

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION MOLÉCULAIRE ET PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE JAK/STAT3 :
IMPLICATION DANS L'INFLAMMATION ET DANS L'ANGIOGÉNÈSE TUMORALE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

NAOUFAL AKLA

SEPTEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A 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.01-2006). 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, Naoufal Akla 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

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Richard Béliveau, dont la contribution dans le traitement et la prévention du cancer est reconnue et qui m'a accueillie chaleureusement et généreusement au sein de son équipe de recherche. J'aimerais également remercier mon codirecteur, le Dr Borhane Annabi qui a pris la relève dans ma formation. Leurs encouragements, conseils et amitiés à mon égard durant ma maîtrise ont été importants dans mon cheminement en recherche. Que leurs conseils et aides puissent continuer longtemps dans le futur!

J'aimerais aussi remercier pour son soutien et sa patience à mes débuts ma superviseuse, la Dre Sylvie Lamy, qui a pris ma formation de base en main. Un merci particulier à Amira Ouanouki et à Jonathan Pratt, qui m'ont aidé durant les différentes étapes de la maîtrise ainsi que pour leur amitié qui a facilité mon séjour dans cette belle aventure. Il y a tant d'autres personnes que j'aimerais remercier, mais je ne peux les nommer de peur d'en oublier. À toutes ces personnes, employés ou étudiants, merci.

Je remercie du fond du cœur et de la raison mon *Alma Mater* qui ma soutenue spirituellement et en m'attribuant deux bourses durant le cours de mes études. Que son œil bienveillant continue.

Sur une note plus personnelle, je remercie ma famille, mes parents Kamle et Mohamed pour m'avoir élevé dans l'amour et le respect, pour leur soutien et leur encouragement, et ma femme Luisa, partenaire et meilleure amie, qui m'a montré ce que c'était que de l'amour inconditionnel.

Pour terminer, je te remercie Dieu qui m'a laissé voir, par l'étude de la biochimie et ta grâce, la beauté profonde de ta création.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DE FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	vii
RÉSUMÉ.....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Les altérations distinctives du cancer.....	2
1.1.3 Les altérations émergentes du cancer.....	9
1.1.4 Les conditions favorables aux altérations.....	11
1.1.4.1 L'instabilité génomique.....	11
1.1.4.2 Le microenvironnement inflammatoire.....	11
1.1.4.3 Types d'inflammations chroniques.....	12
1.1.4.4 Équilibre inflammation/immunosuppression.....	13
1.2 Voies de signalisations oncogéniques.....	17
1.2.1 Voies majeures oncogéniques.....	17
1.2.2 STAT3 relie l'inflammation à l'angiogenèse.....	20
1.2.3 Structure et activation de STAT3.....	23
1.2.3.1 L'implication de la voie IL6/JAK/STAT3.....	26
1.2.3.2 Régulation et inhibition de JAK/STAT3	29
1.2.3.3 Implication de COX-2.....	30
1.3 Contribution des MSC au cancer.....	31
1.3.1 Rôle de la MT1-MMP.....	36
1.3.1.2 Structure et activité de la MT1-MMP.....	38
1.3.1.3 Signalisation régulée par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP.....	39
1.4 Nutraceutiques anti-cancer.....	41
1.4.1 Propriété anti-angiogénique des polyphénols.....	41
1.4.2 STAT3 comme cible anti-angiogénique.....	48

CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE.....	51
2.1 Problématique et hypothèses.....	51
2.2 Objectifs de recherche.....	51
CHAPITRE III	
ARTICLES.....	53
3.1 Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3....	53
Abstract.....	55
Introduction.....	56
Materials and methods.....	59
Results.....	65
Discussion.....	70
References.....	75
CHAPITRE IV	
4.1 Evidence for a JAK/STAT3 signalling axis interplay in the MT1-MMP regulation of Cyclooxygenase-2.....	92
Abstract.....	93
Introduction.....	94
Materials and methods.....	96
Results.....	99
Discussion.....	101
References.....	105
CHAPITRE V	
DISCUSSION.....	121
5.1 Inhibition de l'angiogenèse modulée par l'inflammation.....	121
5.2 La MT1-MMP : Contributeur à l'inflammation.....	129
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	133
RÉFÉRENCES.....	135

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Les traits distinctifs du cancer.....	4
1.2 L'hypothèse de la balance angiogénique.....	8
1.3 Schéma de l'équilibre immunomodulateur tumoral.....	16
1.4 Schéma résumant le processus angiogénique.....	22
1.5 STAT3 et les membres de la famille STAT.....	25
1.6 Voie de signalisation IL6-JAK-STAT3.....	27
1.7 L'interleukine-6 dans l'induction de l'angiogenèse.....	28
1.8 Contribution des MSC au cancer.....	33
1.9 Fonctions des différents domaines de la MT1-MMP.....	37
1.10 Classification, structures et sources des cinq polyphénols alimentaires.....	43
5.1 Schéma récapitulatif de l'inhibition de la voie IL6/STAT3 par Api et Lut.....	123
5.2 Résumé de l'analyse de la relation structure-activité de polyphénols.....	128

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AA	acide arachidonique
AG490	“2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-N(phenylmethyl)-2”, inhibiteur de tyrosine kinase JAK
AKT	souris ak thymoma ou PKB
Api	apigénine
APS	persulfate d’ammonium
BBB	barrière hémato-encéphalique
Bcl-2	cellule-B lymphoma 2
BSA	albumine sérique bovine
CAM	molécule d’adhésion cellulaire
ConA	concanavaline A
COX	cyclo-oxygénase
DMSO	diméthyle sulfoxyde
Dp	delphinidine
EA	acide éllagique
EC	cellule endothéliale
ECM	matrice extracellulaire
EGCG	(-) épigallocatechine gallate
EGFR	récepteur du facteur de croissance épidermique
ERK	kinase régulée par un signal extracellulaire
FBS	sérum fœtal bovin
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
GLUT1	transporteur de glucose 1
HEX	domaine hémopexine
HGF	facteur de croissance des hépatocytes
HIF-1	facteur inductible par hypoxie-1

HUVEC	cellule endothéliale humaine de la veine ombilicale
IBD	maladie inflammatoire de l'intestin
IDO	indoleamine-2,3-dioxygénase
IGF	facteur de croissance à l'insuline
IKB	protéine inhibitrice kappa B
IKK	IKB kinase
IL	interleukine
INF	interféron
JAK	janus kinase
Lut	lutéoline
LY294002	"2-(4-morpholino)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one", inhibiteur de la PI3K
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes
MEK	kinase extracellulaire induite par des mitogènes ou MAPK kinase
MMP	métalloprotéinase de la matrice extracellulaire
MT-MMP	métalloprotéinase de la matrice extracellulaire de type membranaire
MSC	mésenchymal stem cell (cellule souche mésenchymateuse)
NF- κ B	facteur de transcription kappa beta
p53	protéine suppresseur de tumeur de 53 kDa
PBS	tampon phosphate salin
PD98059	"2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one, inhibiteur de MEK1 et MEK2
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGE	prostaglandine
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PKB	protéine kinase B ou AKT
PLGF	facteur de croissance placentaire

PVDF	difluorure de polyvinylène
RAS	système rénine angiotensine
RET	RTK réarrangé durant la transfection
RTK	récepteur à tyrosine kinase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis
siRNA	petit ARN interférent
SOCS	suppresseur de la signalisation aux cytokines
SB203580	inhibiteur de la MAPK p38
STAT	transducteur du signal et activateur de la transcription
TAM	macrophage associé aux tumeurs
TBS	tampon Tris salin
TEDMED	N,N,N',N'-tétraméthylènediamine
TIMP	inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase
TGF	facteur de croissance transformant
TNF	facteur de nécrose tumoral
UO126	“1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene”, inhibiteur de MEK1 et MEK2
VDA	agent disrupteur de la vascularisation
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	récepteur au facteur de croissance endothéliale vasculaire

RÉSUMÉ

Favorisant plusieurs altérations physiologiques et autres conditions telle l'instabilité génomique, l'inflammation chronique joue un rôle central de l'initiation jusqu'au développement du cancer. Cette condition requiert la contribution de plusieurs types cellulaires et de médiateurs inflammatoires telle que la protéine transductrice du signal et activatrice de la transcription 3 (STAT3). Cette dernière est un médiateur majeur dans l'induction et le maintien d'un microenvironnement tumoral inflammatoire. En effet, la phosphorylation de STAT3 est essentielle à la régulation et à la transcription de plusieurs facteurs de croissance et cytokines incluant la cyclooxygénase-2 (COX)-2 et l'interleukine-6 (IL6), mais par son rôle de transducteur, elle répond aussi à plusieurs stimuli tant endogènes qu'environnementaux. Une des voies les plus importantes à cet effet est celle de JAK/STAT3. Une boucle rétroactive d'activation de STAT3 alimente d'ailleurs les processus impliqués dans le développement tumoral comme la prolifération, l'anti-apoptose, l'angiogenèse et la métastase. Les objectifs de notre étude sont, dans un premier temps, d'évaluer les effets de 5 polyphénols connus pour leur propriété anti-angiogénique; la lutéoline (Lut), l'apigénine (Api), l'épigallocatechine gallate (EGCG), la delphinidine (Dp) et l'acide élлагique (EA), sur différentes étapes de l'angiogenèse déclenchée par l'IL-6 et d'en déterminer le mécanisme d'action au niveau moléculaire. Dans un deuxième temps, nous avons évalué chez les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ayant un phénotype pro-inflammatoire induit par la concanavaleine A (ConA), l'implication de la métalloprotéinase membranaire matricielle de type-1 (MT1-MMP) dans l'activation de STAT3 et l'expression de COX-2. Les résultats ont montré principalement que la Lut et l'Api inhibent très significativement la prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales (EC) induite par l'IL-6 via la voie JAK/STAT3. En deuxième lieu, chez les MSC, la MT1-MMP semble être un contributeur important dans le phénotype pro-inflammatoire et implique également la voie JAK/STAT3. De façon inattendue l'inactivation de STAT3 potentialise l'expression de COX-2.

Étant donné que les MSC sont recrutées aux sites inflammatoires de plusieurs cancers, ces résultats confirment l'importance de la MT1-MMP dans la régulation de la signalisation intracellulaire pro-inflammatoire des MSC. L'action double de STAT3 régulé par la MT1-MMP, montre son rôle majeur comme contributeur dans l'équilibre de l'expression de COX-2. Ce mécanisme permettrait ainsi aux MSC de s'adapter au microenvironnement inflammatoire pro-tumoral. Connaissant la diversité des polyphénols d'origine alimentaire et leur potentiel anti-inflammatoire, anti-angiogénique et anticancéreux on a aussi montré dans le cadre de cette étude que le potentiel de l'activité anti-inflammatoire de la Lut et d'Api permet, en partie d'expliquer leur activité anti-angiogénique et anti-cancer. Ainsi, ces flavones pourraient non seulement servir de base de recherche d'agents thérapeutiques anti-angiogéniques minimisant la résistance aux agents chimiothérapeutiques, mais aussi mettre en lumière le rôle majeur de l'alimentation dans la prévention du cancer.

Mots clefs : STAT3, MT1-MMP, angiogenèse, inflammation, IL6, COX-2

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Une des plus vieilles descriptions du cancer vient des 7 papyrus de l'Égypte ancienne (3000-1500 av. J-C.) où l'on décrit les détails et conditions qui sont fidèles à une description moderne du cancer. Dans ces documents, on suggère même une cautérisation, une méthode pour détruire le tissu avec un instrument chauffé (ACS, 2011; Pagé, 1984) :

« Ceci est une tumeur de la chair. Je traiterai ce mal. J'essayerai de le guérir par le feu comme on guérit par cautérisation. »

-Extraits du papyrus d'Ebers

Depuis l'aube des temps l'humain a dû faire face à plusieurs obstacles pour survivre et c'est cette maladie, qui a longtemps co-évolué avec lui (Greaves et Maley, 2012; Lawrence et Valentine, 1970), qui est aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé, l'une des causes du plus grand nombre de décès annuellement au niveau mondial avec 7,9 millions en 2008 et est estimé d'augmenter à 11,5 millions d'ici 2030 (OMS, 2008). Hippocrate (460-370 av. J-C.), père de la médecine, est le premier à établir la différence entre une tumeur bénigne et maligne en observant particulièrement sur cette dernière, un centre dur avec des prolongements et une vascularisation en forme de crabe qu'il appela *καρκίνοσ* (Manton et al., 2009; Pervan et al., 1995). Celsus (28 av. J-C.-50 apr. J-C.), médecin romain employa pour la première fois le terme « cancer » sous la même dénomination connue aujourd'hui et fut le premier à mettre en relation l'inflammation et le cancer (Celsus, traduction de 1838).

Comment était perçu le cancer par les pionniers de la médecine? Les écrits de Galien (131-201 apr. J-C.), d'où le terme *onkos* présent dans le nom « oncologie » lui revient, ont influencé la

pendant plusieurs siècles. Ces écrits reflètent bien le concept de cancer tel que représenté dans l'antiquité qui était vu comme le résultat d'anomalies des flux humoraux. Les médecins utilisant divers vocables avaient tous conscience du pronostic défavorable de certaines tumeurs aujourd'hui reconnues sous le terme de cancer. Voici d'ailleurs des extraits traduits d'aphorismes (Riaud et al., 2010):

« Il vaut mieux ne faire aucun traitement aux personnes atteintes de cancer occulte, car si on les traite, elles meurent rapidement, si on ne les traite pas, leur vie se prolonge »

-Hippocrate

« le squirrhe insensible est incurable, mais les autres formes peuvent guérir, bien que ce ne soit guère facile »

-Galien

Aujourd'hui, on reconnaît plus de 100 types de cancers et nos connaissances sur le cancer n'ont cessé d'évoluer. Mais reste que cette anomalie humorale perçue des anciens est encore ancrée et s'exprime, de façon téléologique, comme des anomalies des circuits régulateurs gouvernant la prolifération et l'homéostasie de cellules normales (Hanahan et Weinberg, 2000). La majorité des cancers humains a pour origine une cellule unique ayant subi des altérations génétiques ou épigénétiques initiant la tumorigenèse ou la transformation d'une cellule saine à cancéreuse. La progéniture de ces cellules cancéreuses accumule à son tour des altérations physiologiques pouvant se combiner et ainsi permettre l'acquisition d'un phénotype malin (Bertolotti et Ozawa, 2008; Hanahan et Weinberg, 2000).

