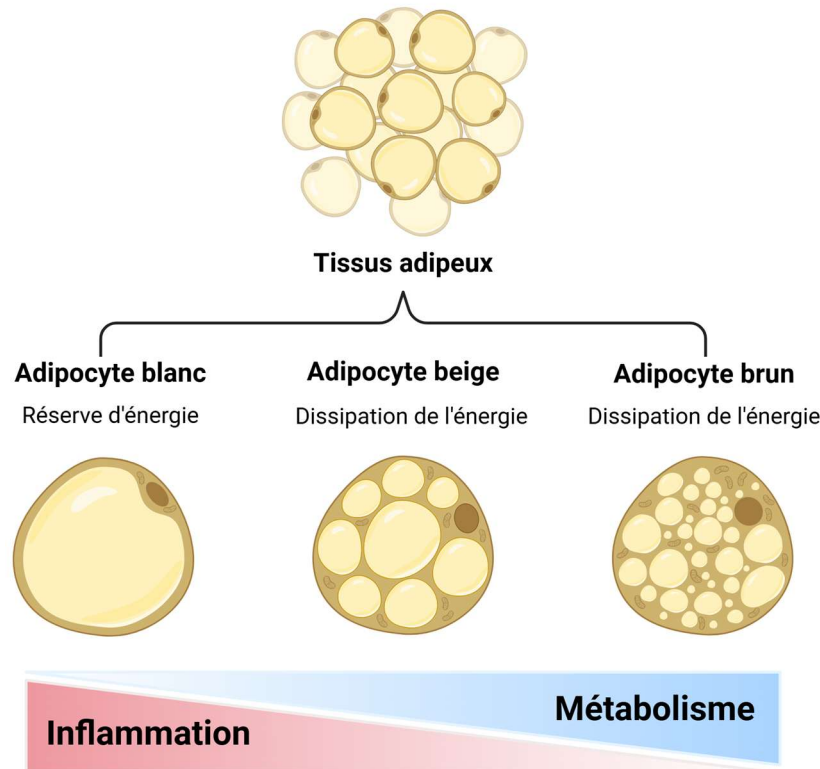


Figure 1.4. Les différentes couleurs de tissus adipeux et leur impact sur l'homéostasie du corps.

L'association entre l'inflammation et le métabolisme est graduellement opposée dans les différents types d'adipocyte. Les blancs sont surtout associés à l'inflammation et peu au métabolisme, à l'opposé des bruns qui sont surtout associés au métabolisme et peu à l'inflammation. Quant aux beiges, ils ont un phénotype intermédiaire (Figure créée avec Biorender, adaptée de (Wu et al., 2025), avec la permission de John Wiley & Sons).

1.2.3.2 Le tissu adipeux blanc : une réserve énergétique

Le WAT est formé de cellules adipocytes qui sont spécialisées dans l'entreposage de lipides sous formes de triglycérides (Zwick *et al.*, 2018); il est très plastique grâce à leur capacité d'augmenter leur taille et leur nombre (Rosen et Spiegelman, 2014; Sakers *et al.*, 2022). Le WAT régule l'homéostasie énergétique par le stockage et la libération de ces gras en réponse aux besoins métaboliques du corps (Wu *et al.*, 2025; Zwick *et al.*, 2018). Cependant, dans le cadre du cancer, la division cellulaire aberrante fait du WAT une source inestimable de gras pour la biosynthèse de nouvelles membranes, ce qui est normalement un facteur limitant à la croissance tumorale (Mukherjee *et al.*, 2022). De même, la lipolyse (dégradation des lipides en acides gras libres (FFAs)) augmente, ce qui permet aux cellules cancéreuses de passer d'un métabolisme dépendant du glucose à un métabolisme basé sur les FFAs (Attané et Muller, 2020; Iwamoto *et al.*, 2018;

Mukherjee *et al.*, 2022). Cette modification permet à la tumeur d'être moins dépendante de l'angiogenèse et donc plus résistante aux traitements (Iwamoto *et al.*, 2018).

1.2.3.3 Le tissu adipeux blanc : un organe régulateur endocrinien

Le deuxième rôle du WAT est celui de régulateur endocrinien. En effet, il s'agit d'un organe sécrétoire très actif produisant de nombreuses molécules de signalisation appelées adipokines. Ces dernières regroupent de multiples cytokines, chimiokines et hormones, avec lesquelles le WAT exerce une régulation autocrine, paracrine et systémique (Brown et Scherer, 2023). Les rôles de nombreuses adipokines ont été associés au cancer et à l'obésité (Figure 1.5).

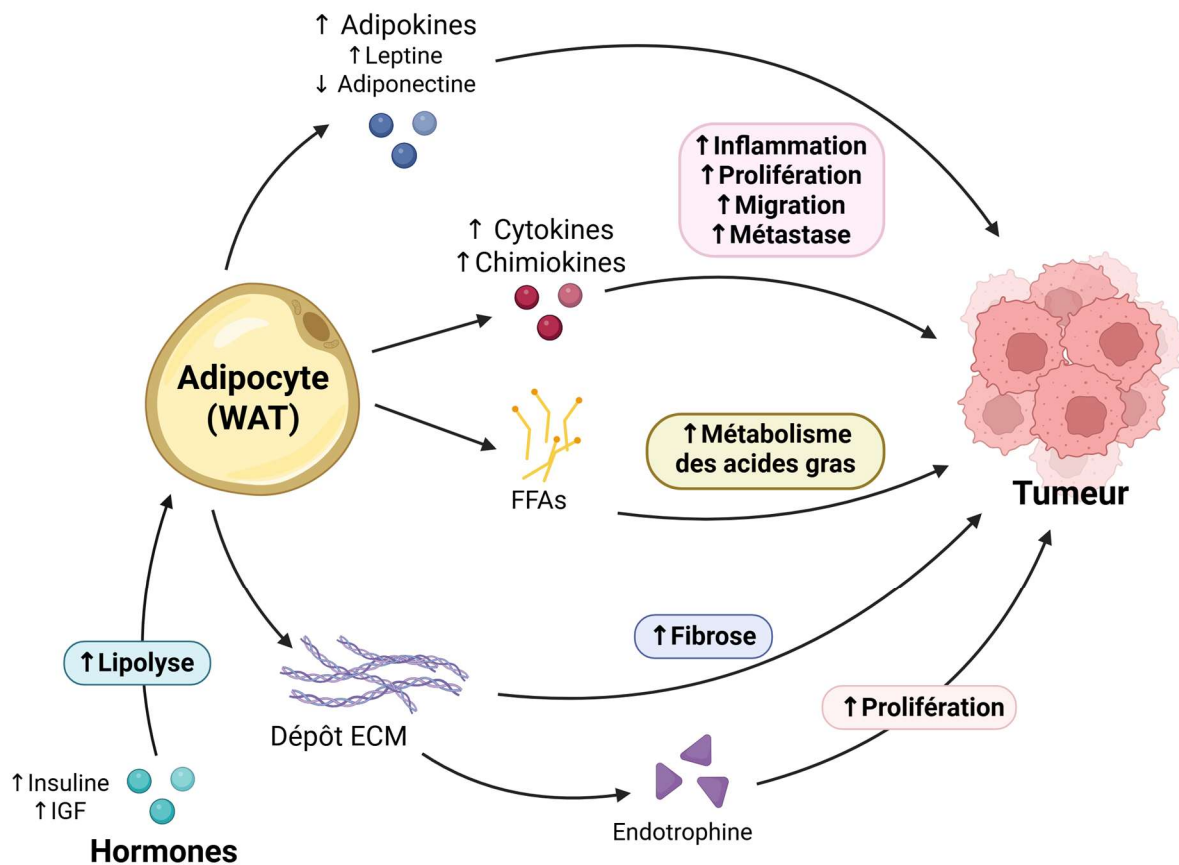


Figure 1.5. Les rôles du tissu adipeux blanc dans la carcinogenèse.

Le WAT sécrète des hormones, des cytokines et des chimiokines qui favorisent l'inflammation, l'invasion et la prolifération. Le WAT sécrète aussi des FFAs, qui stimulent le métabolisme des acides gras, et accroît le dépôt de macromolécules de l'ECM, ce qui augmente la prolifération et la fibrose. Des hormones, comme l'insuline, augmentent la lipolyse du WAT, libérant plus de FFAs (Figure créée avec Biorender à partir d'informations provenant de (Brown et Scherer, 2023; Liu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019)).

La leptine et l'adiponectine, deux adipokines, sont très étudiées pour leurs effets opposés sur la carcinogenèse. La leptine, une hormone de la satiété, est 5 à 10 fois plus élevée chez personnes obèses, sans pour autant diminuer leur appétit. Dans le contexte du cancer, la leptine stimule l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion tumorale (VanSaun, 2013). À l'opposé, l'adiponectine inhibe ces mêmes processus, ayant donc un effet protecteur contre le cancer, mais sa sécrétion est diminuée par l'obésité (Gallagher et LeRoith, 2015; VanSaun, 2013). Plusieurs autres adipokines sont impliquées dans la carcinogenèse : la résistine augmente avec l'adiposité et son effet pro-inflammatoire contribue à la résistance à l'insuline (Gallagher et LeRoith, 2015; Rosen et Spiegelman, 2014); l'endotrophine, produite par le clivage du collagène de type VI, est connue pour son effet stimulateur de croissance tumorale (Rosen et Spiegelman, 2014); et l'estrogène, produite par le WAT à travers le processus d'aromatisation des androgènes, stimule les cancers hormonaux chez les femmes, comme les cancers du sein et de l'endomètre (Gallagher et LeRoith, 2015; Rosen et Spiegelman, 2014).

Une autre hormone surexprimée par les cellules pancréatiques chez les patients obèses est l'insuline, un supprimeur de la lipolyse (Rosen et Spiegelman, 2014). L'obésité amène une résistance à l'insuline qui empêche l'absorption du glucose sanguin et l'inhibition de la lipolyse, favorisant ainsi la transition au métabolisme des acides gras pour compenser. De plus, l'augmentation des FFAs dans la circulation renforce la résistance à l'insuline et l'inflammation chronique (Brown et Scherer, 2023; Gallagher et LeRoith, 2015). Parallèlement, les facteurs de croissance analogue à l'insuline (IGF) ont des effets anti-apoptotiques et stimulent la survie cellulaire et la métastase (Hanahan et Weinberg, 2000; Rosen et Spiegelman, 2014; Samani *et al.*, 2007).

Finalement, l'accumulation excessive de graisse accompagnant l'obésité induit la dérégulation et la surexpression de cytokines et de chimiokines par les adipocytes du WAT. Ces molécules de communication chimique recrutent diverses cellules immunitaires, favorisent la métastase, et instaurent une inflammation chronique pro-tumorale (Brown et Scherer, 2023; Kolb *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2021; Mukherjee *et al.*, 2022). Les adipocytes sont aussi capables de stimuler le dépôt de macromolécules de l'ECM, comme le collagène, contribuant à la fibrose et remodelant le microenvironnement tumoral (TME) dans lequel évolue le cancer (Brown *et al.*, 2023; Divoux *et al.*, 2010).

1.3 Le microenvironnement tumoral

1.3.1 La composition du microenvironnement tumoral dans les tissus adipeux

De plus en plus, le cancer est étudié comme un organe complexe, comprenant la tumeur et son microenvironnement. Le TME est constitué de plusieurs types cellulaires, mais inclut également les capillaires et l'ECM (Figure 1.6) (Laha *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2023). L'ECM sert de support aux cellules et est composée de diverses macromolécules comme du collagène, des glycoprotéines et des polysaccharides. Dans le cancer, cette ECM est altérée par l'hypoxie, l'acidité, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le remodelage par des protéases. Ces modifications peuvent avoir un impact sur la communication cellules-cellules et cellules-ECM (Brassart-Pasco *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2023).

Le TME contient différents types de cellules, dont une population hétérogène de cellules cancéreuses. Elles sécrètent activement des molécules de signalisation d'inflammation et d'angiogenèse, aidant ainsi à recruter plusieurs autres types de cellules au sein de la tumeur. Les cellules cancéreuses sont alors capables de déréguler et reprogrammer ces cellules saines, ce qui favorise la carcinogenèse (Hanahan et Weinberg, 2011).

Dans le contexte des tissus adipeux, le TME contient aussi des adipocytes, surtout de type WAT. La reprogrammation tumorale les fait transitionner à un phénotype d'adipocytes associés au cancer (CAAs). Celui-ci implique une dédifférenciation des adipocytes ainsi que la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires. En effet, le cancer active la lipolyse dans les CAA, ce qui augmente la quantité de FFAs disponibles. Cela a pour effet de favoriser le métabolisme des acides gras et donc la prolifération tumorale (Attané et Muller, 2020; Iwamoto *et al.*, 2018). Les adipocytes délipidés participent au remodelage de l'ECM, à l'inflammation et à la sécrétion de chimiokines et cytokines modulant la réponse immunitaire (Brown et Scherer, 2023). Ces adipocytes peuvent alors se dédifférencier en cellules souches mésenchymateuses (MSCs), ou en cellules similaires aux fibroblastes associés au cancer (CAFs) (Attané et Muller, 2020; Brown et Scherer, 2023). Les fibroblastes sont des cellules stromales (cellules du tissu conjonctif servant au soutien des organes) très abondantes dans le TME (Demir, 2023). Les fibroblastes ayant le phénotype CAF contribuent au développement tumoral via la production d'ECM et la stimulation des cellules du TME avec des facteurs de croissance (Bhowmick *et al.*, 2004). Ils favorisent l'angiogenèse (Ferrara, 2010) et sont aussi associés à l'inhibition de la réponse immunitaire (Brown et Scherer, 2023; Demir, 2023; Wen *et al.*, 2022).

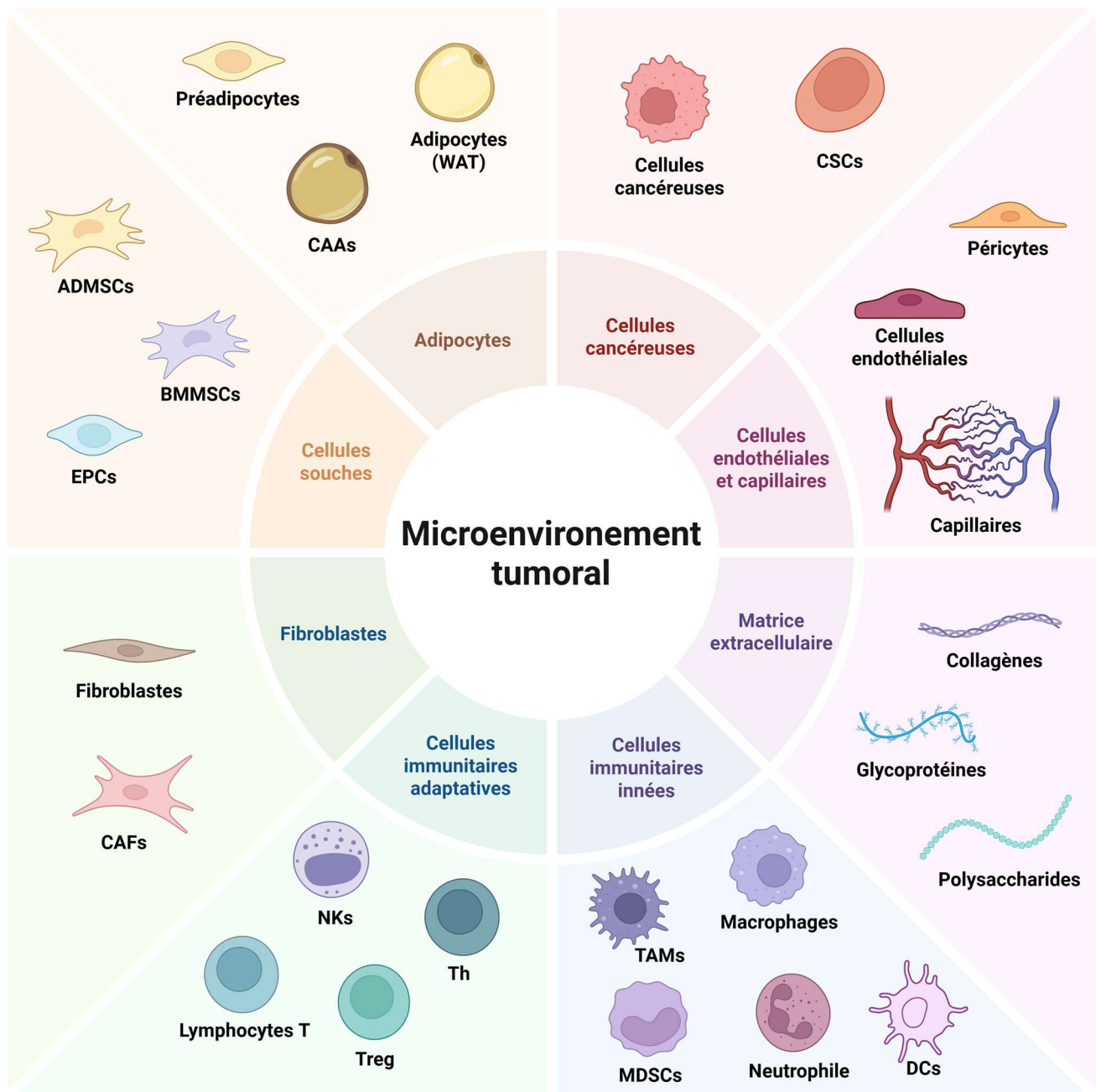


Figure 1.6. Les composantes du microenvironnement tumoral dans les tissus adipeux.

Le microenvironnement tumoral dans les tissus adipeux comprend de nombreux types cellulaires : les cellules cancéreuses, les adipocytes, les cellules souches, les fibroblastes et les cellules immunitaires. Il inclut également les capillaires sanguins et les cellules endothéliales les composant ainsi que l'ECM (Figure créée avec Biorender).

1.3.2 Les cellules immunitaires

De nombreux types de cellules immunitaires s'infiltrant dans le TME en réponse à des chimiokines et cytokines chimio-attractantes (Demir, 2023), mais leurs effets changent selon leur environnement. Les cellules cancéreuses ont des interactions complexes avec ces cellules; en effet, elles sont capables de les utiliser à leur avantage pour former un TME à la fois inflammatoire et immunosuppresseur, échappant ainsi à la destruction immunitaire (Chang et Beatty, 2020). Il en existe deux groupes, soit les cellules immunitaires innées et adaptatives, leurs rôles et leurs fonctionnements différents stimulant ou inhibant la croissance tumorale.

1.3.2.1.1 Les cellules immunitaires innées

Les cellules immunitaires les plus abondantes dans le TME sont les macrophages. Ces cellules représentent jusqu'à 50% de la masse tumorale (Todoric *et al.*, 2016). Elles présentent plusieurs phénotypes dans le TME; les macrophages M1 sont antitumoraux alors que les macrophages M2 sont protumoraux (Pan *et al.*, 2020). Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) ont un phénotype M2, ils favorisent donc l'angiogenèse et la migration des cellules cancéreuses. Ils contribuent à l'immunosuppression et l'inflammation dans le TME (Pan *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2022). Les neutrophiles sont, quant à elles, les premières cellules immunitaires innées à être recrutées dans le TME (Mukherjee *et al.*, 2022). Elles aussi présentent deux phénotypes contraires : le premier est antitumoral, stimulant les cellules T cytotoxiques, alors que le deuxième est immunosuppresseur et protumoral. Ce dernier active les macrophages M2 et induit des ROS, le remodelage du TME, ainsi que la métastase (McFarlane *et al.*, 2021). Il est à noter que, chez les personnes considérées comme obèses, un niveau élevé de neutrophiles se trouve dans la circulation sanguine, dont la majorité serait protumorale (Mukherjee *et al.*, 2022).

Plusieurs autres types de cellules immunitaires innées sont présentes dans le TME, souvent avec des effets opposés sur le développement du cancer. Par exemple, les cellules dendritiques (DCs), servant à présenter les antigènes aux cellules T naïves, peuvent augmenter ou diminuer la tolérance immunitaire dans le TME (Laha *et al.*, 2021). De même, les cellules natural killers (NKs), un type de cellules lymphoïdes cytotoxiques indépendantes des antigènes, peuvent diminuer l'immunotolérance du TME, mais elles peuvent aussi promouvoir la métastase (Chan et Ewald, 2022). Finalement, les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs), des cellules immatures dérivées de la moëlle osseuse immatures, contribuent à l'inflammation, l'angiogenèse, et la métastase. Les MDSCs favorisent l'immunotolérance par la diminution des effets

cytotoxiques des NKs et des cellules T (Wen *et al.*, 2022). L'immunosurveillance des cellules immunitaires adaptatives dépend donc beaucoup de l'action des cellules immunitaires innées.

1.3.2.1.2 Les cellules immunitaires adaptatives

Le système immunitaire adaptatif, majoritairement composé de lymphocytes, joue un rôle essentiel dans la destruction immunitaire des tumeurs (Hanahan et Weinberg, 2011). Les cellules T cytotoxiques, aussi décrites par leur cluster de différenciation (CD)8+, détruisent les cellules cancéreuses (Kurachi, 2019). En situation d'inflammation chronique, comme retrouvée dans l'obésité, les cellules T CD8+ s'épuisent et perdent graduellement leurs fonctions de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines (Kurachi, 2019; Liu *et al.*, 2021; Mukherjee *et al.*, 2022). Un autre type de lymphocytes sont les cellules T régulatrices (Treg), ayant un CD4+. Les Treg sont des cellules immunosuppressives qui favorisent la carcinogenèse en diminuant l'activité cytotoxique des NKs et cellules T CD8+ (Wen *et al.*, 2022). Pour ce qui est des cellules T auxiliaires Th1 et Th2, des sous-populations de CD4+, leur ratio est important pour la réponse immunitaire antitumorale puisque les Th1 l'augmente alors que Th2 la réprime (Shang *et al.*, 2024). De plus, les cytokines produites par les Treg and Th2 induisent la polarisation des macrophages vers le type M2 (Wen *et al.*, 2022).

1.3.2.2 Les cellules souches

Le TME est aussi composé de MSCs. Ces cellules stromales sont capables de s'auto-renouveler et sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier en plusieurs tissus différents (Zuk *et al.*, 2002). Elles jouent un rôle dans l'homéostasie par la régénération tissulaire et l'immunomodulation. Deux principaux types de MSCs sont impliqués dans les cancers adultes, les MSCs adipocytaires (ADMSCs) et celles dérivées de la moëlle osseuse (BMMSCs) (Tian *et al.*, 2022).

Parmi les cellules souches provenant de la moëlle osseuse, on retrouve les cellules endothéliales progénitrices (EPCs). Celles-ci sont des cellules circulantes qui peuvent se différencier en cellules endothéliales (Ferrara, 2010; Yoder, 2012). Enfin, les cellules tumorales ayant acquis la capacité de se dédifférencier et de s'auto-renouveler sont considérées comme des cellules souches cancéreuses (CSCs) (Fan *et al.*, 2013; Hanahan et Weinberg, 2011).

1.3.2.3 L'implication des cellules souches dans le cancer

Les CSCs représentent l'une des causes de la résistance aux traitements anticancéreux; d'abord parce qu'elles peuvent devenir dormante et redémarrer la carcinogenèse par la suite (Hanahan, 2022; Hanahan et Weinberg, 2011), mais aussi parce qu'elles sont impliquées dans l'angiogenèse et ses processus alternatifs (Lizárraga-Verdugo *et al.*, 2020). Les EPCs, par leur capacité à se différencier en cellules épithéliales, participent aussi à la néovascularisation, surtout aux stades précoces du développement tumoral (Ferrara, 2010).

Les caractéristiques des MSCs peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques. Leur plasticité et leur auto-renouvellement les rendent inestimables pour la régénération des tissus et la guérison des plaies (Zuk *et al.*, 2002). Elles jouent un rôle dans l'immunomodulation par contact direct ou par la sécrétion paracrine de cytokines, chimiokines et autres facteurs solubles (Lan *et al.*, 2021; Taha *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2023b). Les MSCs sont aussi connues pour leur capacité à migrer au site tumoral (De Becker et Riet, 2016; Karnoub *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2021); cette caractéristique leur permet de transporter des traitements anticancéreux directement au TME (De Becker et Riet, 2016; Tian *et al.*, 2022). Les ADMSCs sont particulièrement intéressantes comme outil thérapeutique, car elles sont très stables, et elles peuvent facilement être isolées et cultivées à partir de cellules provenant de liposuccions (Hutchings *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2025; Zuk *et al.*, 2002).

Cependant, les MSCs peuvent aussi avoir des effets néfastes et favoriser le développement tumoral (Figure 1.7). Elles induisent la métastase et l'angiogenèse, aident à la résistance aux traitements, et altèrent la réponse immunitaire (Lan *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2021). Leur plasticité leur permet de se différencier en CSCs, en CAFs ou en péricytes (cellules entourant et stabilisant les vaisseaux sanguins) (Liang *et al.*, 2021). Les MSCs résistent aux ROS et à l'hypoxie (Wu *et al.*, 2025); en fait, l'hypoxie les protégerait de la sénescence (Tian *et al.*, 2022).

Dans le TME des tissus adipeux, les MSCs les plus abondantes sont les ADMSCs (Si *et al.*, 2019). Ces dernières peuvent se transformer en adipocytes matures, en passant par un stade de pré adipocytes (Hutchings *et al.*, 2020; Zwick *et al.*, 2018). Toutefois, étant multipotentes, elles peuvent également se différencier en d'autres types cellulaires, comme les cellules épithéliales, ce qui contribue à la néovascularisation en concomitance avec la sécrétion de facteur de croissance (Hutchings *et al.*, 2020). Finalement, les ADMSCs peuvent changer de phénotype sous l'influence des cellules cancéreuses et

devenir semblables aux CAAs. Ce changement est alors synonyme d'inflammation, de prolifération et d'invasion tumorales accrues (Dirat *et al.*, 2011; Gonzalez Suarez *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2019).

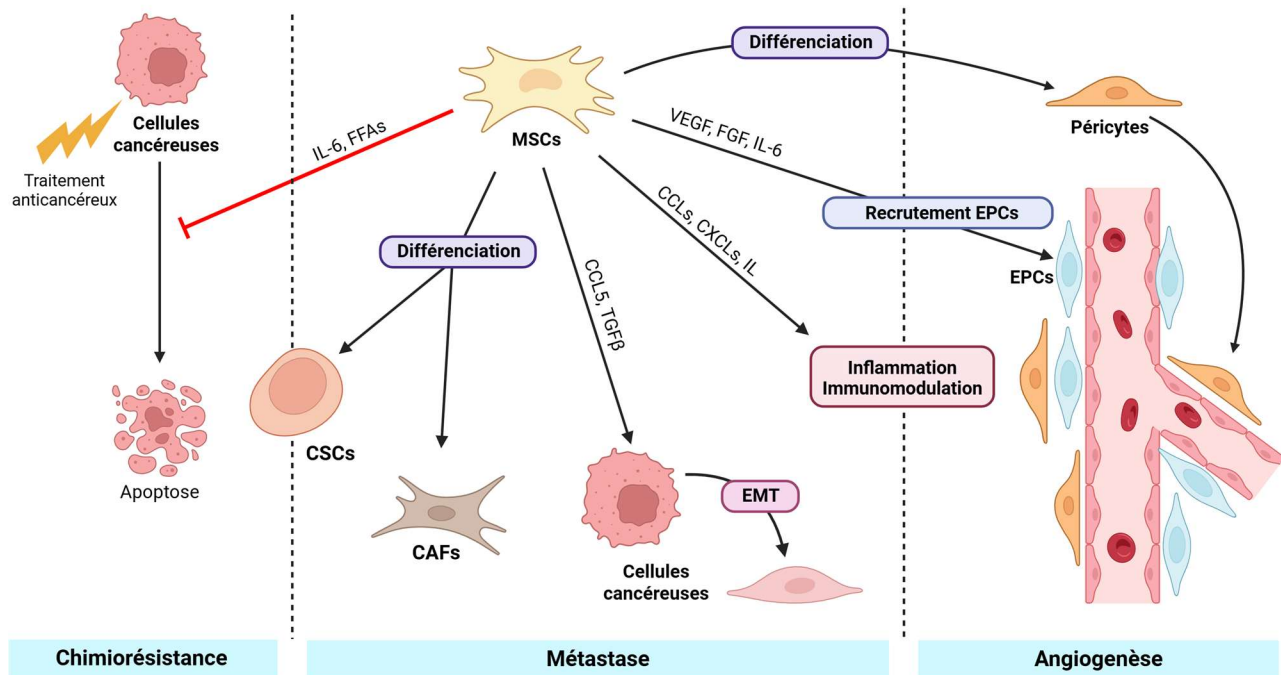


Figure 1.7. Les impacts des cellules souches mésenchymateuses sur le développement du cancer.

Les MSCs jouent plusieurs rôles dans le développement du cancer. Elles causent la chimiorésistance en inhibant les traitements anticancéreux et par leur différenciation en CSCs. Les MSCs peuvent aussi favoriser la métastase en induisant l'EMT, l'inflammation et l'immunomodulation ainsi que par leur différenciation en CSCs ou CAFs. Finalement, les MSCs stimulent l'angiogenèse par le recrutement d'EPCs, leur différenciation en péricyte et l'induction de l'inflammation et immunomodulation. (Figure créée avec Biorender, adaptée de (Liang *et al.*, 2021) avec des informations provenant de (Lan *et al.*, 2021), sous licence CC BY).

1.3.3 L'inflammation dans le microenvironnement tumoral

1.3.3.1 Les rôles paradoxaux de l'inflammation

L'inflammation dans le TME a des effets paradoxaux et complexes (Hanahan et Weinberg, 2011). La réponse inflammatoire est nécessaire pour prévenir plusieurs maladies, mais elle est aussi mise en cause dans plusieurs maladies auto-immunes et le cancer (Demir, 2023). Il s'agit d'une balance fragile et complexe entre molécules de signalisation et cellules immunes. La plupart d'entre eux ont des effets à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires selon leur environnement et la synergie avec les autres composantes du TME (Taha *et al.*, 2020).

L'inflammation aiguë se distingue de l'inflammation chronique par sa régulation dans le temps et l'espace. En effet, l'inflammation aiguë est un mécanisme de défense normal et souhaité qui sert à détruire les pathogènes envahissants et à réparer les blessures. Il s'agit d'un processus auto-régulé, local, et cherchant à restaurer l'homéostasie rapidement (Turizo-Smith *et al.*, 2024). L'inflammation chronique est plutôt caractérisée par une activation constante et systémique incontrôlée (Schäfer et Werner, 2008).

1.3.3.2 Les impacts de l'inflammation chronique sur le cancer

Plusieurs parallèles peuvent être faits entre le cancer et la guérison des blessures. Le cancer est comme une « plaie qui ne guérit pas » (Dvorak, 1986). En effet, si le processus de réparation est trop prolongé et excessif, il initie le développement tumoral qui peut progresser jusqu'à la métastase (Hanahan et Weinberg, 2011; Piotrowski *et al.*, 2020; Schäfer et Werner, 2008). Dans l'obésité, l'accumulation excessive de tissus adipeux, cause un déséquilibre hormonal et cytokinique, et maintient une inflammation chronique. C'est cette inflammation prolongée qui prédispose au cancer (Kolb *et al.*, 2016).

1.3.3.3 Les molécules impliquées dans l'inflammation tumorale

Plusieurs biomarqueurs de l'inflammation et de l'invasion sont bien étudiés dans le cadre du cancer. Premièrement, les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont les protéases les plus associées au cancer (Kessenbrock *et al.*, 2010) puisqu'elles dégradent les macromolécules retrouvées dans l'ECM. Elles permettent donc le remodelage du TME et elles facilitent également la métastase en augmentant la perméabilité des vaisseaux sanguins (Yuan *et al.*, 2023). Elles peuvent aussi libérer des facteurs de croissance séquestrés dans l'ECM (Klein et Bischoff, 2011). Les MMP-2 and MMP-9 sont des marqueurs des cancers agressifs comme les glioblastomes et les TNBC (Huang, 2018), mais les MMPs sont également produites par plusieurs cellulaires immunitaires, dont les CAFs, les neutrophiles et les TAMs (Demir, 2023; Zhao *et al.*, 2023b).

Deuxièmement, la protéine Snail est un marqueur de l'invasion tumorale, car elle est responsable de l'EMT. Elle dégrade la cadhérine épithéliale (E-cadhérine), une protéine d'adhérence, ce qui facilite la migration des cellules cancéreuses. Snail stimule aussi la production de MMPs (Fan *et al.*, 2013). Un autre marqueur tumoral, de l'inflammation cette fois, est la protéine pro-inflammatoire cyclooxygénase-2 (COX-2). Elle inhibe l'apoptose tout en augmentant la migration cellulaire et stimulant l'angiogenèse. Pour ce faire, elle augmente la production de MMPs, de ROS et de prostaglandine E2 (PGE2). À travers la PGE2, COX-2

stimule aussi la production de facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF), qui est la molécule principale induisant l'angiogenèse (Turizo-Smith *et al.*, 2024).

Ensuite, les chimiokines et les cytokines sont des facteurs solubles permettant le recrutement des cellules immunitaires et leur communication bidirectionnelle avec les cellules cancéreuses (Demir, 2023; Piotrowski *et al.*, 2020). Les cytokines et chimiokines sont produites par les cellules stromales, immunes et cancéreuses en réponse aux conditions hypoxiques et inflammatoires (Laha *et al.*, 2021; Piotrowski *et al.*, 2020). Les chimiokines pro-inflammatoires, plusieurs appartenant aux sous-familles C-C motif chimiokine ligands (CCL) et C-X-C motif chimiokine ligands (CXCL), sont des chimio-attractants pour les cellules immunes, les dirigeant jusqu'au TME où elles induisent la réponse immunitaire et la prolifération cellulaire (Li *et al.*, 2023). Il est intéressant de noter que les MSCs migrent de manière similaire aux sites tumoraux puisqu'elles expriment de multiples récepteurs de CCLs (CCR) et de CXCLs (CXCR) (Zhao *et al.*, 2023b).