1.1.2 Les altérations distinctives du cancer

Une des étapes fondamentales dans la tumorigenèse est le dérèglement du cycle cellulaire qui amène à une **prolifération soutenue** (Bosch et Felipe, 2003). En effet, le tissu normal régule de façon méthodique la libération et la production de signaux permettant le contrôle du cycle de division et de croissance assurant l'équilibre du nombre de cellules essentiel à une architecture et à une fonction adéquate du tissu (Hanahan et Weinberg, 2011). Les cellules cancéreuses dérèglent ces signaux et sont ainsi capables de soutenir une prolifération chronique. La

prolifération soutenue peut être atteinte par trois mécanismes : (1) par stimulation autocrine i.e. les cellules produisent leurs propres facteurs de croissance mitogéniques; (2) par des défauts de récepteurs transmembranaires tels qu'une surexpression d'un récepteur rendant les cellules hypersensibles à un niveau normal de facteurs de croissance ou même des altérations de récepteurs ayant pour conséquence une signalisation constitutivement activée; (3) par des altérations dans la signalisation intracellulaire, telle que dans la voie du système rénine angiotensine et des protéines kinases activées par les mitogènes (RAS/MAPK) qui joue un rôle important dans la signalisation en aval des récepteurs à tyrosines kinases (RTK) (Hanahan et Weinberg, 2000; Schneider et al., 2012). Plusieurs autres traits de la physiologie cellulaire ont été classifiés comme caractéristiques aux cellules cancéreuses, initialement au nombre de six, on en dénombre aujourd'hui au moins huit, dont deux propriétés permettant l'acquisition de ces derniers traits (Figure 1.1) (Hanahan et Weinberg, 2011).

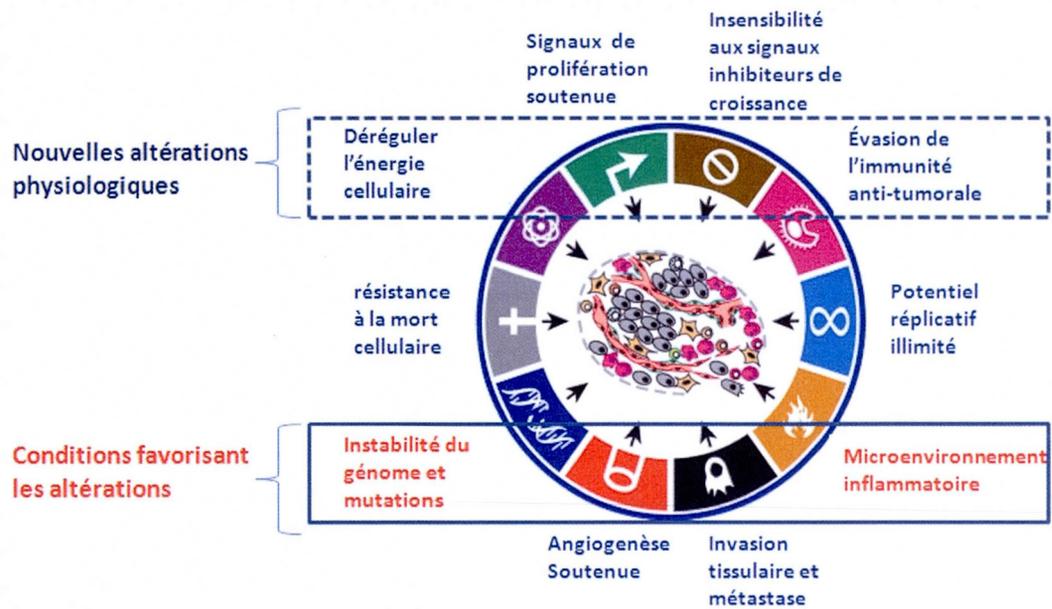


Figure 1.1 Les traits distinctifs du cancer.

Schéma montrant le modèle le plus récent d'Hannahan et Weinberg suggérant que tous les phénotypes rencontrés dans les différents types de cancers sont la manifestation de huit traits distinctifs ou altérations physiologiques (en bleu): Les signaux de prolifération soutenue; la résistance à la mort cellulaire; l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance; l'invasion tissulaire et la métastase; le potentiel réplcatif illimité; l'angiogenèse soutenue, dont les deux plus récentes : la dérégulation de l'énergie métabolique et l'évasion de l'immunité anti-tumorale (encadré pointillé). Selon ce nouveau modèle, les conditions permettant d'acquérir ces altérations sont l'instabilité du génome et mutation ainsi qu'un microenvironnement inflammatoire (en rouge et encadré, lignes pleines). Cette dernière est aussi une condition à l'instabilité génomique.

Illustration modifiée tirée de : Hanahan et Weinberg, 2011

En plus de la prolifération soutenue, d'autres caractéristiques sont aussi essentielles et permettent au programme de croissance cellulaire une certaine indépendance aux signaux environnementaux (Bosch et Felipo, 2003). **L'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance** permet aux cellules cancéreuses d'empêcher l'arrêt du cycle cellulaire en phase 0. Cela est habituellement accompli en gardant la protéine du rétinoblastome (Rb) dans un état hypophosphorylé ou toute autre modification dans le système Rb/E2F qui permette la transcription de gènes essentiels à une progression de la phase G1 → S (Schneider et al., 2012). Le contournement de certains mécanismes étant considérés comme des barrières naturelles, comme l'apoptose, l'autophagie ou même la nécrose, permet aux cellules cancéreuses de **résister à la mort cellulaire programmée**. À cette fin, les cellules cancéreuses ont développé différentes stratégies comme la perte de fonction du suppresseur de tumeur p53, en augmentant l'expression des régulateurs anti-apoptotiques comme la protéine de lymphomes à cellules B-2 (Bcl-2) ou en régulant négativement le facteur anti-apoptotique Bax (Hanahan et Weinberg, 2011). L'inhibition de l'autophagie se fait aussi par des mécanismes qui sont partagés avec ceux de l'apoptose, comme pour l'activation de la voie PI3K/AKT par la production de signaux extracellulaires régissant la survie de la cellule (e.g. facteur de croissance à l'insuline; IGF) bloquant ainsi l'apoptose et l'autophagie. Un autre exemple est l'altération diminuant la libération de Beclin-1, une protéine qui s'est montrée nécessaire dans l'induction de l'autophagie (Hanahan et Weinberg, 2011). Contrairement à l'autophagie et à l'apoptose, la nécrose libère une plus grande quantité de molécules pro-inflammatoires dans le microenvironnement tissulaire attirant des cellules du système immunitaire qui peuvent activement participer à la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse, la prolifération et le potentiel invasif des tumeurs (Grivennikov et al., 2010). Les tumeurs peuvent aussi acquérir de nouvelles capacités leur permettant de contourner les mécanismes de défense anti-cancer comme l'angiogenèse qui est l'habileté à former de nouveaux vaisseaux sanguins de façon soutenue, l'évasion des contrôles internes qui régulent et limitent le potentiel réplicatif et finalement l'acquisition de propriétés leur permettant l'invasion et la formation de métastases.

Tout comme pour les tissus sains, les tumeurs requièrent un apport en nutriments et en oxygène ainsi que la capacité de rejeter des déchets métaboliques et du CO₂ (Hanahan et Weinberg, 2011; Schneider et al., 2012). Cela oblige les cellules tumorales d'être à une distance d'environ

100 μm de proximité des capillaires (Schneider et al., 2012). Il a été proposé initialement par Folkman en 1970 qu'en bloquant **l'angiogenèse** il était possible de limiter la croissance de tumeurs solides à un faible diamètre de quelques millimètres (Folkman et al., 1971). Cette hypothèse fait aujourd'hui consensus du fait que la croissance tumorale et la métastase nécessitent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Hanahan et Folkman, 1996). Sans cette néovascularisation, il a été observé très tôt *in vivo* que la tumeur ne peut croître au-delà d'environ 0,4 mm en diamètre et entre en dormance. S'il y a prévention de la néovascularisation prolongée, les cellules tumorales peuvent devenir nécrotiques et/ou apoptotiques (Gimbrone et al., 1972; Hanahan et Folkman, 1996). Le processus angiogénique physiologique est transitoire, mais lors du développement tumoral un équilibre est perturbé et l'angiogenèse demeure activée (Hanahan et Folkman, 1996). Cette perturbation est communément interprétée comme un commutateur qui est gouverné selon le niveau de plusieurs facteurs pro et anti-angiogéniques qui va faire pencher la balance dans un sens ou dans l'autre et la maintenir (Figure 1.2). Les protéases de la matrice extracellulaire (ECM), telles que les métalloprotéases matricielles (MMP), peuvent aussi contrôler la biodisponibilité de certains facteurs pro ou anti-angiogéniques en les libérant ou en les activant (Rundhaug, 2005). Certains de ces facteurs, comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)-A qui est un des facteurs angiogéniques les plus puissants ou la thrombospondine-1, premier facteur anti-angiogénique découvert, vont se lier aux récepteurs leur étant associés à la surface des cellules endothéliales (EC) (ou autres cellules) pour ainsi inhiber ou stimuler l'angiogenèse.

Heyflick, au début des années 1960, a démontré que la division des cellules normales est limitée à près de 50 divisions cellulaires avant d'entrer en sénescence (Hayflick et Moorhead, 1961). Ce processus dégénératif par lequel la capacité de division cellulaire et de croissance est perdue dans le temps amenant à une incompatibilité avec la vie (Berkow, 2000), est attribuable à des facteurs intrinsèques (Hayflick et Moorhead, 1961). Ceci est contraire aux cellules ayant un phénotype malin qui se propagent en culture et apparaissent acquérir **un potentiel répliatif illimité**, qui est essentiel au développement tumoral (Krauss, 2008). En effet, les cellules malignes semblent déjouer cette limitation en régulant positivement les télomérases qui jouent

un rôle essentiel dans la maintenance de la longueur de l'ADN télomérique responsable, en partie, de cette horloge biologique (Hayflick, 1997; Krauss, 2008).

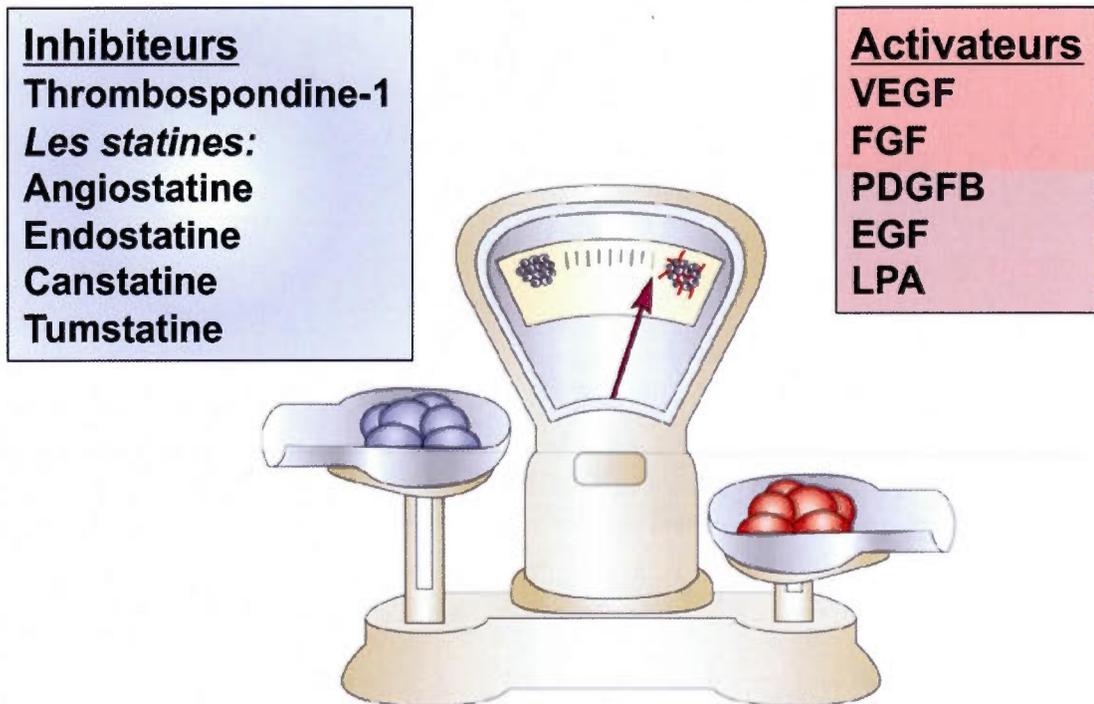


Figure 1.2 L'hypothèse de la balance angiogénique.

La réponse angiogénique dépend d'une variété d'activateurs et d'inhibiteurs dont quelques-uns sont nommés ci-dessus. Les activateurs de la prolifération et de la migration sont principalement les ligands des récepteurs tyrosines kinases, comme les facteurs de croissance; endothéliales vasculaires (VEGF), de fibroblastes (FGF), dérivés des plaquettes (PDGF) et épidermiques (EGF). D'autres peuvent être de différentes origines régulant positivement le niveau de VEGF tel que l'acide lysophosphatique (LPA), la prostaglandine E2 (PGE₂) associée à la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) (Wang et Klein, 2007). La première molécule anti-angiogénique découverte est la thrombospondine-1 qui module la prolifération et la motilité des EC. D'autres molécules, comme certaines statines, proviennent de fragments n'ayant aucun effet connu sur l'angiogénèse, tel que l'angiostatine et la canstatine qui sont dérivées du plasminogène et du collagène respectivement. Généralement, le changement du niveau d'activateurs et d'inhibiteurs détermine l'état quiescent ou angiogénique des EC.

Illustration traduite et modifiée tirée de : Bergers et Benjamin, 2003.

Il est important de mentionner que ces cinq altérations du cancer se retrouvent aussi dans les tumeurs bénignes. Il existe cependant une dernière caractéristique classique, **l'invasion tissulaire et la métastase**, qui, bien qu'elle soit mise au même niveau que les autres altérations physiologiques, est responsable de près de 90% des mortalités liées au cancer (Cavallaro et Christofori, 2004; Lazebnik, 2010). Le cancer peut se disséminer dans le corps par deux mécanismes, l'invasion qui est la migration et la pénétration des cellules cancéreuses dans le tissu avoisinant, et la métastase qui est la capacité des cellules cancéreuses de pénétrer dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins pour envahir un tissu normal à distance (DeVita et al., 2008). L'acquisition de cette capacité dépend premièrement des cinq caractéristiques nommées précédemment : les signaux de proliférations soutenue; l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance; la résistance à la mort cellulaire programmée; l'angiogenèse soutenue et un potentiel réplicatif illimité. Toutefois, ce processus est encore largement inconnu tant au niveau de ses déterminants biochimiques que génétiques. Elle dépend aussi de plusieurs classes de protéines qui sont impliquées dans l'attachement des cellules à leur microenvironnement, comme les molécules d'adhésions cellulaires (CAM) qui assurent les interactions cellulaires, les intégrines qui se chargent de lier les cellules à la ECM (DeVita et al., 2008). Une des altérations fonctionnelles les plus communes, retrouvée dans plusieurs cancers épithéliaux, est celle de l'E-cadhérine qui régit les interactions cellules-cellules et qui agit comme suppresseur d'invasion et de métastase par une signalisation via les β -caténines (Cavallaro et Christofori, 2004; DeVita et al., 2008; Schneider et al., 2012). Aussi, il est à souligner la présence accrue des MMP qui contribuent non seulement au processus angiogénique ou à l'hydrolyse des composantes de l'ECM, mais aussi certains récepteurs de surface, des protéines de jonctions impliquées dans les interactions cellules-cellules ou cellules-ECM (DeVita et al., 2008).

1.1.3 Les altérations émergentes du cancer

Récemment, deux traits distinctifs ont été ajoutés aux six précédents, dont la reprogrammation du métabolisme énergétique (ou **dérégulation de l'énergie cellulaire**) et l'évasion de l'immunité anti-tumorale (Hanahan et Weinberg, 2011). En condition aérobie, les cellules normales utilisent la phosphorylation oxydative pour convertir le glucose, cependant en conditions anaérobiques la glycolyse est favorisée et peu de pyruvate est acheminé vers les

mitochondries (Hanahan et Weinberg, 2011). Il y a plus de 80 ans, Warburg Otto a observé un trait distinctif des cellules cancéreuses qui vont reprogrammer leur métabolisme glucidique en favorisant la glycolyse aérobie calculée à 66 % de la respiration (Warburg et al., 1927), et ce en présence d'oxygène (Hanahan et Weinberg, 2011). Pour contrebalancer le déficit en ATP encouru, les cellules cancéreuses augmentent le transport en glucose par une régulation positive des transporteurs de glucose (e.g. GLUT1), d'enzymes glycolytiques et inhibiteurs du métabolisme mitochondrial (Hsu et Sabatini, 2008; Hanahan et Weinberg, 2011). Il y aurait aussi une autre sous-population de cellules cancéreuses qui préférerait importer ou utiliser le lactate produit dans le microenvironnement comme source principale d'énergie, ceci permettrait à ces dernières d'économiser le glucose afin qu'il puisse possiblement se rendre aux cellules tumorales hypoxiques (Feron, 2009).

Le dernier trait distinctif des cellules tumorales est la capacité à **échapper à l'activité anti-tumorale du système immunitaire**. Selon la théorie mise de l'avant en 1959 par Thomas L., les mécanismes du système immunitaire auraient évolué en tant que défenses contre les cancers où les cellules mutantes reconnues par l'hôte seraient rejetées (Lawrence et Valentine, 1970), empêchant ainsi la formation de tumeurs naissantes. Lorsqu'il y a des altérations qui provoquent une déficience dans cette immunosurveillance, particulièrement dans la fonction des CD8+, des lymphocytes cytotoxiques T, des CD4+ ou des cellules tueuses naturelles (NK), il a été observé que les tumeurs étaient plus fréquentes ou se développaient plus rapidement (Hanahan et Weinberg, 2011). Mais il serait nécessaire d'ajouter à cette capacité d'évasion immunitaire leur capacité de supprimer la réactivité immunitaire, car les tumeurs acquièrent la capacité de libérer plusieurs facteurs tels le TGF- β , IL-10, l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) et convertissent les cellules T naïves en cellules T adaptatives (T_{reg}) (Cavallo et al., 2011).

1.1.4 Les conditions favorables aux altérations

1.1.4.1 L'instabilité génomique

Deux conditions facilitent ou permettent l'acquisition de traits distinctifs ou l'acquisition de capacités fonctionnelles pour survivre, proliférer et se disséminer au cours des différentes étapes de la tumorigenèse. Plusieurs des altérations physiologiques ont pour origine **l'instabilité génomique et les mutations** ainsi que le **microenvironnement inflammatoire** (Hanahan et Weinberg, 2011). L'instabilité génomique est une caractéristique chez la plupart des cancers et résulte des mutations aux gènes responsables pour réparer et maintenir l'intégrité de l'ADN (Negrini et al., 2010). L'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs tels que Tp53 qui code pour la p53 connue comme le gardien du génome (Efeyan et Serrano, 2007), d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes CDKN2A ou autres (Negrini et al., 2010) augmentent les chances d'acquérir un génotype mutant et aboutir par succession d'altérations à la progression tumorale en plusieurs étapes ou expansion clonale. Cette dernière peut s'effectuer par des modifications épigénétiques sans qu'il n'y ait nécessairement mutation, telles que la méthylation de l'ADN, la modification d'histones ou la régulation des microARN affectant la régulation de l'expression génétique (Berdasco et Esteller, 2010).

1.1.4.2 Le microenvironnement inflammatoire

Ayant défini le premier les quatre symptômes cardinaux de l'inflammation; calor (chaleur), dolor (douleur), rubor (rougeur) et tumor (œdème) (Jaccoud, 1875), Celsus avait déjà remarqué, il y plus de deux mille ans, que certaines conditions inflammatoires pouvaient favoriser le cancer (Celsus, traduction de 1838):

«Quelquefois aussi la violence de l'inflammation [...], l'age avancé, la mauvaise disposition du blessé, font dégénérer le mal en cancer »

-Celsus A. C.

Ce lien possible n'a été reconsidéré sérieusement qu'au 19^e siècle à l'observation de tumeurs qui se développaient aux sites d'inflammation chronique. Les biopsies excisées montraient alors la présence de cellules inflammatoires (Mantovani et al., 2008). En effet, la carcinogenèse et l'inflammation sont interconnectées même en absence de stimuli externes (Cavallo et al., 2011) et ceci se reflète expressément par la description analogique d'une tumeur en tant qu'une plaie qui ne guérit jamais (Dvorak, 1986). L'inflammation est une réponse de l'hôte à un stimulus externe ou interne qui sert à contrebalancer une agression de l'hôte et lorsqu'elle est de courte durée, plusieurs s'accordent pour dire qu'elle est bénéfique (Aggarwal et al., 2006b; Grivennikov et al., 2010). Cependant, lorsqu'elle est de longue durée elle peut s'avérer néfaste (Aggarwal et al., 2006b) et il a été observé que lors d'une lésion normale ou pour éliminer un pathogène (Grivennikov et al., 2010), les cellules immunitaires n'apparaissent que transitoirement puis disparaissent, contrairement à un site inflammatoire chronique (Hanahan et Weinberg, 2011). En effet, des études épidémiologiques suggèrent que l'inflammation chronique prédispose les individus à plusieurs types de cancers (Mantovani et al., 2008; Aggarwal et al., 2006b). Il a été estimé que 15-20% des cancers au niveau mondial sont reliés aux agents infectieux qui induisent un **microenvironnement inflammatoire** chronique (Karin et Greten, 2005; Kuper et al., 2000; Tili et al., 2011). L'inflammation chronique a été reliée à plusieurs altérations physiologiques distinctives des étapes de la tumorigenèse, incluant les mutations oncogéniques et l'instabilité du génome, la transformation cellulaire, la prolifération, la promotion tumorale, la survie, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase (Aggarwal et al., 2006b; Grivennikov et al., 2010). À l'heure actuelle, il y a consensus que l'inflammation chronique est un facteur de risque pour la plupart des cancers.

1.1.4.3 Types d'inflammations chroniques

Il y a plusieurs types d'inflammations, entre autres ceux mentionnés précédemment dont celle de courte durée ou inflammation aiguë et celle qui est chronique. Il y a bien sûr l'inflammation chronique associée à la tumeur même, cependant il est important de souligner que le paradigme inflammation chronique-cancer n'est pas absolu, car il y a des exceptions à la règle, voire même contradictoire, pour des conditions telles que le psoriasis (Nickoloff et al., 2005) ou l'arthrite rhumatoïde (Grivennikov et al., 2010). Nickoloff avait mentionné quelques

différences moléculaires possibles sur l'avenue d'une condition inflammatoire chronique favorisant le cancer contrairement à celles ne la favorisant pas, entre autres la production du facteur de nécrose tumoral (TNF), la PGE₂/COX-2 et l'activation de STAT3 (Nickoloff et al., 2005). Ayant mis en lumière ces exceptions peu exhaustives, l'inflammation chronique peut être d'origine auto-immune et/ou infectieuse comme exemples respectifs, les maladies inflammatoires de l'intestin et la gastrite chronique attribuée dans la majorité des cas à *Helicobacter pylori* qui prédispose à l'adénocarcinome de l'estomac distal (Aggarwal et al., 2006b; Grivennikov et al., 2010; Peek et Crabtree, 2006). Il y aurait aussi des états inflammatoires chroniques dits de faible intensité (Grivennikov et al., 2010) dont l'exposition à des polluants environnementaux tel que l'amiante qui est relié à la mésothéliome et le cancer du poumon (Mossman et al., 1996), la fumée de cigarette liée au cancer du poumon (Martey et al., 2004; Aggarwal et al., 2006b) ou des conditions telles que l'obésité qui prédispose à de nombreux cas de cancers comme celui du côlon, du sein, de l'endomètre, du rein, et de l'œsophage (Calle et Thun, 2004). Les thérapies anti-cancer peuvent aussi déclencher une réponse inflammatoire et ainsi stimuler la réapparition des tumeurs et la résistance thérapeutique, cependant l'induction thérapeutique de l'inflammation peut tout aussi bien renforcer la surveillance anti-tumorale en augmentant la présentation d'antigènes du « non-soi » de cellules tumorales (Zitvogel et al., 2008; Grivennikov et al., 2010).

1.1.4.4 Équilibre inflammation/immunosuppression

Ce dernier point amène évidemment à discuter de l'importance de la balance entre l'immunosurveillance et la tumorigenèse inflammatoire. Dans le microenvironnement tumoral, il y a un équilibre délicat entre l'activité anti-tumorale et celle de l'inflammation pro-tumorale (Lin et Karin, 2007) qui est régi par différents médiateurs et modulateurs ainsi que l'activation et le recrutement de plusieurs types cellulaires dans le microenvironnement (Grivennikov et al., 2010). Parmi les cellules immunitaires/inflammatoires impliquées, on retrouve les mastocytes, les neutrophiles, les cellules NK, les lymphocytes T et B, les cellules Myéloïde-dérivées de suppresseur (MDSC) ainsi que plusieurs autres cellules du stroma, incluant les fibroblastes, les péricytes, les cellules mésenchymateuses et les cellules endothéliales (EC) (de Visser et al., 2006) ainsi que les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Auletta et al., 2012), sans

oublier les cellules cancéreuses. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM), qui peuvent former jusqu'à 50% de la masse tumorale (Solinas et al., 2009), sont les cellules retrouvées en plus grand nombre suivi des lymphocytes T. Les TAM sont considérés obligatoires à deux altérations physiologiques dans le cancer, soit l'angiogenèse et l'invasion tissulaire/métastase (Condeelis et Pollard, 2006; Grivennikov et al., 2010). Ces cellules vont communiquer par contacts directs, régulation autocrine (IL1, IL6, IL17, IL23) ou paracrine (TNF, IL1, IL6, IL11, IL17) en sécrétant des chimiokines, des cytokines, des protéases ou des facteurs de croissances angiogéniques. Ainsi, il peut y avoir un effet immunosuppresseur soutenant la tumorigenèse inflammatoire. À l'opposé, il y a immunosurveillance dans le cas où il y aurait production de cytokines cytotoxiques (e.g. IL12, TNF, IFN type-1), par cytotoxicité directe (NK) par la production d'anticorps ou d'autres effecteurs cytotoxiques spécifiques aux tumeurs (Figure 1.3) (Grivennikov et al., 2010). Des recherches récentes avaient en effet suggéré que la modulation de la signalisation par l'activation de STAT3 ferait pencher la balance de la surveillance immunitaire vers des conditions inflammatoires liées au cancer en ayant un effet immunosuppresseur. Par exemple, STAT3 régulerait négativement dans le microenvironnement tumoral l'expression de l'IL12 associée aux cellules dendritiques et positivement l'IL23 des TAM (Kortylewski et al., 2009).

À la lumière de cet effet immunomodulateur de STAT3, il est de plus en plus reconnu que la plupart des signaux inflammatoires affectent la tumorigenèse en activant les facteurs de transcriptions NF- κ B et STAT3 (Li et al., 2011). Ces deux protéines ne sont pas seulement constitutivement activées dans plusieurs cancers, mais sont nécessaires à la transduction du signal cytoplasmique en tant que facteurs de transcriptions de plusieurs gènes clés médiateurs dans l'inflammation liée au cancer, à la prolifération, à la résistance à la mort cellulaire, à l'angiogenèse, à l'invasion tissulaire et à la métastase (Yu et al., 2009). Il est mécaniquement plausible qu'il y ait une interaction entre STAT3 et NF- κ B à différents niveaux, par exemple certaines cytokines telles que l'IL6 ciblées par NF- κ B soient d'importantes activatrices de STAT3 (Grivennikov et al., 2009) et ultimement ces deux facteurs vont co-réguler plusieurs gènes oncogéniques et inflammatoires (Yu et al., 2009) dont l'IL6 (Yoon et al., 2011). Cependant, bien que le NF- κ B soit un inducteur crucial de conditions inflammatoires, il est aussi indispensable à la médiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Karin et Greten,

2005), contrairement à STAT3 qui a un effet restrictif sur l'activité anti-tumorale en antagonisant NF- κ B, ce dernier étant nécessaire à l'expression de cytokines cytotoxiques telles que l'IL12 et l'IFN (Yu et al., 2009). Pour cette raison, STAT3 est maintenant considéré comme le facteur de transcription liant l'inflammation et le cancer (Yu et al., 2009).