Plusieurs chimiokines sont particulièrement étudiées dans le contexte du cancer. D'abord, CCL2, aussi appelée chimio-attractant de monocyte 1 (MCP-1), recrute les macrophages au sein du TME et les polarise en M2 (Hao *et al.*, 2020). CCL2 est aussi impliqué dans la survie et la croissance cellulaire ainsi que l'EMT (Zhao *et al.*, 2021). CCL5 recrute également les macrophages M2 et d'autres cellules myéloïdes tout en favorisant la métastase (Demir, 2023; Karnoub *et al.*, 2007). CXCL5 aide au recrutement des TAMs en plus d'augmenter la perméabilité vasculaire et, par conséquent, la métastase (Wen *et al.*, 2022). CXCL8, aussi classifié comme interleukine (IL-8), a les mêmes fonction que CXCL5, mais permet aussi la stimulation de l'angiogenèse et la production de MMPs, comme MMP-2 et MMP-9 (Hutchings *et al.*, 2020). Le CXCL8 sécrété par les CAFs permet aussi la transformation des macrophages en TAMs (Zhao *et al.*, 2023b).

Les cytokines sont des modulateurs de l'inflammation à la fois dans le cancer et l'obésité (Liu *et al.*, 2021). Les cytokines pro-inflammatoires clés sont les interleukines IL-1 β et IL-6 ainsi que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) (Gallagher et LeRoith, 2015; Liu *et al.*, 2021; Turner *et al.*, 2014). L'IL-1 β est produite entre autres par les neutrophiles, les TAMs, les MDSCs et les CAFs (Wang *et al.*, 2024; Zhao *et al.*, 2023b). Elle joue principalement un rôle immunosuppresseur et stimule les cellules T CD4 $^{+}$ pour leur différenciation en cellules T auxiliaires (Turner *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2024). L'IL-6 est produites par beaucoup de cellules différentes, dont les TAMs, les CAFs, les MSCs et les cellules cancéreuses (Demir, 2023). Elle a pour rôle d'activer les cellules T et de permettre la différenciation des Treg et les Th2 (Turner

et al., 2014). L'IL-6 augmente la quantité de ROS dans le TME et participe à la prolifération cellulaire, la migration et l'angiogenèse (Demir, 2023). Le TNF α , quant à lui, est une puissante cytokine pro-inflammatoire ayant des effets pléiotropiques. Dépendamment de la concentration et de la synergie avec les autres cytokines présentes dans le TME, il peut être protumoral ou non (Laha *et al.*, 2021). Il s'agit d'une cytokine très versatile qui influence l'apoptose, l'angiogenèse, le recrutement des cellules immunes et la régulation de leur réponse, le remodelage de l'ECM ainsi que l'EMT grâce à une communication croisée avec le facteur de transcription Snail (Laha *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024). Le TNF α stimule la sécrétion de plusieurs autres cytokines inflammatoires, comme IL-6 et IL-1 β , et même son auto-sécrétion (Turner *et al.*, 2014). Il recrute et stimule TAMS qui vont à leur tour produire du TNF α , créant une boucle de rétroaction positive (Laha *et al.*, 2021; Wen *et al.*, 2022). Les cellules T, les NKs, les neutrophiles, le WAT et les cellules cancéreuses sont aussi des sources importantes de TNF α (Demir, 2023; Rosen et Spiegelman, 2014).

Il est intéressant de noter que, dans les tissus adipeux, le phénotype CAA est associé avec la surexpression de CCL2, CCL5, IL-1 β , IL-6, TNF α et VEGFA (Dirat *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2019). De même, l'obésité cause un important recrutement des macrophages dans le WAT par la production de CCL2, CCL3 et CCL5. Les macrophages sont aussi attirés par la forte présence d'apoptose chez les adipocytes hypertrophiés, renforçant l'inflammation chronique par la libération accrue de FFA (Kolb *et al.*, 2016).

1.3.3.4 Les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation tumorale

En plus du double rôle des cellules immunitaires et des molécules de signalisation, la multitude de voies de signalisation impliquées rendent le processus inflammatoire très complexe. Les principales voies de l'inflammation sur lesquelles les MSCs exercent une influence sont MAPK, PI3K/AKT, NF- κ B, WNT, MYC, Hippo et JAK/STAT (Figure 1.8) (Chen *et al.*, 2019; Lan *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023b).

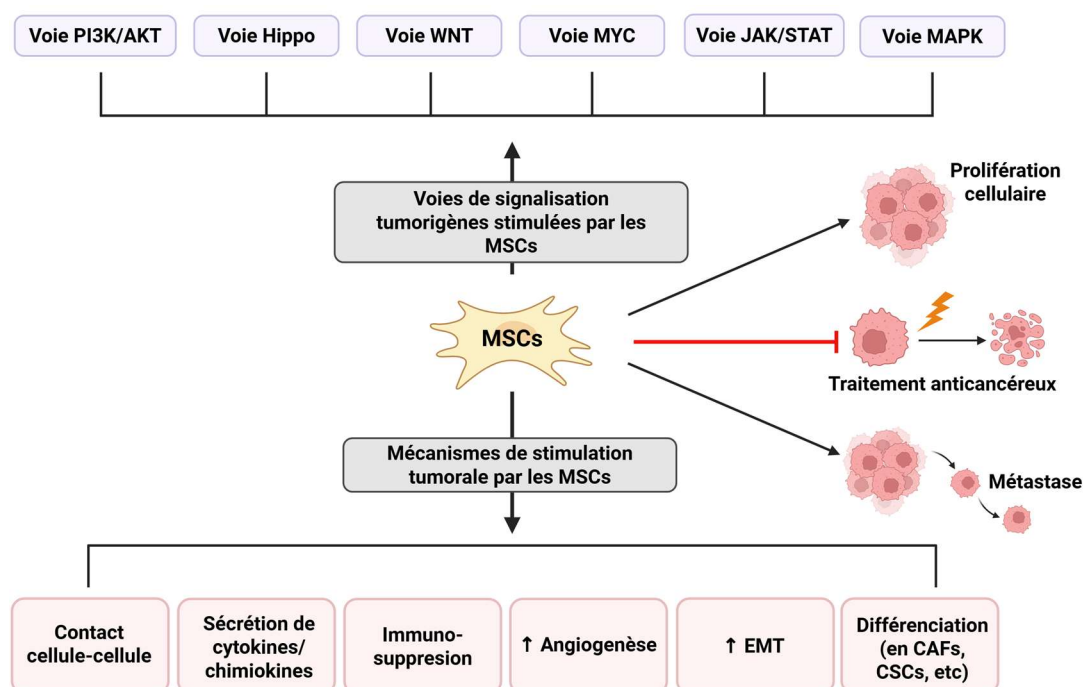


Figure 1.8. Voies de signalisation de l'inflammation et les mécanismes de stimulation du développement tumoral associés aux MSCs

Les MSCs utilisent 6 voies de signalisation associée à l'inflammation pour stimuler la tumorigenèse : les voies PI3K/AKT, Hippo, WNT, MYC, JAK/STAT et MAPK. La stimulation du développement tumoral par les MSCs passent par 9 mécanismes : la prolifération cellulaire, l'inhibition des traitements anticancéreux, la métastase, le contact cellule-cellule, la sécrétion de cytokines et chimiokines, l'immunosuppression, l'angiogenèse, l'EMT, et la différenciation (en CAFs, CSCs, etc.) (Figure créée avec Biorender, adaptée (Zhao *et al.*, 2023b) et (Lan *et al.*, 2021), sous licence CC BY).

D'abord, la voie de signalisation MAPK (protéine kinase activée par des agents mitogènes) regroupe aussi les voies de signalisation ERK (kinases activées par signaux extracellulaires) et JNK (kinase C-Jun N-terminal). Elles sont activées par IL-1 β et TNF α (Turner *et al.*, 2014). Elles régulent l'inflammation, l'apoptose, la différenciation et la survie cellulaire (Hu *et al.*, 2021). Ce sont aussi des voies liées au métabolisme et impliquées dans l'inflammation chronique due à l'obésité (Kolb *et al.*, 2016). Ensuite, la voie de signalisation PI3K/AKT (Phosphoinositide 3-kinase/AKT) est activée par plusieurs cytokines, chimiokines, antigènes et facteurs de croissance, dont beaucoup sont sécrétés par MSCs (Hu *et al.*, 2021; Lan *et al.*, 2021). Cette voie influence la prolifération cellulaire aberrante, la plasticité des cellules souches et la métastase (Lan *et al.*, 2021). Quant à elle, la voie de signalisation NF- κ B (facteur nucléaire kappa B) exerce un double rôle : d'un côté, NF- κ B régule l'homéostasie et du métabolisme, et, de l'autre, elle stimule l'inflammation et la réponse immunitaire (Guo *et al.*, 2024). Elle favorise l'angiogenèse, l'invasion et l'EMT (Piotrowski *et al.*, 2020) et entraîne la surexpression de COX-2, IL-1 β , IL-6 et TNF α (Guo *et al.*, 2024; Hu *et al.*, 2021). NF- κ B est activée par plusieurs ligands, dont IL-1 β , CCL5, et TNF α ainsi que par des stimuli comme les ROS, les antigènes bactériens, et les rayons ultraviolets. Elle agit aussi sur les voies MAPK

et PI3K/AKT (Guo *et al.*, 2024). Pour ce qui est de la voie de signalisation WNT, elle est aussi impliquée dans inflammation chronique et le stress oxydatif à travers la voie NF- κ B (Guo *et al.*, 2024; Vallée *et al.*, 2019). Cependant, WNT est majoritairement un régulateur de l'homéostasie et du développement tissulaire; dans le contexte cancéreux, il permet de conserver la plasticité des CSCs et favorise l'entretien des télomères (Lan *et al.*, 2021).

La voie de signalisation MYC est particulière puisqu'il s'agit d'un oncogène exprimé anormalement dans plus de 70% des cancers. Elle favorise le développement tumoral, l'EMT et l'apoptose (Dhanasekaran *et al.*, 2022; Lan *et al.*, 2021). Via l'interaction avec d'autres voies de signalisation, MYC a aussi un effet inflammatoire et immunosuppresseur (Dhanasekaran *et al.*, 2022). La voie de signalisation Hippo est impliqué dans la réparation tissulaire, la prolifération cellulaire, l'homéostasie et la croissance des organes (Lan *et al.*, 2021; Lv et Zhou, 2023). Cependant, elle joue aussi un rôle dans le développement tumoral par son inhibition de YAP/TAZ (Lan *et al.*, 2021). Lorsqu'Hippo est dérégulée par le cancer, YAP/TAZ sont surexprimées et vont stimuler l'inflammation, l'enrichissement des CSCs, la métastase et la résistance aux traitements (Lan *et al.*, 2021; Zanconato *et al.*, 2016).

La dernière voie de signalisation est JAK/STAT (Janus kinase/transducteur du signal et activateur de la transcription), plus précisément JAK2/STAT3, qui est particulièrement intéressante en oncologie. En effet, STAT3 est constitutivement activé dans plusieurs types de cancer, c'est-à-dire qu'il n'a pas besoin de signal pour son activation. JAK2/STAT3 maintient une inflammation chronique favorisant la croissance et la survie cellulaire tumorale, la différenciation, l'invasion, et l'immunosuppression (Brooks et Putoczki, 2020; Kohal *et al.*, 2024; Turizo-Smith *et al.*, 2024). STAT3 participe aussi à l'angiogenèse par la surexpression de VEGF et de MMPs (Gao *et al.*, 2017).

Beaucoup de récepteurs sont associés avec JAK2/STAT3, permettant l'activation de cette voie de signalisation par un large éventail de facteurs de croissance, cytokines et chimiokines, comme l'IL-1 β et la leptine (Boussoik et Montazeri Aliabadi, 2018; VanSaun, 2013). Toutefois, son activation classique se fait par IL-6 via son récepteur (IL-6R α) et GP130 (Brooks et Putoczki, 2020). Une fois le ligand lié à son récepteur, JAK2 est phosphorylé et transfère son phosphate à STAT3 qui se dimérise. STAT3 est ensuite transloqué au noyau où il agit comme facteur de transcription pour plusieurs gènes de survie et de prolifération cellulaire (Kohal *et al.*, 2024). Différents récepteurs forment des pré-assemblages avec JAK2 en attente de leur ligand, permettant une transduction plus rapide du signal. C'est le cas de TNFR1, qui est impliqué dans l'activation

non classique de JAK2/STAT3 par le TNF α (Figure 1.9) (Guo *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2021; Mori *et al.*, 2011). JAK2/STAT3 peut aussi influencer les voies PI3K/AKT, MAPK, ERK et NF- κ B, et inversement (Boussoik et Montazeri Aliabadi, 2018; Hu *et al.*, 2021; Pincheira *et al.*, 2008). La voie JAK2/STAT3 est donc une cible thérapeutique de choix par son impact sur différentes voies de signalisation et son implication dans plusieurs processus de tumorigenèse, comme l'inflammation et l'angiogenèse.

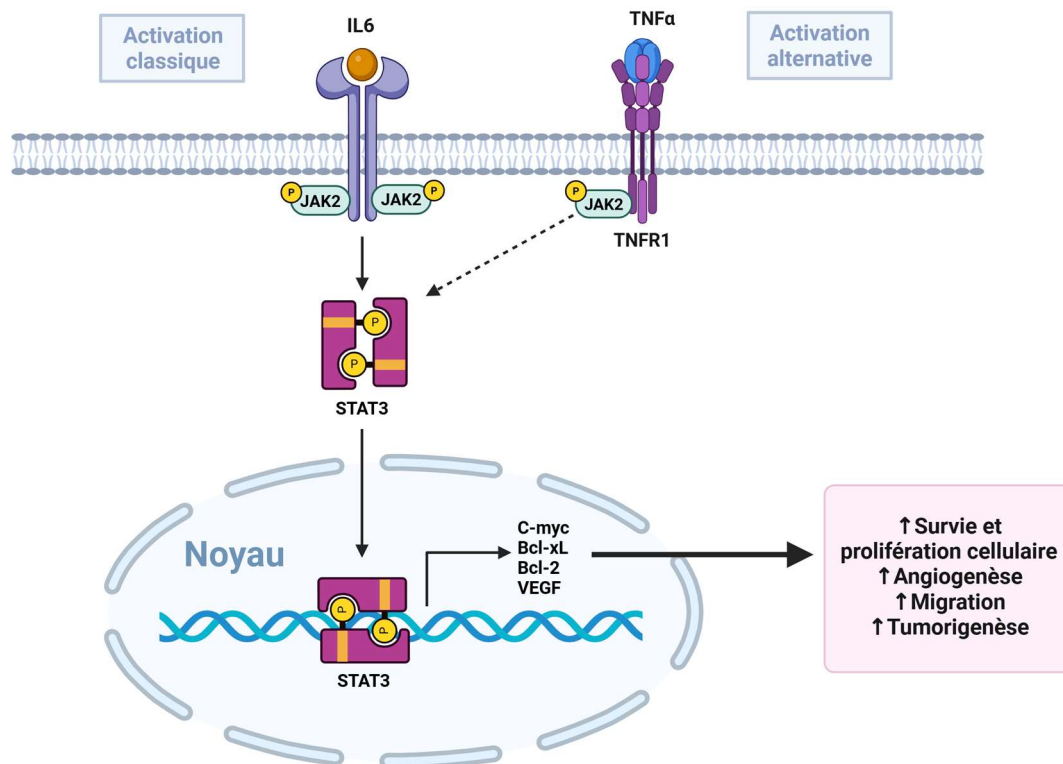


Figure 1.9. Activation classique et alternative de la voie de signalisation JAK2/STAT3.

La voie de signalisation JAK2/STAT3 peut être activée classiquement par IL-6 ou alternativement par TNF α . Une fois le ligand lié à son récepteur, JAK2 est phosphorylé et phosphoryle ensuite STAT3. STAT3 se dimérise et est transloqué au noyau où il transcrit plusieurs gènes. Ceux-ci stimulent la survie et la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la migration et la tumorigenèse (Figure créée avec Biorender, adaptée de (Kohal *et al.*, 2024) avec des informations de (Hu *et al.*, 2021), avec la permission d'Elsevier).

1.4 La vascularisation tumorale

1.4.1 L'angiogenèse et ses mécanismes alternatifs

La vascularisation des tumeurs est essentielle à leur développement. Les cellules ont normalement besoin de se trouver à moins de 100 μ m d'un vaisseau sanguin pour assurer leur survie; le manque d'oxygène et de nutriments ainsi que l'accumulation de déchets métaboliques et du CO₂ sont des facteurs limitant de la croissance tumorale (Hanahan et Weinberg, 2011). Pour remédier à cette situation, les cellules

cancéreuses peuvent donc avoir recours à différents processus de néovascularisation. Le mécanisme principal est l'angiogenèse, ce qui en fait une cible importante pour les traitements anticancéreux (Cao *et al.*, 2009; Iwamoto *et al.*, 2018). L'activation angiogénique stimule les cellules endothéliales quiescentes à bourgeonner et former de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux déjà existants (Luo *et al.*, 2020; Ribatti *et al.*, 2023). Toutefois, les vaisseaux créés ainsi sont désorganisés et inégaux avec un ECM et des péricytes mal attachés aux cellules épithéliales (Ferrara, 2010). Le VEGFA, induit par l'hypoxie, est l'activateur principal de l'angiogenèse; il stimule la prolifération et la survie des cellules épithéliales en plus d'augmenter la perméabilité vasculaire (Haibe *et al.*, 2020). Le VEGF peut provenir de nombreuses sources du TME, telles que les cellules cancéreuses, les adipocytes matures, les CAFs, les TAMs, et les MSCs (Demir, 2023; Ferrara, 2010; Gonzalez Suarez *et al.*, 2022; Kolb *et al.*, 2016; Mukherjee *et al.*, 2022). Les MMPs, comme MMP-9, peuvent aussi libérer le VEGF séquestré dans l'ECM (Bergers *et al.*, 2000; Kessenbrock *et al.*, 2010).

Les traitements anti-angiogéniques ciblent directement VEGFA à l'aide d'anticorps ou bloquent ses récepteurs (Ferrara, 2010). Néanmoins, certains cancers présentent une résistance initiale aux traitements anti-angiogéniques alors que certains patients acquièrent plutôt une résistance avec le temps. Cette résistance peut s'expliquer, en partie, par l'augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogénique induite par l'hypoxie. De plus, il y a de la redondance au niveau des signaux angiogénique avec le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), l'angiopoïétine (Ang) 2 et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Cao *et al.*, 2009; Herrera-Vargas *et al.*, 2021; Ribatti *et al.*, 2023).

Une autre raison expliquant la résistance aux traitements est l'existence de processus alternatifs à l'angiogenèse (Figure 1.10). Premièrement, la vasculogenèse s'en différencie par la création *de novo* de vaisseaux sanguins à partir du recrutement et de la différenciation d'EPCs en cellules épithéliales qui migrent directement à la tumeur. Deuxièmement, l'angiogenèse intussusceptive se caractérise par la croissance de tissu interstitiel à l'intérieur même du lumen d'un vaisseau existant, le divisant en deux (Luo *et al.*, 2020; Ribatti *et al.*, 2023). Quant à elle, la co-option de vaisseaux est la réquisition des vaisseaux existants par les cellules cancéreuses; elle est surtout présente dans les organes déjà fortement vascularisés, comme le cerveau et les poumons, et associé à un phénotype invasif et prolifératif (Lugassy *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2020; Ribatti *et al.*, 2023). De manière similaire, l'angiotropisme est le remplacement des péricytes par des cellules cancéreuses, mais il est associé à un phénotype migratoire

plutôt qu'invasif. En effet, les cellules cancéreuses ne métastasent pas en empruntant le vaisseau sanguin, mais vont migrer en suivant la surface externe du vaisseau sanguin (Lugassy *et al.*, 2020).

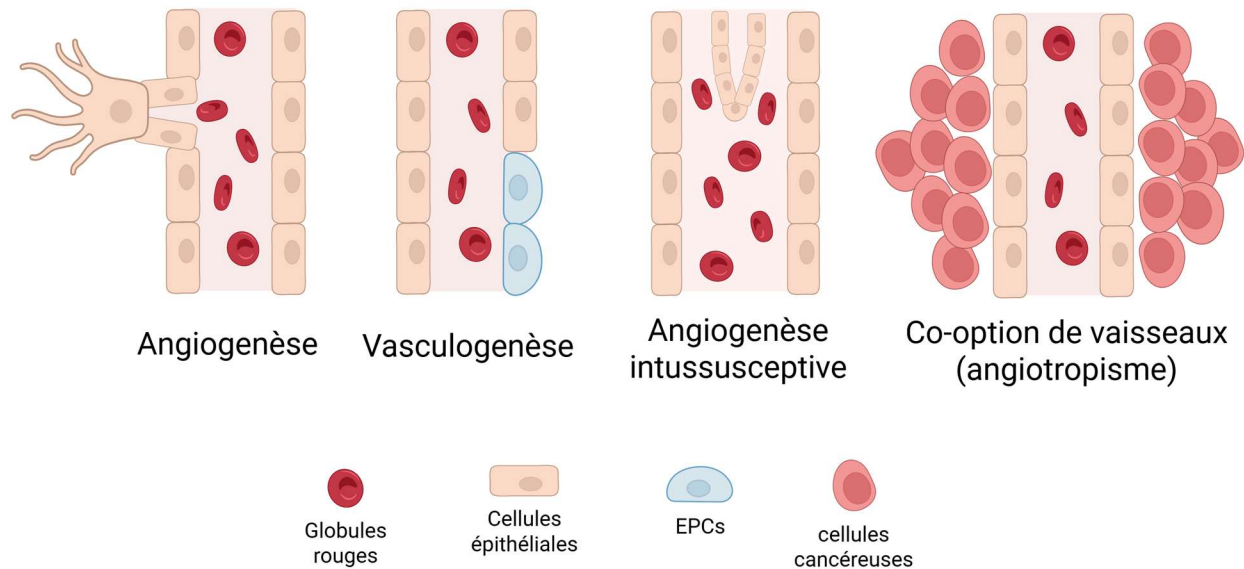


Figure 1.10. Les différents mécanismes de vascularisation tumorale par les cellules épithéliales.

L'angiogenèse est la création de nouveaux vaisseaux sanguins par le bourgeonnement des cellules épithéliales de vaisseaux existants. La vasculogenèse est la création de nouveaux vaisseaux sanguins par le recrutement et la différenciation de EPCs en cellules épithéliales. L'angiogenèse intussusceptive est la création de nouveaux vaisseaux sanguins dans le lumen de vaisseaux existants. La co-option de vaisseaux et l'angiotropisme est l'utilisation de vaisseaux existants par les cellules cancéreuses. (Figure créée avec Biorender, adaptée de (Luo *et al.*, 2020), sous licence CC BY).

1.4.2 Le mimétisme vasculogénique

Le dernier mécanisme alternatif à l'angiogenèse est le mimétisme vasculogénique (VM). Il est caractérisé par la formation *de novo* de structures capillaires par des cellules non-endothéliales (Maniotis *et al.*, 1999). Ces structures forment une pseudo-vasculature très poreuse mais fonctionnelle permettant une microcirculation tumorale (Folberg *et al.*, 2000; Folberg et Maniotis, 2004). Le concept du VM a été mis en lumière en 1999 (Luo *et al.*, 2020; Maniotis *et al.*, 1999), et, depuis, il est étudié dans plusieurs types de cancers, comme les mélanomes, les glioblastomes, le TNBC et les cancers du côlon (El Hallani *et al.*, 2010; Gonzalez Suarez *et al.*, 2021; Luo *et al.*, 2020). Le VM en ressort comme un marqueur de cancers agressifs et de mauvais pronostic, par son association avec la métastase et de plus grands risques de récurrence des tumeurs (Ribatti *et al.*, 2023).

Plusieurs études ont démontré que les structures capillaires du VM sont formées à partir de CSCs (Lizárraga-Verdugo *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2020). La plasticité de ces cellules leur permet d'imiter les cellules épithéliales sans se différencier complètement. En effet, les CSCs sont positives pour la cadhérine vasculaire endothéliale (VE-cadhérine), un marqueur de cellules endothéliales; cependant, elles sont négatives pour CD31, aussi appelé marqueur endothélial PECAM-1 (molécule d'adhésion des cellules endothéliales et des plaquettes 1), et restent identifiables par un marqueur spécifique aux CSCs (CD133+) (Fernández-Cortés *et al.*, 2019; Folberg et Maniotis, 2004). Les CSCs se différencient donc partiellement et vont de la tumeur vers les vaisseaux sanguins, les connectant et permettant un apport nutritif suffisant. De plus, la présence de péricytes, tel que testé en co-culture *in vitro*, semble permettre une stabilisation des structures (Fernández-Cortés *et al.*, 2019).

Il existe une deuxième forme moins étudiée de VM, le VM à motif matriciel. Celle-ci ne forme pas de structures capillaires mais plutôt des canaux dans l'ECM bordés par des cellules cancéreuses (Figure 1.11) (Herrera-Vargas *et al.*, 2021). La présence *in vivo* des deux types de VM a été confirmée par immunohistochimie, microscopie photonique et microscopie (Valdivia *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2007).

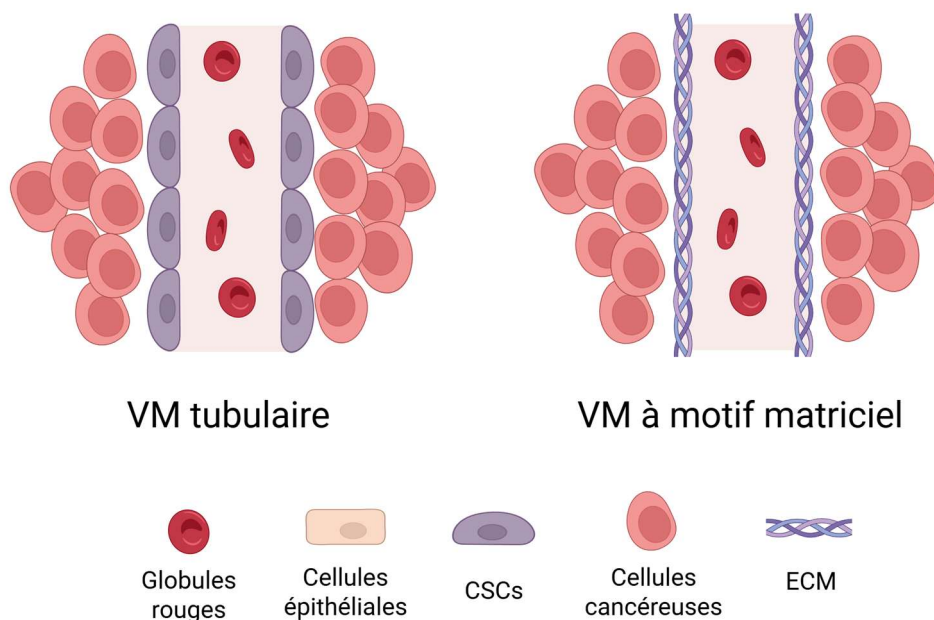


Figure 1.11. Les différents types de mimétisme vasculogénique.

Le VM tubulaire implique la création de structures capillaires formées sans cellules épithéliales et bordées de CSCs. Le VM à motif matriciel ne contient pas de CSCs, le canal étant formé d'ECM et bordés de cellules cancéreuses (Figure créée avec Biorender, adaptée de (Luo *et al.*, 2020), sous licence CC BY).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la formation de structures capillaires de type VM. Tout d'abord, il nécessite une plasticité des cellules et le recours à l'EMT, d'où l'importance des CSCs. Les MMPs jouent un rôle important dans le remodelage de l'ECM pour accommoder la formation des nouvelles structures (Valdivia *et al.*, 2019). Ensuite, tout comme l'angiogenèse, le VM est induit par l'hypoxie et le VEGFA, malgré l'absence de cellules épithéliales (Cao *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2020). Le VM est aussi associé à une augmentation de la VE-cadhérine, une protéine liée à l'adhérence cellule-cellule (Herrera-Vargas *et al.*, 2021; Luo *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2007). (Luo *et al.*, 2020) Les voies de signalisation de PI3K/AKT et WNT sont impliquées (Herrera-Vargas *et al.*, 2021; Luo *et al.*, 2020). De plus, Le VM est régulé positivement ou négativement par divers micro ARNs (miRNAs), des ARNs non codants permettant la suppression de l'expression de nombreux gènes (Luo *et al.*, 2020; Wan *et al.*, 2022). Finalement, l'obésité pourrait avoir un effet sur le VM à travers l'effet stimulateur de la leptine et de l'inflammation (Fernández-Cortés *et al.*, 2019; Herrera-Vargas *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2007). Ainsi, mieux comprendre le VM et le rôle des différents acteurs impliqués dans la néovascularisation tumorale est un enjeu majeur pour la lutte contre le cancer, en particulier ceux associés à l'obésité.

1.5 Projet de recherche

1.5.1 Problématique

Le VM joue donc un rôle complémentaire ou alternatif à l'angiogenèse tumorale. La formation de structures capillaires par les CSCs est indicateur d'un mauvais pronostic et de cancers agressifs. Récemment, de nouvelles recherches ont exploré la possibilité que les MSCs puissent elles aussi participer au VM et ainsi contribuer à la vascularisation alternative des tumeurs (Bhuniya *et al.*, 2022; Roy *et al.*, 2024a; Rytlewski *et al.*, 2015). Plusieurs voies de signalisation ont été explorées pour expliquer les mécanismes du VM, dont YAP-TAZ/Hippo (Roy *et al.*, 2024b; Wan *et al.*, 2022) et JAK/STAT3 passant par la tyrosine kinase Src (Roy *et al.*, 2024a). Cependant, toutes ces études ont été faites sur des BMMSCs. La contribution potentielle des ADMSCs au VM reste donc très peu connue. Considérant le lien entre le cancer et l'obésité, nous nous sommes penchés sur l'impact des ADMSCs non-différenciées dans la vascularisation tumorale et l'inflammation via le VM.

1.5.2 Hypothèse

Notre étude s'inscrit dans le contexte des recherches précédemment effectuées par la Dre Narjara Gonzalez-Suarez dans notre laboratoire, utilisant une lignée commerciale et bien caractérisée d'ADMSCs humaines. Ses résultats avaient démontré que les cellules cancéreuses créent une synergie avec les adipocytes, chacun s'influençant via leur sécrétome respectif. Les ADMSCs, différenciées ou non, créent également une communication bidirectionnelle avec les cellules cancéreuses et les adipocytes matures (Gonzalez Suarez *et al.*, 2023; Gonzalez Suarez *et al.*, 2022; Gonzalez Suarez *et al.*, 2021). Ainsi, nous souhaitons savoir si les ADMSCs peuvent sortir de ce cycle et favoriser la tumorigenèse, autrement que par la signalisation paracrine, en contribuant elles-mêmes possiblement au VM (Figure 1.12).

Nous émettons l'hypothèse que les ADMSCs ont la capacité de participer à la vascularisation tumorale par la formation de structures capillaires de type VM, et que ce phénotype est associé à une signature moléculaire inflammatoire régulée par la voie JAK2/STAT3.

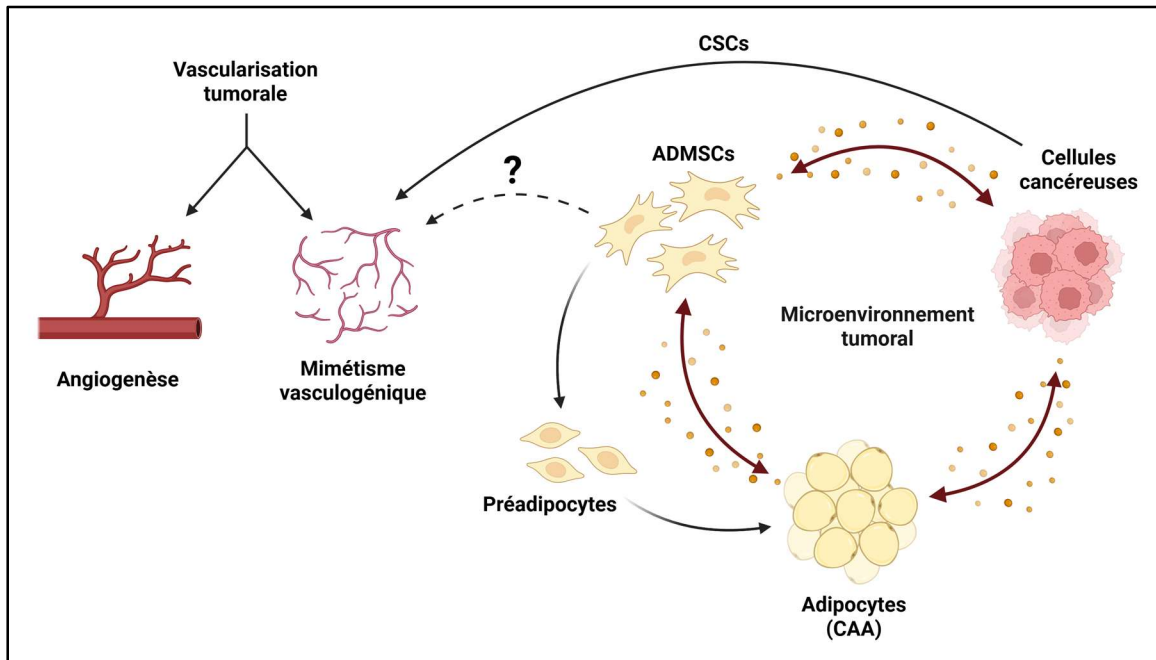


Figure 1.12. Hypothèse et contexte du projet.

Les ADMSCs, les cellules cancéreuses et les adipocytes établissent une communication bidirectionnelle entre elles. Les ADMSCs peuvent se différencier en préadipocytes puis en adipocytes matures. Les cellules cancéreuses peuvent également se différencier en CSCs et ainsi participer au mimétisme vasculogénique, un processus alternatif à l'angiogenèse dans la vascularisation tumorale. La question posée est : est-ce que les ADMSCs pourraient également participer au mimétisme vasculogénique ? (Figure créée avec Biorender).

1.5.3 Objectifs du projet

Les objectifs de notre étude reposent donc sur l'analyse différentielle des phénotypes moléculaires de cultures d'ADMSCs sur une matrice tridimensionnelle imitant le TME ou en monocouche sans matrice, et se déclinent comme suit :

- Évaluer si les ADMSCs ont la capacité à former des structure capillaires caractéristiques du VM *in vitro*;
- Caractériser la signature moléculaire inflammatoire induite par le VM dans les ADMSCs;
- Comparer cette signature moléculaire associée au VM à un profil pro-inflammatoire classique tel qu'induit par le TNF α dans les ADMSCs;
- Évaluer l'implication de la voie de signalisation JAK2/STAT3 dans la formation de structure capillaires VM *in vitro* et dans l'induction d'une signature moléculaire inflammatoire.