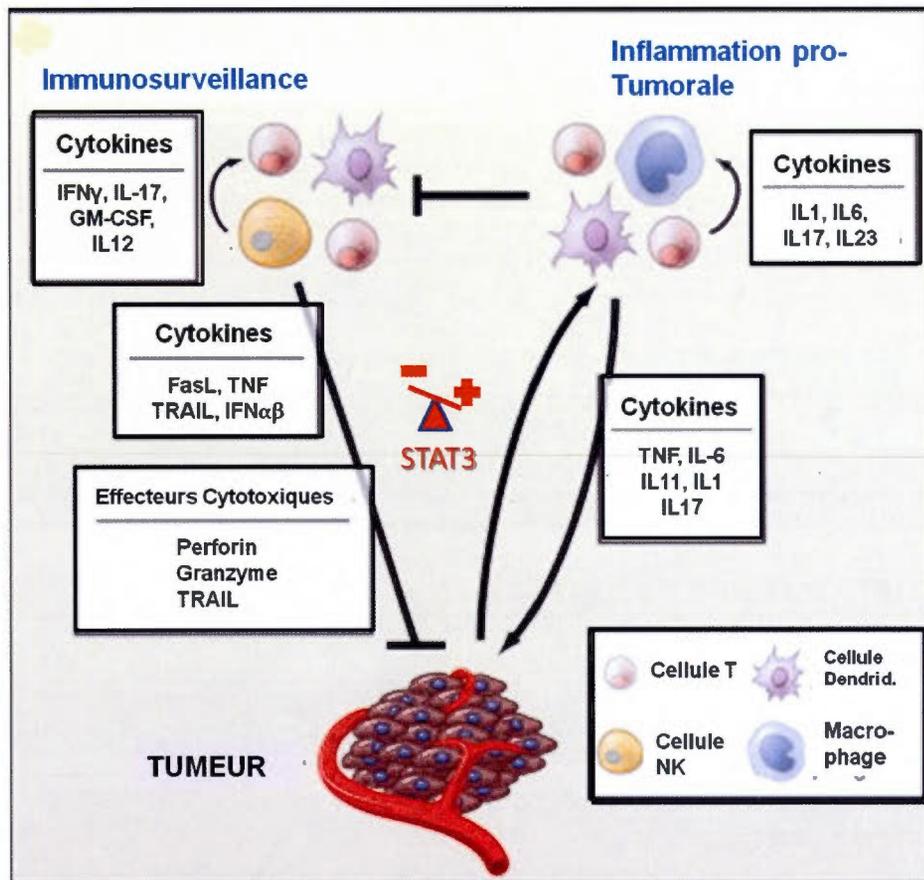


Figure 1.3 Schéma de l'équilibre immunomodulateur tumoral.

Représentation de l'équilibre entre l'immunosurveillance et l'inflammation qui favorise l'évasion de l'immunité tumorale. Bien que les cellules tumorales puissent présenter des antigènes du « non-soi » et être assujetties à une activité anti-tumorale ou cytokines cytotoxiques, les tumeurs produisent plusieurs facteurs, incluant des cytokines pro-inflammatoires qui agissent en faveur de l'évasion anti-tumorale. Par une boucle rétroactive positive, ce déséquilibre est associé en partie à STAT3 qui va favoriser l'expression des cytokines pro-inflammatoires (tels que IL6 et IL23) qui vont en retour attirer d'autres cellules immunitaires et inflammatoires et soutenir davantage l'inflammation pro-tumorale.

Illustration adaptée et modifiée de : Grivennikov et al., 2010.

1.2 Voies de signalisations oncogéniques

Les voies de signalisation cellulaire sont essentielles aux mécanismes oncogéniques. Non seulement elles y contribuent par leurs altérations propres, mais elles peuvent servir de support aux altérations par leur implication dans diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la motilité et la survie (Hanahan et Weinberg 2000; Robert, 2010). Une subdivision simpliste des voies principales peut se faire selon leurs fonctions physiologiques qui orchestrent ensemble les capacités distinctives des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg 2011). La connaissance des anomalies de la signalisation cellulaire reliées aux mécanismes oncogéniques a permis de traiter la cause de ces perturbations à la source et non plus les effets qui en résultent (Robert, 2010). Cela a permis l'émergence du concept des thérapies ciblées vers la fin des années 1980. Parmi les voies majeures impliquées dans le cancer, qui sont aussi impliquées dans le renouvellement et la différenciation des cellules souches, on retrouve Notch, MAPK, PI3K/AKT, NF-kB, Wnt, TGF- β , Hedgehog et la voie des cytokines JAK/STAT (Dressen et Brivanlou, 2007) (Robert, 2010).

1.2.1 Voies majeures oncogéniques

La voie de signalisation Notch est importante lors de l'embryogenèse et la morphogenèse, et joue un rôle majeur dans la différenciation des cellules souches. La surexpression de certaines de ces composantes (i.e. c-myc) est impliquée dans des pathologies cancéreuses (Robert, 2010). Des mutations dans la signalisation de Notch ont été identifiées dans près de 60 % des lymphomes et dans les leucémies lymphoblastiques-T (T-ALL) et résultent en une prolifération incontrôlée des cellules T immatures (Dressen et brivalou, 2007). Tout comme Notch, la voie Wnt (ou β -caténine) est importante non seulement dans le développement et la différenciation des cellules souches, mais aussi dans leur prolifération. Cette voie est universelle chez l'espèce animale et plusieurs altérations génétiques, somatiques ou germinales sont liées à l'oncogenèse. Par exemple, dans 90% des cancers du côlon, il y a mutation du type perte de fonction de l'APC, une protéine adaptatrice de cette voie permettant la dégradation de la β -caténine, menant à une prolifération soutenue. Des mutations du type gain de fonction sont aussi communes à cette voie et impliquent souvent la β -caténine. Tout comme Wnt et Notch, une

voie importante dans le développement, l'embryogenèse, la morphogenèse est la voie Hedgehog, qui a aussi une fonction importante dans l'engagement des cellules souches vers leur différenciation et leur renouvellement (Ingham et McMahon, 2001; Robert, 2010). La voie Hedgehog est activée par trois protéines sécrétées *sonic Hedgehog*, *Indian Hedgehog* et *Desert Hedgehog* qui vont se lier à une protéine transmembranaire appelée Patched (Ptch) (Goss et Kahn, 2011). Une activation accrue de cette voie a été impliquée dans plusieurs types de cancers, incluant la peau, le cervelet, le pancréas et le tractus intestinal. Il a été rapporté que la communication-croisée ou « cross-talk » avec la voie Wnt optimise la signalisation Hedgehog.

Une des voies les plus connues et les plus ciblées pharmacologiquement est celle des RAS/MAPK, à cause de leur rôle central dans la prolifération cellulaire, car elles sont dérégulées dans plusieurs tumeurs humaines (Robert, 2010) (Dressen et Brivalou, 2007). Ces voies sont situées en aval de plusieurs récepteurs répondant à des facteurs de croissance (e.g. RTK) ou des cytokines et ainsi plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs y ont été identifiés. La plupart des altérations de ces voies se situent au niveau de RAS et RAF résultant en l'activation constitutive d'un état prolifératif soutenu. Il a été suggéré que des mutations de RAF sont retrouvées dans près de 2/3 des mélanomes (Dressen et Brivalou, 2007). Il y a bien sûr des protéines qui ne portent pas de mutations activatrices récurrentes telles que les kinases extracellulaires induites par des mitogènes (MEK) et ERK, mais servent plutôt de support oncogénique lorsqu'elles sont surexprimées par des altérations en amont (Robert, 2010).

Une voie qui répond à plusieurs signaux impliquant les récepteurs RTK et les récepteurs à cytokines, et qui est connue pour son rôle dans la survie cellulaire, est celle PI3K/AKT. Elle médie aussi d'autres fonctions telles que la prolifération et le métabolisme énergétique et est reliée à celle des MAPK au niveau de RAS. La PI3K est une oncoprotéine primordiale qui est reliée au cancer du sein et du côlon (Robert, 2010). Cette voie est constitutivement active dans plusieurs cancers et entre en communication croisée avec plusieurs voies telles que Wnt et NF- κ B. Ceci est dû principalement aux nombreux substrats d'AKT qui va par exemple activer la protéine I κ B kinase (IKK) qui à son tour va phosphoryler la protéine I-kappa B (I κ B) levant ainsi l'inhibition de NF- κ B qui va réguler ainsi la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération et l'angiogenèse (Luo et al., 2005). La mutation et la

dérégulation de la signalisation de NF- κ B ont été impliquées dans une variété de cancers, principalement les mutations sur le gène encodant un des cinq facteurs de transcription NF- κ B, REL.

Plusieurs études concernant la voie des TGF- β et ses analogues sont contradictoires, car d'une part elles montrent une activité antiproliférative et fonctionnent comme étant anti-oncogénique (Markowitz et Roberts, 1996) et d'autre part, elles peuvent montrer une action oncogénique et jouer un rôle d'importance dans la dissémination de la métastase (Gupta et Massague, 2006). Globalement, les mutations ou régulations négatives des récepteurs à TGF- β , l'inactivation de SMAD4 ou p15^{INK4B} peuvent être retrouvées dans une variété de cancers (Dressen et Brivalou, 2007) tels que ceux du côlon, du poumon et du pancréas (Robert, 2010).

Succinctement sans les nommer toutes, il y aurait d'autres voies impliquées dans le cancer comme la voie des sémaphorines dont les récepteurs sont retrouvés principalement chez les EC et ainsi ont une fonction dans l'angiogenèse (Sakurai et al., 2012). La voie des intégrines est constituée de protéines ayant une signalisation bidirectionnelle, modulant une signalisation de l'extérieur vers l'intérieur et de l'intérieur vers l'extérieur en s'attachant ou en interagissant essentiellement à des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) ou des MMP (Robert, 2010). Les altérations au niveau des intégrines peuvent par exemple augmenter le potentiel invasif et métastatique des cancers (Fujita et al., 1995).

Finalement, les cellules peuvent communiquer entre elles par la sécrétion de cytokines, des protéines de 8-30 kDa, qui en se liant à leurs récepteurs respectifs peuvent activer les Janus kinases (JAK) leur étant associées ce qui permet le recrutement et la phosphorylation des transducteurs de signaux et activateurs de la transcription (STAT) (Dressen et Brivalou, 2007). Cette voie JAK/STAT, lorsque dérégulée est reconnue pour contribuer à la tumorigenèse. Il existe de nombreuses altérations de cette voie de signalisation sur le plan oncogénique, entre autres, les kinases JAK, les facteurs de transcription STAT et les suppresseurs de tumeurs SOCS. Cependant, bien que STAT soit souvent considéré comme une oncoprotéine, sa mutation n'a pas été observée dans les cancers, contrairement aux JAK et SOCS (Robert, 2010). Plusieurs recherches ont montré que l'activation constitutive de STAT (phosphorylation

soutenue en Y⁷⁰⁵), et en particulier STAT3, était retrouvée dans de nombreuses tumeurs solides. Cette activation était aussi requise pour maintenir le phénotype transformé de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, de tumeurs primaires ou des lignées transformées par des oncogènes (Bromberg, 2002). La signalisation par JAK/STAT peut aussi contribuer de façon indirecte à certains cancers en compromettant l'immunosurveillance dont il a été question plus tôt.

1.2.2 STAT3 relie l'inflammation à l'angiogenèse

Selon la démarche dans les sections précédentes, l'inflammation, et particulièrement lorsqu'elle est chronique, serait une condition nécessaire à plusieurs altérations distinctes, incluant l'angiogenèse. Il a été vu aussi que STAT3 jouerait un rôle central reliant l'inflammation et le cancer, donc la question serait d'évaluer jusqu'à quelle mesure STAT3 contribuerait à l'angiogenèse. Tout d'abord, l'angiogenèse soutenue nécessite, comme il a été vu, un déséquilibre entre les niveaux anti-/pro-/angiogéniques (Hanahan et Folkman, 1996) où le signal angiogénique dirigé vers les EC vient de diverses cellules du microenvironnement, incluant les tumeurs, les kératinocytes, fibroblastes, les TAM (Jackson et al., 1997) et les cellules MSC (Liu et al., 2011). Cela est généralement accompli par un manque d'oxygène/hypoxie (Pugh et Ratcliffe, 2003) et comme attendu, l'inflammation (Jackson et al., 1997). Le rôle de STAT3 dans l'angiogenèse tumorale modulée par l'inflammation chronique a été démontré plus haut. Pour montrer à quel point STAT3 est un acteur critique dans l'angiogenèse, il a été rapporté que STAT3 non seulement était capable de s'associer seule au promoteur VEGF et d'activer l'expression de VEGF, mais participe activement dans l'expression du VEGF en conditions hypoxiques en s'associant aussi au facteur HIF-1 (Chen and Han, 2008; Gray et al., 2005; Jung et al., 2005; Niu et al., 2002). STAT3 contribue aussi par l'activation d'autres gènes impliqués dans le processus angiogénique qui s'effectue en plusieurs étapes (Figure 1.4) tels que le bFGF, la MMP2 et la MMP9 par exemple (Xie et al., 2004; Dechow et al., 2004; Chen et Han, 2008). En effet, plus généralement, STAT3 induit l'expression de plusieurs cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et médiateurs tels COX-2 et IL6 liés à la tumorigenèse inflammatoire (Yu et al., 2009). Outre son rôle en tant que facteur de transcription, STAT3 agit aussi en tant que transducteur de signal de plusieurs cytokines appartenant à la famille IL6, celles de la famille IFN, celle de la famille IL10, qui

vont agir par l'intermédiaire des récepteurs à cytokines. Aussi, plusieurs facteurs de croissance, tels que l'EGF, le PDGF, l'HGF, vont agir par l'intermédiaire des récepteurs de facteurs de croissance, sans oublier les oncogènes et finalement, certaines lectines (Closa et al., 2007; Hirano et al., 2000; Kisseleva et al., 2002; Levy et Lee, 2002; O'Sullivan et al., 2007; Yu et al., 2009). Mis à part ces facteurs intrinsèques à l'activation de STAT3, plusieurs autres facteurs extrinsèques environnementaux sont aussi connus pour induire les divers types d'inflammation chronique reliés au cancer en activant la voie STAT3, tel que la fumée de cigarette agissant par l'entremise des récepteurs nicotiques, le stress par les récepteurs adrénérgiques, les infections par l'activité des récepteurs Toll-like 4 (TLR4), les radiations et carcinogènes par les récepteurs à cytokines (Yu et al., 2009). Cette dernière classe de récepteurs montre à quel point la voie des cytokines/JAK/STAT3, comme celle de l'IL6/JAK/STAT3 est importante dans le cancer médié par l'inflammation, puisqu'elle est non seulement impliquée de façon intrinsèque, mais aussi environnementale (Yu et al., 2009).