CHAPITRE 2

ARTICLE : EVIDENCE FOR A JAK2/STAT3 PROINFLAMMATORY AND VASCULOGENIC MIMICRY INTERRELATED MOLECULAR SIGNATURE IN ADIPOCYTE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL/STEM CELLS

Carolane Veilleux¹, Marie-Ève Roy¹, Alain Zgheib¹, Michel Desjarlais², et Borhane Annabi¹

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie and CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada, H3C 3P8; ²Département d'ophtalmologie, Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, H3T 1J4

Manuscrit publié en juin 2025 dans Cell Communication and Signaling, **23**, 291.

DOI : 10.1186/s12964-025-02298-6

Contribution des auteurs

Conceptualisation : Carolane Veilleux, Borhane Annabi; Investigation, Carolane Veilleux; Méthodologie : Carolane Veilleux, Marie-Ève Roy et Alain Zgheib; Conservation des données : Carolane Veilleux, Marie-Ève Roy et Alain Zgheib; Analyse formelle : Carolane Veilleux, Marie-Ève Roy, Alain Zgheib et Borhane Annabi; Montage des figures : Carolane Veilleux et Borhane Annabi; Acquisition du financement : Borhane Annabi; Supervision : Borhane Annabi; Écriture – ébauche originale : Carolane Veilleux et Borhane Annabi; Écriture – révision et corrections : Carolane Veilleux, Marie-Ève Roy, Michel Desjarlais, et Borhane Annabi. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

2.1 Résumé

Contexte : Lors de l'obésité, l'accumulation excessive de graisse dans les tissus favorise une dérégulation de l'homéostasie hormonale et cytokinique, déclenchant une inflammation chronique, associée, en partie, à une incidence accrue de certains cancers. Cet environnement inflammatoire protumoral est exacerbé par le sécrétome des adipocytes matures, qui favorise l'angiogenèse tumorale. De nouvelles études suggèrent que les cellules stromales/souches mésenchymateuses dérivées d'adipocytes humains (ADMSCs) pourraient contribuer à un processus complémentaire favorisant l'angiogenèse locale, appelé mimétisme vasculogénique (VM). Les mécanismes moléculaires reliant les ADMSCs au VM et à l'inflammation restent mal compris.

Méthodes : Des structures tridimensionnelles (3D) de type capillaire ont été générées par ensemencement d'ADMSCs sur Cultrex. Une analyse structurale a été réalisée à l'aide de Wimasis. L'ARN total a été extrait par TRIzol et des RT-qPCR ont été réalisées pour évaluer l'expression génique basale ou par criblage. La répression génique transitoire de JAK2/STAT3 a été réalisée par transfection cellulaire avec un siRNA spécifique contre STAT3. Des lysats protéiques ont été récoltés et utilisés pour l'immunobuvardage de type Western. La migration cellulaire en temps réel a été réalisée avec le système xCELLigence.

Résultats : Nos résultats révèlent que la culture *in vitro* des ADMSCs sur Cultrex conduit à la formation de structures 3D de type capillaire et à l'acquisition d'une signature moléculaire inflammatoire. Les ADMSCs formant du VM partagent une signature moléculaire pro-inflammatoire commune similaire à celle induite dans les monocouches 2D d'ADMSCs par le facteur de nécrose tumorale (TNF)-alpha et sont caractérisées par une surexpression de *COX2*, *CCL2*, *CCL5*, *CXCL5*, *CXCL8*, *IL-6*, *SNAI1* et *MMP9*. Il est intéressant de noter que l'inhibition pharmacologique ou la répression génique de la voie de signalisation JAK2/STAT3 réduit la migration cellulaire chimiotactique, le VM *in vitro* ainsi que l'expression de biomarqueurs pro-inflammatoires et invasifs.

Conclusions : Dans l'ensemble, nous fournissons de nouvelles évidences que l'inhibition du VM régulé par JAK2/STAT3 peut également modifier l'acquisition d'une signature pro-inflammatoire et empêcher la contribution des ADMSCs aux processus alternatifs de néovascularisation tumorale.

2.2 Abstract

Background: During obesity, the excessive accumulation of fat in tissue promotes dysregulated hormonal and cytokine homeostasis that triggers chronic inflammation, which is, in part, associated with an increased incidence of some cancers. This protumoral inflammatory environment is further exacerbated through the secretome of mature adipocytes, which promotes tumor angiogenesis. Emerging studies suggest that human adipocyte-derived mesenchymal stromal/stem cells (ADMSCs) may contribute to a complementary process supporting local angiogenesis termed vasculogenic mimicry (VM). The molecular mechanisms linking ADMSCs to VM and inflammation remain poorly understood.

Methods: ADMSC three-dimensional (3D) capillary-like structures were generated upon seeding on Cultrex. Structure analysis was performed using Wimasis. Total RNA was extracted using TRIzol and RT-qPCR was performed to assess gene expression or screen RT² PCR arrays. Transient gene repression of JAK2/STAT3 was performed by transfecting cells with a specific siRNA against STAT3. Protein lysates were harvested and used for Western blotting. Real-time cell migration was performed with the xCELLigence system.

Results: Our findings revealed that *in vitro* priming of ADMSCs with Cultrex leads to the formation of 3D capillary-like structures and the acquisition of an inflammatory molecular signature. VM-derived ADMSCs share a common proinflammatory molecular signature similar to that induced in 2D ADMSC monolayers by tumor necrosis factor (TNF)-alpha and are characterized by upregulated expression of *COX2*, *CCL2*, *CCL5*, *CXCL5*, *CXCL8*, *IL-6*, *SNAI1*, and *MMP9*. Interestingly, pharmacological inhibition or gene silencing of the JAK2/STAT3 signaling pathway reduces chemotactic cell migration, *in vitro* VM and the expression of proinflammatory and invasive biomarkers.

Conclusions: Overall, we provide novel evidence that inhibiting JAK2/STAT3-regulated VM can also alter the acquisition of a proinflammatory signature and prevent the contribution of ADMSCs to alternative tumor neovascularization processes.

2.3 Background

Cancer remains one of the leading death causes in the world (World Health Organization, 2025). It is worsened by the widespread obesity pandemic which has been linked with poor cancer prognosis (Lauby-Secretan *et al.*, 2016). Several studies have in fact closely associated obesity with a minimum of 13 types of cancer and the excess adipose tissue represents a key initial component promoting tumor initiation and

metastasis processes (Brown et Scherer, 2023; Mukherjee *et al.*, 2022). Moreover, obese patients present more risk of developing a second independent cancer (Park et Colditz, 2021). Among the key pathological processes caused by obesity that contribute greatly to carcinogenesis, one can observe the creation of a chronic and sustained inflammatory microenvironment favorable to the development of tumors. This phenotype is characterized by a systemic imbalance of hormones levels, and importantly, proinflammatory cytokine and chemokine upregulation (Kolb *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2021; Mukherjee *et al.*, 2022). Additionally, the mature adipocyte secretome is suggested to establish inflammatory conditions that support the emergence of aggressive cancer phenotypes, including solid tumors vascularization processes (Demir, 2023; Gonzalez Suarez *et al.*, 2022; Kolb *et al.*, 2016; Mukherjee *et al.*, 2022).

Tumor angiogenesis, defined as the sprouting of new blood vessels from existing vessels and known as a hallmark of cancer (Hanahan et Weinberg, 2000; Iwamoto *et al.*, 2018), is a classical targeting strategy in cancer treatment (Cao *et al.*, 2009; Iwamoto *et al.*, 2018). However, the existence of complementary alternative neovascularization mechanisms, such as vasculogenic mimicry (VM), leads to therapy resistance and a poor prognosis for patients. VM involves the development of capillary-like structures by non-endothelial cells (Folberg et Maniotis, 2004; Maniotis *et al.*, 1999) which generates a leaky but still functional pseudovasculature that provides the tumor with nutrients and oxygen through microcirculation (Folberg *et al.*, 2000; Folberg et Maniotis, 2004). VM has been studied in many aggressive cancer types, including melanomas, glioblastomas, and breast cancer (El Hallani *et al.*, 2010; Gonzalez Suarez *et al.*, 2021; Maniotis *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2014), found induced by hypoxia (Liu *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2015; Wechman *et al.*, 2020), and linked to increased expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) biomarkers in metastatic and invasive phenotypes (Folberg *et al.*, 2000; Qiao *et al.*, 2015; Wechman *et al.*, 2020). Recent studies also link the occurrence of VM to cancer stem cells (CSCs), whose plasticity allows to mimic endothelial cells and create *de novo* blood vessels (Fan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Wechman *et al.*, 2020).

Emerging studies now suggest that circulating mesenchymal stem cells (MSCs) actively contribute to VM in the tumor microenvironment (TME) (Bhuniya *et al.*, 2022; Roy *et al.*, 2024a; Rytlewski *et al.*, 2015) as they can mobilize towards tumors in response to cues from cancer cells to support neovascularisation (De Becker et Riet, 2016; Lan *et al.*, 2021). In the case of tumors within adipose tissue, the TME contains a significant population of MSCs, namely the adipocyte-derived mesenchymal stromal/stem cells (ADMSCs), whose potential contribution to VM remains poorly understood.

Given their mesenchymal phenotype, we questioned whether ADMSC could form three-dimensional (3D) capillary-like structures and contribute to *in vitro* VM. We further questioned whether VM could lead to the acquisition of a proinflammatory molecular signature and the contribution of the Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription (STAT3) (JAK2/STAT3), an important signaling pathway involved in cell and proliferation, angiogenesis and metastasis (Banerjee et Resat, 2016). Our study revealed that *in vitro* priming of ADMSC on Cultrex, an extracellular matrix (ECM) and growth factors-enriched extract from murine tumors, induces the formation of 3D capillary-like structures and is correlated with a proinflammatory molecular signature. This phenotype shares specific similarities with the TNF α -induced inflammation profile in 2D monolayers of ADMSCs. Pharmacological and transient gene repression of the JAK2/STAT3 signaling pathway attenuated VM formation and reduced the expression of proinflammatory markers genes. Considering the molecular crosstalk between obesity and cancer, our study highlights a potential proinflammatory paracrine control of ADMSCs in carcinogenesis upon VM. These findings also reinforce the importance of STAT3 as a relevant signaling hub for anticancer therapeutic targeting.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Reagents

Sodium dodecyl sulfate (SDS), human recombinant TNF α (654205), and the protease inhibitor cocktail (EMD Millipore; 539131-1VL) were all purchased from Sigma–Aldrich (Oakville, ON, Canada). Tyrphostin AG490 was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA, USA; 133550-30-8). Pierce’s micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The electrophoresis reagents and bovine serum albumin were purchased from Bio Basic (Markham, ON, Canada). The Clarity™ Enhanced Chemiluminescence for horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody detection reagents was obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

2.4.2 Cell culture

The cells and culture media were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Human ADMSCs (PCS-500-011) were cultured without antibiotics in positive media composed of mesenchymal stem cell basal medium (PCS-500-030), low in serum (2% fetal bovine serum (FBS)) and supplemented with a mesenchymal stem cell growth media kit for adipose and umbilical-derived MSCs (PCS-500-040). The cells were kept subconfluent and expanded over a maximum of 8 passages by a 1:2 weekly split in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. The treatments were performed in 6-well plates

with 1×10^5 cells, which were incubated under the same conditions. TNF α and AG490 treatments were performed over 24 hours in serum-free media (negative media).

2.4.3 Capillary-like structure formation assay

The formation of 3D capillary-like structures was assessed on Cultrex (R&D Systems Inc., Toronto, ON, Canada; 3432-010-01). ADMSCs were seeded at 1×10^4 cells/100 μ L in serum-supplemented culture media (positive media) in a 96-well plate, using cells between passage 3 to 8. The wells were previously coated with 40 μ L of Cultrex and left to polymerize for 30 minutes at 37°C, while the controls were seeded as monolayers on plastic. The vehicle (0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO)) or AG490 (0.3, 1, 3, or 10 μ M) was added to the cell suspension. The cells were incubated for up to 6 hours in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. Pictures were taken over time with a digital camera coupled to a phase-contrast inverted microscope. These images were analyzed via Wimasis Analysis Software (Cordoba, Spain) to quantify the number of loops and total tube branching.

2.4.4 Transfection and RNA interference

ADMSCs were transiently transfected with small interfering RNA (siRNA) sequences via the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific; 11668019). STAT3 gene silencing was performed for 24 hours via 50 nM siRNA (siSTAT3; FlexiTube siRNA, SI02662338) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281), which were synthesized by QIAGEN (Valencia, CA, USA) and annealed to form duplexes. Gene silencing efficacy was assessed by RT-qPCR as described below.

2.4.5 Total RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR.

Total RNA was extracted from 2D cell monolayers via TRIzol, following the manufacturer's recommendations (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA; 15596018). For the 3D capillary-like structure formation assays, cells were collected from the Cultrex layer, and 10 wells per condition were pooled for extraction. The total RNA concentration was measured via a NanoPhotometer P330 (Implen), and 0.5–1 μ g was reverse-transcribed into cDNA via a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA; 4368814). The samples were prepared with primer sets and SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad; 1725204). The primer sets used were all purchased from QIAGEN: C-C motif chemokine ligand (CCL) 2 (Hs_CCL2_1_SG, QT00212730), CCL3 (Hs_CCL3_2_SG, QT01008063), CCL5 (Hs_CCL5_1_SG, QT00090083), cyclooxygenase-2 (COX-2, Hs_PTGS2_1_SG, QT00040586), C-X-C motif chemokine ligand (CXCL) 5 (Hs_CXCL5_1_SG, QT00203684), CXCL8 (Hs_CXCL8_1_SG, QT000000322),

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247), interleukin-6 (IL-6, Hs_IL6_1_SG, QT00083720), matrix metalloproteinase 9 (MMP9, Hs_MMP9_1_SG, QT00040040), SNAI1 (Hs_SNAI1_1_SG, QT00010010), and ribosomal protein S18 (RPS18; Hs_RPS18_2_SG, QT02310203). Gene expression was quantified via real-time quantitative PCR (RT-qPCR) on a CFX Connect instrument (Bio-Rad) with Bio-Rad CFX manager software version 3.0. The relative RNA quantities of each target gene were normalized against those of two housekeeping genes, *GAPDH* and *RPS18*, via the standard $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method.

2.4.6 Human inflammation profiler PCR arrays

Premade RT² Profiler PCR arrays for Human Inflammatory Cytokines and Receptors (PAHS-011ZD) were purchased from QIAGEN and used following the manufacturer's instructions. Briefly, the genomic DNA was removed before 0.5 µg of total RNA was reverse transcribed via the RT² First Strand Kit (QIAGEN, 330404). Each plate was used to assess one cDNA sample prepared with RT² SYBR Green qPCR Mastermix (QIAGEN, 330502). The relative expression analysis of 84 genes and controls was performed through the GeneGlobe analysis center, a website provided by QIAGEN (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>), via the standard fold change $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method. Based on the overall number of genes and modulation profile, the fold regulation used in the figures for upregulated genes was cutoff ≥ 2 , and for downregulated genes cutoff ≤ -2 .

2.4.7 Protein-protein interactions

The database STRING v11 (<https://www.string-db.org/>, accessed on April 2025) was used to identify and build protein-protein interaction networks (Szklarczyk *et al.*, 2021), with a confidence score of 0.4. The maximum number of interactions shown was set to 10 to improve the readability of the predictions.

2.4.8 Western blot

Total cell lysates were obtained through lysis in a RIPA buffer: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt, 1 mM egtazic acid (EGTA), 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1X proteases inhibitor cocktail set I (EMD Millipore; 539131-1VL). Proteins (10 µg) were then separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Next, proteins were electro-transferred to low-fluorescence polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and blocked for 1 hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were washed thrice in TBST and incubated overnight at 4°C with agitation, with monoclonal primary antibodies diluted in TBST containing

3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich). All primary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA): STAT3 1/1,000 (79D7 – CAT# 4904 S), phospho-STAT3 1/1,000 (D3A7 – CAT# 9145 S), COX-2 1/1,000 (D5H5 – CAT# 12282 S) and GAPDH 1/10,000 (D4C6R – CAT# 97166 S). After three washes in TBST, membranes were incubated for 1 hour at room temperature in TBST containing 5% non-fat dry milk with HRP-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin (Ig) G (1/2,500 dilution), purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Immunoreactive bands were visualized by ECL on a Chemidoc. Densitometric analysis was performed using ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

2.4.9 Real-time cell migration assay

Real-time cell migration experiments were conducted using the Agilent Real-Time Cell Analysis (RTCA) Dual-Purpose (DP) instrument and the xCELLigence system (Roche Diagnostics, QC, Canada), following the instructions of the supplier. Prior to cell seeding, the upper chamber's wells from a CIM-plate 16 (Roche Diagnostics) had their bottom coated with 0.15% gelatin in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 1 hour at 37°C. The lower chamber was filled with supplemented media (positive media) containing either the vehicle (0.1% DMSO) or AG490 (1, 3, 10 μ M concentrations). The upper chamber was then seeded with 2.5×10^4 cells per well, in non-supplemented media (negative media), and incubated at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 30 minutes of initial adhesion, cell migration was monitored every 5 minutes for 24 hours. The impedance value was measured by the RTCA DP instrument and expressed as an arbitrary unit called the Normalised Cell Index. Each experiment was performed two times and measured in triplicate. Data and error bars represent the mean $\pm$ standard deviations (SDs).

2.4.10 Statistical data analysis

The data and error bars are expressed as the means $\pm$ SDs of three independent experiments unless otherwise stated. Statistical analysis was conducted using the nonparametric tests Mann–Whitney U-test (for two-group comparisons) or Kruskal–Wallis test followed by a Dunn Tukey's post-test (for data with more than three groups) (Whitlock et Schluter, 2015). P-values considered significant were indicated in the figures (< 0.05 (*)). All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 10 software version 10.4.1 (GraphPad Software LLC, San Diego, CA, USA).

2.5 Results

2.5.1 The formation of 3D capillary-like structures in ADMSCs requires a functional JAK2/STAT3 signaling pathway

The 3D capillary-like structure formation capacity of ADMSCs *in vitro* was first assessed. The cells were seeded on Cultrex as described in the Methods section, and phase contrast images were taken for up to 5 hours (Figure 2.1A, upper panels). The digitized images were then analyzed via Wimasis (Figure 2.1A, lower panels). The structural maturation parameters revealed a vascular-like network that is confirmed by a significant increase in the total number of loops and branching points (Figure 2.1B). The importance of the JAK2/STAT3 signaling pathway in this process was next assessed through pharmacological inhibition with AG490, a classically used inhibitor of JAK2/STAT3 (Figure 2.1C) (Meydan *et al.*, 1996). Capillary-like structure formation was significantly reduced at 10 μ M AG490 (Figure 2.1E, black bars). Similarly, the direct impact of STAT3 downstream signaling suppression on VM was also assessed upon transient siSTAT3 transfection of ADMSCs (Figure 2.1D). Accordingly, both pharmacological inhibition and gene silencing strategies targeting STAT3 activity led to similar and significant reductions in total branching points (40–50%) and loops (30–40%) (Figure 2.1E). Gene silencing of STAT3 was found to reduce VM (Figure 2.1E, gray bars) through reducing *STAT3* expression (Figure 2.1F, gray bars). AG490 did not affect *STAT3* expression, confirming that its anti-VM effect was rather effective through the inhibition of JAK2 kinase activity (Figure 2.1F, black bars). Together, these data indicate that JAK2/STAT3 is necessary for capillary-like structure formation in ADMSCs.

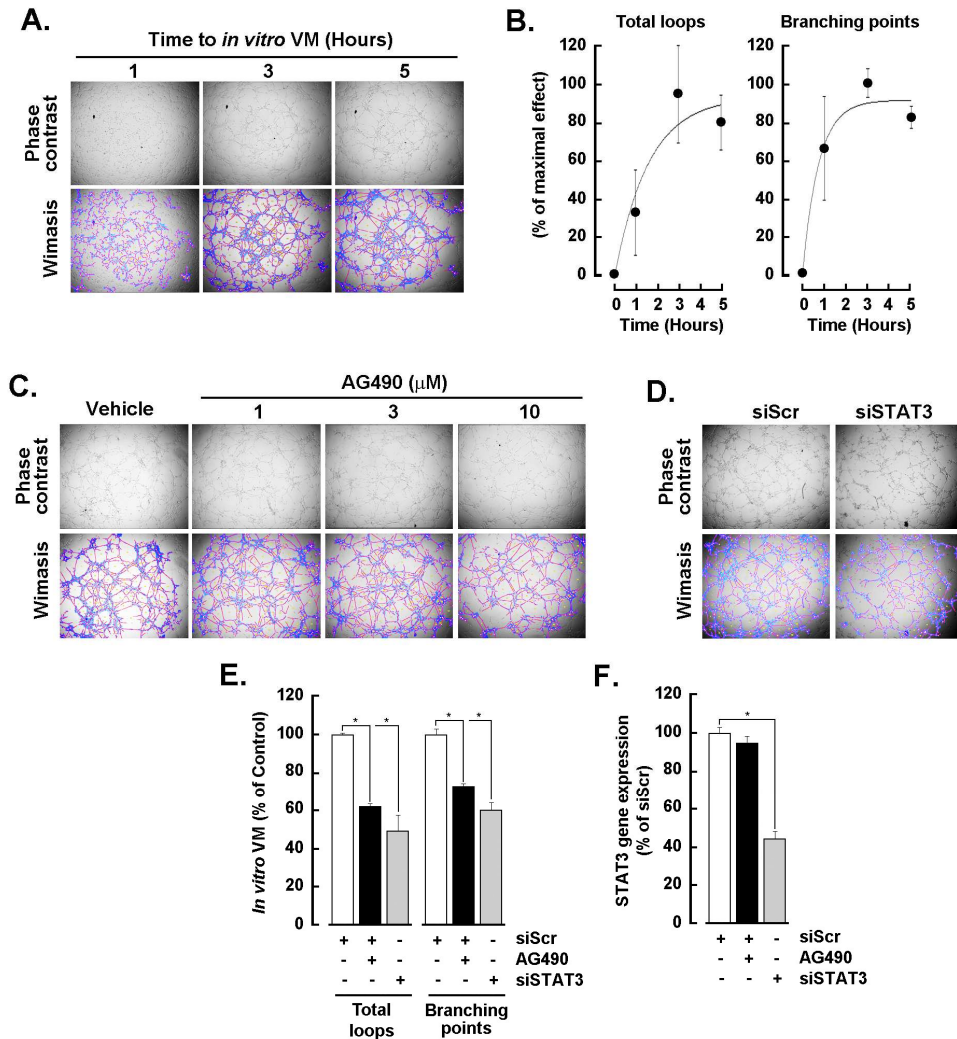


Figure 2.1. Effect of the JAK2/STAT3 signaling pathway inhibition on the formation of 3D capillary-like structures in ADMSCs.

ADMSCs were trypsinized and seeded on top of a Cultrex layer as described in the Methods section. (A) Representative phase contrast images were taken to monitor the formation of capillary-like structures (upper panels) and were analyzed via Wimasis (lower panels). (B) Quantification from Wimasis analysis of the total loops and branching points over time. (C) Representative phase contrast images were taken to monitor the inhibition of capillary-like structure formation by increasing concentrations of AG490 after 5 hours (upper panels). The structures were analyzed via Wimasis (lower panels). (D) Representative phase contrast pictures were taken to monitor the inhibition of capillary-like structure formation by RNA-mediated interference via siSTAT3 in transiently transfected ADMSCs after 5 hours (upper panels) compared with that in control cells transiently transfected with a scrambled sequence (siScr); the structures were analyzed via Wimasis (lower panels). (E) Quantification from Wimasis analysis of the total loops and of branching points at 10 μ M AG490 (black bars) and upon siSTAT3-transfection (gray bars) are shown as percentages of their respective controls (0.1% DMSO and siScr). (F) Relative gene expression of STAT3 after pharmacological inhibition with 10 μ M AG490 (black bars) and upon transient interference with siSTAT3 (gray bars). The VM data are representative of three independent experiments, and the transfection data are representative of two independent experiments.

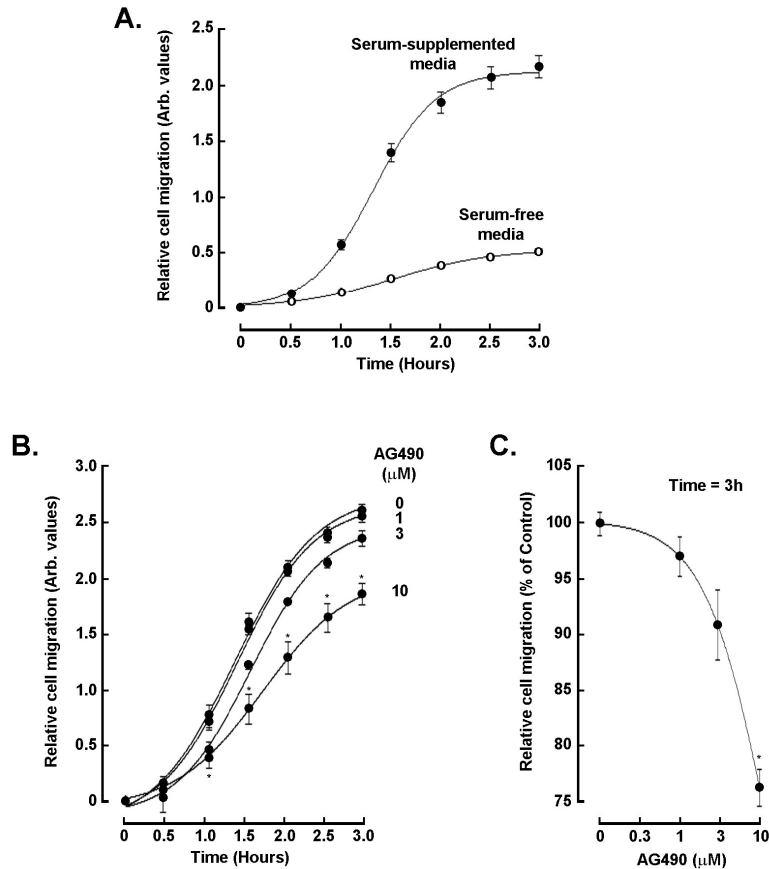


Figure 2.2. Effect of a pharmacological inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway on the chemotactic migration capacity of ADMSCs.

Chemotactic real-time cell migration was performed as described in the Methods section. (A) Relative cell migration in serum-supplemented or serum-free media was monitored over a 3-hour period. (B) A representative profile of the effects of the indicated increasing concentrations of AG490 on relative cell migration was compared to that of the vehicle (0.1% DMSO) over 3 hours. (C) Quantification of the inhibitory effect of AG490 concentration on the chemotactic response. All the data are representative of two independent experiments, each performed in triplicate.

2.5.2 Pharmacological inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway prevents the acquisition of an inflammatory molecular signature upon ADMSC VM

The potential impact of *in vitro* priming of VM on Cultrex on the acquisition of an inflammatory phenotype in ADMSCs was next assessed. The cells were left to generate 3D capillary-like structures, total RNA was isolated, the RNA was transcribed into cDNA, and qPCR was performed for a transcriptomic screen via an RT² Profiler PCR array. The gene expression levels of 84 inflammatory cytokines and their specific receptor genes were assessed and compared to their respective basal expression levels in 2D ADMSC monolayers. Among these genes, 22 were found significantly upregulated (Figure 2.3A). Notably, these included the CXCL (*CXCL1*, 2, 3, 5, 6, and 8) and CCL families (*CCL2*, 3, 4, 5, 7, and 20), as well as several key proinflammatory interleukins, including *IL-1 β* and *IL-33*, and the angiogenic growth factor *VEGFA*.

Additionally, 48 genes were found to be concomitantly downregulated (Figure 2.3A). These include multiple CCL, CXCL and IL receptors, as well as several interleukins (*IL-3, 5, 7, 9, 13, 15, 16, and 27*). Protein–protein interaction networks were constructed via predictions from the STRING database for the top 10 VM-upregulated (Figure 2.3C) and VM-downregulated (Figure 2.3E) genes. These networks allow us to appreciate the different associations between regulated genes of similar functions (Safari-Alighiarloo *et al.*, 2014; Szklarczyk *et al.*, 2021), and demonstrate the multiple strong relationships that exist between them. When ADMSC VM was inhibited by AG490, the overexpression of 77% (17 out of the 22) VM-upregulated genes (Figure 2.3B) and the repression of 60% (29 out of the 48) VM-downregulated genes (Figure 2.3D) were significantly reversed, especially members of the CXCL family. Genes from the PCR array screens were next validated by qPCR, including *CCL2*, *CXCL5*, and *CXCL8*, as well as other well-known markers of inflammation and invasion that were not included in the array (*COX-2*, *IL-6*, *MMP9*, and *SNAI1*). VM-induced gene expression was confirmed in 3D ADMSCs (Figure 2.4, black bars) compared with 2D monolayers (Figure 2.4, white bars), and the inhibitory effect of AG490 was found to reduce gene expression by 40–60%, except for *CCL2*, whose expression was reduced by ~20% (Figure 2.4, gray bars). Collectively, we showed that ADMSC VM induces an inflammatory profile that can be inhibited through the JAK2/STAT3 signaling pathway.

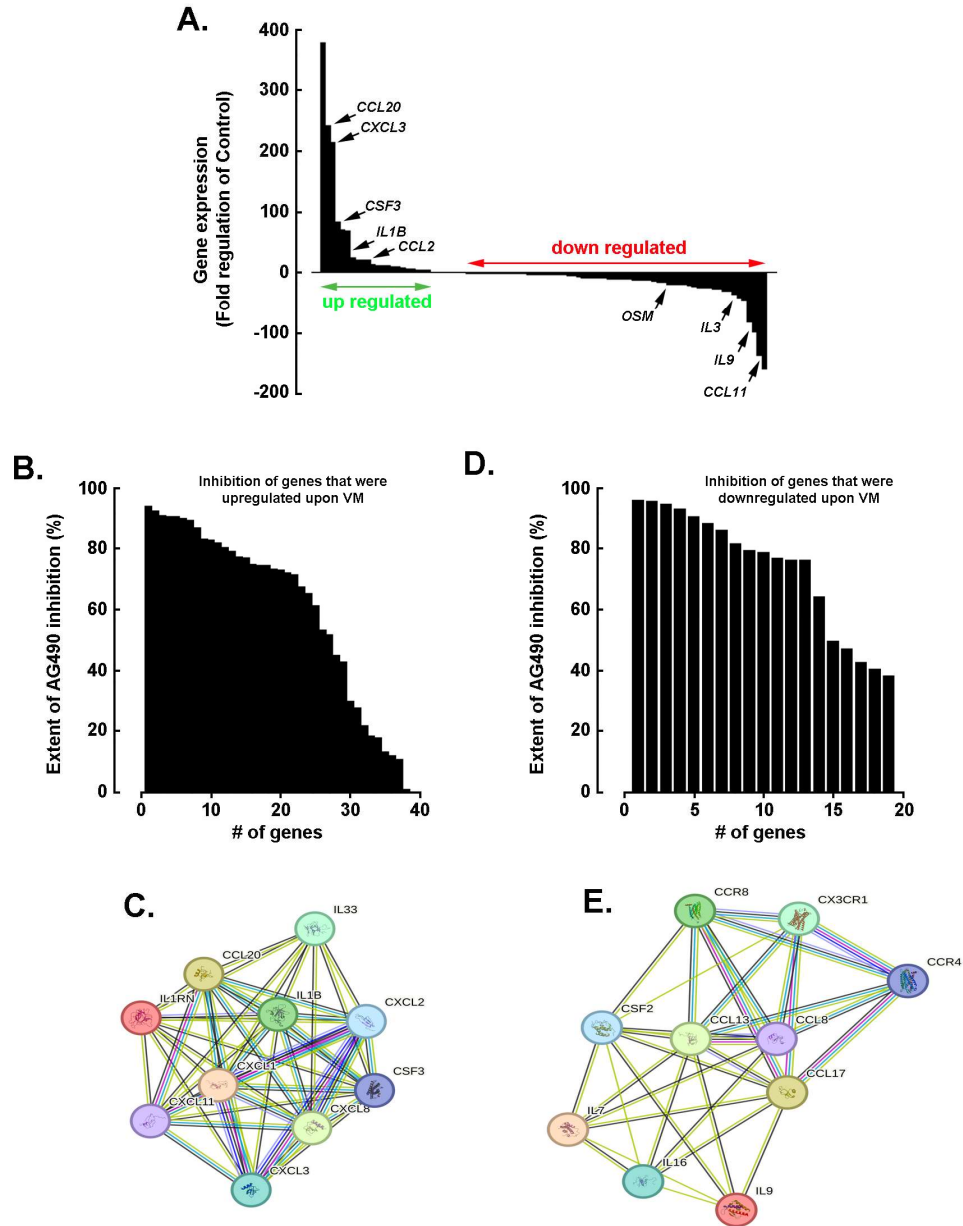


Figure 2.3. Transcriptomic analysis of inflammatory molecular signature induced by capillary-like structure formation.

ADMSCs were seeded on top of Cultrex dishes and left to form 3D capillary-like structures for 5 hours in the presence or absence of 10 μ M AG490 (the control consisted of vehicle-treated 2D monolayers). Total RNA was extracted, and gene expression was assessed via an RT² Profiler PCR array for human inflammatory cytokines and receptors as described in the Methods section. (A) Gene expression levels of upregulated genes (green arrow) and downregulated genes (red arrow) are represented as the fold regulation between the control 2D monolayers and VM-forming ADMSCs, with a cut-off value greater than or equal to two. (B) Number of VM-induced genes and extent of their AG490-mediated inhibition of expression. (C) Protein-protein interaction network of the 10 most VM-induced genes whose expression was inhibited by AG490, as retrieved with STRING. (D) Number of VM-downregulated genes and extent of their AG490-mediated inhibition of expression. (E) Protein-protein interaction network of the 10 most VM-downregulated genes whose expression was also inhibited by AG490, as determined with STRING.

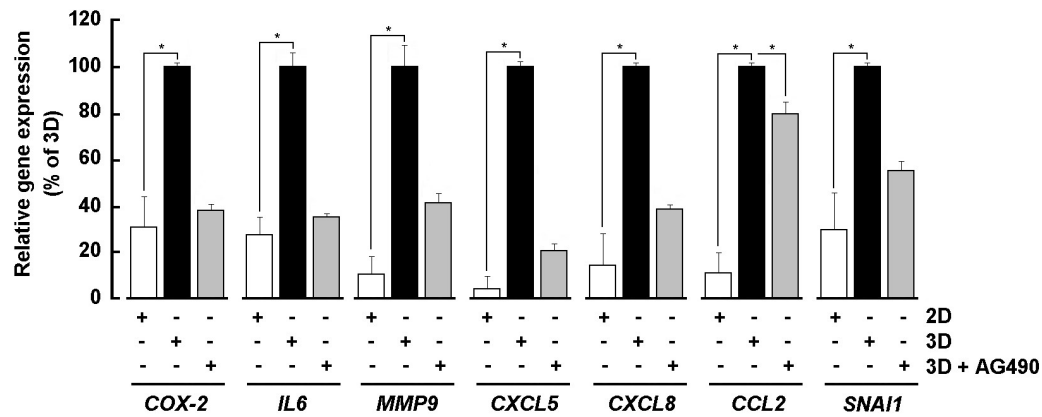


Figure 2.4. Effects of AG490 on inflammation and invasion markers related to capillary-like structure formation.

ADMSC response to priming on Cultrex for 5 hours for capillary-like structure formation in the presence or absence of 10 μ M AG490 (control, 2D monolayers). Total RNA was extracted, and gene expression was assessed via RT-qPCR, as described in the Methods section. Relative gene expression of inflammation and invasion markers was compared between the control (vehicle-treated 2D monolayers, white bars) and VM-forming ADMSCs in the presence (3D + AG490; gray bars) or absence (vehicle-treated 3D; black bars) of 10 μ M AG490. The results are presented as percentages of VM-related gene expression levels. The data are representative of two to three independent experiments performed in triplicate, except for the AG490 data, which are representative of one to two independent experiments performed in triplicate.

2.5.3 The JAK2/STAT3 signaling pathway mediates the TNF α -induced inflammatory molecular signature in ADMSCs

We next aimed to address how the inflammatory profile acquired from ADMSCs that form 3D capillary-like structures is comparable to that of classical proinflammatory cytokines inducers such as TNF α , on 2D ADMSC monolayers. The cell lysates were harvested, and Western blotting was performed as described in the Methods section (Figure 2.5A). TNF α dose-dependently induced biphasic phosphorylation of STAT3 (Figure 2.5B), which was able to sustain the expression of COX-2 (Figure 2.5B). In addition to protein expression, gene expression levels of several inflammation and invasion markers, including *COX-2*, *IL-6*, *MMP9*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL5*, *CXCL5*, and *CXCL8*, were also analyzed in response to TNF α (Supplemental Figure 2.8). The 30 ng/mL TNF α concentration was selected for experimentation since it induced the highest response in all genes investigated in our hands and was also validated in MSCs from previous studies (Ren *et al.*, 2012). The effects of JAK2/STAT3 inhibition were also further tested upon increasing concentrations of AG490 against the TNF α -mediated induction of COX-2 and STAT3 phosphorylation (Figure 2.5C). AG490 was found to inhibit COX-2 by ~30% at 3 μ M, and ~50% at

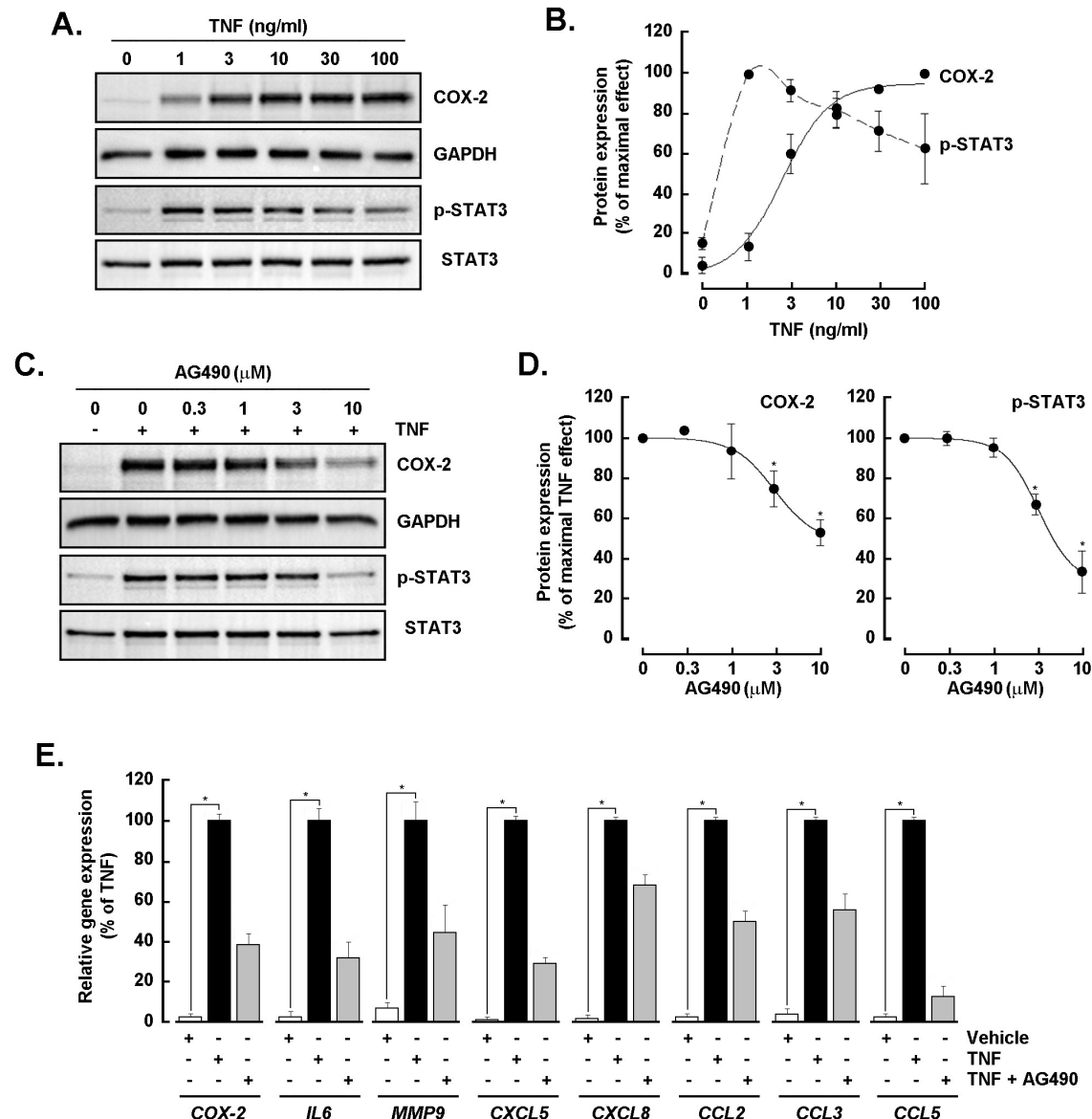


Figure 2.5. Involvement of the JAK2/STAT3 signaling pathway in TNF α -induced inflammatory molecular signature in ADMSCs.

(A) Monolayer ADMSC culture response to increasing TNF α concentrations for 24 hours. COX-2, phospho-STAT3 (pSTAT3) and total STAT3 protein lysates were immunoblotted, with GAPDH serving as a loading control. (B) Densitometry analysis of COX-2 and pSTAT3 expression, represented as the percentage of the respective maximal effect of TNF α . (C) ADMSC 2D monolayer cultures treated with 30 ng/mL TNF α in the presence of the indicated increasing concentrations of AG490 for 24 hours (vehicle, 0.1% DMSO). COX-2, pSTAT3 and STAT3 protein lysates were immunoblotted, with GAPDH serving as a loading control. (D) Densitometry analysis of TNF α -induced COX-2/GAPDH inhibition, represented as the percentage of the maximal effect of TNF α (labelled COX-2; left panel), and of TNF α -induced pSTAT3/STAT3 (labelled p-STAT3; right panel). (E) Monolayer-ADMSC cultures subjected to 30 ng/mL TNF α in the presence or absence of 10 μ M AG490 for 24 hours (the control was 0.1% DMSO). Modulation profiles of inflammation and invasion gene markers by TNF α (black bars) and by AG490 (gray bars) were measured via RT-qPCR. All the data are representative of three independent experiments.

10 μ M (Figure 2.5D, left panel). Similarly, AG490 tended to inhibit STAT3 phosphorylation by $\sim$ 70%, with a maximal effect at 10 μ M (Figure 2.5D, right panel). Finally, the effects of AG490 on the TNF α -induced inflammatory profile were validated via the expression of inflammation and invasion marker genes, including *CCL2*, *CCL3*, *CCL5*, *COX-2*, *CXCL5*, *CXCL8*, *IL-6*, and *MMP9* (Figure 2.5E, gray bars). As for ADMSC VM, the JAK2/STAT3 signaling pathway mediates the inflammatory profile induced by TNF α in ADMSCs.

2.5.4 Pharmacological inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway prevents TNF α -induced inflammatory molecular signature in ADMSCs

To address the potential common inflammatory molecular signature that is acquired upon VM or triggered by TNF α , a PCR screen was performed using total RNA isolated from TNF α -treated ADMSC monolayers. Among the 84 genes investigated, 16 were significantly upregulated, including members of the CXCL (*CXCL1*, 3, 5, 6, and 8), CCL (*CCL2*, 3, 4, 5, 7, and 20), and some interleukins/interleukin receptor (*IL-1A*, *IL-7*, and the IL-10 receptor (*IL10RA*)) (Figure 2.6A, left panel). Notably, two TNF α -related genes, *TNFSF10* and *TNFRSF11B*, were strongly upregulated. *TNFSF10*, also known as TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), is a membrane protein that can bind DR4 or DR5, two death receptors, whereas *TNFRSF11B*, or osteoprotegerin (OPG), is a TNF α receptor that inhibits osteoclastogenesis and inflammation. In addition, 23 genes were concomitantly downregulated upon TNF α treatment, including several CCLs and CXCLs, as well as some of their receptors, and a few interleukins (*IL-3*, 9, 17C, 16, and 21) (Figure 2.6A, right panel). JAK2/STAT3 signaling was next assessed in the presence of AG490 and was found to prevent TNF α -mediated upregulation of 30 genes (Figure 2.6B), some of which were not significantly induced by TNF α , as was the repression of 52% (12 out of 23) from the downregulated genes (Figure 2.6D). The protein–protein interaction network confirmed the multiple interactions between the 10 upregulated genes that were under the control of JAK2/STAT3 (Figure 2.6C), as well as between the top 10 most downregulated genes (Figure 2.6E).

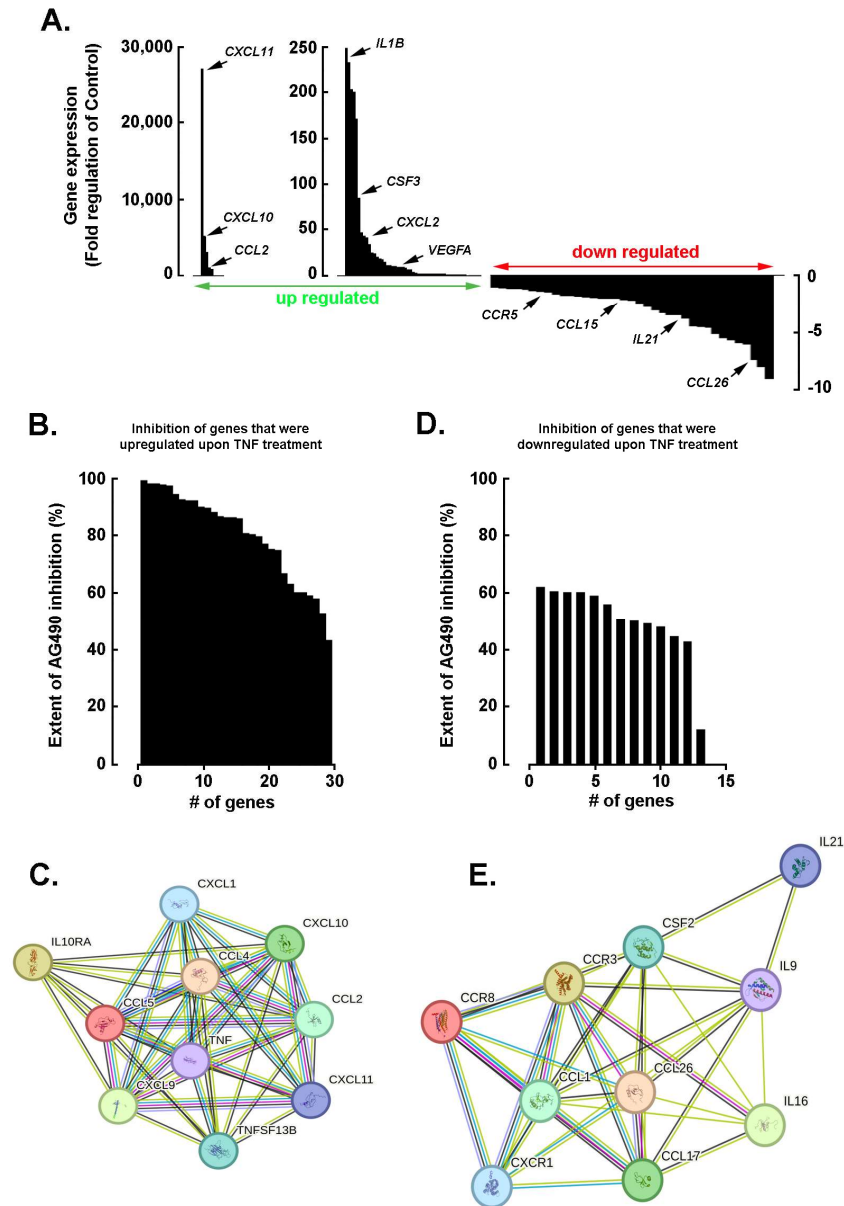


Figure 2.6. Implication of JAK2/STAT3 in the inflammatory molecular signature of ADMSCs stimulated with TNF α .

ADMSCs were treated with 30 ng/mL TNF α in the presence or absence of 10 μ M AG490 for 24 hours (the control was treated with 0.1% DMSO) to perform a RT² PCR array for human inflammatory cytokines and receptors, as described in the Methods section. (A) Gene expression of upregulated genes (green arrow) and downregulated genes (red arrow) is represented as the fold regulation between the control and TNF α -treated cells, with a cut-off value greater than or equal to two. (B) Number of TNF α -induced genes and extent to which AG490 inhibited their expression. (C) Protein-protein interaction network of the 10 TNF α -induced genes whose expression was inhibited the most by AG490, as determined via the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING). (D) Number of TNF α -downregulated genes and extent to which AG490 inhibited their expression. (E) Protein-protein interaction network of the 10 genes most downregulated by TNF α that were inhibited by AG490, as determined with STRING. The data are representative of one of two independent experiments.

2.5.5 Towards a shared inflammatory molecular signature between VM-forming and TNF α -treated ADMSC phenotypes

By comparing the different inflammatory genes that were modulated under both VM and TNF α conditions, three molecular signatures were identified, namely, moderately induced genes (10- to 100-fold induction), highly induced genes (> 100-fold induction), and genes whose expression was slightly to moderately downregulated (2- to 10-fold downregulation). Two distinct groups of upregulated genes were thus clearly identified with molecular markers that were either highly upregulated under both conditions (Figure 2.7A; blue circle) or only moderately overexpressed (Figure 2.7A; red circle). Table 1 recapitulates the role of each of these inflammation markers. Similarly, genes whose expression was repressed under both VM- and TNF α -treated conditions were found to group within a unique population of moderately downregulated genes (Figure 2.7B). The roles of these genes are also listed in Table 2.

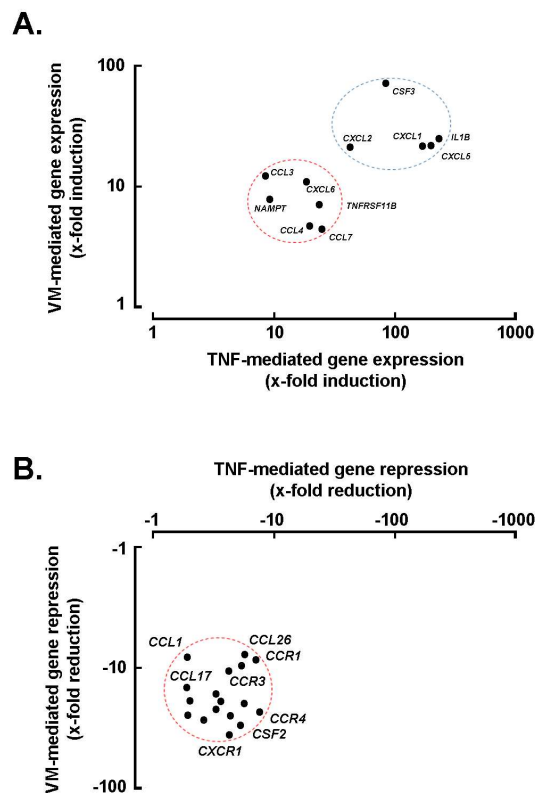


Figure 2.7. Towards a shared inflammatory molecular signature between VM-forming and TNF α -treated ADMSC phenotypes.

VM- and TNF α -mediated gene expression was compared via the RT² PCR gene array shown in Figure 2.3 and Figure 2.6 and is expressed as x-fold induction (A) or x-fold reduction (B).

Table 2.1. Roles of shared inflammation genes upregulated via VM- and TNF α -induction

Cytokines	Other names	VM	VM + AG490	TNF α	TNF α + AG490	Cellular / Functional effects	References
CCL2	MCP-1	11.03	6.65	990.83	25.11	Attracts M1 macrophage and DC to sites of inflammation; induces cell proliferation and survival, tumorigenesis and metastasis	(Hao <i>et al.</i> , 2020; Li <i>et al.</i> , 2023; Rezaeeyan <i>et al.</i> , 2018)
CCL7	MCP-3	4.51	2.42	19.73	4.96	Involved in the recruitment of macrophages, basophils, neutrophils, leukocytes and T cells; increases EMT	(Liu <i>et al.</i> , 2018; Rezaeeyan <i>et al.</i> , 2018)
CCL20	MIP-3 α	241.07	16.37	40.86	5.74	Involved in the recruitment of T cells and DC to inflammatory sites; helps tumor immune evasion	(Korbecki <i>et al.</i> , 2020)
CSF3	G-CSF	69.71	14.16	84.59	10.41	Stimulates the production of granulocytes from bone marrow	(Karagiannidis <i>et al.</i> , 2021)
CXCL1	GRO-1	21.01	2.5	170.37	13.74	Attracts neutrophils to sites of inflammation, promotes angiogenesis and carcinogenesis	(Arango Duque et Descoteaux, 2014; Dai <i>et al.</i> , 2023; Korbecki <i>et al.</i> , 2022)
CXCL2	MIP-2 α , GRO-2	20.58	5.29	42.59	8.75	Attracts neutrophils to sites of inflammation, promotes angiogenesis and carcinogenesis	(Arango Duque et Descoteaux, 2014; Dai <i>et al.</i> , 2023; Korbecki <i>et al.</i> , 2022)
CXCL3	-	214.28	19.74	46.61	9.32	Similar to CXCL1, involved in neutrophil recruitment	(Dai <i>et al.</i> , 2023; Korbecki <i>et al.</i> , 2022)

Table 2.1. Continued.

CXCL5	ENA-78	21.16	5.44	199.81	28.44	Attracts and activates neutrophils, T/B lymphocytes and eosinophils; promotes angiogenesis	(Dai <i>et al.</i> , 2023; Deng <i>et al.</i> , 2022; Zhang <i>et al.</i> , 2020)
CXCL8	IL-8	378.29	29.72	810.41	85.63	Strongly attracts neutrophils and plays a key role in acute inflammation, enhance angiogenesis	(Arango Duque et Descoteaux, 2014; Rezaeeyan <i>et al.</i> , 2018)
CXCL11	IP-9	5.36	1.23	27034.24	568.1	Strongly attracts T cells and NK cells, inhibits angiogenesis and tumorigenesis	(Arango Duque et Descoteaux, 2014)
IL1B	IL-1 β	24.14	3.35	232.73	77.71	Induces fever and the production of other cytokines	(Arango Duque et Descoteaux, 2014)
NAMPT	-	7.59	4.73	9.14	3.66	Involved in the production of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD ⁺), which is important for cellular metabolism and inflammation	(Lin, 2022)
TNFRSF11B	OPG	4.27	1.07	24.8	3.43	Decoy receptor for RANKL, inhibiting osteoclastogenesis and inflammation; involved in tumor survival, EMT, angiogenesis, invasion, and metastasis	(Wang <i>et al.</i> , 2022)

CCL, C-C motif chemokine ligand; CSF, colony stimulating factor; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; DC, dendritic cells; EMT, epithelia-mesenchymal transition; ENA, epithelial neutrophil-activating; GCP, granulocyte chemotactic protein; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GRO, growth-regulated protein; IL, interleukin; IP, inducible protein; NAMPT, Nicotinamide phosphoribosyl-transferase; NK, natural killer cells; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, macrophage inflammatory protein; OPG, Osteoprotegerin; RANKL, receptor activator for nuclear factor κ B ligand; TNFRSF, TNF receptor superfamily member.

Table 2.2. Roles of shared inflammation genes downregulated via VM- and TNF α -induction

Cytokines	Other names	VM	VM + AG490	TNF α	TNF α + AG490	Cellular / Functional effects	References
CCL1	I-309	-10.53	-2.98	-4.46	-1.78	Involved in neovascularisation	(Do <i>et al.</i> , 2020)
CCL17	TARC	-29.79	-2.88	-5.53	-2.11	Recruits Th2	(Do <i>et al.</i> , 2020)
CCL26	Eotaxin-3	-23.21	-4.95	-8.04	-3.2	Attracts killer lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils to inflammation site	(Zajkowska et Mroczko, 2021)
CCR3		-8.44	-2.17	-7.45	-3.81	Receptor for: CCL4 to 9, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL23, CCL24, CCL26, CCL28. Expressed by Th1, Th2, Th9, Treg cells, MDSCs, neutrophils, macrophages, basophils, eosinophils, mast cells	(Do <i>et al.</i> , 2020)
CCR4		-21.96	-2.42	-3.52	-3.1	Receptor for: CCL3, CCL5, CCL17, CCL22, Initiation of adaptive immune response; involved in recruitment of lymphocyte and mobility of T cells, DC and leukocytes	(Do <i>et al.</i> , 2020; Hughes et Nibbs, 2018)
CCR8		-25.05	-4.31	-4.59	-1.84	Receptor for: CCL3, CCL5, CCL17, CCL22 Th2, Th17, Th22, Treg cells, T and B cells, DC, monocytes and basophils	(Do <i>et al.</i> , 2020)
CSF2	GM-CSF	-7.76	-1.37	-6.05	-2.99	Induces survival, proliferation and differentiation of hematopoietic myeloid cells	(Sielska <i>et al.</i> , 2020)
CX3CR1		-16.41	2.22	-3.5	-1.75	Receptor for: CX3CL1 and CCL26 Recruitment of myeloid populations; Involved in tumorigenesis and cancer migration	(Chaudhri <i>et al.</i> , 2023)

Table 2.2. Continued.

CXCR1		-9.49	-7.45	-5.69	-2.97	Receptor for: CXCL6 and 8; At higher doses: CXCL1, 2, 3, 5 and 7; Involved in neutrophil infiltration	(Korbecki <i>et al.</i> , 2023)
IL9		-99.5	-9.76	-9.05	-5.03	T cell and mast cell growth factor; inhibits Th1- production of cytokines	(Akdis <i>et al.</i> , 2016)
IL16		-18.85	1.54	-3.78	-1.56	Attracts T cells and helps Th1 response; Inhibits T cell proliferation, reduce Th2 inflammation, increase production of TNF α	(Akdis <i>et al.</i> , 2016)
IL21		-36.17	-14.09	-4.52	-2	T cell growth factor; activates T cells and NK cells cytotoxicity; B cell proliferation, differentiation and survival	(Akdis <i>et al.</i> , 2016)
TNFSF13	APRIL	-19.65	-1.97	-5.93	-3.41	Regulates B cell growth, maturation, differentiation and survival	(Nowacka et Jabłońska, 2021)

APRIL, A proliferation-inducing ligand; CCL, C-C motif chemokine ligand; CCR, C-C chemokine receptor; CSF, colony stimulating factor; CX3CR, CX3C motif chemokine receptor; CXCR, C-X-C motif chemokine ligand receptor; DC, dendritic cells; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; IL, interleukin; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; NK, natural killer cells; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; Th, helper T cells; TNFSF, TNF superfamily family; Treg, regulatory T cells.

2.6 Discussion

Chronic and sustained inflammation, a pathological condition observed in obesity, represents a key condition that can promote tumor development. However, the precise molecular mechanisms that interrelate the recruitment of immune cells, the secretion of inflammatory mediators in the TME, tissue remodeling processes, and angiogenesis remain unclear (Demir, 2023; Wen *et al.*, 2022). Importantly, an adipocyte-rich microenvironment can contribute to chemoresistance, which disrupts the efficacy of numerous antiangiogenic therapies and is becoming one of the many reasons why anticancer treatments have become increasingly ineffective (Chen *et al.*, 2024; Kim et Jung, 2024). At the cellular level, the processes that trigger chemoresistance involve, in part, the ability of cancer cells to acquire properties that allow them to develop a tumor pseudovasculature independent of angiogenesis, notably by forming *de novo* neovascularization or through mobilization of circulating stem cells such as MSCs (Belotti *et al.*, 2021). While VM has long been associated with CSC plasticity (Luo *et al.*, 2020), recent studies point to an active contribution of MSCs released into the circulation that mobilize toward tumors to further contribute to inflammation through their secretome (Bhuniya *et al.*, 2022; Roy *et al.*, 2024a; Rytlewski *et al.*, 2015). Here, we provide new evidence that the mesenchymal nature of ADMSCs could also enable these cells to contribute to 3D capillary-like structures that mimic VM and adopt a proinflammatory molecular signature.

The hypoxic TME triggers the release of various chemotactic factors into the circulation, which allows the release of bone marrow (BM) MSCs in the peripheral circulation, which, in turn, are recruited within the solid TME to promote tumor vasculogenesis (Annabi *et al.*, 2004; De Becker et Riet, 2016; Lan *et al.*, 2021). Accordingly, our findings confirm that ADMSCs respond to chemotactic migration, which further enables them to form *in vitro* 3D capillary-like structures that mimic VM. *In vitro*-mediated VM, triggered by priming ADMSCs on Cultrex, a complex matrix of proteins and soluble factors extracted from murine tumors, closely simulates the tumor ECM microenvironment. Complex ECM signaling and intercellular interactions in response to soluble factors such as inflammatory cytokines allow VM induction by Cultrex, and the absence of those soluble components disables VM formation (Roy *et al.*, 2024a). Like for BM-MSCs, the importance of the JAK2/STAT3 signaling pathway is further confirmed here for ADMSCs, since its inhibition reduces the chemotactic migration response as well as the formation of 3D capillary-like structures. This signaling pathway therefore appears central to multiple cellular processes known to be regulated, including cell survival, proliferation, angiogenesis, and metastasis. In fact, the JAK2/STAT3 signaling pathway is increasingly recognized not only as an important therapeutic target against cancer

but also as a signaling hub targeted by chemopreventive nutraceutical interventions to prevent the onset of chronic inflammation (Akla *et al.*, 2025; Kohal *et al.*, 2024).

Our findings highlight the importance of JAK2/STAT3 signaling in the acquisition of a proinflammatory phenotype in ADMSCs, induced either upon VM or through TNF α -mediated induction of numerous cytokines and chemokines from the CCL, CXCL, and IL families. As a result, these molecules may facilitate the recruitment, activation, and regulation of various immune cells during inflammatory responses. As both conditions also repress the expression of many genes encoding receptors involved in vasculogenic activity, such complex interplay of chemokines may become challenging to reconcile with VM, since the recruitment of immune cells to inflammation sites can eventually exert either pro- or antitumoral effects depending on the type of cells attracted (Arango Duque et Descoteaux, 2014; Li *et al.*, 2023). Nonetheless, there exists similarities between the VM- and TNF α -mediated gene expression of critical markers triggered and shared between both conditions, as shown in Tables 1 and 2 as well as in Figures 2.4 and 2.5. Indeed, the *CCL2*, *CCL5*, *IL-1 β* , and *IL-6* genes are all induced and known to characterize the cancer-associated adipocyte (CAA) phenotype (Dirat *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2019). VEGF α , which is triggered upon VM formation, and TNF α , which is self-induced by TNF α treatment, are also linked to the CAA-like phenotype (Dirat *et al.*, 2011). Interestingly, this profile can be triggered in ADMSCs in part through IL-6 stimulation originating from the secretome of breast cancer cells (Gonzalez Suarez *et al.*, 2022), and is linked to the induction of tumor-promoting conditions when ADMSCs differentiate into mature adipocytes.

The activation of STAT3 is known to increase the expression of VEGF α and MMPs in many types of tumors, further promoting angiogenesis (Gao *et al.*, 2017). Accordingly, VEGF α is known not only as an angiogenic factor for endothelial cells but also for its contribution to the mobilization of different types of stem cells, including endothelial progenitor cells (EPCs) and MSCs, contributing collectively to alternative vasculogenesis (Liang *et al.*, 2021; Lorenc *et al.*, 2024). On the other hand, MMPs facilitate the degradation of the ECM, allowing neovascularization via local tumor angiogenesis and vasculogenesis. Moreover, degradation of the ECM allows the release of different proangiogenic and inflammatory molecules sequestered in the matrix, increasing the concentration of angiogenic factors and promoting a proinflammatory molecular signature (Neve *et al.*, 2014). More particularly, MMP-9 has been linked to the angiogenic switch and to promote tumor growth (Bergers *et al.*, 2000). Accordingly, our results showed an increase in the expression of *MMP9* and *VEGFA* by both VM and TNF α , which was inhibited by AG490 along

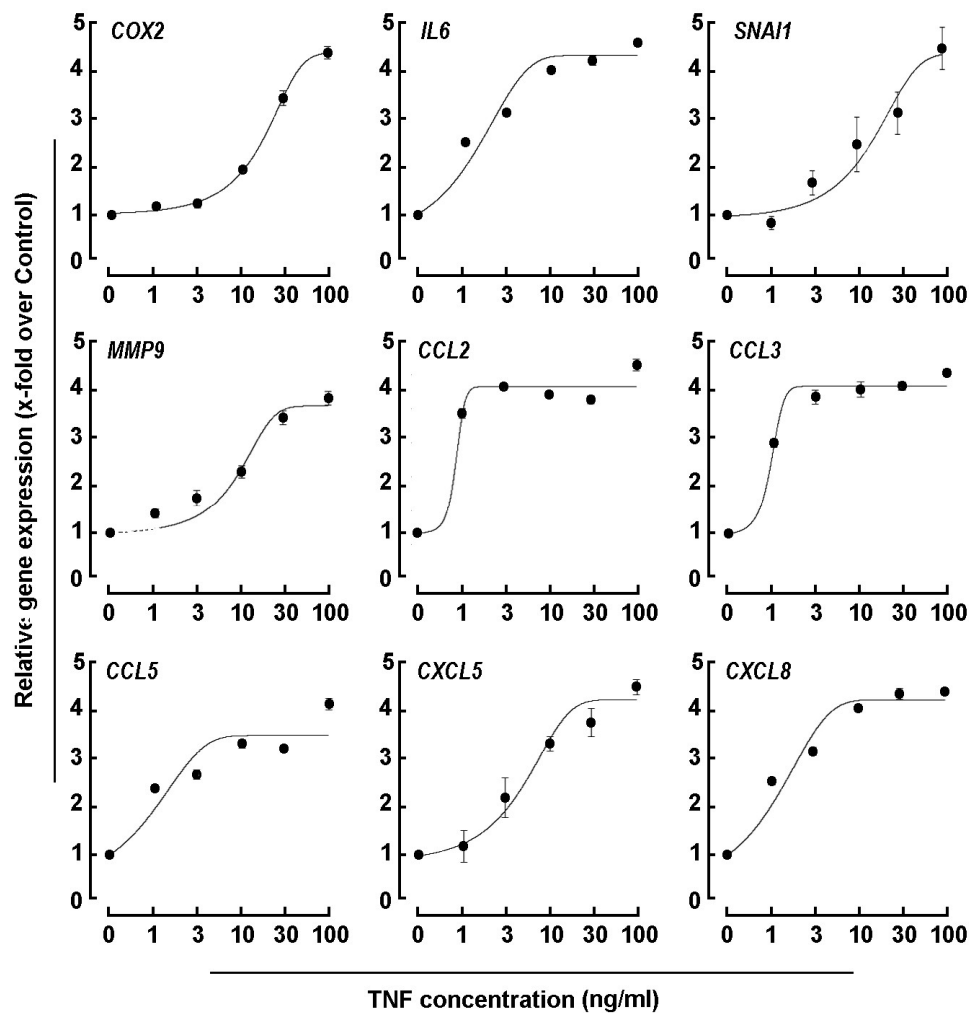
with a reduced migration response. We also obtained similar results for *SNAI1*, a marker of EMT and invasion in cancer.

Otherwise, it would be interesting to study micro RNAs (miRNAs) in ADMSC VM, as key non-coding RNAs negatively regulate the expression of more than 60% of genes (Friedman *et al.*, 2009), including genes involved in the control of the inflammasome and of the biological activity of MSCs (Guo *et al.*, 2011; Stămat *et al.*, 2023). Indeed, the JAK2/STAT3-mediated signaling is known to modulate the expression level of specific miRNAs. Among those, miR-146b is induced by STAT3 and triggers a feedback loop to inhibit NF- κ B to the IL-6 signaling axis and the downstream STAT3-driven cancer phenotypes (Xiang *et al.*, 2014). In addition, miR-146b has been shown to increase the angiogenic properties of EPCs, a type of stem cell with vasculogenic properties similar to those of MSCs (Desjarlais *et al.*, 2019). Finally, miRNAs can also modulate STAT3 activity by targeting upstream mediators, such as IL-6, IL-9, and JAKs, or by directly binding to the STAT3 gene. Conversely, STAT3 can in turn regulate miRNA expression, suggesting a mutual influence on their activity and function in tumor processes (Sajjadi-Dokht *et al.*, 2022).