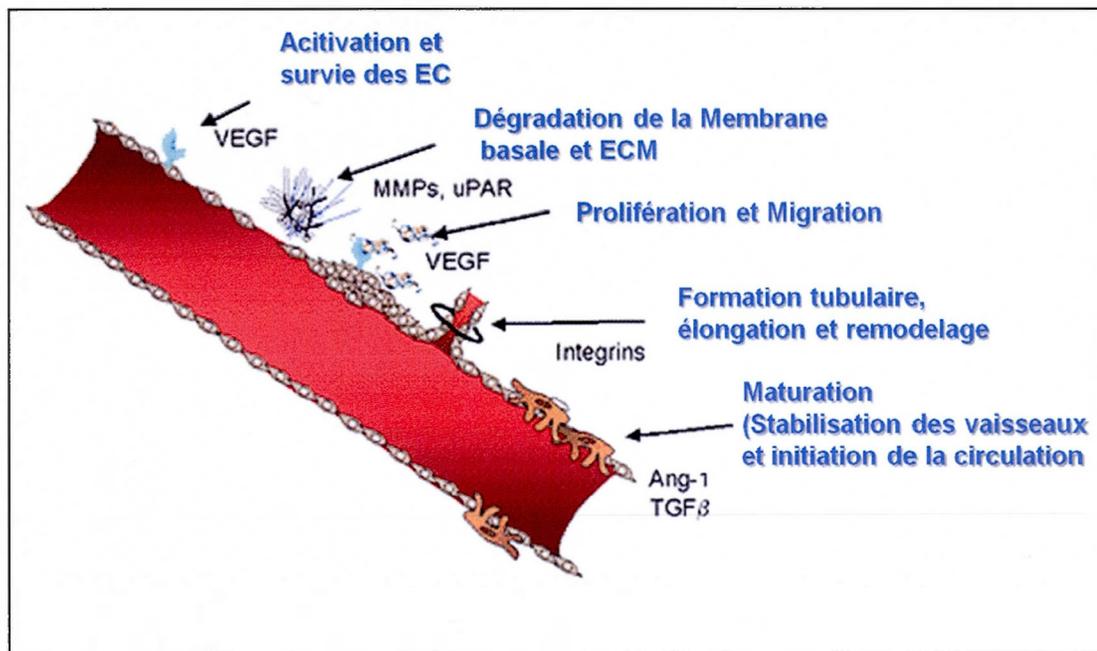


Figure 1.4 Schéma résumant le processus angiogénique.

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants s'effectuant en plusieurs étapes et qui est finement régulée par plusieurs facteurs pro et anti-angiogéniques. Une tumeur ne peut croître au-delà de 0,4 mm (Gimbrone et al., 1972) sans avoir un apport en nutriments et en oxygène adéquat, ainsi elle produit plusieurs facteurs pour susciter sa vascularisation qui s'effectue en plusieurs étapes. Suite à l'activation des EC par des facteurs proangiogéniques (voir Figure 1.2), le processus angiogénique est caractérisé en premier lieu par la dégradation de la membrane basale enveloppant le tube formé d'EC par différentes protéases, permettant à ces dernières de s'échapper dans le stroma. La prolifération des EC s'entame par la suite pour ainsi former une colonne à front migratoire des EC où ces dernières cessent de proliférer, changent de formes et adhèrent l'une contre l'autre pour former la lumière d'un tube capillaire. Finalement, ces tubes bourgeonnent et se fusionnent pour ainsi former des boucles vasculaires dans lesquelles pourra s'établir la circulation (Hanahan et Folkman, 1996).

Illustration modifiée et tirée : Griffioen et Molema, 2000.

1.2.3 Structure et activation de STAT3

Lors de la découverte de STAT3, une protéine de 92 kDa (Huang, 2007), on a d'abord pensé que c'était simplement un membre additionnel de la famille STAT, 7 au total (Figure 1.5), qui induirait en réponse à l'IL6 libérée lors d'une inflammation, la transcription de gènes en phase aiguë de l'inflammation. Cela se fait via l'interaction de STAT3 avec le promoteur d'une région amplificatrice de l'ADN, connue sous le nom d'élément de réponse en phase aiguë (Levy et Lee, 2002). Cependant, peu à peu, il a été mis en évidence qu'il était activé par une variété de cytokines, facteurs de croissance et d'autres stimuli (Levy et Lee, 2002; Takeda et al., 1997). Comme pour les autres STAT, STAT3 est caractérisé comme étant un facteur cytoplasmique latent de transcription qui contient un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine homologue au Src-2 (SH2) et un domaine de liaison phosphotyrosine (P-Y⁷⁰⁵) à l'extrémité carboxy-terminale (Huang, 2007; Levy et Lee, 2002). Le site SH2 permet à STAT3 d'être recruté aux complexes/récepteurs ce qui permet à STAT3 d'être non seulement phosphorylé en Y⁷⁰⁵ par trois des quatre membres de la famille JAK (JAK1, JAK2 ou Tyk2) (O'Sullivan et al., 2007) associés aux complexes/récepteurs à cytokines ou par les tyrosines kinases associées à des récepteurs de facteurs de croissance, mais aussi par des tyrosines kinases non associées à des récepteurs tel que Src et abl (Bromberg et Darnell, 2000) et les MEKK 1 (Lim et Cao, 2001). Cette dernière est connue aussi pour la phosphorylation en S⁷²⁷. Bien que STAT3 soit activé aussi par la phosphorylation en la S⁷²⁷ et par l'acétylation en K⁶⁸⁵, elles stabilisent aussi la dimérisation (Levy et Lee, 2002; Yuan et al., 2005). Toutefois certaines recherches montrent l'effet contraire pour la pS⁷²⁷ (Chung et al., 1997). La phosphorylation en Y⁷⁰⁵ est essentielle à la dimérisation ou l'homodimérisation de STAT3 et sa translocation au noyau pour ainsi exercer son rôle d'activateur de transcription par son domaine de liaison à l'ADN (Huang, 2007). Néanmoins, l'activation de certains gènes tels IL6, RANTES ou IL8 peut s'effectuer sans la phosphorylation et/la dimérisation de STAT3, par un mécanisme dépendant d'une combinaison avec d'autres facteurs de transcription comme mentionné précédemment avec le NF- κ B, ou de façon indépendante par exemple pour un autre sous-groupe de gènes (Yang et al., 2007). Non seulement la modification posttraductionnelle réversible par l'acétylation en K⁶⁸⁵ semble jouer un rôle dans cette interaction STAT3/ NF- κ B ainsi que la stabilité homo- ou hétérodimérique de STAT3, mais une autre modification, l'O-

glycosylation, semble augmenter sa liaison au co-activateur CBP (Schindler et al., 2007). Dans la présente recherche, l'activation représente sa phosphorylation en Y⁷⁰⁵.

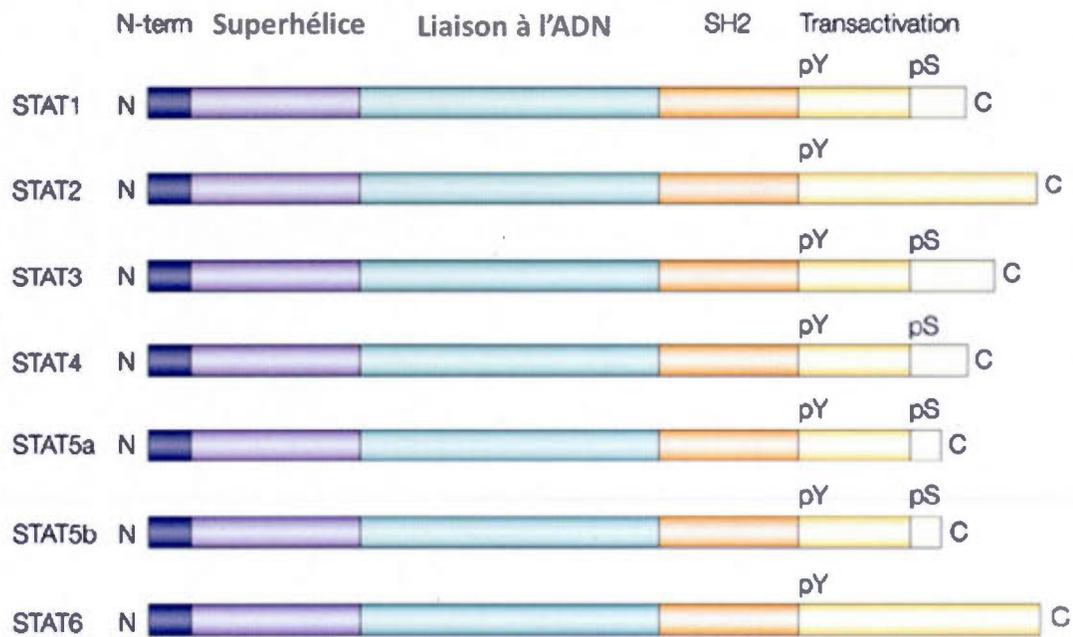


Figure 1.5 STAT3 et les membres de la famille STAT.

Représentation structurale des domaines des 7 membres de la famille STAT. Le domaine de transactivation est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de gènes cibles par l'interaction avec des protéines, telles que les histones acétyltransférases. Ce domaine comprend le domaine carboxy-terminal (C) et un site de phosphorylation d'une sérine (p-S) qui augmente l'activité transcriptionnelle. Le domaine de liaison à l'ADN entre en contact direct avec les sites de liaisons sur les promoteurs contenant des sites consensus spécifiques. L'interaction réciproque entre les domaines Src-homologie-2 (SH2) d'un monomère STAT et celui d'une phosphotyrosine (pY) d'un autre monomère médiant la formation de dimère est requise pour la liaison à l'ADN. Le domaine faisceau hélice ou superhélice est impliqué dans l'interaction avec des protéines régulatrices et autres facteurs de transcription. Le domaine en N-terminal (N-term) médie les interactions entre deux dimères STAT-STAT pour la formation des tétramères ce qui stabilise la liaison de deux dimères STAT sur des sites adjacents d'ADN, mais ce n'est pas essentiel à la fonction de STAT (Yu et Jove, 2004).

1.2.3.1 L'implication de la voie IL6/STAT3

Le double rôle de STAT3 en tant qu'activateur et transducteur de signal lui permet d'auto-amplifier un signal en étant un acteur principal dans une boucle rétroactive en réponse à divers signaux inflammatoires (Yu et al., 2009). L'IL6, une cytokine pléiotropique, affectant l'activité de plusieurs types de cellules telles que les astrocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales (Hodge et al., 2005), potentialise l'angiogenèse par la voie JAK/STAT3 (Huang et al., 2004; Jee et al., 2004). Étant produite aussi en phase aiguë, elle va dicter la transition d'une inflammation aiguë à chronique en changeant la nature des cellules qui infiltrent les tumeurs, de neutrophiles polymorphonucléaires à monocyte/TAM (Gabay, 2006). Cette transition augmente la présence de l'IL-6 qui sera sécrétée principalement par les TAM (Allavena et Mantovani, 2012) ou d'autres cellules dans leur microenvironnement. Ainsi, la transduction du signal se poursuit par l'activation de l'IL6R (gp80) et l'autophosphorylation de la gp130 (Hodge et al., 2005) qui, à son tour, peut initier plusieurs voies de signalisation, incluant la voie JAK/STAT3 (Figure 1.6). Une fois STAT3 phosphorylé, il y a homodimérisation STAT3-STAT3 qui va moduler l'expression de ce même gène IL6 et d'autres gènes pro-inflammatoires et angiogéniques (tels que VEGF et bFGF) qui peuvent à leur tour activer de nouveau STAT3 par des voies autocrines ou paracrines (Yu et al., 2009). En effet, plusieurs cellules répondent à l'IL6, incluant les EC, TAM, astrocytaires, pulmonaires, ovariennes, de l'endomètre du stroma, cardiaques, amniotiques, monocytaires, microgliales (Hodge et al., 2005). En plus, pour augmenter davantage le signal, STAT3 régule jusqu'à 2 fois sa propre expression (Yang et al., 2007; Hillion et al., 2008) ce qui maintient une réponse inflammatoire chronique et par conséquent une angiogenèse soutenue (Figure 1.7). Dépendamment du type de cellule, l'IL6 est capable d'activer aussi différentes voies de signalisations telles que celle des RAS/MAPK et celle de PI3K/AKT (Hodge et al., 2005; Yang et al., 2003).

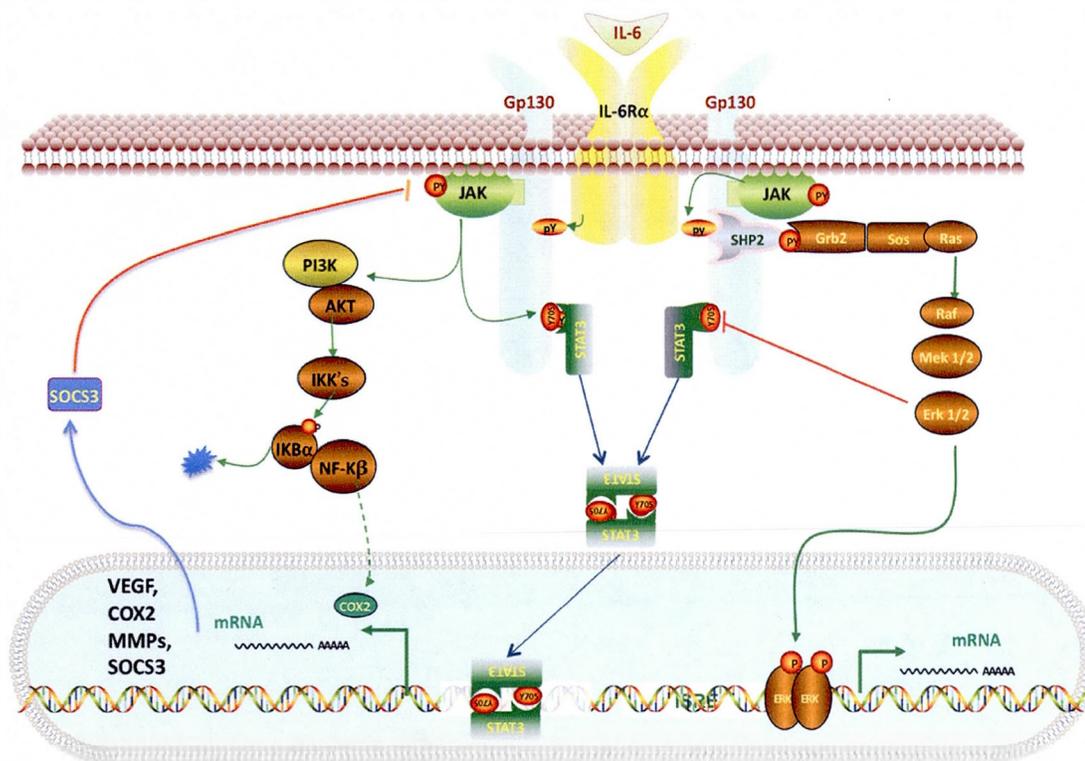


Figure 1.6 Voie de signalisation IL6-JAK-STAT3.