2.7 Conclusions

In conclusion, our research highlights the potential paracrine regulation of ADMSCs through their adoption of an inflammatory phenotype, akin to that of CAA, and the importance of JAK2/STAT3 signaling in this process. Our findings suggest that ADMSCs could also possibly contribute to the instauration of tumoral microcirculation and, therefore, promote tumor growth and invasion. We conclude that reinforcing JAK2/STAT3 as a therapeutic target to abrogate VM could potentially reduce resistance to current antiangiogenic treatments.

2.8 Supporting information



Supplemental figure 2.8. Efficiency of TNFα to induce a dose-dependent pro-inflammatory and invasive molecular signature in ADMSC monolayers.

ADMSC were cultured as 2D monolayers in the presence of the indicated increasing concentrations of TNFα for 24 hours. Total RNA was extracted as described in the Methods section. The relative gene expression levels of multiple inflammation and invasive markers were measured via RT-qPCR and are expressed as the percentages of the maximal TNFα effect (100 ng/mL TNFα). All data are representative of two to three independent experiments, each performed in triplicate.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Le cancer est en hausse depuis une soixantaine d'années, conjointement avec l'obésité, qui est aujourd'hui au stade de pandémie (Mukherjee *et al.*, 2022). Cette dernière prédispose au développement tumoral par l'accumulation excessive de WAT, causant un déséquilibre hormonal et cytokinique. Conséquemment, l'obésité stimule l'inflammation et la vascularisation tumorale, deux caractéristiques essentielles à la carcinogénèse (Hanahan et Weinberg, 2011). La perméabilité augmentée des vaisseaux favorise également la métastase; combiné au WAT inflammé qui est une niche parfaite pour l'invasion, on voit une augmentation des métastases chez les personnes obèses, et donc une augmentation de la mortalité (Brown et Scherer, 2023). Cependant, malgré le fait que l'angiogénèse est une des cibles privilégiées pour traiter le cancer, plusieurs processus amènent une chimiorésistance. L'un d'eux est le VM, qui permet la formation d'une pseudo-vasculature indépendante des cellules épithéliales (Folberg et Maniotis, 2004; Maniotis *et al.*, 1999). Ce phénomène est associé aux CSCs, par leur capacité d'auto-renouvellement et leur plasticité (Luo *et al.*, 2020). Cependant, des études récentes ont montré que les BMMSCs pourraient aussi être impliquées dans le VM (Bhuniya *et al.*, 2022; Roy *et al.*, 2024a; Rytlewski *et al.*, 2015); l'apport potentiel des ADMSCs reste inconnu. Notre projet de recherche s'est donc penché sur la question et nous avons démontré que les ADMSCs peuvent former des structures de type capillaires similaires au VM *in vitro* et qu'elles acquièrent une signature moléculaire inflammatoire via la voie de signalisation JAK2/STAT3.

Premièrement, notre étude a démontré que les cellules ADMSCs sont capables de former des structures de type capillaires qui sont caractéristiques du VM *in vitro* lorsque cultivées sur Cultrex. Leur maturation est caractérisée par une augmentation du nombre de boucles et d'intersections sur seulement quelques heures. Les cellules en monocouches ne peuvent former de structures, nécessitant le support de la matrice tridimensionnelle. Nous avons utilisé le Cultrex, car il s'agit d'un extrait d'ECM provenant de tumeurs murines et contenant des facteurs solubles; il nous permet d'imiter le TME autant que possible, vu notre utilisation en monoculture. De plus, bien que les contacts cellules-cellules et cellules-ECM soient importants (Brassart-Pasco *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2023), les facteurs solubles sont essentiels à la formation de structures tel que démontré par Roy *et al.* En effet, lorsque l'on déplete le Cultrex de ses facteurs solubles, le VM est inhibé (Roy *et al.*, 2024a).

Deuxièmement, les MSCs sont connues pour leur capacité de migration au site tumoral, médiée par l'hypoxie et plusieurs chimiokines (Li *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023b). Cette caractéristique est impliquée dans le VM, car elle permet aux cellules de se réorganiser et de former des structures capillaires tridimensionnelles. Tel qu'attendu, les ADMSCs ont une réponse migratoire lorsqu'exposées à des chimio attractants, un milieu supplémenté avec du sérum FBS dans notre cas. De même, les MMPs jouent un rôle important dans le VM vu leur fonction dans le remodelage de l'ECM (Valdivia *et al.*, 2019). MMP-9, qui est associée avec la croissance tumorale et l'activation de l'angiogenèse, était justement surexprimée chez les ADMSCs formant des structures capillaires (Bergers *et al.*, 2000).

Ensuite, nous avons évalué la signature moléculaire inflammatoire induite par le VM puisque l'inflammation chronique contribue à des plusieurs processus de la tumorigenèse comme l'angiogenèse, le remodelage de l'ECM et la métastase (Demir, 2023). Les ADMSCs formant des structures capillaires ont une expression accrue de plusieurs CCLs, CXCLs et interleukines, dont *IL-1 β* . Aussi, il est particulièrement intéressant qu'elles surexpriment elles-mêmes *VEGFA*, car, malgré l'absence d'implications des cellules épithéliales dans le VM, le *VEGFA* stimule sa formation. Cela peut s'expliquer par son action de recrutement des EPCs et des MSCs, qui peuvent contribuer à la vascularisation en se différenciant (Liang *et al.*, 2021; Lorenc *et al.*, 2024), ce qui pourrait aussi entraîner un effet de stimulation autocrine. Autrement, le profilage génique a également mesuré la répression de plusieurs gènes inflammatoires, majoritairement des interleukines.

Parallèlement, nous avons comparé la signature moléculaire inflammatoire induite par le VM avec celle médiée par le TNF α . Notre choix s'est porté sur cette cytokine pro-inflammatoire, car elle est produite par plusieurs composantes du TME, soit les cellules cancéreuses, les adipocytes matures et plusieurs types de cellules immunitaires (TAMS, NKs, cellules T et neutrophiles) (Demir, 2023; Laha *et al.*, 2021; Wen *et al.*, 2022). Elle active la voie de signalisation NF- κ B, mais elle peut aussi déclencher l'activation alternative de STAT3 par l'assemblage de JAK2 et TNFR1 (Guo *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2021; Mori *et al.*, 2011). Nous avons donc commencé par confirmer les effets du TNF α sur les ADMSCs en monocouches. Tel qu'attendu, la production de COX-2 et la phosphorylation de STAT3 ainsi que l'expression de gènes de biomarqueurs de l'inflammation étaient augmentées de manière dose-dépendante par le TNF α . Nous avons poursuivi les expériences avec une concentration de 30 ng/mL de TNF α pour être près du plateau pour la plupart des gènes, comparables ou sous les doses utilisées dans d'autres expériences semblables (Ren *et al.*, 2012; Taha *et al.*, 2020). En faisant un profilage génique RT² PCR, on obtient des résultats conformes à la

littérature, entre autres, une augmentation de *CCL5*, *CXCL8*, *CXCL10*, *CXCL11* (Taha *et al.*, 2020); de plus, on voit l'induction de l'expression d'*IL-1β*, d'*IL-6* et de *TNFα* lui-même (Turner *et al.*, 2014).

Ainsi, les MSCs exercent une régulation paracrine sur les tumeurs par leur capacité immunomodulatrice ainsi que la sécrétion de cytokines et d'exosomes (Zhao *et al.*, 2023b). Ici, le portrait général peint par la signature moléculaire commune de VM et *TNFα* montre une surexpression de chimiokines CCLs et CXCLs favorisant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'EMT et la tumorigenèse. Plusieurs d'entre elles recrutent des neutrophiles et les macrophages. Les autres ciblent les DCs, les cellules T et les NKs. Il est difficile de tirer des conclusions sur ce profil puisque les cellules immunes ont des effets synergiques et communiquent entre elles. Dans un cas *in vitro* comme le nôtre, on ne peut pas déterminer si les cellules immunitaires seraient de type protumoral (comme les TAMs, les macrophages M2, et certains neutrophiles) ou antitumoral (comme les macrophages M1 et les autres neutrophiles). De même, on ne peut pas savoir si les cellules T auraient un phénotype épuisé et peu cytotoxique. Cependant, pour ce qui est des gènes réprimés par le VM et le *TNFα*, il s'agit majoritairement de gènes de récepteurs, ce qui semble indiquer une perte de sensibilité des ADMSCs aux signaux externes de recrutement. En effet, les MSCs migrent au site tumoral par l'action de cytokines et de chimiokines et portent donc de nombreux récepteurs à leur surface. Parmi ceux-ci, on en retrouve justement trois dans notre profil, soit CCR3, CCR4 et CXCR1 (Zhao *et al.*, 2023b). Les autres gènes réprimés ciblent principalement les cellules immunitaires adaptatives. En effet, on voit une diminution des gènes recrutant les cellules auxiliaires (Th1 et Th2) ainsi que les cellules T cytotoxiques et NKs. On peut interpréter ces données comme l'acquisition d'une certaine immunotolérance dans le TME puisque les cellules T et NKs sont les principaux agents capables de détruire les cellules cancéreuses.

Toutefois, notre étude met en lumière l'acquisition par les ADMSCs formant du VM et traitées au *TNFα* d'un phénotype similaire à celui des CAAs. Celui-ci est normalement observé chez les adipocytes matures recrutés par le cancer, mais il a déjà été observé également chez les ADMSCs en réponse au sécrétome de TNBC, dont principalement l'*IL-6* (Gonzalez Suarez *et al.*, 2022). Le phénotype CAA est caractérisé par la surexpression de *CCL2*, *CCL5*, *IL-1β*, *IL-6* et *TNFα* (Dirat *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2023b), exactement ce que nous avons obtenu pour nos deux groupes d'ADMSCs. *CCL2* et *CCL5* sont des cytokines recrutant les macrophages au site de l'inflammation. Cela peut engendrer une boucle de rétroaction positive, les macrophages étant sensibles au *TNFα* et le produisant eux-mêmes (Laha *et al.*, 2021; Wen *et al.*, 2022).

Dans le cadre de notre expérience, l'acquisition d'un phénotype similaire aux CAAs chez les ADMSCs est très intéressant puisque la voie JAK2/STAT3 est activée à la fois par IL-6, IL-1 β et TNFa. En effet, une grande partie de ce projet était dédiée à évaluer le rôle de la voie de signalisation JAK2/STAT3 dans le VM. Pour ce faire, nous avons réprimé la voie JAK2/STAT3 par un inhibiteur pharmacologique, Tyrphostin AG490. Il a montré une belle efficacité à 10 μ M, confirmant les données de la littérature indiquant un effet faible à 3 μ M et un effet marqué à 10 μ M (Meydan *et al.*, 1996). Cependant, la dose pourrait être augmentée encore davantage si nécessaire, car AG490 n'est pas cytotoxique jusqu'à une concentration de 50 μ M (Lanuti *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2009). Son mode d'action passe par l'inhibition de la phosphorylation de JAK2, et, par conséquent, celle de STAT3 en aval. Nous avons confirmé l'effet inhibiteur d'AG490 en le comparant avec la répression génique par siRNA ciblant spécifiquement STAT3. L'expression de *STAT3* n'a été diminuée qu'avec l'utilisation de siSTAT3. Nous avons également comparé les effets de ces deux inhibitions sur la formation de structures capillaires sur Cultrex. Dans les deux cas, les boucles et les intersections ont été diminuées significativement et de façon similaire. Ayant ainsi validé l'AG490, nous avons poursuivi les expérimentations avec l'inhibiteur pharmacologique uniquement.

Par la suite, l'influence de la voie JAK2/STAT3 a été testée sur la capacité migratoire des ADMSCs. Comme pour le VM, une diminution significative a été obtenue seulement à la concentration 10 μ M. De même, l'inhibition pharmacologique diminue l'expression des biomarqueurs de l'invasion *SNAI1* et *MMP-9* chez les ADMSCs formant du VM, ce qui peut expliquer une baisse de la migration et de la formation de structures. Finalement, la voie JAK2/STAT3 joue également un rôle dans l'inflammation, son inhibition causant la diminution de tous les gènes d'inflammation surexprimés, et inversement augmentant l'expression des gènes réprimés, le profil génique se rapprochant de celui du contrôle. Nous avons également validé l'effet de l'AG490 au niveau protéique, ce dernier permettant l'inhibition de COX-2 et de la phosphorylation de phospho-STAT3, toujours à 10 μ M. L'effet biphasique vu sur le phospho-STAT3 pourrait s'expliquer par la longueur du traitement (24 heures); en effet, ce genre d'inhibition montre d'excellents résultats très rapidement, aussi peu qu'une heure (Seo *et al.*, 2009).

Pour résumer, l'inhibition pharmacologique de JAK2/STAT3 par AG490 permet de diminuer la formation de VM, la migration cellulaire, et l'expression génique de marqueurs de l'inflammation et de l'invasion.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons démontré que la voie de signalisation JAK2/STAT3 joue un rôle dans le VM chez les ADMSCs par :

- 1) La réduction de la formation de structures de type capillaires sur une matrice tridimensionnelle imitant partiellement le TME;
- 2) La diminution de la capacité migratoire des ADMSCs en réponse à un signal chimiotactique;
- 3) L'inhibition de l'acquisition d'une signature moléculaire inflammatoire et similaire au phénotype des CAAs.

L'importance de notre étude découle de notre découverte que les ADMSCs ont le potentiel de participer à la microcirculation tumorale par la formation de VM. Ce genre de mécanisme alternatif à l'angiogenèse est associé avec la chimiorésistance et des cancers agressifs. Nous avons également approfondi notre connaissance de leur potentiel de régulation paracrine en caractérisant leur signature moléculaire inflammatoire. Enfin, nous renforçons l'importance de JAK2/STAT3 comme cible thérapeutique anticancéreuse par son rôle dans l'inflammation, la migration et le VM.

Afin de compléter nos observations, il serait pertinent de faire des expériences *in vivo* pour confirmer que les ADMSCs se joignent aux CSCs dans la formation du VM. De même, des cellules primaires pourraient être testées *in vitro* au lieu d'utiliser une lignée commerciale d'ADMSCs. De plus, il serait intéressant d'étudier si l'obésité a un impact sur ce phénomène. Pour ce faire, il faudrait caractériser les cellules avec leurs CD spécifiques, par immunohistochimie ou par cytométrie. En effet, le VM est caractérisé par des cellules négatives pour CD31 et positives pour VE-cadhérine (Folberg et Maniotis, 2004; Rytlewski *et al.*, 2015); si les ADMSCs sont aussi impliquées *in vivo* sous leur forme non-différenciée, on devrait observer des cellules positives pour les marqueurs spécifiques aux MSCs comme CD166 (American Type Culture Collection, 2024; Brinkhof *et al.*, 2020). Il pourrait être intéressant de tester les structures capillaires formés par les ADMSCs *in vitro* pour confirmer la présence d'un lumen, le VM étant défini comme une pseudo-vasculature capable de supporter un apport sanguin tumoral (Valdivia *et al.*, 2019). Finalement, il faudrait également valider les niveaux de phosphorylation de JAK3 puisque AG490 peut aussi avoir un effet sur cette protéine dans certaines lignées cellulaires (Wang *et al.*, 1999). La répression génique de JAK2 et JAK3 individuellement permettrait de développer davantage nos conclusions.

Les ADMSCs sont beaucoup étudiées comme outil thérapeutique, car elles sont facilement accessibles par la liposuccion et elles sont stables en culture (Hutchings *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2025; Zuk *et al.*, 2002). En plus de leur grande capacité de régénération tissulaire et d'immunomodulation, elles peuvent être utilisée comme transporteur de traitements migrant spécifiquement vers le site tumoral (De Becker et Riet, 2016; Tian *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2025; Zuk *et al.*, 2002). En effet, les ADMSCs peuvent migrer au site tumoral, délivrant les molécules thérapeutiques de manière spécifique avec peu d'effets secondaires ou de toxicité, contrairement à la chimiothérapie actuelle (Kohal et al., 2024; Liang et al., 2021). Plusieurs études ont été faites sur la modification de MSCs pour améliorer leur capacité de migration et pour qu'elles expriment des miRNAs inhibiteurs de tumeur (Wan *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023b). De même, des recherches ont démontré que les MSCs exogènes ne survivent pas longtemps dans le TME (Zhao *et al.*, 2023b); toutefois, nous avons observé la formation de VM après seulement quelques heures, il serait donc intéressant de confirmer si les MSCs exogènes peuvent être reprogrammée par le cancer et participer au VM.

Pour conclure, avec la hausse récente des cancers chez les personnes de moins de 50 ans (Zhao *et al.*, 2023a) et de 30 à 50% des cas dus à des habitudes de vie modifiables (Stein et Colditz, 2004; World Health Organization, 2025), il devient pressant de mettre l'emphasis sur la prévention. Dans le cas de l'obésité, les risques élevés sont réversibles avec la perte de poids (Lauby-Secretan *et al.*, 2016). De simples changements de mode de vie peuvent avoir un grand impact sur la santé; de fait, l'augmentation de l'exercice physique permet la sécrétion de myocytokines (cytokines d'origine musculaire), dont certaines inhibent les effets d'IL-1 β et de TNF α (Monsalve *et al.*, 2023), diminuant ainsi l'inflammation. La lutte contre le cancer commence donc à une échelle individuelle d'abord et avant tout.

APPENDICE A

ARTICLE : PROBING INTO THE CHEMOPREVENTIVE PROPERTIES OF SYNTHETIC 1,3,6-TRI-O-GALLOYL- α -D-GLUCOSE (α -TGG) AGAINST GLIOBLASTOMA AND TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER-DERIVED CELL MODELS

Carolane Veilleux¹, Jihane Khalifa², Alain Zgheib¹, Angélique Sabaoth Konan¹, Roger Gaudreault¹, et Borhane Annabi¹

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie and CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada, H3C 3P8, et ²Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada, H3C 3P8

Manuscrit publié en avril 2025 dans Current Research in Pharmacology and Drug Discovery **8**, 100219.

DOI: 10.1016/j.crphar.2025.100219

Contribution des auteurs

Conceptualisation : Carolane Veilleux et Borhane Annabi; Conservation des données : Carolane Veilleux, Jihane Khalifa et Alain Zgheib; Analyse formelle : Carolane Veilleux, Jihane Khalifa, Roger Gaudreault et Borhane Annabi; Acquisition du financement : Borhane Annabi; Investigation : Carolane Veilleux; Méthodologie : Carolane Veilleux, Jihane Khalifa, Alain Zgheib et Angélique Sabaoth Konan; Montage des figures : Carolane Veilleux et Borhane Annabi; Supervision : Roger Gaudreault et Borhane Annabi; Rédaction – ébauche originale : Carolane Veilleux et Borhane Annabi; Rédaction – révision et corrections : Carolane Veilleux, Roger Gaudreault et Borhane Annabi. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

A.1. Résumé

L'inflammation joue un rôle important dans la progression du cancer. Les stratégies chimiopréventives contre la réponse cellulaire aux signaux pro-inflammatoires pourraient donc contribuer à inhiber l'acquisition d'un phénotype invasif. Le 1,3,6-Tri-O-Galloyl- β -D-Glucose (β -TGG) est un type de gallotannin naturellement présent dans des plantes comme *Paeonia lactiflora* et *Terminalia chebula*. Malheureusement, les rendements globaux d'extraction du β -TGG nécessitent des protocoles de purification complexes à partir de sources végétales et sont relativement faibles. Ici, un nouvel α -anomère synthétique de TGG (α -TGG) a été caractérisé pour ses propriétés biologiques anti-inflammatoires et anticancéreuses. Des signaux pro-inflammatoires et de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) *in vitro*, déclenchés par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), la concanavaline A (ConA), le facteur de nécrose tumorale (TNF) α et le facteur de croissance transformant (TGF) β , ont été utilisés pour cribler le α -TGG dans deux modèles de cellules cancéreuses humaines très agressives, à savoir le glioblastome U87 et les cellules dérivées du cancer du sein triple négatif (TNBC) MDA-MB-231. Le α -TGG a inhibé de manière dose-dépendante l'activation médiée par ConA de la métalloprotéinase matricielle latente pro-MMP-2 en sa forme active MMP-2 ainsi que l'expression de la cyclooxygénase (COX)-2 médiée par ConA et PMA, deux biomarqueurs de l'inflammation, dans les cellules U87. Dans les MDA-MB-231, le α -TGG a inhibé l'induction de la pro-MMP-9 médiée par le PMA et le TNF α , un marqueur de l'inflammation et du phénotype invasif. Enfin, dans les deux lignées cellulaires, le α -TGG a également inhibé la chimiotaxie induite par le TGF β , ainsi que la phosphorylation de Smad2 et l'expression de Snail induites par le TGF β , respectivement une voie de signalisation cruciale en amont et un biomarqueur en aval associés à l'EMT. Collectivement, nous confirmons que le α -TGG a conservé de puissantes propriétés pharmacologiques anti-inflammatoires et anti-invasives qui soutiennent son potentiel chimiopréventif.

A.2. Abstract

Inflammation plays a significant role in cancer progression. Chemopreventive strategies against cellular response to pro-inflammatory cues may therefore contribute to inhibit the acquisition of an invasive phenotype. 1,3,6-Tri-O-Galloyl- β -D-Glucose (β -TGG) is a type of gallotannin naturally found in plants like *Paeonia lactiflora* and *Terminalia chebula*. Unfortunately, the overall yields of β -TGG extraction require complex purification protocols from plant sources and are relatively low. Here, a new synthetic α -anomer of TGG (α -TGG) was characterized for anti-inflammatory and anticancer biological properties. *In vitro* pro-inflammatory and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) cues, triggered by phorbol 12-myristate 13-

acetate (PMA), concanavalin A (ConA), tumour necrosis factor (TNF) α , and transforming growth factor (TGF) β , were used to screen α -TGG in two highly aggressive human cancer cell models, namely the U87 glioblastoma and the MDA-MB-231 triple-negative breast cancer (TNBC)-derived cells. α -TGG dose-dependently inhibited ConA-mediated activation of the latent matrix metalloproteinase pro-MMP-2 into its active MMP-2 form as well as the ConA- and PMA-mediated cyclooxygenase (COX)-2 expression, two biomarkers of inflammation, in U87 cells. In MDA-MB-231, α -TGG inhibited PMA- and TNF α -mediated induction of pro-MMP-9, a marker of inflammation and invasive phenotype. Finally, in both cell lines, α -TGG further inhibited TGF β -induced chemotaxis, as well as TGF β -induced Smad2 phosphorylation and Snail expression, respectively a crucial upstream signaling pathway and a downstream biomarker associated with EMT. Collectively, we confirm that α -TGG retained potent anti-inflammatory and anti-invasive pharmacological properties which support its chemopreventive potential.

A.3. Introduction

With cancer and its associated chronic inflammation still being a leading cause of death worldwide, prevention becomes as important an avenue of research as treatments are. Preventing inflammation in cancer involves a combination of lifestyle changes and medical interventions (Hou *et al.*, 2021; Todoric *et al.*, 2016). Chronic inflammation creates a tumor-promoting environment through, in part, inflammatory cells infiltration and secretion of mediators within the tumor microenvironment, where they contribute to processes like tissue remodeling and angiogenesis (Demir, 2023). Persistent inflammation can also lead to genomic instability, causing DNA damage, activation of oncogenes, or impairment of tumor suppressor genes (Rajput et Wilber, 2010). Inflammation can further promote the initiation of cancer and facilitate metastasis by interacting with various cellular and non-cellular components in the body (Wen *et al.*, 2022).

Current research actively explores ways to target inflammation as a strategy for both cancer prevention and treatment modalities, with some promising early results (Crusz et Balkwill, 2015; Wang *et al.*, 2024). Many phytochemicals, naturally occurring in fruits, vegetables, and other plant-based foods, can reduce inflammation by targeting various pro-inflammatory processes, such as the inhibition of cytokines production and the enhancement of anti-inflammatory cytokines production (Nisar *et al.*, 2023). Common anti-inflammatory phytochemicals include flavonoids, carotenoids, and polyphenols, which are abundant in foods like berries, citrus fruits, leafy greens, and nuts (Pyo *et al.*, 2024).

Certain phytochemicals found in plants also possess anticancer properties, such as gallotannins, a type of hydrolysable tannin consisting of a central sugar molecule (usually glucose) esterified with multiple gallic acid units (Jourdes *et al.*, 2013). Indeed, many studies on galloyl glucosides, especially the penta-galloyl, showed potent antitumor properties in humans (Li *et al.*, 2015; Wen *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2009). Multiple bi- and tri-galloyl glucosides had an inhibition rate between 64.2% and 92.9% at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ on various cancer cell lines, including K562 chronic myeloid leukemia, HL-60 acute promyelocytic leukemia, and HeLa adenocarcinoma cells (Li *et al.*, 2015). Interestingly, recent structure-to-function studies performed on catechins, a polyphenol-type phytochemical, have demonstrated that their galloyl moiety plays a crucial role in enhancing their antioxidant and anti-inflammatory activities (Takahashi *et al.*, 2018), as well as other processes including TGF β -induced EMT, and inhibition of vasculogenic mimicry (Djerir *et al.*, 2018; Sicard *et al.*, 2021). Computational methods have been further designed for structure-to-function analysis of diet-derived catechins-mediated targeting of *in vitro* vasculogenic mimicry (Uthamacumaran *et al.*, 2021).

The gallotannin 1,3,6-Tri-O-galloyl- β -D-glucose (β -TGG), or 1,3,6-Tri-O-galloyl- β -D-glucopyranose (National Center of Biotechnology Information, 2024), is a phytochemical found naturally in plants such as *Paeonia lactiflora* and *Terminalia chebula* (Zhou *et al.*, 2011). Unfortunately, the overall yields of β -TGG purification from plant sources are relatively low due to the complexity of the compound and require elaborate extraction protocols. An improved total synthesis of TGG's α -anomer (α -TGG) was recently reported (Pauvert *et al.*, 2023) which chemopreventive properties have however yet to be characterized. To address whether α -TGG possess any anti-inflammatory or anticancer pharmacological activity, four pro-inflammatory cues (i.e. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), concanavalin A (ConA), tumour necrosis factor (TNF) α and transforming growth factor (TGF) β) were used to screen those properties. The experimentations were performed *in vitro* using two highly aggressive human cancer cell models, namely the U87 glioblastoma and the MDA-MB-231 triple-negative breast cancer (TNBC)-derived cells.

α -TGG was found to inhibit, in a dose-dependent manner, the ConA-mediated activation of the latent matrix metalloproteinase (MMP) pro-MMP-2 form into its active MMP-2 form, as well as the ConA- and PMA-mediated cyclooxygenase (COX)-2 expression, two biomarkers of inflammation, in U87 cells. In MDA-MB-231, α -TGG inhibited PMA- and TNF α -mediated induction of pro-MMP-9, a marker of inflammation and invasive phenotype. Finally, in both cell lines, α -TGG further inhibited TGF β -induced chemotaxis, as well as TGF β -induced Smad2 phosphorylation and Snail expression, respectively a crucial upstream

signaling pathway and a downstream biomarker associated with EMT. Collectively, these anti-inflammatory and anti-invasive pharmacological properties of α -TGG support its chemopreventive potential.

A.4. Materials and Methods

A.4.1. Reagents

α -TGG was a kind gift of Yann Pauvert (Université de Montréal, Montreal, QC, Canada) (Pauvert *et al.*, 2023). Zymography standards for pro-MMP-2 and pro-MMP-9 were produced in our own laboratory (Veilleux *et al.*, 2025). PMA, ConA, TNF α , type A gelatin, and protease inhibitor cocktail were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Cell culture media were from Wisent (St-Jean-Baptiste, QC, Canada). TGF β and Pierce's micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagents were from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Electrophoresis reagents were purchased from Bio Basic (Markham, ON, Canada). The Clarity™ Enhanced Chemiluminescence (ECL) for HRP (horseradish peroxidase)-conjugated antibody detection reagents were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). The polyclonal antibodies against Snail (3879S), Smad2 (5339S), phospho-Smad2 Ser465/467 (3108S), as well as the monoclonal antibody against Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (97166S) were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The polyclonal antibody against COX-2 (610203) was from BD Bioscience (Franklin Lake, NJ, USA). HRP-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

A.4.2. Cell culture

Human glioblastoma U87 (HTB-14) and TNBC-derived MDA-MB-231 (HTB-26) cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). U87 cells were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% (volume/volume (v/v)) fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories, SH30541.03), 100 units/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Wisent, 250-202-EL). MDA-MB-231 cells were cultured in Dulbecco's Modification Eagle's Medium supplemented (DMEM) with 10% (v/v) FBS, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 1% (v/v) non-essential amino acids (HyClone Laboratories, SH40003.01). Both cell lines were cultured in 6-well plates at 3×10^5 cells/mL and incubated in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. Cells were kept subconfluent and expanded in number over 20 passages by a 1:3-1:4 split, 2 to 3 times per week. Tested compounds,

ConA (30 µg/mL), PMA (1 µM), TNFα (30 ng/mL), TGFβ (30 ng/mL) and TGGα (3-100 µM), were added to serum-free cell culture media, and cells treated for 24 hours at 37°C with 5% CO₂.

A.4.3. Zymography

Gelatin zymography was used to assess the extracellular level of gelatinolytic activities of pro-MMP-9, pro-MMP-2, and MMP-2 (Veilleux *et al.*, 2025). In summary, conditioned culture media was harvested and centrifuged at 3,500 rpm for 5 minutes to remove cell debris. A sample of 20 µL was electrophoresed on a gel containing 1 mg/mL gelatin, a substrate that these enzymes are highly effective at hydrolyzing. The gels were incubated in 2.5% Triton X-100 to renature the MMPs. The gels were washed with ultrapure water before being further incubated at 37°C overnight in a solution of 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij®-35, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6. The gels were then stained with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10% acetic acid and 40% methanol in water. Destaining was done in 10% acetic acid and 30% methanol in water which allowed detection of gelatinolytic activity as unstained bands on a blue background. Densitometric analysis was performed using ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

A.4.4. Western Blot

Total cell lysates were obtained through lysis in a buffer containing 1 mM each of sodium fluoride and sodium orthovanadate as well as 1X proteases inhibitor cocktail. Proteins (10-20 µg) were then separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Next, proteins were electro-transferred to low-fluorescence polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and blocked for 1 hour at room temperature with 5% non-fat 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 thrice in TBST and incubated overnight with the appropriate primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) at 4°C with agitation. After three washes in TBST, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG at 1/2,500 dilutions in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive bands were visualized by ECL on a Chemidoc or by autoradiography. Densitometric analysis was performed using ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

A.4.5. Real-time cell migration assay

Experiments were carried out using the Real-Time Cell Analysis (RTCA) dual purpose (DP) instrument and the xCELLigence system (Agilent, QC, Canada), following the instructions of the supplier: 25,000 cells per well were seeded in a CIM-plate 16 (Roche Diagnostics) and incubated at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 hours. Prior to cell seeding, the bottom of each well in the upper chamber was coated with 0.15% gelatin in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 1 hour at 37°C. The lower chamber was filled with serum-free medium containing either the vehicle or treatment. The upper chamber of each well was filled with 25,000 cells, in serum-free media as well. After 30 minutes of initial adhesion, cell migration was monitored for 2-7 hours. The impedance value was measured by the RTCA DP instrument and expressed as an arbitrary unit called the Cell Index. Each experiment was performed in quadruplicate wells, data and error bars were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

A.4.6. Statistical data analysis

Data and error bars were expressed as the mean $\pm$ SEM of two to three independent experiments. Hypothesis testing was conducted using a Mann-Whitney U-test (for comparison of two groups) with probability (P) values of less than 0.05 (*) considered significant and denoted in the respective figures. All statistical analysis were performed using the GraphPad Prism 7 software version 9.0.0 (GraphPad Software LLC, San Diego, California, USA).