La voie JAK/STAT3 est l'une des plus importantes dans la signalisation reliant l'inflammation au cancer et régule plusieurs fonctions physiologiques. Cette voie est activée par plusieurs facteurs de croissance et cytokines tel que l'IL6. Par exemple, cette dernière se lie à son récepteur IL6R qui induit la l'homodimérisation de la glycoprotéine à la surface membranaire gp130. Cette dernière va provoquer l'activation des JAK qui lui sont associés qui vont à leur tour s'autophosphoryler ainsi que leurs récepteurs. Les sites phosphorylés sur gp130 et les JAK vont servir de point d'ancrage pour plusieurs protéines telles que STAT3, SHP2 ainsi que d'autres protéines adaptatrices contenant les domaines de liaison SH2. Cela initie éventuellement l'activation de trois voies principales dont celle de JAK/STAT3, Ras/MAPK et PI3K/AKT. Une fois activé STAT3 peut se dimériser et ainsi transloquer jusqu'au noyau pour activer la transcription de plusieurs gènes pro-inflammatoires et proangiogéniques tels que COX-2, IL6, la MMP, VEGF qui vont être traduits en protéines par la suite. Une des voies principales rétro-inhibitrices de la voie JAK/STAT3 est le suppresseur de la signalisation aux cytokines-3 (SOCS3).

Illustration et mécanismes inspirés de : Cell Signalling et QIAGEN.

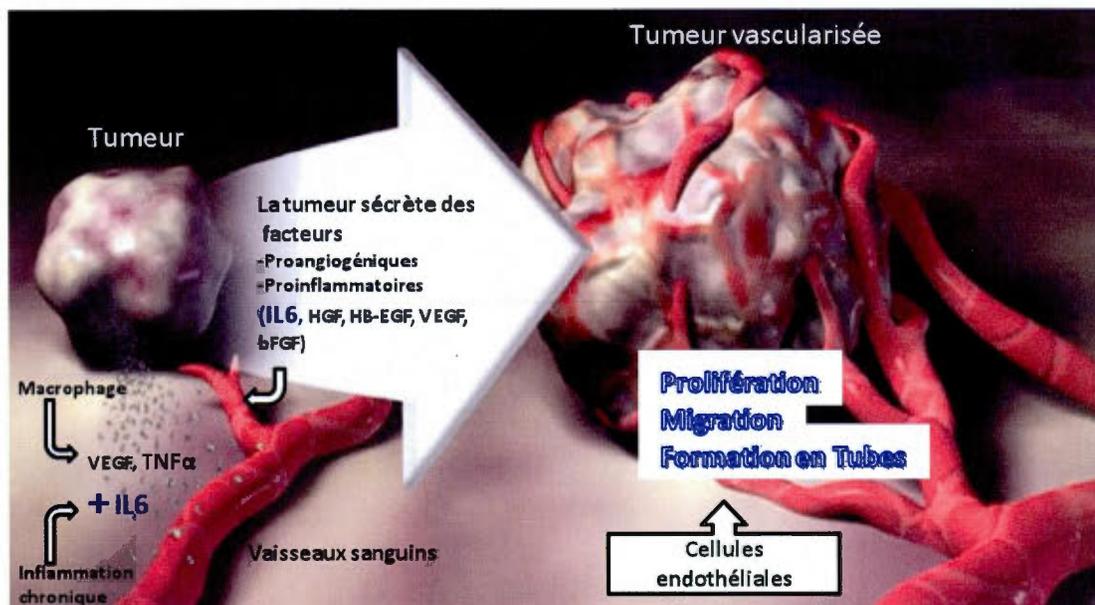


Figure 1.7 L'Interleukine-6 dans l'induction de l'angiogenèse.

Schéma montrant qu'une condition inflammatoire chronique fournit au microenvironnement tumoral des facteurs pro-inflammatoires et proangiogéniques, dont IL-6, favorisant l'angiogenèse tumorale. Celle-ci est sécrétée par plusieurs types cellulaires tels les macrophages et les cellules tumorales.

Illustration modifiée de : Vona-Davis et Rose, 2009.

1.2.3.2 Régulation et inhibition de JAK/STAT3

Une des caractéristiques de la signalisation par JAK/STAT est qu'éventuellement et suite à une activation rapide, le signal décroît, STAT s'accumule dans le noyau et ce dernier doit être inévitablement réacheminé dans le cytoplasme où il pourra de nouveau être réactivé (Schindler et al., 2007). Cette diminution du signal peut être régulée négativement par trois mécanismes principaux, la déphosphorylation, l'exportation nucléaire et par rétro-inhibition par les suppresseurs de la signalisation aux cytokines (SOCS) (Schindler et al., 2007). Plusieurs phosphatases peuvent agir soit au niveau des kinases (e.g. SHP-1, SHP-2, CD45) ou directement sur STAT3 au niveau du noyau (e.g. SHP-2, TC-PTP), ce qui est essentiel au transport extranucléaire (Mustelin et al., 2005; Schindler et al., 2007). Ce dernier étant régulé par plusieurs séquences d'exportation nucléaire (NES) ou localisation nucléaire (NLS). Finalement, les SOCS vont inhiber la phosphorylation de STAT indirectement en ce liant en amont aux JAK empêchant leur activité tyrosine kinase (Hodge et al., 2005). Certains SOCS, comme SOCS3 vont inhiber certaines voies spécifiques inflammatoires comme l'IL6/STAT3 (Jo et al., 2005; Yoshimura, 2009), mais pas celle d'IL10/STAT3 qui a une fonction anti-inflammatoire (Yasukawa et al., 2003) pour ainsi acheminer JAK vers le protéasome (Shuai et Liu, 2003). Au niveau moléculaire, cette inhibition spécifique par SOCS3 se fait principalement par l'interaction de deux domaines, le domaine SH2 qui se lie au motif pY⁷⁵⁷XXV ou pY⁷⁵⁹XXV (chez la souris ou l'humain) (Lanza, 2004; Wang et al., 2012) de la gp130 présente au complexe signalétique du récepteur à l'IL6, mais qui ne fait pas partie du complexe IL10/IL10R (Yoshimura et al., 2005; Yoshimura, 2009). Et le domaine KIR de SOCS3, qui induirait un changement de conformation de la poche catalytique en se liant à la surface catalytique du domaine kinase de JAK, empêchant ainsi le transfert de groupements phosphates aux tyrosines (Babon et al., 2012; Yoshimura et Yasukawa, 2012). Ces interactions empêchent le recrutement au récepteur gp130 des protéines telle que STAT3 et sa phosphorylation subséquente en Y⁷⁰⁵ par les JAK (Figure 1.6)(Lanza, 2004).

1.2.3.3 Implication de COX-2

Les enzymes cyclooxygénases ou prostaglandines-endopéroxydes synthases (Ptgs) (EC 1.14.99.1) (Schwab, 2001), dont les isoformes cyclooxygénases COX-1 et COX-2 sont les plus étudiées, sont aussi connues sous le nom de prostaglandines H₂ synthases (PGH₂ synthases). Ces enzymes contiennent deux sites actifs, l'un cyclooxygénase et l'autre peroxydase catalysant chacun respectivement les deux premières étapes dans la biosynthèse des prostaglandines (PGE) à partir de l'acide arachidonique (AA) (Goodsell, 2000), débutant par la bis-dioxygénation en prostaglandines PGG₂ suivie de la réduction de cette dernière en PGH₂ (Rouzer et Marnett, 2009). La PGH₂ sert de substrat pour la production des 5 principales prostaglandines bioactives catalysées par la PGE synthase dont la TXA₂, la PGI₂, la PGD₂, la PGF₂ et finalement la PGE₂ chacune ayant des fonctions physiologiques uniques (Hata et Breyer, 2004). Cependant COX-1, une protéine de 65 kDa composée de 565 acides aminés (Williams et DuBois, 1996), est exprimée constitutivement dans la plupart des tissus (Rouzer et Marnett, 2009) et est importante dans des conditions physiologiques normales (McAdam et al., 1999). Par exemple, dans le tissu gastro-intestinal, la PGI₂ dérivant de COX-1 protège les muqueuses intestinales et vasculaires (McAdam et al., 1999; Wang et Dubois, 2006). Cependant, COX-2 ou Ptgs₂, une protéine de 68 kDa constituée de 604 acides aminés (Schwab, 2001), se distingue de COX-1, car son expression est normalement absente dans la plupart des tissus et cellules. COX-2 est induite lors de conditions pathologiques (Rouzer et Marnett, 2009) en réponse à des cytokines pro-inflammatoires, des hormones et des promoteurs tumoraux (Wang et Dubois, 2006). Cela a mis évidemment en valeur la recherche thérapeutique pour des inhibiteurs sélectifs de COX-2, comparativement à la classe des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) qui ciblent les deux isoformes (Rouzer et Marnett, 2009). Avec plus de 15 000 citations dans la littérature médicale, COX-2 est documenté en tant qu'un médiateur majeur de l'inflammation, et par le fait même, est surexprimé dans plusieurs cancers leucémiques, gastro-intestinaux, génito-urinaires, mammaires, gynécologiques ainsi que de la tête et du cou (Aggarwal et Gehlot, 2009).

Les PGE₂ produites par la COX-2 ont des effets pro-inflammatoires et sont connues pour jouer un rôle important dans la progression tumorale, dont des traits distinctifs physiologiques

incluent la résistance à la mort programmée, la prolifération, l'angiogenèse, l'évasion de l'immunité tumorale par immunosuppression ainsi que l'invasion tissulaire et la métastase (Wang et Dubois, 2006). Ces traits distinctifs physiologiques du cancer sont en commun avec celles auxquelles contribuent les MSC et les MT1-MMP. Certaines observations ont permis de mettre en évidence directe les PGE₂ et la promotion tumorale, comme lors d'une régression des adénomes par l'inversion de l'effet pro-inflammatoire des PGE₂ par les NSAIDs (Hansen-Petrik et al., 2002) et l'observation que la PGE₂ accélère la croissance de l'adénome intestinal (Wang et al., 2004). Les mécanismes par lequel la PGE₂ exerce son effet cellulaire et la promotion tumorale se fait par la liaison aux récepteurs EP1 à EP4 activant les voies telles que RAS/MAPK et PI3K/AKT, qui régulent positivement le VEGF, bFGF et BCL2. La PGE₂ montre un effet régulant négativement les cytokines du Th1 tel que le TNF- α , l'INF- γ et l'IL2 et régule positivement l'IL10, IL6, des Th2 (Wang et Dubois, 2006). Certaines études ont aussi montré qu'il y avait possiblement une signalisation croisée entre la voie JAK/STAT3 et l'activation de l'EP4 par la PGE₂ (Han et al., 2006)

1.3 Contribution des MSC au cancer

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont des cellules progénitrices pluripotentes (Caplan et Dennis, 1996) non-hématopoïétiques recrutées au site de plusieurs conditions pathologiques inflammatoires, lors de la réparation tissulaire, mais aussi de plusieurs cancers (Bergfeld et DeClerck, 2010). Ces cellules souches proviennent de la moelle osseuse et sont caractérisées par leur capacité à se différencier en plusieurs types de cellules tels que les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes, les cellules musculaires, les péricytes, les fibroblastes réticulaires, les cellules neuronales (Bergfeld et DeClerck, 2010) et en EC (Oswald et al., 2004). Ainsi, de par leur capacité à se différencier, elles vont contribuer à la maintenance et la régénération des cellules du tissu connectif en réponse à un signal distal (Dwyer et al., 2007). Bien que cette propriété de pouvoir migrer et réparer le tissu soit un des rôles des cellules souches, les MSC, tout comme les EC ou leucocytes, vont migrer aux tumeurs (ou au site inflammatoire) en réponse à différents facteurs tels le VEGF, TGF- β , IL8 et la neutrotropine (NT)3 (Figure 1.8) (Bergfeld et DeClerck, 2010; Birnbaum et al., 2007). D'autres facteurs de croissance et cytokines chemo-attractants (ou chimiokines) peuvent aussi

promouvoir le recrutement des MSC spécifiquement au site de tumeurs primaires tels les EGF, HGF, bFGF et PDGF, CCL2 (MCP-1) (Dwyer et al., 2007; Stagg, 2008). En effet, on retrouve parmi les premières interactions MSC-cancer des expériences montrant que les MSC sont recrutées non-seulement préférentiellement aux sites de transplantation de mélanomes pulmonaires comparativement au tissu sain, mais aussi aux sites de métastases (B. Linju Yen, 2008; Staudy et al., 2002).. En effet, des études ont démontré que les MSC recrutées par l'inflammation gastrique chronique résultante à l'infection à *helicobacter pylori*, contribuent à l'augmentation de l'incidence de carcinome de l'estomac (Houghton et al., 2004). Ainsi, les MSC sont recrutées aux lésions tissulaires, aux tumeurs et l'inflammation chronique pourrait en être le facteur commun qui mobilise les MSC. Cette propriété de migrer et de s'incorporer aux tumeurs a suscité l'intérêt d'utiliser les MSC comme cellules vecteurs de thérapie génique anti-cancer. La plupart des données proviennent soit de cultures cellulaires ou de modèles d'animaux en utilisant des MSC modifiées génétiquement pour produire des agents tels l'IFN α dans des modèles de mélanomes chez la souris et l'IL2 dans des modèles de gliomes chez le rat (Sun et al., 2011). Les MSC peuvent aussi être modifiées pour le relargage d'une enzyme de conversion d'un promédicament. Par exemple, dans un modèle de cancer du pancréas chez la souris, la MSC modifiée administrée par voie i.v. libère la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSV-tk) au site tumoral, l'enzyme va phosphoryler le promédicament ganciclovir en sa forme toxique amenant ainsi à la mort cellulaire (Zischek et al., 2009). Ainsi, la modification des MSC peut conduire vers des nouvelles thérapies efficaces contre le cancer (Dai et al., 2011).