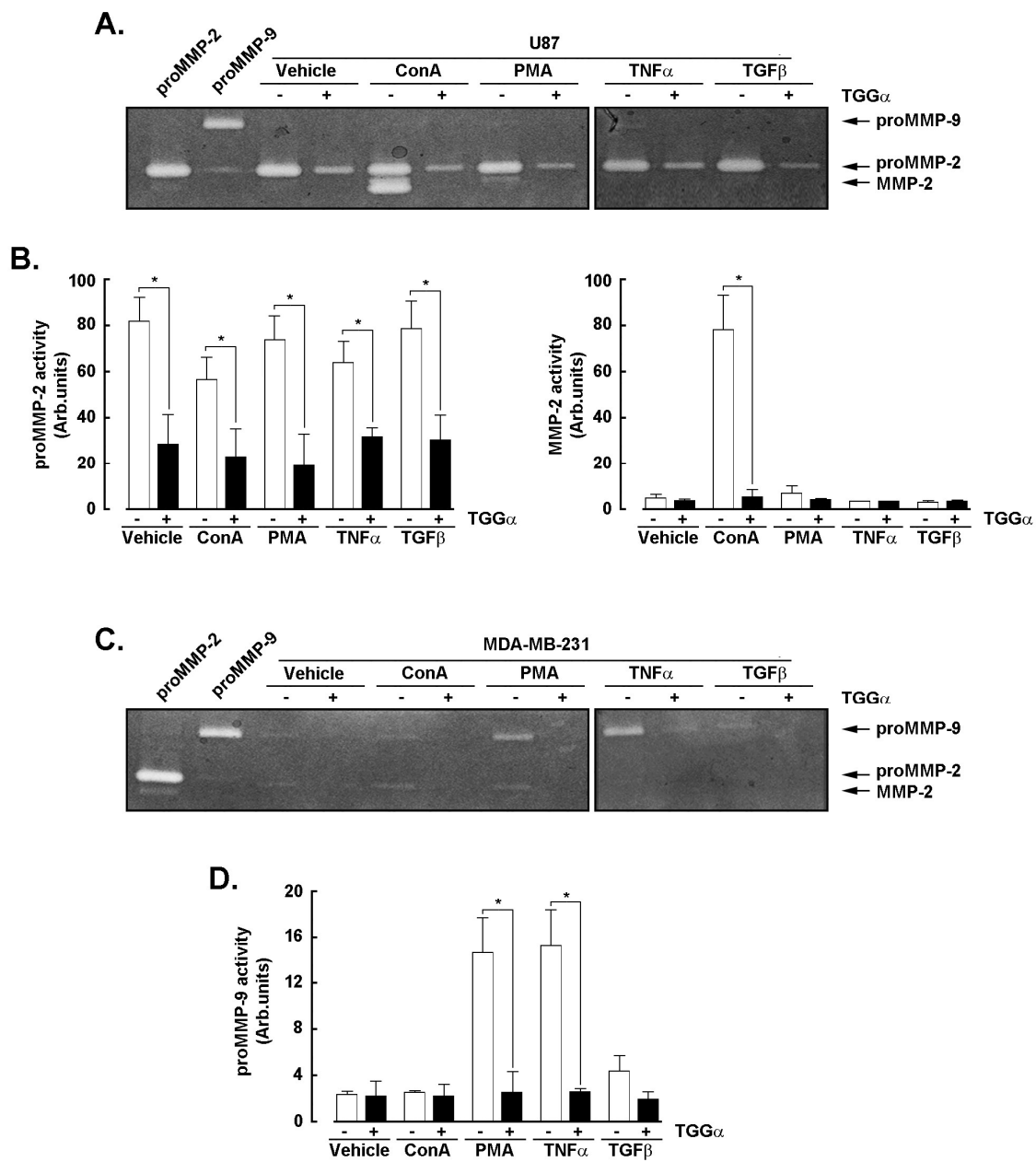
A.5. Results

A.5.1. *In vitro* pharmacological impact of α -TGG against pro-inflammatory treatments on the gelatinolytic activity and activation status of pro-MMP-2 and pro-MMP-9

During inflammation, MMPs expression and activity can be induced and contribute to both the progression and resolution of the inflammatory process (O'Shea et Smith, 2014). They are also linked to angiogenesis, cancer growth and metastasis (Klein et Bischoff, 2011). The pro-inflammatory cues of several reputed pharmacological agents including ConA, PMA, TNF α , and TGF β were therefore assessed in U87 glioblastoma cells as well as in MDA-MB-231 TNBC-derived cells. Media conditioned by the treated cells in the presence or absence of 100 μ M α -TGG were harvested and gelatin zymography performed as described in the Methods section (Figure A.1A and A.1C). On the one hand, while very low to undetectable

pro-MMP-9 secretion was observed upon PMA and TNF α treatments in U87 cells, it was significantly induced in MDA-MB-231 cells (Figure A.1D). On the other hand, ConA activated the latent pro-MMP-2 into its active MMP-2 form only in U87 cells (Figure A.1B, right panel). Interestingly, the inclusion of α -TGG further prevented the basal secretion of pro-MMP-2 (Figure A.1B, left panel) and pro-MMP-2 activation in U87 cells (Figure A.1B, right panel), as well as the induction of pro-MMP-9 secretion in MDA-MB-231 cells (Figure A.1D). Altogether, these data suggest that cells were responsive to the pharmacological action of α -TGG against the pro-inflammatory cues tested.

Given the PMA- and TNF α -induced secretion of pro-MMP-9 observed mostly in MDA-MB-231 cells (Figure A.1E) and its importance in cancerous invasion phenotypes (Huang, 2018; Klein et Bischoff, 2011), we further show that α -TGG dose-dependently inhibited PMA- and TNF α -mediated pro-MMP-9 secretion (Figure A.1F). Finally, chemotactic real-time cell migration was also performed with this cell line: TNF α was effectively found to trigger cell migration, whereas α -TGG inhibited such chemotactic cell response (Figure A.1G). Collectively, these data suggest that α -TGG can refrain the acquisition of an invasive phenotype by inhibiting the pro-inflammatory cues, which involve either the activation of latent MMPs, their secretion, chemotactic response, or a combination of these cellular processes.



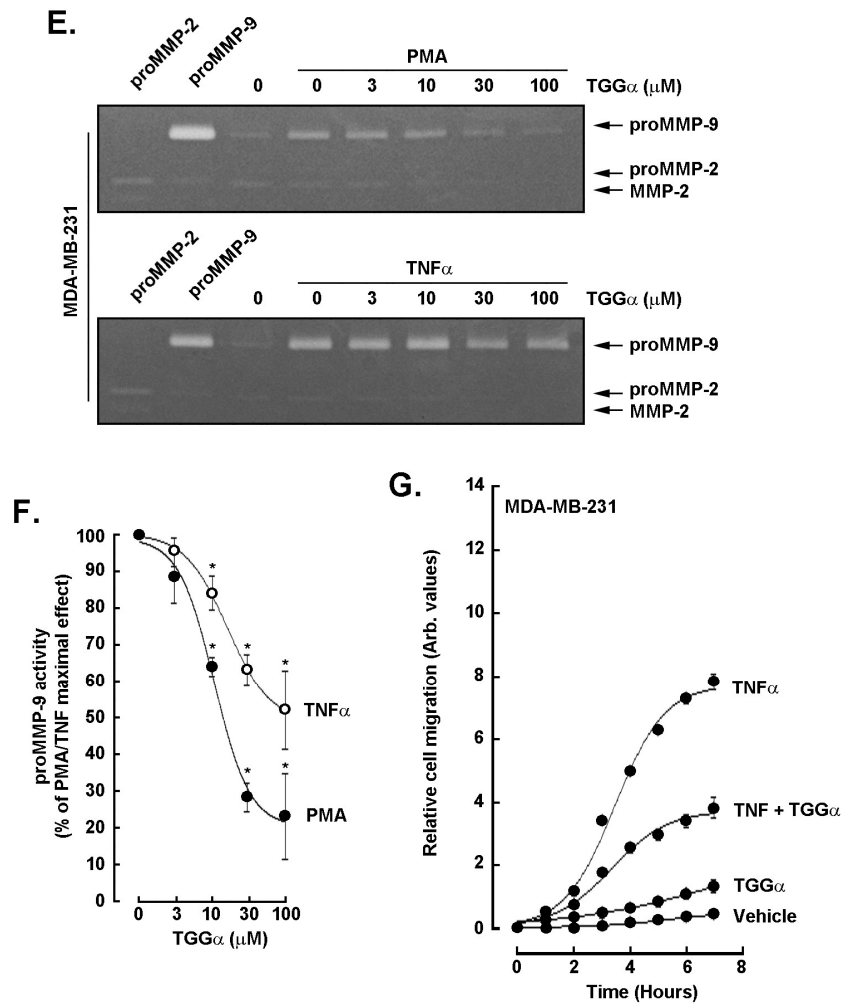


Figure A.1. *In vitro* pharmacological impact of α -TGG against pro-inflammatory treatments on the secretion and activation status of pro-MMP-2 and pro-MMP-9.

U87 glioblastoma cells and MDA-MB-231 TNBC-derived cells were treated for 24 hours with vehicle, 30 μ g/ml ConA, 1 μ M PMA, 30 ng/mL TNF α , or 30 ng/mL TGF β in serum-free media in the presence or absence of 100 μ M α -TGG. Conditioned media were harvested and gelatin zymography performed as described in the Methods section in (A) U87 cells, (C) and (E) MDA-MB-231 cells. A densitometry analysis was performed to assess (B) the secretion (left panel) and activation levels of pro-MMP-2 (right panel) for the indicated treatment in the presence (black bars) or absence (white bars) of α -TGG in U87 cells, as well as (D) in MDA-MB-231 cells). (F) A densitometry analysis was performed to quantify the dose-dependent inhibition by α -TGG of pro-MMP-9 secretion induced by PMA (open circles) and TNF α (closed circles). (G) Chemotactic real-time cell migration was performed as described in the Methods section on MDA-MB-231 cells only in the presence of vehicle, 100 μ M α -TGG, 30 ng/mL TNF α , or a combined α -TGG/TNF α , over a period of 7 hours. All data are representative from two to three independent experiments.

A.5.2. Dose-dependent inhibition of Concanavalin A-mediated activation of pro-MMP-2 by α -TGG in U87 glioblastoma cells

To further explore the impact of α -TGG on the ConA-mediated activation of pro-MMP-2, U87 glioblastoma cells and MDA-MB-231 TNBC-derived cells were serum-starved and treated with 30 μ g/mL ConA with increasing concentrations of α -TGG for 24 hours. A dose-dependent inhibition of pro-MMP-2 activation was observed when assessed by gelatin zymography (Figure A.2A, upper panel), while very low to undetectable secretion of pro-MMP-2 was observed in MDA-MB-231 cells (Figure A.2A, lower panel). A densitometry analysis confirms the potent pro-MMP-2 activation into MMP-2 (Figure A.2B, left panel) and the dose-dependent inhibition of increasing concentrations of α -TGG which, at 100 μ M, almost completely reversed ConA-mediated activation of pro-MMP-2 (Figure A.2B, right panel).

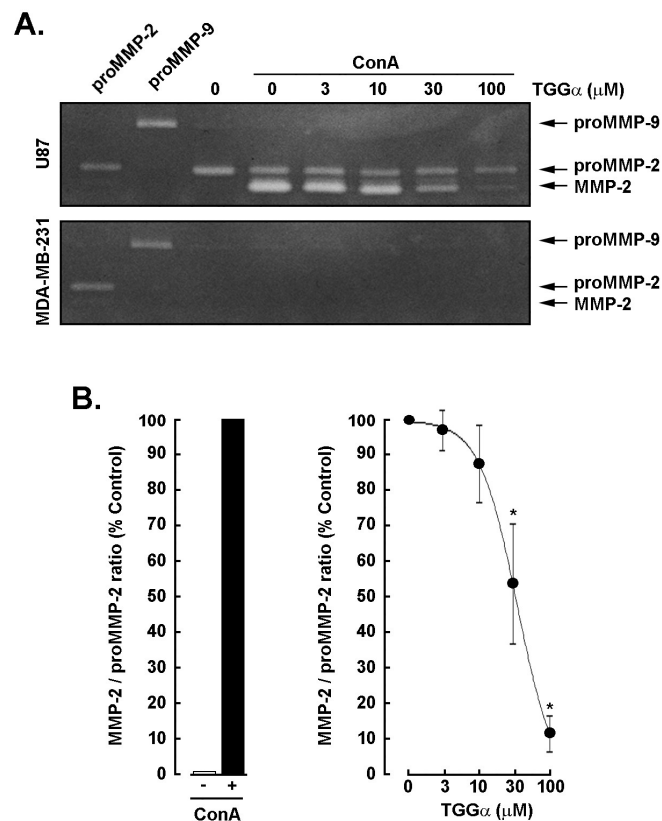


Figure A.2. Dose-dependent inhibition of Concanavalin A-mediated activation of pro-MMP-2 by α -TGG in U87 glioblastoma cells.

U87 glioblastoma cells and MDA-MB-231 TNBC-derived cells were serum-starved and treated for 24 hours with 30 μ g/ml ConA and increasing concentrations of α -TGG (3 to 100 μ M). (A) Conditioned media were harvested and gelatin zymography performed as described in the Methods section. (B) A densitometry analysis was performed to assess the extent of pro-MMP-2 activation into MMP-2 (left panel) and the dose-dependent effect of increasing concentrations of α -TGG (right panel). All data are representative from two to three independent experiments.

A.5.3. Dose-dependent inhibition of Concanavalin A-induced COX-2 expression by α -TGG in U87 glioblastoma cells

Given the capacity of α -TGG to inhibit ConA-mediated pro-MMP-2 activation, we questioned whether any other intracellular signaling which triggers inflammation may be affected in U87 glioblastoma cells. Cells were treated as described above, protein lysates harvested, and Western blotting performed to detect the pro-inflammatory COX-2 biomarker expression (Figure A.3A, upper panel). ConA effectively induced COX-2 (Figure A.3B, left panel), and α -TGG dose-dependently prevented such induction (Figure A.3B, right panel) as quantified from a densitometry analysis. These data confirm the capacity of α -TGG to alter the signaling cues that lead to the acquisition of a pro-inflammatory phenotype.

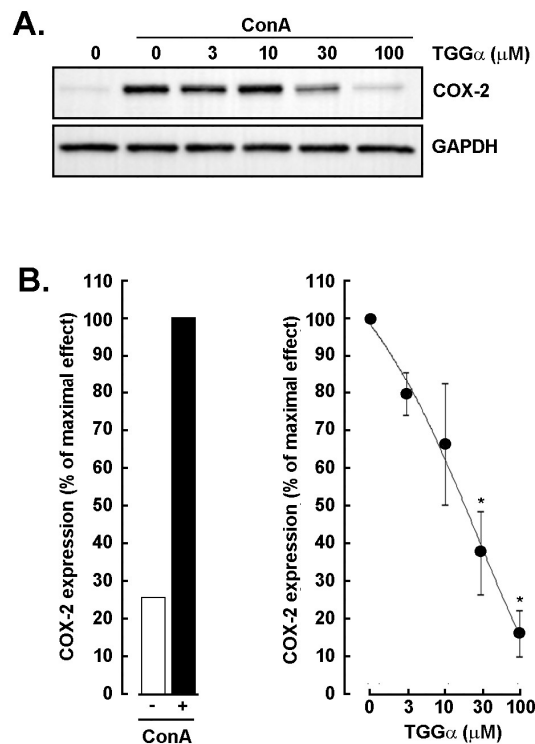


Figure A.3. Dose-dependent inhibition of Concanavalin A-induced COX-2 expression by α -TGG in U87 glioblastoma cells.

U87 glioblastoma cells were serum-starved and treated for 24 hours with 30 μ g/ml ConA and increasing concentrations of α -TGG (3 to 100 μ M). (A) Cell lysates were harvested, and Western blotting performed as described in the Methods section to detect COX-2 expression. GAPDH expression was used as a loading control. (B) A densitometry analysis was performed to assess the extent of COX-2 expression induced by ConA (left panel) and the dose-dependent effect of increasing concentrations of α -TGG (right panel). Data are representative from two independent experiments.

A.5.4. Dose-dependent inhibition of PMA-induced COX-2 expression by α -TGG in U87 glioblastoma cells

We further extended our pharmacological screen to PMA and TNF α , two reputed inducers of inflammation in U87 glioblastoma cells. The cells were treated with either 1 μ M PMA or 30 ng/mL TNF α in the presence or absence of α -TGG. Protein lysates were harvested, and Western blotting performed as described in the Methods section to detect COX-2 expression. While TNF α induction was barely detectable, PMA on the other hand significantly triggered COX-2 expression (Figure A.4A), which induction was effectively and dose-dependently reversed by α -TGG (Figure A.4B). A densitometry analysis confirmed the extent of COX-2 expression induced by PMA (Figure A.4C, left panel) and the dose-dependent effect of increasing concentrations of α -TGG (Figure A.4C, right panel). Altogether, this is an additional confirmation of the capacity of α -TGG to alter the impact of pro-inflammatory cues.

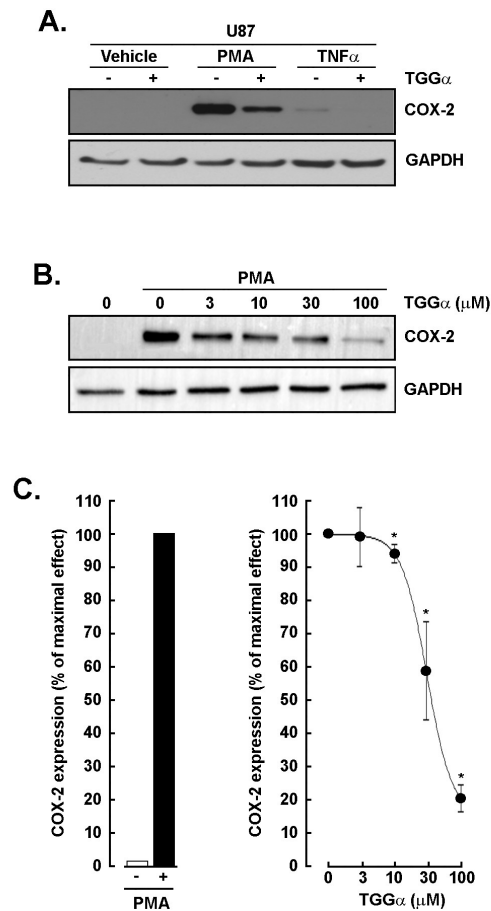


Figure A.4. Dose-dependent inhibition of PMA-induced COX-2 expression by α -TGG in U87 glioblastoma cells.

U87 glioblastoma cells were serum-starved and treated for 24 hours with 1 μ M PMA or 30 ng/mL TNF α in the presence or absence of 100 μ M α -TGG. (A) Cell lysates were harvested, and Western blotting performed as described

in the Methods section to detect COX-2 expression. (B) A representative Western blot of a dose-response effect of α -TGG against PMA-induced COX-2 expression is shown. GAPDH was used as an internal loading control. (C) A densitometry analysis was performed to assess the extent of COX-2 expression induced by PMA (left panel) and the dose-dependent effect of increasing concentrations of α -TGG (right panel). Data are representative from two independent experiments.

A.5.5. Dose-dependent inhibition of TGF β -induced Smad2 phosphorylation and Snail expression by α -TGG in U87 glioblastoma and MDA-MB-231 cells

TGF β is a pro-inflammatory cytokine also known to trigger the EMT in glioblastoma and ovarian cancer cells (Djedai *et al.*, 2021; Ouanouki *et al.*, 2017; Sicard *et al.*, 2021). U87 glioblastoma and MDA-MB-231 TNBC-derived cells were therefore treated with 30 ng/mL TGF β and screened in the presence or absence of 100 μ M α -TGG. Cell lysates were harvested, and Western blotting performed to detect a significant TGF β -induced Snail expression which was prevented by α -TGG in both cell lines (Figure A.5A). This inhibitory effect of α -TGG was further found to be dose-dependent in both U87 cells (Figure A.5B, three upper panels) and MDA-MB-231 cells (Figure A.5B, three lower panels) against TGF β -induced Snail expression as well as Smad2 phosphorylation. A densitometry analysis confirmed the extent of Snail expression induced by TGF β (Figure A.5C, left panel) and the dose-dependent effect of increasing concentrations of α -TGG (Figure A.5C, right panel) in U87 cells. The extent of TGF β -mediated phosphorylation of Smad2 (Figure A.5D, left panel) was also found to be dose-dependently inhibited by increasing concentrations of α -TGG (Figure A.5D, right panel). Similar inhibitory profiles were obtained with MDA-MB-231 cells (Figure A.5B, lower panels). Here, evidence suggests that, along with its anti-inflammation properties, α -TGG can also alter the acquisition of an invasive TGF β -mediated EMT phenotype in two cell models.

A.5.6. α -TGG inhibits the TGF β -induced chemotactic cell response in U87 glioblastoma and MDA-MB-231 cells

We finally assessed whether the real-time chemotactic cell migration response to TGF β was also altered by α -TGG. In accordance with their molecular response to TGF β documented above, migration of U87 glioblastoma (Figure A.6A, left panel) and MDA-MB-231 TNBC-derived (Figure A.6B) cells was found to be induced by TGF β and significantly reduced by α -TGG. Interestingly, chemotactic cell migration was also found to be inhibited by α -TGG in response to serum-enriched media (Figure A.7). Moreover, such

inhibition was not attributed to cytotoxic effects of α -TGG as assessed by the common method of Trypan Blue exclusion assay to determine cell viability (Shekhawat *et al.*, 2025).

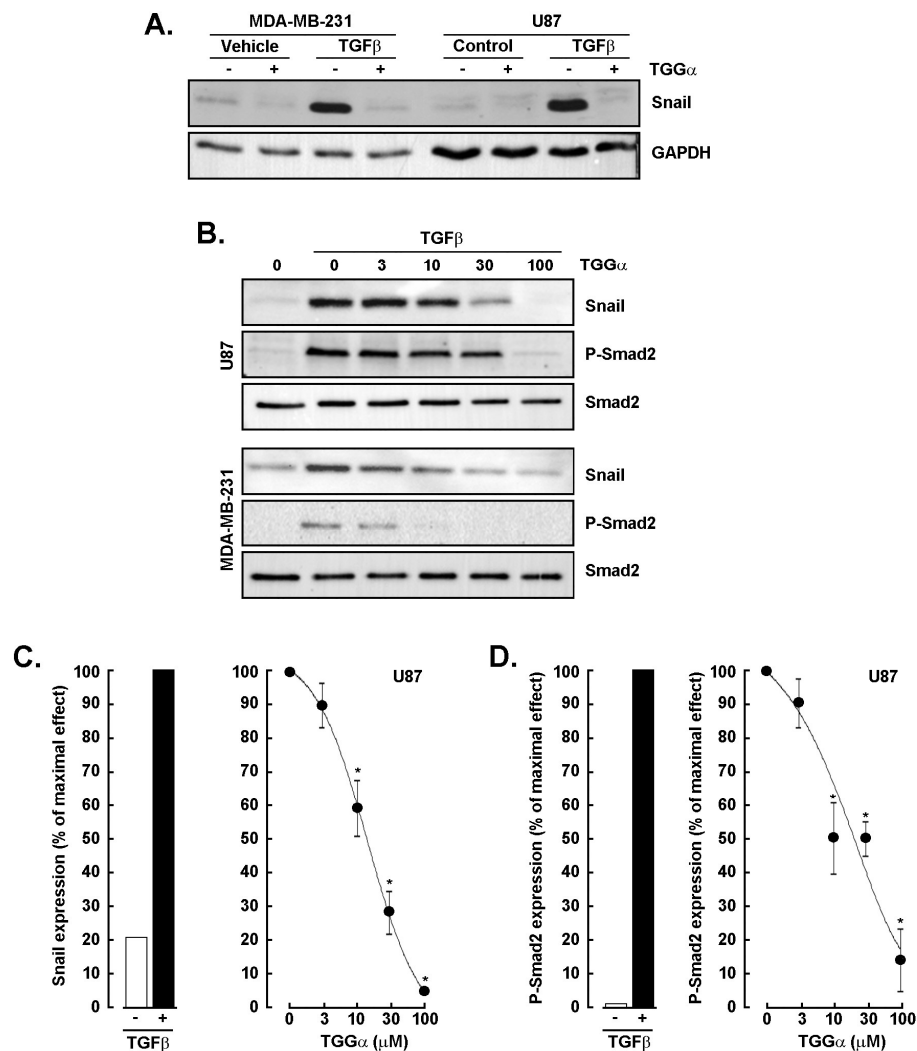


Figure A.5. Dose-dependent inhibition of TGF β -induced Smad2 phosphorylation and Snail expression by α -TGG in U87 glioblastoma and MDA-MB-231 cells.

U87 glioblastoma and MDA-MB-231 TNBC-derived cells were serum-starved and treated for 24 hours with 30 ng/mL TGF β in the presence or absence of 100 μ M α -TGG. (A) Cell lysates were harvested, and Western blotting performed as described in the Methods section to detect Snail expression. GAPDH was used as an internal loading control. (B) A representative Western blot of a dose-response effect of α -TGG against TGF β -induced Snail and phospho-Smad2 expression is shown in U87 glioblastoma cells (upper three panels) and in MDA-MB-231 cells (lower three panels). Smad2 was used as an internal loading control. (C) A densitometry analysis was performed to assess the extent of Snail expression induced by TGF β (left panel) and the dose-dependent effect of increasing concentrations of α -TGG (right panel) in U87 glioblastoma cells. (D) A densitometry analysis was performed to assess the extent of phospho-Smad2 expression induced by TGF β (left panel) and the dose-dependent effect of increasing concentrations of α -TGG (right panel) in U87 glioblastoma cells. All data are representative from two independent experiments.

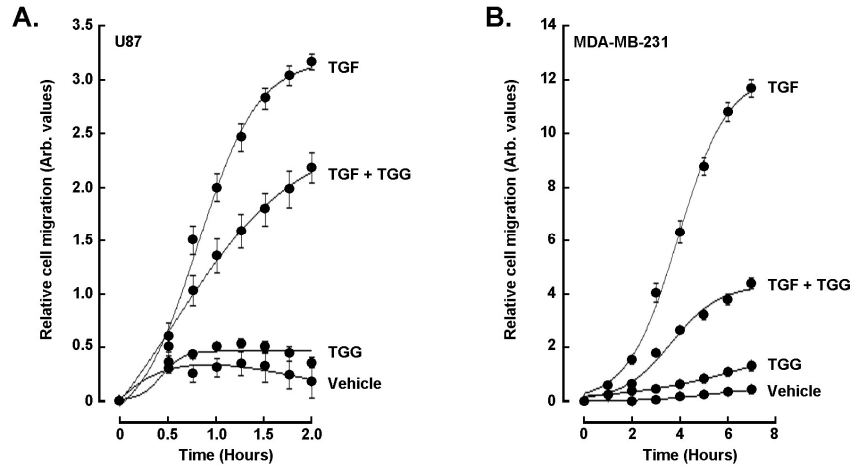


Figure A.6. α -TGG inhibits the TGF β -induced chemotactic cell response in U87 glioblastoma and MDA-MB-231 cells.

Real time chemotactic cell migration was assessed as described in the Methods section in (A) U87 glioblastoma and (B) MDA-MB-231 TNBC-derived cells, in response to vehicle, 30 ng/mL TGF β , 100 μ M α -TGG, or a combination of α -TGG/TGF β , over a period of 2 and 7 hours respectively. Data are triplicates from a representative experiment of each cell line.

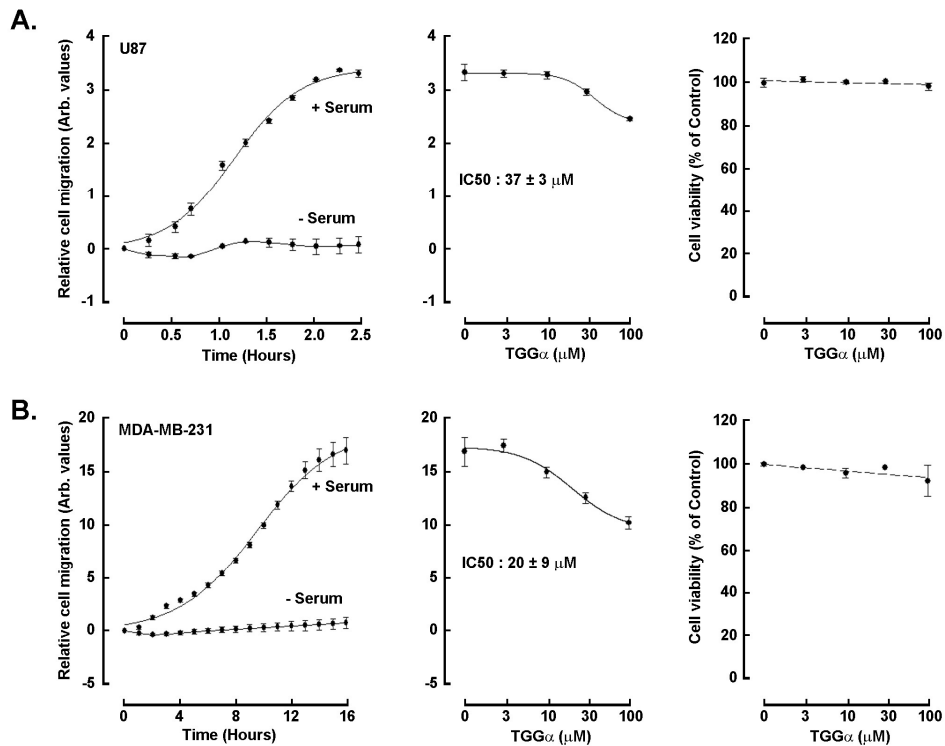


Figure A.7. α -TGG inhibits serum-induced chemotactic cell response in U87 glioblastoma and MDA-MB-231 cells.

Real time chemotactic cell migration was assessed as described in the Methods section in (A) U87 glioblastoma or (B) MDA-MB-231 TNBC-derived cells, in response to serum or serum-free media (left panels), and in the presence of increasing concentrations of α -TGG (3 to 100 μ M) (middle panels) over 7 hours. Cell viability was also evaluated for each concentration of α -TGG in negative media using the Trypan Blue exclusion assay and a TC20 Automated Cell Counter (Biorad; right panels). Data are representative from two independent experiments.

A.6. Discussion

Pharmacological probing into the anti-inflammatory mechanisms of action is among the initial essential molecular steps for developing comprehensive cancer treatment and prevention strategies. Given the link between chronic inflammation and cancer where inflammatory cues can promote tumor growth, metastasis, and resistance to treatment (Turizo-Smith *et al.*, 2024), pharmacological screening strategies for new molecules with potential anti-inflammatory and anticancer properties can provide invaluable information in early detection and prevention by identifying the expression profiles of inflammatory biomarkers and invasive processes. Here, we specifically explored the anti-inflammatory properties of α -TGG to reduce tumor-related inflammation, which understanding may improve the effectiveness of its use in chemopreventive and therapeutic modalities.

Studies on galloyl glucosides did show that multiple gallotannins possessed anticancer properties (Li *et al.*, 2015; Wen *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2009). However, although the TGG properties are yet to be characterized, its potential therapeutic effects have been recognized against ferroptosis (Li *et al.*, 2020) as well as in Alzheimer's disease (Khalifa *et al.*, 2023) and SARS-CoV-2 (Binette *et al.*, 2021; Haddad *et al.*, 2022). An improved method for TGG synthesis was recently developed and allowed the generation of a new α -anomer of TGG (α -TGG) (Pauvert *et al.*, 2023). Here, α -TGG was tested for its ability to target specific mechanisms and pathways which can potentially further reduce inflammation and the risk of cancer recurrence and metastasis (Joshi *et al.*, 2024). A critical step in developing robust and comprehensive cancer therapies implies testing anticancer molecules against highly aggressive and resistant to treatment cancer cells as exemplified in this study using U87 glioblastoma and MDA-MB-231 TNBC-derived cell models. This sheds light for a better understanding of drug efficacy, and to better clinical outcome prediction to guide future clinical trial designs.

The first molecular aspect investigated here was the impact of α -TGG on MMPs as these enzymes play a crucial role in remodeling of the extracellular matrix (ECM), in the regulation of the inflammatory response, in angiogenesis, cancer growth and metastasis (Klein et Bischoff, 2011; Lagente *et al.*, 2011; Löffek *et al.*, 2011; O'Shea et Smith, 2014). Inflammatory cues were used, starting with ConA, a plant-derived lectin known to trigger pro-inflammatory and immune responses in various immune cells through the release of pro-inflammatory cytokines like interleukin (IL)-1 β , IL-6, and TNF α (Cai *et al.*, 2024; Mohamed *et al.*, 2022; Zhuang *et al.*, 2016). ConA also induces the Membrane Type (MT)1-MMP, or MMP-14, which in turns cleave the pro-domain of the latent pro-MMP-2 form (Akla *et al.*, 2012; Nanni *et al.*, 2016). This ConA-

mediated activation of MMP-2 was indeed observed by zymography in the U87 glioblastoma cell model, and α -TGG inhibited this activation. It is yet unclear whether such action was directed toward the secretion/activation of pro-MMP-2, or the catalytic activity of MMP-2 itself. α -TGG also inhibited ConA-induced expression of COX-2, a pro-inflammatory biomarker requiring the NF- κ B signaling pathway (Sina *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2021).

The second pro-inflammatory cue used was TNF α , a pleiotropic cytokine that can lead to chronic inflammation associated with various autoimmune diseases and inflammatory conditions (Alim *et al.*, 2024). Our data showed the induction of pro-MMP-9 by TNF α in MDA-MB-231 cells and, concomitantly, the induction of cell chemotaxis. Both effects were inhibited dose-dependently by α -TGG, thus demonstrating anti-invasive effects as pro-MMP-9 is associated with an invasive cancerous phenotype with increased cell migration, metastasis and angiogenesis (Huang, 2018). The same results were obtained for PMA, a molecule that can activate Protein Kinase C (PKC), which in turn can lead to the expression of various pro-inflammatory cytokines including IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, and TNF α in different cell types, such as T cells and macrophages (Patil *et al.*, 2015). Similarly, PMA effects were found inhibited by α -TGG, confirming its anti-inflammatory properties.

The last pro-inflammatory cue used was TGF β , a complex cytokine with both pro-inflammatory and anti-inflammatory roles (Giarratana *et al.*, 2024; Yoshimura *et al.*, 2010). It is well-known for its capacity to trigger the EMT, which is characterized by an increase in cell invasion (Sicard *et al.*, 2021). Our data showed that TGF β induced the phosphorylation of Smad2 and the expression of Snail as well as chemotaxis in both cell lines, and that α -TGG inhibited these effects in a dose-dependent manner, showing anti-invasion properties. Finally, Li *et al.* (Li *et al.*, 2015) reported that many galloyl glucosides molecules had an inhibition rate between 64.2% and 92.9% at a concentration of 100 μ g/mL with an IC₅₀ ranged from 17.2-124.7 μ g/mL, on various cancer cell lines. This correlates with our findings as the maximum concentration used in our study was 100 μ M, which corresponds to 63.7 μ g/mL, and it showed an almost complete reversal for most experiments. Finally, an interesting parallel can be done between α -TGG and 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose (PGG), a gallotannin renowned for its significant anti-inflammatory and anti-cancer properties, where the α -anomer was found to stand out as more potent than the β -anomer. Subsequent research into α -PGG has demonstrated its powerful pro-apoptotic effects on human colon carcinoma cell lines (Cao *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2005).

A.7. Conclusion

Chemoprevention is a very important field of cancer research, and numerous and varied phytochemicals have shown great promise in that regard. Many have anticancer properties, just as we discovered for the gallotannin α -TGG. It showed pharmacological anti-inflammatory and anti-invasive effects on two aggressive *in vitro* cancer cell models, the U87 glioblastoma and MDA-MB-231 TNBC cells, against four different pro-inflammatory cues (ConA, PMA, $\text{TNF}\alpha$ and $\text{TGF}\beta$). Indeed, we report here that α -TGG inhibited both the secretion and activation of two MMPs as well as the expression of inflammation and EMT protein biomarkers. It also reduced the chemotaxis effect on cell migration upon pro-inflammatory cues.

This research hints at the very interesting anticancer properties of α -TGG. *In vivo* preclinical studies will be required to dive deeper into its full effects and further decipher its mechanisms of action. However, it would also be interesting to test α -TGG in other contexts than cancer as its β -anomer showed potential as a therapeutic agent for diseases, like Alzheimer's and SARS-CoV-2, as well as an antiapoptosis agent (Binette *et al.*, 2021; Khalifa *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2020).

APPENDICE B

ARTICLE : ASSESSING MMP-2/9 PROTEOLYTIC ACTIVITY AND ACTIVATION STATUS BY ZYMOGRAPHY IN PRECLINICAL AND CLINICAL TISSUE SAMPLES

Carolane Veilleux, Marie-Ève Roy, et Borhane Annabi

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie and CERMO-FC, Université du Québec à
Montréal, Montréal, QC, Canada, H3C 3P8*

Manuscrit publié en avril 2025 dans Zymography. Methods in Molecular Biology, vol 2918. Springer Nature, Humana, New York, NY.

DOI: 10.1007/978-1-0716-4482-9_13

Contribution des auteurs

Investigation : Carolane Veilleux; Méthodologie : Carolane Veilleux; Montage des figures : Carolane Veilleux et Borhane Annabi; Acquisition du financement : Borhane Annabi; Supervision : Borhane Annabi; Rédaction – ébauche originale : Carolane Veilleux, Marie-Ève Roy et Borhane Annabi; Rédaction – révision et corrections : Carolane Veilleux, Marie-Ève Roy et Borhane Annabi. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

B.1. Résumé

La zymographie est une puissante technique permettant d'évaluer spécifiquement les niveaux d'expression relatif d'un groupe d'enzymes protéolytiques appelées métalloprotéinases matricielles (MMPs) grâce à leur activité catalytique. Elle permet également de surveiller le rapport entre les formes actives et latentes des MMPs, ce qui permet de mieux comprendre leur rôle physiologique dans la régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM). Les biopsies de tissus cliniques, les lysats de cultures de cellules primaires *in vitro* ou les milieux conditionnés par des cultures de cellules dérivées de tumeurs précliniques *in vitro* peuvent être utilisés par les chercheurs pour évaluer par zymographie l'efficacité d'un traitement clinique ou l'impact pharmacologique de médicaments en développement sur le taux de MMPs. L'augmentation du taux de protéines MMPs n'étant pas nécessairement corrélée à une augmentation de l'activité enzymatique, l'évaluation des MMPs dans des échantillons de tissus cliniques ou à partir de modèles cellulaires précliniques par zymographie constitue le meilleur indicateur de l'impact d'un traitement donné sur le statut d'activation de ces enzymes, ou de l'impact sur un phénotype moléculaire invasif dans le cas de biopsies tumorales. Dans ce chapitre, l'activité protéolytique de deux gélatinases, MMP-2 et MMP-9, est détectée sous forme de bandes claires digérées non colorées sur un fond de gélatine colorée dans des gels de polyacrylamide. Les forces de la zymographie résident dans sa rentabilité, sa rapidité et son adaptabilité, car elle permet d'évaluer, avec une quantité relativement faible de matériel de départ, l'état d'activation et l'activité protéolytique d'autres types de MMPs lorsqu'elles sont utilisées en gel avec leurs substrats spécifiques.

B.2. Abstract

Zymography is a powerful technique that can be exploited to specifically assess the relative expression levels of a group of proteolytic enzymes termed matrix metalloproteinases (MMPs) through their catalytic activity. It is further used to monitor the ratios status of activated over latent MMP forms that provide more accurate insights in their physiological roles in regulating the degradation of the extracellular matrix (ECM). Clinical tissue biopsies, *in vitro* primary cell culture lysates, or media conditioned by tumor-derived preclinical *in vitro* cell cultures can be used by researchers to assess by zymography clinical treatment efficacy or pharmacological impact of drugs in development on MMPs level. As increases in MMPs protein levels do not necessarily correlate with increased enzymatic activity, assessing MMPs in clinical tissue samples or from pre-clinical cell models using zymography is the best indicator of the impact of a given therapy on the activation status of these enzymes, or the impact on an invasive molecular phenotype in

the case of tumor biopsies. In this chapter, the proteolytic activity of MMP-2 and MMP-9, two gelatinases, is detected as unstained clear digested bands against a stained gelatin background in polyacrylamide gels. Zymography's strengths are its cost effectiveness, rapidity and adaptability since it can be used with a relatively small amount of starting material to assess the activation status and proteolytic activity of other MMPs types when used *in gel* with their specific substrates.

B.3. Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs), or metalloproteases, are a family of calcium-dependent proteolytic enzymes with a zinc-containing catalytic site that can degrade components of the extracellular matrix (ECM) and contribute to physiological as well as pathological processes (Klein et Bischoff, 2011; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). There are at least 23 types of MMPs in humans that can be divided into 6 groups: collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane-type MMPs (MT-MMPs) and a heterogeneous group (Klein et Bischoff, 2011; Löffek *et al.*, 2011; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). Most soluble MMPs are expressed and secreted as latent enzymes that require being further activated to efficiently hydrolyze components of the ECM (Löffek *et al.*, 2011). On the other hand, MT-MMPs remain located at the cell membrane where they can contribute to the activation process of latent secreted MMPs (Itoh, 2015). Indeed, the latent MMPs form, called zymogen or pro-MMP, has a pro-domain blocking the catalytic site, which must be cleaved by other MMPs or proteases to generate the active form (Klein et Bischoff, 2011; Löffek *et al.*, 2011; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). MMPs play a significant role by remodeling the ECM and are involved in numerous physiological processes such as tissue regeneration and embryogenesis, or diseases such as tumor development and metastasis (Bencsik *et al.*, 2017; Klein et Bischoff, 2011; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005; Toth *et al.*, 2012). It is the case with MMP-2 and MMP-9, two gelatinases, whose expression and activation status are closely related to cancer progression and can easily be assessed by using gelatin zymography (Bencsik *et al.*, 2017; Ricci *et al.*, 2015; Toth *et al.*, 2012).

Zymography is a semi-quantitative technique for the assessment of the relative level of expression and activity of MMPs present in preclinical (cell culture models) or clinical samples (tissues or body fluids); it allows preclinical drug development investigations, comparison between different preclinical cell line models, expression levels in pathological tissues, or in the monitoring of treatment efficacy (Figure B.1) (Annabi *et al.*, 2002; Desrosiers *et al.*, 2006; Hajjar *et al.*, 2021; Ricci *et al.*, 2015). The method uses standard sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to separate the enzymes according

to their molecular weight, but in non-reducing conditions to preserve their catalytic activity (Granelli-Piperno et Reich, 1978; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). The particularity of zymography is the co-polymerization of a given MMP substrate in the polyacrylamide gels that varies depending on the selected MMPs to assess (Bencsik *et al.*, 2017; Klein et Bischoff, 2011; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). Following the electrophoresis step, the enzymes are reactivated *in-gel* and incubated to allow hydrolysis of the substrate that will ultimately be detected as clear unstained bands from Coomassie blue-stained gels (Granelli-Piperno et Reich, 1978; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). Both the active and latent MMP forms can be distinguished by their migration shift, reflecting their respective different molecular weight sizes (Toth *et al.*, 2012). Altogether, this makes zymography a very low cost and rapid technique that can easily be adapted to detect a wide variety of MMPs activity, thus providing critical insights into their activity in clinical settings.

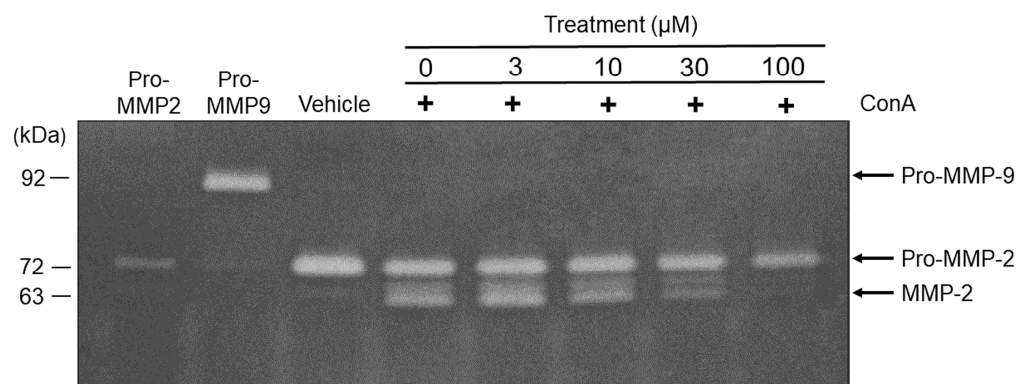


Figure B.1. Example of a zymography gel showing the cleavage of latent pro-MMP-2 into its active MMP-2 form by Concanavalin A (ConA) in the U87 glioblastoma cells conditioned media.

The pharmacological treatment used here exemplifies a dose-dependent inhibition of this activation process by a drug in preclinical development. The colored image has been converted to a black and white image to facilitate bands visualisation (unpublished data).

B.4. Materials

Prepare all solutions with ultrapure water and molecular grade reagents. They should always be prepared and used at room temperature in clean glassware.

B.4.1. Solutions for SDS polyacrylamide gels

1. 30% Bis-acrylamide solution : 0.8% bis-acrylamide and 29.2% acrylamide. Add 600 mL of water to a beaker. Using a magnetic stirrer, dissolve 8 g of bis-acrylamide and 292 g of acrylamide (see Note 1). Wait

until the solution is no longer cold and has reached room temperature and then complete the volume to one L. Filter through 11 μ m Wattman qualitative paper filter. Store the solution at 4°C.

2. Separating gel buffer : 1.5 M Tris-HCl at pH 8.8. Add 600 mL of water to a beaker. Using a magnetic stirrer, dissolve 181.7 g of Tris, then adjust the pH to 8.8 with HCl (see Note 2). Complete the volume to 1 L and filter through 11 μ m Wattman qualitative paper filter. Store the solution at 4°C.

3. Stacking gel buffer : 0.5 M Tris-HCl at pH 6.8. Add 600 mL of water to a beaker. Using a magnetic stirrer, dissolve 60.6 g of Tris, then adjust the pH to 6.8 with HCl (see Note 2). Complete the volume to 1 L and filter through 11 μ m Wattman qualitative paper filter. Store the solution at 4°C.

4. Gelatin solution : 1% solution in water. Add 0.1 g of gelatin (type A) to 10 mL of water in a sterile 15 mL tube (see Note 3). Bring the temperature of the solution to approximately 40°C in a water bath until complete dissolution. Cool to room temperature for a brief period just before use. Prepare fresh every time.

5. Sodium dodecyl sulfate (SDS) solution : 10% solution in water. Add 200 mL of water to a beaker. Using a magnetic stirrer, dissolve 25 g of SDS (see Note 4). Mix slowly, to prevent the formation of bubbles until complete dissolution. Complete the volume to 250 mL and filter through 0.45 μ m Wattman membrane filter. Store the solution at room temperature.

6. Tetramethylenediamine (TEMED) : Keep at room temperature in a dark bottle (see Note 5).

7. Ammonium persulfate (APS) : 10% solution in water. Add 0.1 g of APS to 1 mL of water in an Eppendorf tube. Allow APS to completely dissolve and filter through 0.22 μ m syringe filter (see Note 6).

8. Electrophoresis running buffer (10X) : 1.92 M glycine, 250 mM Tris and 1% SDS at pH 8.3-8.5. Dissolve 576.8 g of glycine, 121.14 g of Tris and 40 g of SDS in 3 L of water. Adjust the pH to 8.3-8.5 with NaOH and complete the volume to 4 L before filtering through 11 μ m Wattman qualitative paper filter. Confirm that the conductivity of the buffer approximates 5.0-5.5 mS (see Note 7). Store the buffer at room temperature.

9. Stock solution of 1.25 M Tris-HCl at pH 6.8 : Dissolve 7.57 g of Tris in 35 mL of water in a beaker using a magnetic stirrer, then adjust the pH with HCl (see Note 2). Complete the volume to 50 mL. Filter through 0.45 µm Wattman membrane filter and store the solution at 4°C.

Non-reducing loading buffer (Laemmli 5X) : 312.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% glycerol, 10% SDS and 0.0313% bromophenol blue. In a sterile 15 mL tube, dissolve 1 g of SDS in 2.5 mL of 1.25 M Tris-HCl pH 6.8 stock solution. Add 4 mL of glycerol before completing the volume to 10 mL with water. Finally, add 3.13 mg of bromophenol blue and homogenize the solution by vortexing for 30 seconds then by mixing on a shaker for 5 minutes. Aliquots of 1 mL can be stored at -20°C.

B.4.2. Solutions for zymography

1. Renaturing solution : 2.5% Triton X-100. Add 2.5 g of Triton X-100 to 85 mL of water in a glass beaker equipped with a magnetic stirrer. Cover with Parafilm and stir for 20 minutes. Once fully dissolved, complete the volume to 100 mL with water.

2. Development buffer (5X) : 1 M NaCl, 25 mM CaCl₂, 250 mM Tris-HCl and 0.1% Brij-35 at pH 7.6 (see Note 8). Dissolve 58.44 g of NaCl, 3.675 g of CaCl₂·H₂O, 30.29 g of Tris and 10 mL of Brij-35 10% solution in 750 mL of water. Heat the solution to 37°C and adjust the pH to 7.6 with HCl (see Note 9). Complete the volume to 1 L with water and store at 4°C.

3. Staining solution : 0.1% Coomassie Blue R-250, 40% methanol and 10% glacial acetic acid. Dissolve 4 g of Coomassie Blue R-250 in 1.6 L of methanol in an Erlenmeyer (see Note 10). Cover with Parafilm to prevent evaporation and stir for 1 hour. Add 0.4 L of glacial acetic acid and stir for 3 hours. Add 2 L of water and stir for 30 minutes. Filter through 11 µm Wattman qualitative paper filter and store solution at room temperature.

4. Destaining solution : 30% methanol and 7.5% glacial acetic acid. Add 6 L of methanol and 1.5 L of glacial acetic acid to 12.5 L of water in a 20 L polypropylene carboy. Stir well and store at room temperature.

5. MMP standards solutions can be obtained from media conditioned *in vitro* by certain cell lines or upon treatment with specific chemicals (see Note 11) :

- a. Pro-MMP-2 standard : Culture U87 glioblastoma cells at 80% confluence in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Starve the cells overnight in serum-free medium (Djedai *et al.*, 2021). Harvest the conditioned culture medium and centrifuge at 3500 rpm for 5 minutes. Collect the supernatant, aliquot and store at -80°C.
- b. MMP-2 standard : Culture U87 glioblastoma cells at 80% confluence in EMEM with 10% FBS, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Starve the cells overnight in serum-free medium in the presence of 30 µg/mL Concanavalin A (ConA) (Nanni *et al.*, 2016; Sina *et al.*, 2009). Harvest the conditioned culture medium and centrifuge at 3500 rpm for 5 minutes. Collect the supernatant, aliquot and store at -80°C.
- c. Pro-MMP-9 : Culture human HL-60 promyelomonocytic cells in Iscove's Modified Dulbecco's Medium with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Starve cells overnight in serum-free medium containing 0.3 µM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Chokor *et al.*, 2014; Kassouri *et al.*, 2022; Vézina *et al.*, 2012) (see Note 12). Harvest the conditioned culture medium and centrifuge at 1200 rpm for 5 minutes to pellet the cells. Collect the supernatant, aliquot and store at -80°C.

B.4.2. Solutions for clinical sample preparation

1. Stock solution 1 M Tris-HCl at pH 7.5 : Dissolve 6.06 g of Tris in 35 mL of water in a beaker with a magnetic stirrer, then adjust the pH with HCl (see Note 2). Complete the volume to 50 mL. Filter through 0.45 µm Wattman membrane filter and store the solution at 4°C.
2. Lysis buffer : 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (NP-40) and 1X protease inhibitors cocktail. In 125 mL of water, add 5 mL of 1 M Tris-HCl stock solution at pH 7.5, 5.8443 g of NaCl and 2 mL of NP-40. Wait until entire dissolution and complete the volume to 200 mL with water. Aliquot the solution and store at -20°C. The protease inhibitors cocktail is only added immediately before use, at a 1X final concentration as per the supplier's instructions.

B.5. Methods

All procedures are carried at room temperature unless otherwise stated. Use ultrapure water as well as clean glassware and containers. Dilute the stock solutions to 1X before use.

B.5.1. SDS-PAGE

1. Prepare a 9% polyacrylamide separation gel containing 0.1% gelatin. Recipe for two gels: In a beaker, mix 5 mL of 30% bis-acrylamide, 4.2 mL of separation gel buffer, 5.6 mL of water, 1.7 mL of 1% gelatin solution and 166 μ L of 10% SDS solution (see Note 3 and Note 13). Add 8.3 μ L of TEMED and 83.3 μ L of 10% APS to the gel, once the clean glass plates and gel cassettes are assembled.
2. Pour the gel slowly and leave enough space for the stacking gel (see Note 14). Cover with a thin layer of isobutyl alcohol (see Note 15) and let polymerize for approximately 45-60 minutes.
3. Prepare a 3.9% polyacrylamide stacking gel. Recipe for two gels: In a beaker, mix 0.65 mL of 30% bis-acrylamide, 1.25 mL of stacking gel buffer, 3.05 mL of water and 50 μ L of 10% SDS solution (see Note 13). Finally, add 5 μ L of TEMED and 25 μ L of 10% APS when the gel is ready to be poured.
4. Remove the isobutyl alcohol layer covering the polymerized separating gel and gently rinse 2-3 times with water. Remove the excess water with absorbent paper, pour the stacking gel, and insert the comb. Let polymerize for 20-30 minutes.
5. Prepare the electrophoresis chamber and fill with 1X electrophoresis running buffer (see Note 16). Remove the comb and rinse the wells by pipetting running buffer in them.
6. Prepare the MMP standards and samples by mixing them with the non-reducing loading buffer (Laemmli 5X) (see Note 17). Limit the quantity of sample loaded as zymography is quite a sensitive method (see Note 18). A protein molecular weight ladder can also be used to confirm the molecular weight of the proteolytic bands; if so, load directly 12.5 μ L in one or more wells.
 - a. For standards : Thaw the standards' aliquots and use 20 μ L to mix with 5 μ L of Laemmli 5X. Vortex for 5-10 seconds and load 20 μ L in each well.
 - b. For preclinical samples : Collect media conditioned by the culture cells and centrifuge at 3500 rpm for 5 minutes to remove any cell debris. Keep only the supernatant. Pipet 20 μ L of supernatant and mix with 5 μ L of Laemmli 5X. Vortex for 5-10 seconds and load 20 μ L in each well (see Note 19). The excess supernatant left can be stored at -80°C for further experiments.

- c. For clinical samples : Collect tissue samples in an Eppendorf tube. Snap-freeze the tubes immediately in liquid nitrogen and store at -80°C . To process the tissue, cut it in small pieces of a few mm (see Note 20) and homogenize for 1 minute in a mortar on ice with 150-200 μL ice-cold lysis buffer. Quantify proteins using a bicinchoninic acid (BCA) assay and prepare 20 μL of each sample at equal protein concentration. Add 5 μL of Laemmli 5X before vortexing for 5-10 seconds and loading 20 μL in each well. The tissue homogenates left are stored at -80°C .

7. Run the electrophoresis at 110 V and at constant voltage for 2 hours (Figure B.2). Stop electrophoresis once the colored migration front runs out of the gel (see Note 21).

8. Disassemble the gel plates with a spatula and discard the stacking gel. A corner of the separation gel can be slightly cut to help with orientation and well identification. Transfer the separation gel in a recipient containing ultrapure water (see Note 22).

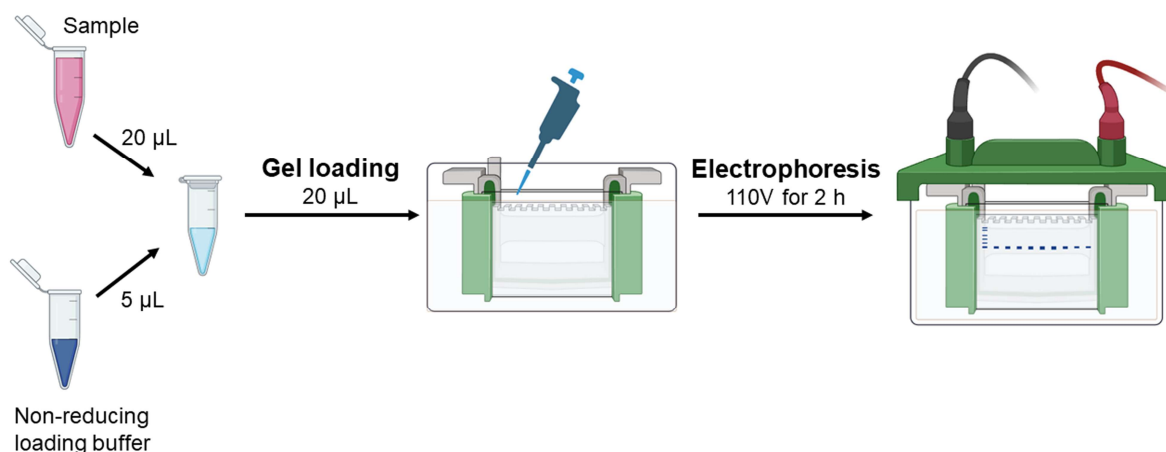


Figure B.2. Summary of the steps for the SDS-PAGE.

Made with Biorender.

B.5.2. Zymography

1. Remove the water and add 50 mL of renaturing buffer (see Note 23). Incubate 30 minutes at room temperature with agitation. Repeat a second time.
2. Rinse five times with water to remove all traces of Triton X-100.
3. Add 50 mL of 1X development buffer and incubate overnight at 37°C .

4. Discard the development buffer and rinse 1-2 times with water before adding 50 mL of staining solution (see Note 23). Incubate at room temperature with agitation for 1 to 2 hours. The gels must show uniform blue staining.

5. Make two quick rinses in 25 mL of destaining solution. Incubate 30 minutes in 50 mL of destaining solution at room temperature with agitation (see Note 23). Perform 2-3 more washes of 1 hour each in 50 mL of destaining solution at room temperature with agitation (Figure B.3).

6. Once proteolytic unstained bands are revealed (see Note 24), the gels can be put in between plastic protection sheets. Digitize gels using either a scanner or an imager system such as a ChemiDoc (see Note 25).

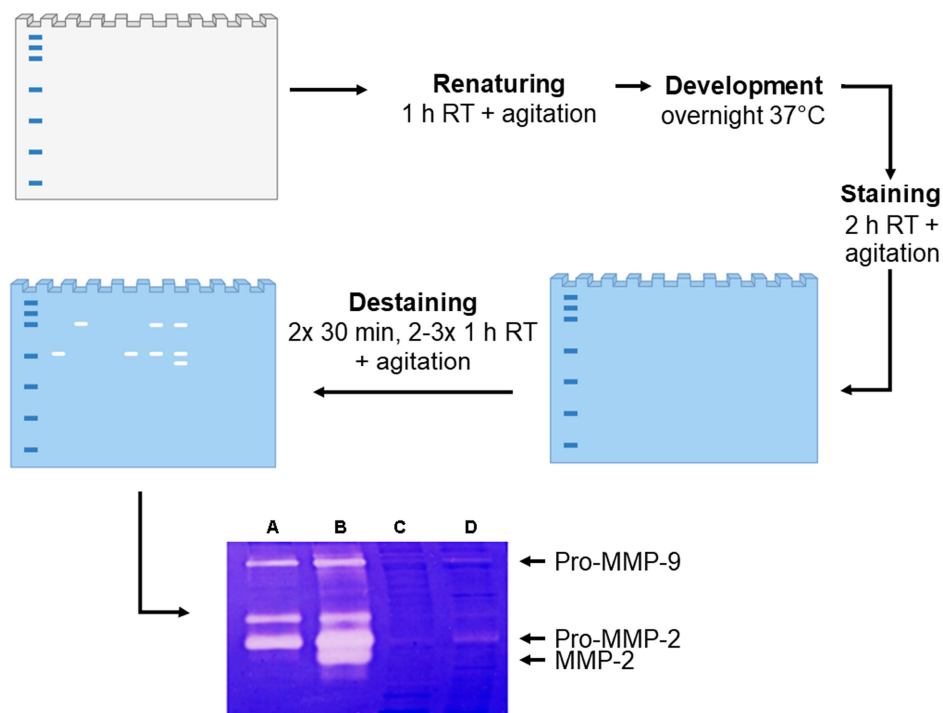


Figure B.3. Summary of the steps for the zymography and example of clinical tissue analysis.

Made with Biorender. Following electrophoresis, gels are renatured and zymography processed as described in the text. An example of preclinical human tumor xenograft implanted in mice analysed by gelatin zymography : (A) Invasive tumor from untreated animal with significant latent pro-MMP-9 and latent pro-MMP-2 gelatinolytic activity, (B) More invasive tumor phenotype from untreated animal with, in addition to pro-MMP-9 and pro-MMP-2 activity, defined by the presence of the active MMP-2 form, (C) and (D) remains of tumors resected from chemotherapy treated animals (unpublished data).

B.6. Notes

1. Bis-acrylamide and acrylamide are neurotoxic, wear appropriate protective equipment when manipulating.
2. Slowly add pure (36 N) or concentrated (12 N) HCl to bring the pH to the desired value, then switch to more diluted HCl. Use a pH meter constantly while adding acid so that the pH does not drop too low. Be careful to wear protection equipment and do not inhale the fumes.
3. Gelatin may be replaced by other types of substrates depending on the MMP to be detected (e.g. casein, collagen, elastin) (Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). Keep in mind that this protocol is optimized for gelatin zymography; parameters, such as concentration of substrate in the gel, electrophoresis running time or development buffer, may need to be optimized to assess the in-gel proteolytic activities of other MMPs.
4. SDS is a very volatile reagent and should be handled with a fume mask on and under a fume hood.
5. TEMED is prone to oxidation and has a strong odor. It should be handled under a chemical hood and do not leave the bottle open for long.
6. Alternatively, the 10% APS solution can be prepared in larger volumes, aliquoted and frozen at -20°C for later use. Thaw one aliquot and use for both the separation and stacking gels before discarding. Do not perform multiple freeze-thaw cycles, as APS will lose its reactivity.
7. The conductivity may vary depending on the conductivity meter used. If the conductivity is significantly lower or higher, verify the quantities used for each ingredient and remake the solution.
8. Inhibitors of MMPs can be added to the incubation buffer to confirm that the proteolytic bands arise from the MMPs action. 1,10-Phenanthroline monohydrate is a zinc-chelating agent and, as such, can act as a non-specific MMP inhibitor (Ellis et Crawford, 2016). Phenanthroline can be added at a concentration of 1 mM in 1X incubation buffer.

9. The pH of the incubation buffer needs to be adjusted at 37°C since this is the temperature at which it will be used. Warm the incubation buffer solution as well as the pH standards at 37°C in a water bath for a brief moment. Calibrate the pH meter with the warm standards before adjusting the pH of the incubation buffer.

10. Try to recuperate as much Coomassie Blue as possible by using 600 mL of the 1.6 L of methanol to rinse the weighing dish before adding it to the solution. While doing so, try to also rinse the powder residue on the walls of the Erlenmeyer.

11. If you do not have access to the appropriate cell lines or materials, you can also directly buy MMPs as recombinant proteins from commercial suppliers.

12. HL-60 are non-adherent cells, so the conditioned medium must be collected and centrifuged to pellet those cells that did not adhere upon PMA treatment.

13. To accelerate the polymerization process, the mix can be degassed with a vacuum system for a few minutes before adding the TEMED and APS. The quantity of TEMED and APS can also be slightly increased to polymerize the gel faster.

14. To leave enough space for the stacking gel, place the comb between the glass plates and make a mark at 0.5 cm underneath its teeth. Remove the comb before pouring the separation gel up to that mark.

15. Be careful to slowly add the isobutyl alcohol without disturbing the gel underneath as the polymerization has already started. Otherwise, the subsequent migration may be uneven.

16. Make sure the small glass plate is facing the gasket. Fill the small chamber first with 1X electrophoresis running buffer and verify that it is not leaking before filling the big chamber. Reassemble the chamber if there is a leak as it will result in an uneven migration or a power supply error code during the electrophoresis.

17. Do not heat the samples as you are working in denaturing but non-reducing conditions to retain the proteolytic activity of the enzymes. Do not use Laemmli loading buffer containing β -mercaptoethanol

either. However, make sure the Laemmli is at room temperature before use to ensure it has a good fluidity and to prevent pipetting errors. Likewise, do not work on ice as this may thicken the sample mix.

18. Zymography is a technique more sensitive than Western Blotting in assessing MMP levels and activation status. Proteolytic bands can be observed as low as 10 pg of MMP level in a sample (Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). For MMP-2 and MMP-9, discernible bands can be seen at 1-2 μ g (Ren *et al.*, 2017).

19. For clinical tissue samples, zymography can be performed in a quantitative manner using equal protein concentration instead of constant volume.

20. The pieces of tissue should approximate 50-60 mg in total. Do not use exact weights as it prolongs the manipulation time and increases the risks of protein degradation.

21. The running time can be shortened to 90 minutes, but there will be less separation between the gelatinase bands. The percentage of polyacrylamide gels can also be lowered to 7-8% if the aim is to see dimeric forms or better separation of pro-MMP and active MMP. However, this may cause a loss in band sharpness (Ren *et al.*, 2017; Toth *et al.*, 2012).

22. To prevent breakage of the gel, put water in a container first and slowly lift one corner with the spatula while holding the glass upside down. Dip the corner in the water and let the gel slide in the container by itself.

23. This volume may vary depending on the container used. The solution should cover completely the gel and not overflow when agitated.

24. If the bands are still too faint after 4 hours of destaining, samples can be concentrated by using centrifugal filter device. Be sure to select a column with a molecular weight cut-off under the size of your MMP.

25. Zymography is a semi-quantitative method that can measure relative quantities of latent and active MMPs (Ricci *et al.*, 2015; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005; Toth *et al.*, 2012). Densitometric

analysis of the proteolytic bands can be achieved using ImageJ or another image analysis software (Bencsik *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2017; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005).

RÉFÉRENCES

- Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, Duan S, Eiwegger T, Eljaszewicz A, Ferstl R, et al. (2016) Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 138: 984-1010.
- Akla N, Pratt J et Annabi B (2012) Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Experimental Cell Research* 318: 2498-2506.
- Akla N, Veilleux C et Annabi B (2025) The chemopreventive impact of diet-derived phytochemicals on the adipose tissue and breast tumor microenvironment secretome. *Nutrition and Cancer* 77: 9-25.
- Alim LF, Keane C et Souza-Fonseca-Guimaraes F (2024) Molecular mechanisms of tumour necrosis factor signalling via TNF receptor 1 and TNF receptor 2 in the tumour microenvironment. *Current Opinion in Immunology* 86: 102409.
- American Type Culture Collection. (2024) Dans Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Récupéré le 2025-04-25 de <https://www.atcc.org/products/pcs-500-011>
- Annabi B, Naud E, Lee YT, Eliopoulos N et Galipeau J (2004) Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *Journal of Cellular Biochemistry* 91: 1146-1158.
- Annabi B, Shédid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Mouldjian R et Béliveau R (2002) Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery* 35: 539-546.
- Arango Duque G et Descoteaux A (2014) Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology* 5: 491.
- Attané C et Muller C (2020) Drilling for oil: Tumor-surrounding adipocytes fueling cancer. *Trends in Cancer* 6: 593-604.
- Banerjee K et Resat H (2016) Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *International Journal of Cancer* 138: 2570-2578.
- Belotti D, Pinessi D et Tarabozetti G (2021) Alternative vascularization mechanisms in tumor resistance to therapy. *Cancers (Basel)* 13: 1912.
- Bencsik Pt, Bartekova M, Görbe A, Kiss K, Pálóczi Jn, Radosinska J, Szűcs G et Ferdinandy Pt (2017) MMP activity detection in zymograms. Dans *Zymography : Methods and Protocols*. Wilkesman J et Kurz L, eds, Humana Press. New Jersey.

- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, et al. (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology* 2: 737-744.
- Bhowmick NA, Neilson EG et Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432: 332-337.
- Bhuniya A, Sarkar A, Guha A, Choudhury PR, Bera S, Sultana J, Chakravarti M, Dhar S, Das J, Guha I, et al. (2022) Tumor activated platelets induce vascular mimicry in mesenchymal stem cells and aid metastasis. *Cytokine* 158: 155998.
- Binette V, Côté S, Haddad M, Nguyen PT, Bélanger S, Bourgault S, Ramassamy C, Gaudreault R et Mousseau N (2021) Corilagin and 1,3,6-Tri-O-galloyl- β -d-glucose: potential inhibitors of SARS-CoV-2 variants. *Physical Chemistry Chemical Physics* 23: 14873-14888.
- Bousoik E et Montazeri Aliabadi H (2018) “Do We Know Jack” about JAK? A closer look at JAK/STAT signaling pathway. *Frontiers in Oncology* 8: 287.
- Brassart-Pasco S, Brézillon S, Brassart B, Ramont L, Oudart JB et Monboisse JC (2020) Tumor microenvironment: Extracellular matrix alterations influence tumor progression. *Frontiers in Oncology* 10: 397.
- Brinkhof B, Zhang B, Cui Z, Ye H et Wang H (2020) ALCAM (CD166) as a gene expression marker for human mesenchymal stromal cell characterisation. *Gene* 763s: 100031.
- Brooks AJ et Putoczki T (2020) JAK-STAT signalling pathway in cancer. *Cancers (Basel)* 12: 1971.
- Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU et Pienta KJ (2023) Updating the definition of cancer. *Molecular Cancer Research* 21: 1142-1147.
- Brown KA et Scherer PE (2023) Update on adipose tissue and cancer. *Endocrine Reviews* 44: 961-974.
- Cai Y, Chen Z, Chen E, Zhang D, Wei T, Sun M et Lian Y (2024) Succinic acid ameliorates Concanavalin A-induced hepatitis by altering the inflammatory microenvironment and expression of BCL-2 family proteins. *Inflammation* 47: 2000-2012.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K et Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *New England Journal of Medicine* 348: 1625-1638.
- Cao Y, Evans SC, Soans E, Malki A, Liu Y, Liu Y et Chen X (2011) Insulin receptor signaling activated by penta-O-galloyl- α -d-glucopyranose induces p53 and apoptosis in cancer cells. *Apoptosis* 16: 902-913.
- Cao Y, Zhong W et Sun Y (2009) Improvement of antiangiogenic cancer therapy by understanding the mechanisms of angiogenic factor interplay and drug resistance. *Seminars in Cancer Biology* 19: 338-343.