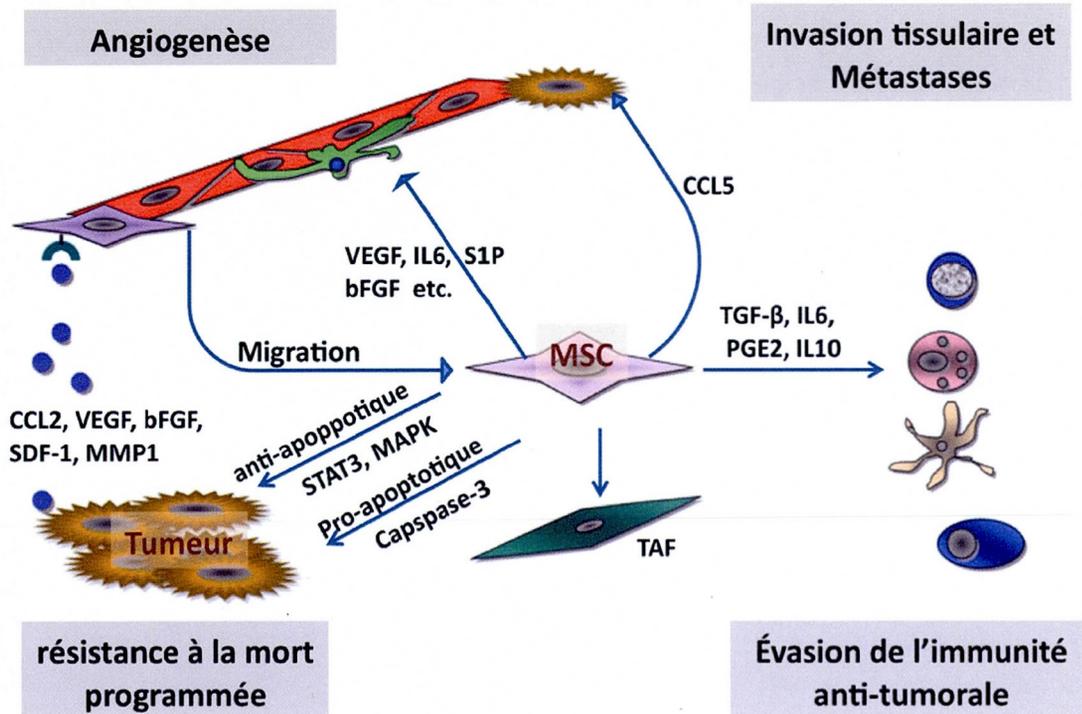


Figure 1.8 Contribution des MSC au cancer.

Les MSC migrent jusqu'au site inflammatoire tumoral en réponse à plusieurs stimuli sécrétés par le microenvironnement tumoral. Les MSC rendues au site peuvent contribuer à quatre traits physiologiques distinctifs reliés au cancer : elles peuvent affecter la survie des cellules tumorales en ayant des effets pro ou anti-apoptotiques, elles peuvent contribuer à l'angiogenèse tumorale en produisant des facteurs proangiogéniques ou y contribuer directement par leur différenciation en péricytes ou en EC, elles peuvent permettre aux cellules tumorales d'éviter l'immunité tumorale en produisant des facteurs inhibant les Th1, les cellules dendritiques, cellules B et NK et diminuer la production de cytokines cytotoxiques, finalement par la production de CCL5, permettre la mobilisation des cellules tumorales vers d'autres sites et organes et favoriser l'invasion tissulaire et la métastase.

Illustration modifiée tirée de : Berkfeld et DeClerk 2010.

Ainsi, sans aucun doute l'une des propriétés importantes est la migration des MSC qui permet l'interaction tumorale. On a déjà montré que cette migration jusqu'au lieu d'inflammation chronique, en réponse aux signaux déjà mentionnés, soit principalement médiée par l'activation de la voie des MAPK ainsi que la transduction du signal par JAK2/STAT3 (Gao et al., 2009). De plus, l'inhibition de JAK2 empêchait complètement la migration qui corrélait fortement avec la phosphorylation de STAT3 (Gao et al., 2009). Les MSC se rendant dans l'environnement tumoral deviennent une source additionnelle importante de cytokines pro-inflammatoires, et peuvent contribuer à au moins quatre des traits distinctifs dans le développement du cancer (Figure 1.8) (Galderisi et al., 2010; Bergfeld et DeClerck, 2010) :

(1) Résistance à la mort programmée; dépendamment du type d'engagement dans la différenciation cellulaire, les MSC peuvent favoriser la survie tumorale en affectant des voies pro ou anti-apoptotiques. Par exemple, les MSC engagées en adipocytes produiront de la leptine pour ainsi favoriser l'activation de STAT3 et la voie de MAPK chez les cellules tumorales et ainsi avoir un effet anti-apoptotique (Bergfeld et DeClerck, 2010). Cependant, elles montrent un effet apoptotique lorsqu'elles sont utilisées de façon thérapeutique, par exemple lorsqu'elles sont isolées du tissu adipeux et injectées par i.v. à des souris transplantées de carcinomes mammaires humains, on a remarqué une augmentation du clivage de caspase-3 et de PARP-1 (Bergfeld et DeClerck, 2010; Sun et al., 2009).

(2) Évasion de l'immunité tumorale; par immunosuppression, elles peuvent empêcher le système immunitaire de rejeter des cellules cancéreuses pour ainsi favoriser la croissance tumorale en augmentant la population de T_{reg} (B. Linju Yen, 2008), en inhibant la prolifération des lymphocytes T, la maturation des cellules dendritiques, ainsi que l'activation des cellules NK (Giuliani et al., 2011) et la prolifération et différenciation des lymphocytes B (Corcione et al., 2006) (Bergfeld et DeClerck, 2010). Dans un autre contexte que celui tumoral, cette capacité immunosuppressive peut être favorable dans le cas du rejet de transplantations, tel la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD). Des patients ayant eu un traitement avec les MSC ont vu leurs chances de survie globale augmenter de deux ans (Le Blanc et al., 2008). Cet effet immunosuppresseur est engendré par la sécrétion de plusieurs facteurs solubles comme l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO), l'induction de l'oxyde nitrique synthétase, la sécrétion

d'antigènes, TGF- β , d'IL6 et de PGE₂ (Bouffi et al., 2010). La PGE₂, par exemple, inhibe la prolifération des NK et celle des lymphocytes T et par conséquent leur cytotoxicité (Newman et al., 2009).

(3) Favoriser l'angiogénèse; les MSC vont non seulement être recrutées par certains facteurs de croissance et chimiokines, mais rendues au site inflammatoire elles vont aussi en produire, incluant le VEGF, ainsi que le bFGF pour favoriser l'angiogénèse (Wang et al., 2007; Feng and Chen, 2009). Elles peuvent aussi contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux en se différenciant en EC ou péricytes (Bergfeld et DeClerck, 2010). En réponse à d'autres molécules, comme le chemo-attractant sphingosine-1-phosphate (S1P) qui peut être produit par plusieurs types de cellules, incluant les tumeurs, permet d'induire les fonctions angiogéniques des MSC (Annabi et al., 2003).

(4) Invasion tissulaire et métastase; par la sécrétion de la CCL5 (RANTES) (Stagg, 2008) qui est médiée par STAT3 (Kovacic et al., 2010), les MSC favorisent la motilité des cellules tumorales et en conséquence la métastase (Bergfeld et DeClerck, 2010; Galderisi et al., 2010). En effet, il a été montré que les MSC dans le site tumoral potentialisaient les capacités d'invasion tissulaire et de métastase dans le cancer du sein (Karnoub et al., 2007). La relation entre les MSC et le microenvironnement tumoral est réciproque. Les MSC peuvent être attirées au site tumoral et s'y différencier, par exemple, en fibroblastes associés aux cancers (TAF), essentiels à la progression tumorale et qui fournissent plusieurs cytokines, facteurs de croissance ainsi qu'un support structural aux cellules primaires et métastases (Spaeth et al., 2009). Réciproquement, les MSC peuvent aussi attirer les cellules tumorales dans la moelle osseuse (Bergfeld et DeClerck, 2010).

1.3.1 Rôle de la MT1-MMP

Plusieurs protéases contribuent au processus de recrutement des MSC vers le site d'inflammation chronique (Bergfeld et DeClerck, 2010). Afin d'infiltrer le site d'inflammation tumorale, les cellules MSC doivent se frayer un chemin à travers le stroma riche, entre autres, en collagène de type-1 qui est la composante principale de l'ECM dans le tissu de mammifères. Cette hydrolyse est en grande partie contrôlée par la métalloprotéase matricielle membranaire de type-1 (MT1-MMP) (Figure 1.9) (Lu et al., 2010). Cela implique non seulement leurs domaines extracellulaires, mais aussi leurs domaines intracellulaires leur permettant non seulement l'invasion, mais aussi la différenciation, la morphogénèse (Lu et al., 2010). Cependant, d'autres MMP sont aussi indispensables dans le processus invasif des MSC telles que la MMP2 et MMP9 (Ries et al., 2007; Lu et al., 2010). En lien avec la fonction cellulaire des MSC, la MT1-MMP est impliquée dans de nombreuses fonctions pathologiques concomitantes avec celles observées à l'échelle cellulaire des MSC vues précédemment, telles que l'inflammation, la guérison, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase (Itoh et Seiki, 2004). Cela montre l'importance du rôle que jouerait la MT1-MMP dans la contribution aux différents traits physiologiques reliés au cancer en réponse à des conditions inflammatoires.

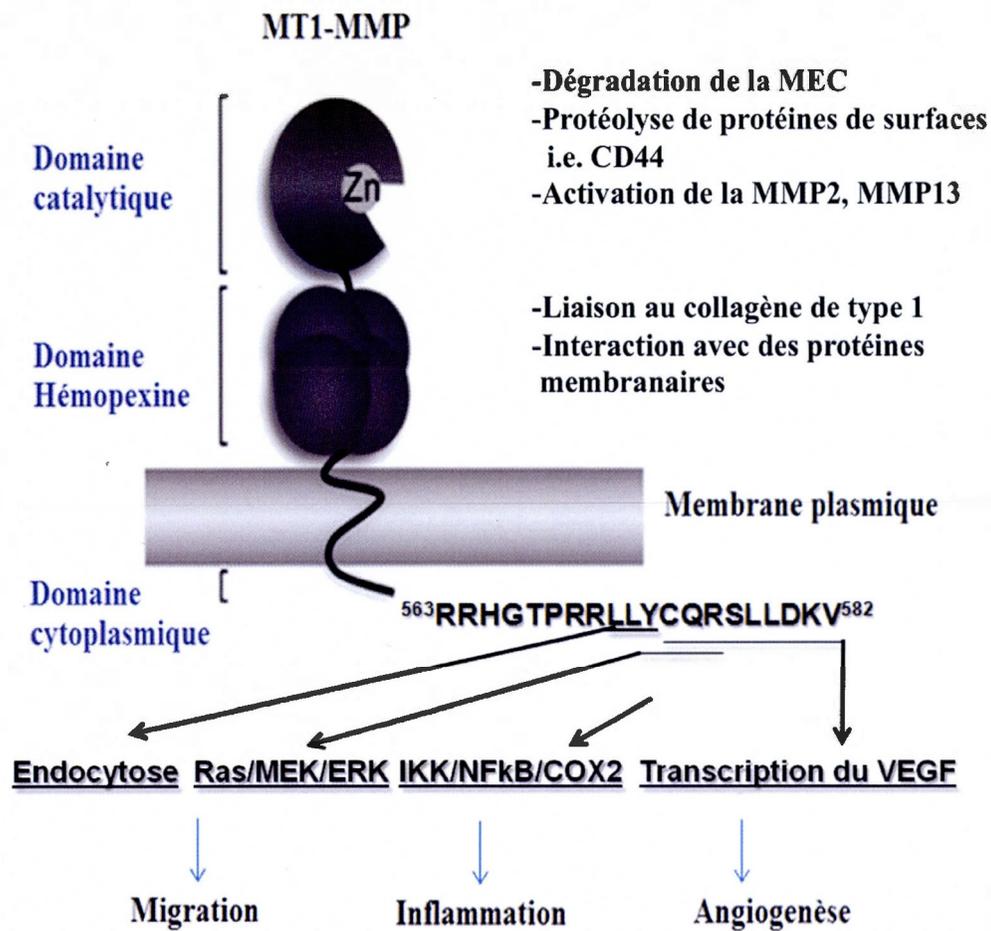


Figure 1.9 Fonctions des différents domaines de la MT1-MMP.

Représentation schématique des domaines de la MT1-MMP et leurs implications dans certaines fonctions et conditions cellulaires dont la protéolyse péricellulaire, la migration, l'angiogenèse et l'inflammation.

Illustration modifiée tirée de : Gingras et Béliveau 2010.

1.3.1.2 Structure et activité de la MT1-MMP

La MT1-MMP fait partie de la sous-classe des MT-MMP, dont 6 membres (Radichev et al., 2010) sont inclus dans la grande famille comprenant 26 MMP (Chen et al., 2012; Gingras et Béliveau, 2010). Les MMP possèdent toutes un domaine catalytique à zinc, un lien peptidique et un domaine hémapexine (HEX). Au niveau structural, la MT1-MMP et les autres MT-MMP, contiennent un domaine transmembranaire les ancrant à la membrane contrairement aux autres MMP. Le domaine C-terminal cytoplasmique est constitué de 20 acides aminés (⁵⁶³RRHGTPRRLLYCQRSLLDKV⁵⁸²) (Gingras et Béliveau, 2010). Comme les autres MMP, la MT1-MMP est produite comme une zymogène sous sa forme proMT1-MMP, à 63 kDa (Lehti et al., 1998), et requiert un clivage activateur dans le Golgi puis se présente à la surface membranaire sous sa forme active à 60 kDa où elle peut à nouveau être clivée par elle-même à 44-45 kDa (Itoh et Seiki, 2006) et générer une forme inactive (Lehti et al., 1998). La MT1-MMP peut dégrader plusieurs macromolécules de l'ECM autres que le collagène de type I, telles que le collagène de type II et III, la gélatine, la laminine 1 à 5 et la fibronectine. En plus, elle active la proMMP2 et la proMMP13 (Gingras et Béliveau, 2010; Itoh et Seiki, 2006). Cette activité protéolytique peut servir comme indicateur de la présence active de la MT1-MMP à la surface cellulaire (Itoh et Seiki, 2006). L'activation de la proMMP2 par la MT1-MMP s'effectue en plusieurs étapes; en premier lieu, deux MT1-MMP forment un homodimère par la liaison réciproque de leurs domaines HEX. Cela est suivi par la liaison de l'inhibiteur endogène TIMP2 sur le site catalytique de l'une des deux enzymes MT1-MMP formant ainsi un complexe ternaire. Par la suite, le domaine HEX de la proMMP2 a une affinité pour le domaine C-terminal exposé de la TIMP2 du complexe exposant de façon optimale la partie à cliver de la proMMP2 par la deuxième MT1-MMP résultant en l'activation de la MMP2. Cette activation nécessite la glycosylation des MT1-MMP (Itoh et Seiki, 2004). Les MT1-MMP vont aussi cliver différentes protéines de surface telles que le CD44, la transglutaminase, des récepteurs à lipoprotéines de faibles densités (LDLR) (Itoh et Seiki, 2006). La protéolyse de l'ECM va aussi libérer différentes chimiokines, cytokines, facteurs de croissance qui peuvent agir en retour par voie autocrine ou paracrine.