- Centre Léon Bérard. (2025) Dans Surpoids, obésité et cancer. Récupéré le 2025-04-10 de <https://www.cancer-environnement.fr/fiches/nutrition-activite-physique/surpoids-obesite-et-cancer/>
- Chan IS et Ewald AJ (2022) The changing role of natural killer cells in cancer metastasis. *Journal of Clinical Investigation* 132: e143762.
- Chang RB et Beatty GL (2020) The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *Journal of Leukocytes Biology* 108: 363-376.
- Chaudhri A, Bu X, Wang Y, Gomez M, Torchia JA, Hua P, Hung SH, Davies MA, Lizee GA, von Andrian U, et al. (2023) The CX3CL1-CX3CR1 chemokine axis can contribute to tumor immune evasion and blockade with a novel CX3CR1 monoclonal antibody enhances response to anti-PD-1 immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 14: 1237715.
- Chen J, Ji T, Wu D, Jiang S, Zhao J, Lin H et Cai X (2019) Human mesenchymal stem cells promote tumor growth via MAPK pathway and metastasis by epithelial mesenchymal transition and integrin $\alpha 5$ in hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Disease* 10: 425.
- Chen S, Liu Z, Wu H, Wang B, Ouyang Y, Liu J, Zheng X, Zhang H, Li X, Feng X, et al. (2024) Adipocyte-rich microenvironment promotes chemoresistance via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma/ABCG2 in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Molecular Medicine* 53: 37.
- 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. *OncoTargets and Therapy* 7: 667-677.
- Chu K, Bos SA, Gill CM, Torriani M et Bredella MA (2020) Brown adipose tissue and cancer progression. *Skeletal Radiology* 49: 635-639.
- Crusz SM et Balkwill FR (2015) Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Reviews Clinical Oncology* 12: 584-596.
- Dai CL, Yang HX, Liu QP, Rahman K et Zhang H (2023) CXCL6: a potential therapeutic target for inflammation and cancer. *Clinical and Experimental Medicine* 23: 4413-4427.
- De Becker A et Riet IV (2016) Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Journal of Stem Cells* 8: 73-87.
- Demir AB (2023) Tumor promoting inflammation. *Current Molecular Biology Reports* 9: 21-32.
- Deng J, Jiang R, Meng E et Wu H (2022) CXCL5: a coachman to drive cancer progression. *Frontiers in Oncology* 12: 944494.

- Desjarlais M, Dussault S, Rivard F, Harel S, Sanchez V, Hussain SNA et Rivard A (2019) Forced expression of microRNA-146b reduces TRAF6-dependent inflammation and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic conditions. *Atherosclerosis* 289: 73-84.
- Després JP (2017) Overweight: the body mass index category with an identity crisis. *Annals of Internal Medicine* 166: 671-672.
- Desrosiers RR, Rivard ME, Grundy PE et Annabi B (2006) Decrease in LDL receptor-related protein expression and function correlates with advanced stages of Wilms tumors. *Pediatric Blood and Cancer* 46: 40-49.
- Dhanasekaran R, Deutzmann A, Mahauad-Fernandez WD, Hansen AS, Gouw AM et Felsher DW (2022) The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nature Reviews Clinical Oncology* 19: 23-36.
- Dillekås H, Rogers MS et Straume O (2019) Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine* 8: 5574-5576.
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang YY, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, et al. (2011) Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research* 71: 2455-2465.
- Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, et al. (2010) Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 59: 2817-2825.
- Djediai S, Gonzalez Suarez N, El Cheikh-Hussein L, Rodriguez Torres S, Gresseau L, Dhayne S, Joly-Lopez Z et Annabi B (2021) MT1-MMP cooperates with TGF- β receptor-mediated signaling to trigger SNAIL and induce epithelial-to-mesenchymal-like transition in U87 glioblastoma cells. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 13006.
- Djerir D, Iddir M, Bourgault S, Lamy S et Annabi B (2018) Biophysical evidence for differential gallated green tea catechins binding to membrane type-1 matrix metalloproteinase and its interactors. *Biophysical Chemistry* 234: 34-41.
- Do HTT, Lee CH et Cho J (2020) Chemokines and their receptors: multifaceted roles in cancer progression and potential value as cancer prognostic markers. *Cancers (Basel)* 12: 287.
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England Journal of Medicine* 315: 1650-1659.
- Ebadi M, Martin L, Ghosh S, Field CJ, Lehner R, Baracos VE et Mazurak VC (2017) Subcutaneous adiposity is an independent predictor of mortality in cancer patients. *British Journal of Cancer* 117: 148-155.
- El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idbaih A, Marie Y, Mokhtari K, Thomas JL, Eichmann A, et al. (2010) A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* 133: 973-982.

- Ellis TR et Crawford BD (2016) Experimental dissection of metalloproteinase inhibition-mediated and toxic effects of phenanthroline on zebrafish development. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 1503.
- Fan YL, Zheng M, Tang YL et Liang XH (2013) A new perspective of vasculogenic mimicry: EMT and cancer stem cells (review). *Oncology Letters* 6: 1174-1180.
- Fernández-Cortés M, Delgado-Bellido D et Oliver FJ (2019) Vasculogenic mimicry: become an endothelial cell "but not so much". *Frontiers in Oncology* 9: 803.
- Ferrara N (2010) Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 21-26.
- Folberg R, Hendrix MJ et Maniotis AJ (2000) Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *American Journal of Pathology* 156: 361-381.
- Folberg R et Maniotis AJ (2004) Vasculogenic mimicry. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology* 112: 508-525.
- Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB et Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19: 92-105.
- Galassi FM, Varotto E, Vaccarezza M, Martini M et Papa V (2024) A historical and palaeopathological perspective on cancer. *Journal of Preventative Medicine and Hygiene* 65: E93-97.
- Gallagher EJ et LeRoith D (2015) Obesity and diabetes: the increased risk of cancer and cancer-related mortality. *Physiological Reviews* 95: 727-748.
- Gao P, Niu N, Wei T, Tozawa H, Chen X, Zhang C, Zhang J, Wada Y, Kapron CM et Liu J (2017) The roles of signal transducer and activator of transcription factor 3 in tumor angiogenesis. *Oncotarget* 8: 69139-69161.
- Garvey WT et Mechanick JI (2020) Proposal for a scientifically correct and medically actionable disease classification system (ICD) for obesity. *Obesity (Silver Spring)* 28: 484-492.
- Giarratana AO, Prendergast CM, Salvatore MM et Capaccione KM (2024) TGF- β signaling: critical nexus of fibrogenesis and cancer. *Journal of Translational Medicine* 22: 594.
- Gonzalez Suarez N, Fernandez-Marrero Y, Hébert MPA, Roy M-E, Boudreau LH et Annabi B (2023) EGCG inhibits the inflammation and senescence inducing properties of MDA-MB-231 triple-negative breast cancer (TNBC) cells-derived extracellular vesicles in human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cancer Cell International* 23: 240.
- Gonzalez Suarez N, Fernandez-Marrero Y, Torabidastgerdooei S et Annabi B (2022) EGCG prevents the onset of an inflammatory and cancer-associated adipocyte-like phenotype in adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells in response to the triple-negative breast cancer secretome. *Nutrients* 14: 1099.

- Gonzalez Suarez N, Rodriguez Torres S, Ouanouki A, El Cheikh-Hussein L et Annabi B (2021) EGCG inhibits adipose-derived mesenchymal stem cells differentiation into adipocytes and prevents a STAT3-mediated paracrine oncogenic control of triple-negative breast cancer cell invasive phenotype. *Molecules* 26: 1506.
- Granelli-Piperno A et Reich E (1978) A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *Journal of Experimental Medicine* 148: 223-234.
- Guo D, Dunbar JD, Yang CH, Pfeffer LM et Donner DB (1998) Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor. *Journal of Immunology* 160: 2742-2750.
- Guo L, Zhao RCH et Wu Y (2011) The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 39: 608-616.
- Guo Q, Jin Y, Chen X, Ye X, Shen X, Lin M, Zeng C, Zhou T et Zhang J (2024) NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9: 53.
- Haddad M, Gaudreault R, Sasseville G, Nguyen PT, Wiebe H, Van De Ven T, Bourgault S, Mousseau N et Ramassamy C (2022) Molecular interactions of tannic acid with proteins associated with SARS-CoV-2 infectivity. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 2643.
- Haibe Y, Kreidieh M, El Hajj H, Khalifeh I, Mukherji D, Temraz S et Shamseddine A (2020) Resistance mechanisms to anti-angiogenic therapies in cancer. *Frontiers in Oncology Volume 10 - 2020*: 221.
- Hajjar R, Olierio M, Cuisiniere T, Fragoso G, Calvé A, Djedai S, Annabi B, Richard CS et Santos MM (2021) Improvement of colonic healing and surgical recovery with perioperative supplementation of inulin and galacto-oligosaccharides. *Clinical Nutrition* 40: 3842-3851.
- Hanahan D (2022) Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery* 12: 31-46.
- Hanahan D et Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanahan D et Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hao Q, Vadgama JV et Wang P (2020) CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Communication and Signaling* 18: 82.
- Herrera-Vargas AK, García-Rodríguez E, Olea-Flores M, Mendoza-Catalán MA, Flores-Alfaro E et Navarro-Tito N (2021) Pro-angiogenic activity and vasculogenic mimicry in the tumor microenvironment by leptin in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 62: 23-41.
- Hou J, Karin M et Sun B (2021) Targeting cancer-promoting inflammation — have anti-inflammatory therapies come of age? *Nature Reviews Clinical Oncology* 18: 261-279.
- Hu X, Li J, Fu M, Zhao X et Wang W (2021) The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6: 402.

- Huang H (2018) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances. *Sensors* 18: 3249.
- Hughes CE et Nibbs RJB (2018) A guide to chemokines and their receptors. *FEBS Journal* 285: 2944-2971.
- Hutchings G, Janowicz K, Moncrieff L, Dompe C, Strauss E, Kocherova I, Nawrocki MJ, Kruszyna Ł, Wąsiatycz G, Antosik P, et al. (2020) The proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells in neovascularization and angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 3790.
- Hwee J et Bougie E (2021) Do cancer incidence and mortality rates differ among ethnicities in Canada? *Health Reports* 32: 3-17.
- Itoh Y (2015) Membrane-type matrix metalloproteinases: their functions and regulations. *Matrix Biology* 44-46: 207-223.
- Iwamoto H, Abe M, Yang Y, Cui D, Seki T, Nakamura M, Hosaka K, Lim S, Wu J, He X, et al. (2018) Cancer lipid metabolism confers antiangiogenic drug resistance. *Cell Metabolism* 28: 104-117.e105.
- Joshi DC, Sharma A, Prasad S, Singh K, Kumar M, Sherawat K, Tuli HS et Gupta M (2024) Novel therapeutic agents in clinical trials: emerging approaches in cancer therapy. *Discover Oncology* 15: 342.
- Jourdes M, Pouységu L, Deffieux D, Teissedre P-L et Quideau S (2013) Hydrolyzable tannins: gallotannins and ellagitannins. Dans *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Ramawat KG et Mérillon J-M, eds, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.
- Karagiannidis I, Salataj E, Said Abu Egal E et Beswick EJ (2021) G-CSF in tumors: aggressiveness, tumor microenvironment and immune cell regulation. *Cytokine* 142: 155479.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R et Weinberg RA (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449: 557-563.
- Kassouri C, Rodriguez Torres S, Gonzalez Suarez N, Duhamel S, Annabi B et Wong D (2022) EGCG prevents the transcriptional reprogramming of an inflammatory and immune-suppressive molecular signature in macrophage-like differentiated human HL60 promyelocytic leukemia cells. *Cancers* 14: 5065.
- Kessenbrock K, Plaks V et Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52-67.
- Khalifa J, Bourgault S et Gaudreault R (2023) Interactions of polyphenolic gallotannins with amyloidogenic polypeptides associated with Alzheimer's Disease: from molecular insights to physiological significance. *Current Alzheimer Research* 20: 603-617.

- Kim B et Jung J (2024) Impact of obesity and lysosomal dysfunction on chemoresistance in ovarian cancer. *Biomedicines* 12: 604.
- Klein T et Bischoff R (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids : The Forum for Amino Acid, Peptide and Protein Research* 41: 271-290.
- Kohal R, Bisht P, Gupta GD et Verma SK (2024) Targeting JAK2/STAT3 for the treatment of cancer: a review on recent advancements in molecular development using structural analysis and SAR investigations. *Bioorganic Chemistry* 143: 107095.
- Kolb R, Sutterwala FS et Zhang W (2016) Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Current Opinion in Pharmacology* 29: 77-89.
- Korbecki J, Barczak K, Gutowska I, Chlubek D et Baranowska-Bosiacka I (2022) CXCL1: gene, promoter, regulation of expression, mRNA stability, regulation of activity in the intercellular space. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 792.
- Korbecki J, Grochans S, Gutowska I, Barczak K et Baranowska-Bosiacka I (2020) CC chemokines in a tumor: a review of pro-cancer and anti-cancer properties of receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 ligands. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 7619.
- Korbecki J, Kupnicka P, Barczak K, Bosiacki M, Ziętek P, Chlubek D et Baranowska-Bosiacka I (2023) The role of CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR5, and CXCR6 ligands in molecular cancer processes and clinical aspects of acute myeloid leukemia (AML). *Cancers (Basel)* 15: 4555.
- Kurachi M (2019) CD8(+) T cell exhaustion. *Seminars in Immunopathology* 41: 327-337.
- Lagente V, Victoni T et Boichot E (2011) Matrix metalloproteinase inhibitors as new anti-inflammatory drugs. Dans *Proteases and their receptors in inflammation*. Vergnolle N et Chignard M, eds, Springer Basel. Basel.
- Laha D, Grant R, Mishra P et Nilubol N (2021) The role of tumor necrosis factor in manipulating the immunological response of tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology Volume 12 - 2021*: 656908.
- Lan T, Luo M et Wei X (2021) Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy. *Journal of Hematology and Oncology* 14: 195.
- Lanuti P, Bertagnolo V, Pierdomenico L, Bascelli A, Santavenere E, Alinari L, Capitani S, Miscia S et Marchisio M (2009) Enhancement of TRAIL cytotoxicity by AG-490 in human ALL cells is characterized by downregulation of cIAP-1 and cIAP-2 through inhibition of Jak2/Stat3. *Cell Research* 19: 1079-1089.
- Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F et Straif K (2016) Body fatness and cancer--viewpoint of the IARC working group. *New England Journal Medicine* 375: 794-798.

- Li B, Liu S, Yang Q, Li Z, Li J, Wu J, Sun S, Xu Z, Sun S et Wu Q (2023) Macrophages in tumor-associated adipose microenvironment accelerate tumor progression. *Advanced Biology (Weinheim)* 7: e2200161.
- Li C-W, Dong H-J et Cui C-B (2015) The synthesis and antitumor activity of twelve galloyl glucosides. *Molecules* 20: 2034-2060.
- Li X, Fan Q, Peng X, Yang S, Wei S, Liu J, Yang L et Li H (2022) Mesenchymal/stromal stem cells: necessary factors in tumour progression. *Cell Death Discovery* 8: 333.
- Li X, Liu J, Chen B, Chen Y, Dai W, Li Y et Zhu M (2020) Covalent bridging of corilagin improves antiferroptosis activity: comparison with 1,3,6-Tri-O-galloyl- β -d-glucopyranose. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 11: 2232-2237.
- Li Y, Kim J, Li J, Liu F, Liu X, Himmeldirk K, Ren Y, Wagner TE et Chen X (2005) Natural anti-diabetic compound 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose binds to insulin receptor and activates insulin-mediated glucose transport signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336: 430-437.
- Liang W, Chen X, Zhang S, Fang J, Chen M, Xu Y et Chen X (2021) Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. *Cellular & Molecular Biology Letters* 26: 3.
- Lin TC (2022) Updated functional roles of NAMPT in carcinogenesis and therapeutic niches. *Cancers (Basel)* 14: 2059.
- Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q, Yao Z, Dong XY, Zhao N et Liu N (2013) CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 32: 544-553.
- Liu XZ, Pedersen L et Halberg N (2021) Cellular mechanisms linking cancers to obesity. *Cell Stress* 5: 55-72.
- Liu Y, Cai Y, Liu L, Wu Y et Xiong X (2018) Crucial biological functions of CCL7 in cancer. *PeerJ* 6: e4928.
- Lizárraga-Verdugo E, Avendaño-Félix M, Bermúdez M, Ramos-Payán R, Pérez-Plasencia C et Aguilar-Medina M (2020) Cancer stem cells and its role in angiogenesis and vasculogenic mimicry in gastrointestinal cancers. *Frontiers in Oncology* 10: 413.
- Löffek S, Schilling O et Franzke CW (2011) Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal* 38: 191-208.
- Lorenc P, Sikorska A, Molenda S, Guźniczak N, Dams-Kozłowska H et Florczak A (2024) Physiological and tumor-associated angiogenesis: key factors and therapy targeting VEGF/VEGFR pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 180: 117585.

- Lugassy C, Kleinman HK, Vermeulen PB et Barnhill RL (2020) Angiotropism, pericytic mimicry and extravascular migratory metastasis: an embryogenesis-derived program of tumor spread. *Angiogenesis* 23: 27-41.
- Luo Q, Wang J, Zhao W, Peng Z, Liu X, Li B, Zhang H, Shan B, Zhang C et Duan C (2020) Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *Journal of Hematology and Oncology* 13: 19.
- Lv L et Zhou X (2023) Targeting Hippo signaling in cancer: novel perspectives and therapeutic potential. *MedComm* (2020) 4: e375.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS et Hendrix MJ (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *American Journal of Pathology* 155: 739-752.
- McFarlane AJ, Fercoq F, Coffelt SB et Carlin LM (2021) Neutrophil dynamics in the tumor microenvironment. *Journal of Clinical Investigation* 131: e143759.
- Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, et al. (1996) Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379: 645-648.
- Mohamed GA, Ibrahim SRM, El-Agamy DS, Elsaed WM, Sirwi A, Asfour HZ, Koshak AE et Elhady SS (2022) Cucurbitacin E glucoside alleviates concanavalin A-induced hepatitis through enhancing SIRT1/Nrf2/HO-1 and inhibiting NF- κ B/NLRP3 signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology* 292: 115223.
- Monsalve FA, Delgado-López F, Fernández-Tapia B et González DR (2023) Adipose tissue, non-communicable diseases, and physical exercise: an imperfect triangle. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 17168.
- Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, Asakawa M, Kawasumi M, Kobayashi T, Morioka H, Chiba K, Toyama Y et Yoshimura A (2011) IL-1 β and TNF α -initiated IL-6–STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *International Immunology* 23: 701-712.
- Mukherjee A, Bilecz AJ et Lengyel E (2022) The adipocyte microenvironment and cancer. *Cancer Metastasis Review* 41: 575-587.
- Nanni SB, Pratt J, Beauchemin D, Haidara K et Annabi B (2016) Impact of Concanavalin-A-mediated cytoskeleton disruption on low-density lipoprotein receptor-related Protein-1 internalization and cell surface expression in glioblastomas. *Cancer Biomarkers* 8: 77-87.
- National Cancer Institute. (2022) Dans Obesity and Cancer Fact Sheet. Récupéré le 2025-04-08 de <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/obesity/obesity-fact-sheet>
- National Center of Biotechnology Information. (2024) Dans PubChem Compound Summary for CID 452707, 1,3,6-tri-O-galloyl-beta-D-glucose Récupéré le 2024-08-09 de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_3_6-tri-O-galloyl-beta-D-glucose

- Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A et Ribatti D (2014) Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *BioMed Research International* 2014: 756078.
- Nisar A, Jagtap S, Vyavahare S, Deshpande M, Harsulkar A, Ranjekar P et Prakash O (2023) Phytochemicals in the treatment of inflammation-associated diseases: the journey from preclinical trials to clinical practice. *Frontiers in Pharmacology* 14: 1177050.
- Nowacka KH et Jabłońska E (2021) Role of the APRIL molecule in solid tumors. *Cytokine Growth Factor Review* 61: 38-44.
- Nussinov R, Yavuz BR et Jang H (2025) Molecular principles underlying aggressive cancers. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 10: 42.
- O'Shea NR et Smith AM (2014) Matrix metalloproteases role in bowel inflammation and inflammatory bowel disease: an up to date review. *Inflammatory Bowel Diseases* 20: 2379-2393.
- Ouanouki A, Lamy S et Annabi B (2017) Anthocyanidins inhibit epithelial–mesenchymal transition through a TGF β /Smad2 signaling pathway in glioblastoma cells. *Molecular Carcinogenesis* 56: 1088-1099.
- Pan Y, Yu Y, Wang X et Zhang T (2020) Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Frontiers in Immunology* 11: 583084.
- Park Y et Colditz GA (2021) Obesity elevates cancer survivors' risk of second cancer: identifying modifiable risk factors for second cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 113: 1113-1114.
- Patil RH, Babu RL, Naveen Kumar M, Kiran Kumar KM, Hegde SM, Ramesh GT et Chidananda Sharma S (2015) Apigenin inhibits PMA-induced expression of pro-inflammatory cytokines and AP-1 factors in A549 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 403: 95-106.
- Pauvert Y, Gaudreault R et Charette AB (2023) Improved total synthesis of 1,3,6-trigalloyl- β -D-glucose from glucose. *Synthesis* 55: 2325-2332.
- Pincheira R, Castro AF, Ozes ON, Idumalla PS et Donner DB (2008) Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity. *Journal of Immunology* 181: 1288-1298.
- Piotrowski I, Kulcenty K et Suchorska W (2020) Interplay between inflammation and cancer. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* 25: 422-427.
- Pyo Y, Kwon KH et Jung YJ (2024) Anticancer potential of flavonoids: their role in cancer prevention and health benefits. *Foods* 13: 2253.
- Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X et Tian Y (2015) Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19: 315-326.

- Rajput S et Wilber A (2010) Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Frontiers in Bioscience* 2: 176-183.
- Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, Yuan ZR, Roberts AI, Zhang L, Zheng B, et al. (2012) CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell* 11: 812-824.
- Ren Z, Chen J et Khalil RA (2017) Zymography as a research tool in the study of matrix metalloproteinase inhibitors. Dans *Zymography : Methods and Protocols*. Wilkesman J et Kurz L, eds, Humana Press. New Jersey.
- Rezaeeyan H, Shirzad R, McKee TD et Saki N (2018) Role of chemokines in metastatic niche: new insights along with a diagnostic and prognostic approach. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology* 126: 359-370.
- Ribatti D, Annese T et Tamma R (2023) Vascular co-option in resistance to anti-angiogenic therapy. *Frontiers in Oncology Volume 13 - 2023*: 1323350.
- Ricci S, D'Esposito V, Oriente F, Formisano P et Carlo AD (2015) Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 54: 1281-1290.
- Rosen Evan D et Spiegelman Bruce M (2014) What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156: 20-44.
- Roy M-E, Veilleux C et Annabi B (2024a) In vitro biomaterial priming of human mesenchymal stromal/stem cells : implication of the Src/JAK/STAT3 pathway in vasculogenic mimicry. *Scientific Reports* 14: 21444.
- Roy ME, Elimam R, Zgheib A et Annabi B (2024b) A role for the Hippo/YAP1 pathway in the regulation of in vitro vasculogenic mimicry in glioblastoma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 28: e70304.
- Rytlewski JA, Alejandra Aldon M, Lewis EW et Suggs LJ (2015) Mechanisms of tubulogenesis and endothelial phenotype expression by MSCs. *Microvascular Research* 99: 26-35.
- Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Rezaei-Tavirani M, Goliaei B et Peyvandi AA (2014) Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 7: 17-31.
- Sajjadi-Dokht M, Merza Mohamad TA, Sulaiman Rahman H, Suliman Maashi M, Danshina S, Shomali N, Solali S, Marofi F, Zeinalzadeh E, Akbari M, et al. (2022) MicroRNAs and JAK/STAT3 signaling: a new promising therapeutic axis in blood cancers. *Genes & Diseases* 9: 849-867.
- Sakers A, De Siqueira MK, Seale P et Villanueva CJ (2022) Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* 185: 419-446.
- Samani AA, Yakar S, LeRoith D et Brodt P (2007) The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine Reviews* 28: 20-47.

- Schäfer M et Werner S (2008) Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 628-638.
- Schneider CA, Rasband WS et Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671-675.
- Seo IA, Lee HK, Shin YK, Lee SH, Seo SY, Park JW et Park HT (2009) Janus Kinase 2 Inhibitor AG490 Inhibits the STAT3 Signaling Pathway by Suppressing Protein Translation of gp130. *Korean J Physiol Pharmacol* 13: 131-138.
- Shang Q, Yu X, Sun Q, Li H, Sun C et Liu L (2024) Polysaccharides regulate Th1/Th2 balance: a new strategy for tumor immunotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 170: 115976.
- Shekhawat KS, Bhatia P, Bhatnagar K, Shandilay S et Chaudhary S (2025) Roadmap to cytotoxicity: exploring assays and mechanisms. *ASSAY and Drug Development Technologies* -.
- Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X et Hui Y (2019) Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 114: 108765.
- Sicard A-A, Tiziana D, Gonzalez SN et and Annabi B (2021) Diet-derived gallated catechins prevent TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition, cell migration and vasculogenic mimicry in chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells. *Nutrition and Cancer* 73: 169-180.
- Sielska M, Przanowski P, Pasierbińska M, Wojnicki K, Poleszak K, Wojtas B, Grzeganeck D, Ellert-Miklaszewska A, Ku M-C, Kettenmann H, et al. (2020) Tumour-derived CSF2/granulocyte macrophage colony stimulating factor controls myeloid cell accumulation and progression of gliomas. *British Journal of Cancer* 123: 438-448.
- Sina A, Lord-Dufour S et Annabi B (2009) Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation. *Cancer Letters* 279: 171-176.
- Sina A, Proulx-Bonneau S, Roy A, Poliquin L, Cao J et Annabi B (2010) The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway. *Journal of Cell Communication and Signaling* 4: 19.
- Snoek-van Beurden PAM et Von den Hoff JW (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 38: 73-83.
- Stămat L, Dinescu S et Costache M (2023) Regulation of inflammasome by microRNAs in triple-negative breast cancer: New opportunities for therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 3245.
- Stein CJ et Colditz GA (2004) Modifiable risk factors for cancer. *British Journal of Cancer* 90: 299-303.
- Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, Doncheva NT, Legeay M, Fang T, Bork P, et al. (2021) The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional

- characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research* 49: D605-d612.
- Taha S, Volkmer E, Haas E, Alberton P, Straub T, David-Rus D, Aszodi A, Giunta R et Saller MM (2020) Differences in the inflammatory response of white adipose tissue and adipose-derived stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1086.
- Takahashi T, Nagatoishi S, Kuroda D et Tsumoto K (2018) Thermodynamic and computational analyses reveal the functional roles of the galloyl group of tea catechins in molecular recognition. *PLOS ONE* 13: e0204856.
- Tian Y, Fang J, Zeng F, Chen Y, Pei Y, Gu F, Ding C, Niu G et Gu B (2022) The role of hypoxic mesenchymal stem cells in tumor immunity. *International Immunopharmacology* 112: 109172.
- Todoric J, Antonucci L et Karin M (2016) Targeting inflammation in cancer prevention and therapy. *Cancer Prevention Research* 9: 895-905.
- Toth M, Sohail A et Fridman R (2012) Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. Dans *Metastasis Research Protocols*. Dwek M, Brooks SA et Schumacher U, eds, Humana Press. New Jersey.
- Turizo-Smith AD, Córdoba-Hernandez S, Mejía-Guarnizo LV, Monroy-Camacho PS et Rodríguez-García JA (2024) Inflammation and cancer: friend or foe? *Frontiers in Pharmacology* 15: 1385479.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T et Pennington DJ (2014) Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843: 2563-2582.
- Uthamacumaran A, Suarez NG, Baniré Diallo A et Annabi B (2021) Computational methods for structure-to-function analysis of diet-derived catechins-mediated targeting of in vitro vasculogenic mimicry. *Cancer Informatics* 20: 11769351211009229.
- Valdivia A, Mingo G, Aldana V, Pinto MP, Ramirez M, Retamal C, Gonzalez A, Nualart F, Corvalan AH et Owen GI (2019) Fact or fiction, it is time for a verdict on vasculogenic mimicry? *Frontiers in Oncology* 9: 680.
- Vallée A, Lecarpentier Y et Vallée JN (2019) Targeting the canonical WNT/ β -Catenin pathway in cancer treatment using non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Cells* 8: 726.
- VanSaun MN (2013) Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. *Clinical Cancer Research* 19: 1926-1932.
- Veilleux C, Roy M-E et Annabi B (2025) Serie Assessing MMP-2/9 proteolytic activity and activation status by zymography in preclinical and clinical tissue samples. Dans *Zymography: Methods and Protocols*. Springer. USA.
- 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 Immunology & Immunotherapy* 61: 2321-2331.

- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA et Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science (New York, NY)* 339: 1546-1558.
- Wan F, Zhang H, Hu J, Chen L, Geng S, Kong L et Lu JJ (2022) Mesenchymal stem cells inhibits migration and vasculogenic mimicry in nasopharyngeal carcinoma via exosomal miR-125a. *Frontiers in Oncology* 12: 781979.
- Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR et Farrar WL (1999) JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *The Journal of Immunology* 162: 3897-3904.
- Wang M, Chen S, He X, Yuan Y et Wei X (2024) Targeting inflammation as cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 17: 13.
- Wang Y, Liu Y, Huang Z, Chen X et Zhang B (2022) The roles of osteoprotegerin in cancer, far beyond a bone player. *Cell Death Discovery* 8: 252.
- Wechman SL, Emdad L, Sarkar D, Das SK et Fisher PB (2020) Vascular mimicry: triggers, molecular interactions and in vivo models. *Advanced Cancer Research* 148: 27-67.
- Wen C, Dechsupa N, Yu Z, Zhang X, Liang S, Lei X, Xu T, Gao X, Hu Q, Innuan P, et al. (2023) Pentagalloyl glucose: a review of anticancer properties, molecular targets, mechanisms of action, pharmacokinetics, and safety profile. *Molecules* 28: 4856.
- Wen Y, Zhu Y, Zhang C, Yang X, Gao Y, Li M, Yang H, Liu T et Tang H (2022) Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Frontiers in Pharmacology* 13: 1040163.
- Whitlock MC et Schluter D (2015) *The analysis of biological data*. Macmillan Learning, New York.
- World Health Organization. (2024) Dans Obesity and overweight. Récupéré le 2024-03-07 de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- World Health Organization. (2025) Dans Cancer. Récupéré le 2025-03-07 de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wu Q, Li B, Li Z, Li J, Sun S et Sun S (2019) Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology & Oncology* 12: 95.
- Wu Y, Deng S, Wei S, Wei W, He Y et Guo J (2025) Adipocyte-targeted nanotechnology and cell-based therapy for obesity treatment. *ChemMedChem* 20: e202400611.
- Xiang M, Birkbak NJ, Vafaizadeh V, Walker SR, Yeh JE, Liu S, Kroll Y, Boldin M, Taganov K, Groner B, et al. (2014) STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF- κ B to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes. *Science Signaling* 7: ra11.
- Yoder MC (2012) Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2: a006692.

- Yoshimura A, Wakabayashi Y et Mori T (2010) Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β . *The Journal of Biochemistry* 147: 781-792.
- Yuan Z, Li Y, Zhang S, Wang X, Dou H, Yu X, Zhang Z, Yang S et Xiao M (2023) Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: from mechanisms to treatments. *Molecular Cancer* 22: 48.
- Zajkowska M et Mroczko B (2021) From allergy to cancer-clinical usefulness of eotaxins. *Cancers (Basel)* 13: 128.
- Zanconato F, Cordenonsi M et Piccolo S (2016) YAP/TAZ at the roots of cancer. *Cancer Cell* 29: 783-803.
- Zhang A, Miao K, Sun H et Deng CX (2022) Tumor heterogeneity reshapes the tumor microenvironment to influence drug resistance. *International Journal of Biological Sciences* 18: 3019-3033.
- Zhang D, Sun B, Zhao X, Ma Y, Ji R, Gu Q, Dong X, Li J, Liu F, Jia X, et al. (2014) Twist1 expression induced by sunitinib accelerates tumor cell vasculogenic mimicry by increasing the population of CD133+ cells in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer* 13: 207.
- Zhang J, Li L, Kim SH, Hagerman AE et Lü J (2009) Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharmaceutical Research* 26: 2066-2080.
- Zhang S, Xiao X, Yi Y, Wang X, Zhu L, Shen Y, Lin D et Wu C (2024) Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9: 149.
- Zhang S, Zhang D et Sun B (2007) Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Letters* 254: 157-164.
- Zhang W, Wang H, Sun M, Deng X, Wu X, Ma Y, Li M, Shuo SM, You Q et Miao L (2020) CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target. *Cancer Communications (London)* 40: 69-80.
- Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y et Li Y (2021) Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6: 263.
- Zhao J, Xu L, Sun J, Song M, Wang L, Yuan S, Zhu Y, Wan Z, Larsson S, Tsilidis K, et al. (2023a) Global trends in incidence, death, burden and risk factors of early-onset cancer from 1990 to 2019. *BMJ Oncology* 2: e000049.
- Zhao Y, Shen M, Wu L, Yang H, Yao Y, Yang Q, Du J, Liu L, Li Y et Bai Y (2023b) Stromal cells in the tumor microenvironment: accomplices of tumor progression? *Cell Death and Disease* 14: 587.
- Zhou J, Xie G et Yan X (2011) *Vol. 5: Isolated compounds T—Z, References, TCM plants and congeners*. Springer. Berlin, Heidelberg.

Zhuang Y, Li Y, Li X, Xie Q et Wu M (2016) Atg7 knockdown augments Concanavalin A-induced acute hepatitis through an ROS-mediated p38/MAPK pathway. *PLOS ONE* 11: e0149754.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P et Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 13: 4279-4295.

Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V et Plikus MV (2018) Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. *Cell Metabolism* 27: 68-83.