1.3.1.3 Signalisation régulée par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP

Hormis que sa fonction dans la protéolyse péricellulaire lors du processus invasif comme mentionné précédemment, le domaine cytoplasmique de MT1-MMP est non seulement important dans sa régulation, son internalisation ainsi que sa redistribution, mais il lui permet la transduction du signal intracellulaire. Cependant, une des limites de notre compréhension de ces mécanismes est qu'il manque plusieurs motifs de reconnaissances des protéines de signalisation comme SH2, SH3, PTB et qui demeurent à être élucidés (Gingras et Béliveau, 2010). Toutefois, la MT1-MMP s'associe avec plusieurs protéines membranaires et cytoplasmiques et parmi les protéines impliquées dans la migration on retrouve, entre autres la p130Cas ayant un rôle dans l'angiogenèse (Gingras et al., 2008) qui s'associe aussi à STAT3 (Gao et Bromberg, 2006). La MT1-MMP peut s'associer et cliver CD44 qui par la suite peut médier la phosphorylation de STAT3 (Lee et al., 2009b). Le CD44 coordonne non seulement la motilité, mais aussi la résistance à la mort programmée (Jung et al., 2011). Le contrôle de l'expression des MT1-MMP et leur relocalisation au front cellulaire migratoire par son domaine cytoplasmique se fait principalement par internalisation médiée par endocytose, qui est accomplie notamment par l'interaction de la séquence ⁵⁷¹LLY⁵⁷³ avec la sous-unité μ 2 de la protéine adaptatrice-2 (AP-2), composante clef des vésicules recouvertes de clathrine (Uekita et al., 2001; Gingras et Béliveau, 2010). Puisque la MT1-MMP interagit spécifiquement avec la cavéoline-1 phosphorylée (Labrecque et al., 2004), cette interaction serait critique à un autre mécanisme d'endocytose via les cavéoles, qui sont une invagination en forme de coupe de la membrane plasmique, impliquant les tyrosines kinases Src qui vont phosphoryler la cavéoline-1 (Sverdlov et al., 2007). La palmitoylation post-transcriptionnelle en sa seule cystéine dans son domaine cytoplasmique semble aussi être essentielle à son internalisation et à la migration cellulaire (Anilkumar et al., 2005).

Certaines recherches ont montré l'effet transducteur du signal de la MT1-MMP selon une phosphorylation de protéines cytoplasmiques en tyrosine, médiée par la lectine concanavaleine A, qui corrélait avec la surexpression de la MT1-MMP et la MMP2 (Yu et al., 1997). Bien sûr, des voies plus précises ont été mise en évidence comme celle des RAS/MAPK impliquant ERK, qui permettrait possiblement la locomotion et la transcription de plusieurs gènes (Gingras

et Béliveau, 2010; Gingras et al., 2001). Cette activation du signal ne nécessiterait pas l'activité protéolytique du site catalytique, mais plutôt la liaison du TIMP2/MT1-MMP de façon dose-dépendante (D'Alessio et al., 2008). Il est possible que cette activation s'effectue par la région $^{573}\text{YCQR}^{576}$ (D'Alessio et al., 2008; Gingras et Béliveau, 2010). D'autres études impliquant la voie RAS/MAPK, comme celle de JNK et p38, ont récemment mis en évidence que la MT1-MMP potentialise l'effet du bFGF sur l'angiogenèse cornéenne (Onguchi et al., 2009). Des études antérieures avaient déjà mis en lien l'expression de la MT1-MMP et la régulation positive du VEGF qui favorisait la croissance tumorale et l'angiogenèse (Sounni et al., 2002). En fait, il a été suggéré que la MT1-MMP régulait l'expression du VEGF en formant un complexe avec le VEGFR-1 et le Src (Eisenach et al., 2010).

Une étude a montré récemment que la seule tyrosine du domaine cytoplasmique était phosphorylée de manière dose-dépendante au Src (Nyalendo et al., 2007). L'inhibition de cette même tyrosine, par l'administration sous-cutanée d'un peptide constitué du domaine cytoplasmique muté non phosphorylable de la MT1-MMP, empêchait le développement et la progression de tumeurs *in vivo* (Nyalendo et al., 2010). Ce peptide rendrait inaccessible la phosphorylation en Y^{573} en se dimérisant à la partie cytoplasmique de la MT1-MMP. D'autres voies de signalisation ont été récemment mises en lumière comme ayant une importance immunomodulatrice pro-inflammatoire et dans la résistance à la mort cellulaire programmée. Les MT1-MMP présentes spécifiquement à la surface membranaire (Proulx-Bonneau et al., 2011) induisent l'expression de COX-2 médiée par IKK/NF- κ B en réponse à la ConA (Annabi et al., 2009; Sina et al., 2010) de façon indépendante du site catalytique. Ici, ce qui est intéressant, est que COX-2 peut induire l'activation de STAT3 par une régulation positive de l'IL6 (Dalwadi et al., 2005). Aussi, certaines recherches ont indiqué que STAT3 s'associait avec le promoteur de COX-2 (Lo et al., 2010), malgré qu'il soit bien connu que NF- κ B soit aussi un facteur de transcription médiant l'expression de COX-2 (Nakao et al., 2002).

1.4 Nutraceutiques anti-cancer

Mis à part les régulateurs internes de la voie JAK/STAT3 mentionnés plus tôt, on doit considérer les inhibiteurs de sources naturelles qui ont longtemps été un réservoir important de molécules utilisées dans le traitement de plusieurs pathologies (Newman et Cragg, 2007). C'était avec une grande logique médicale et intuition qu'Hippocrate avait déjà, il y a près de 2500 ans, soupçonné l'importance évidente de l'alimentation pour la santé et anticipé son utilisation spécifique dans l'art de la prévention et du traitement :

« Que ton aliment soit ton médicament et que ton aliment soit ton remède. La nature guérit seulement si elle en est donnée l'opportunité »

-Hippocrate selon (Georgiou et al., 2011)

Il a fallu attendre jusqu'à l'année 1805 avant d'isoler le premier composé pur d'une plante, la morphine de *papaver somniferum* par Friederich Serturmer (Fan et al., 2006). Les molécules provenant de sources naturelles, ce qui inclut les molécules dérivant de notre alimentation, se sont révélées prometteuses dans le criblage d'agents efficaces dans le traitement et dans la prévention du cancer. En effet, dans le domaine de l'oncologie et depuis les années 1940, 48,6 % de nouveaux médicaments sont d'origine naturelle de façon directe ou en dérivent (Newman et Cragg, 2012). Selon la même source, sur les 51 médicaments anti-inflammatoires approuvés à l'utilisation thérapeutique depuis 1981, 13 dérivent de produits naturels. Ainsi, plusieurs agents nutraceutiques (qui sont des substances faisant partie ou qui dérivent d'aliments) procurant un intérêt médicinal et bénéfique pour la santé, ont été approuvés ou sont présentement en phase de recherches cliniques (Gupta et al., 2010).

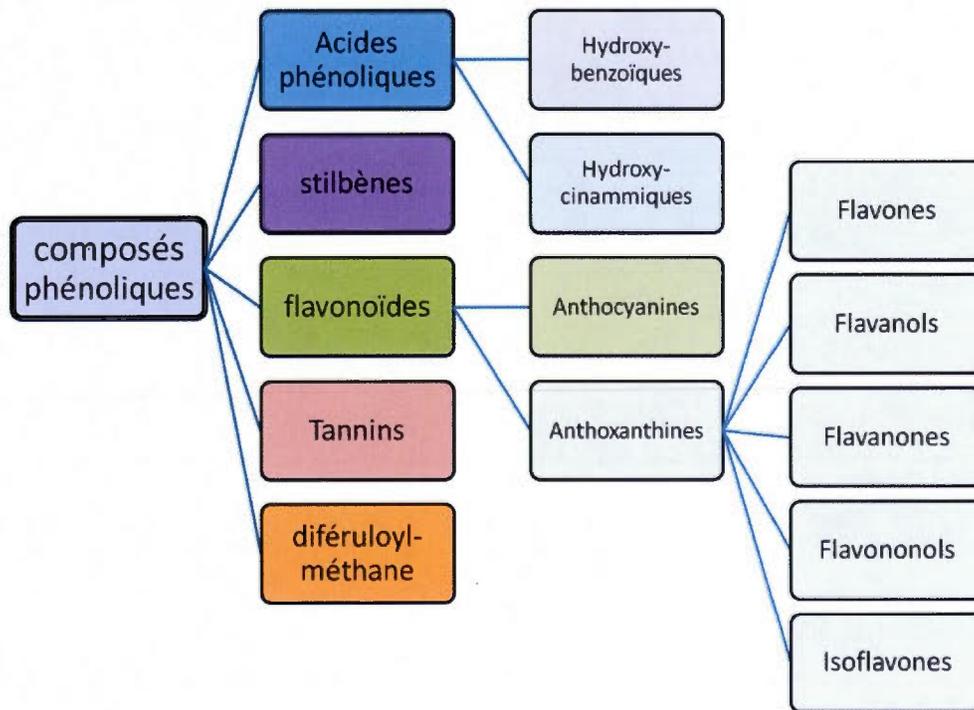
1.4.1 Propriété anti-angiogénique des polyphénols

Les polyphénols d'origine alimentaire possèdent plusieurs propriétés leur permettant d'avoir une bioactivité cellulaire importante; ils peuvent avoir un rôle de piègeurs de radicaux libres, d'inhibiteurs d'enzymes oxydatives, d'inducteurs d'enzymes ayant des fonctions anti-oxydantes et un effet modulateur sur la transduction du signal (Han et al., 2007). Ainsi, ils sont

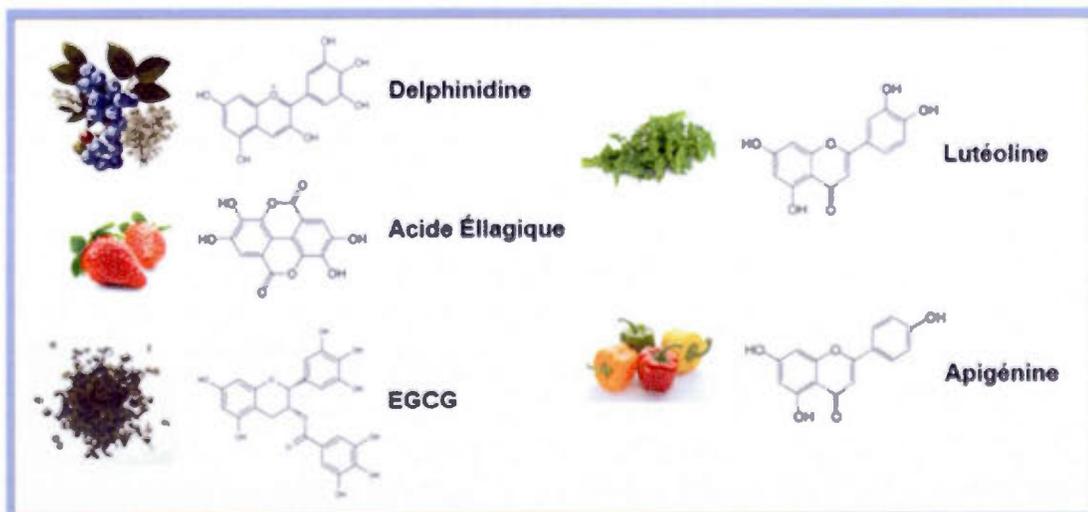
capables d'interférer à différents niveaux de l'initiation à la progression du cancer en inhibant des voies reliées à des conditions inflammatoires chroniques qui sont propices aux altérations physiologiques telles la résistance à la mort programmée, la prolifération, l'invasion tissulaire et la métastase, ainsi que l'angiogenèse (Gupta et al., 2010; Han et al., 2007) ce qui implique, comme il a été démontré, l'importance de la voie IL6/STAT3.

Ces polyphénols représentent un groupe de métabolites secondaires et se retrouvent dans une variété de fruits, légumes, vins, thé, huile d'olive extra vierge, de chocolat ou autres produits de cacao (Han et al., 2007). Avec plus de 8 000 composés différents, ils peuvent être classifiés en différents groupes basés sur le nombre de cycles phénoliques et le nombre de groupements hydroxyles, ainsi que les éléments structuraux qui relient ces cycles (Han et al., 2007). On retrouve parmi ces groupes la classe des diféruloylmethanes, des stilbènes, celle des acides phénoliques; contenant les sous-classes dérivant des acides hydroxybenzoïques (e.g. acide éllagique, acide gallique) et des acides hydroxycinnamiques (e.g. l'acide cafféique, acide ferrulique et coumarique), celle des tanins ainsi que la classe la plus abondante des polyphénols, avec 4000 composés (Ramos, 2008), les flavonoïdes; qui incluent les sous-classes des anthocyanidines, flavonols, flavones, isoflavones, flavanones et flavanols (Han et al., 2007) (Figure 1.10 A). Par cette diversité, les polyphénols alimentaires ont donc des propriétés qui leur permettent d'avoir des activités biologiques diversifiées.

A



B



C

Flavones

R5=R7=OH

Apigénines

R3'=H; R4'=OH

Lutéoline

R3'=R4'=OH

Flavanols

R3=R5=R7=OH

EGCG

R3=gallate;

R3'=R4'=R5'=OH

Anthocyanidines

R3=R5=R7=R4'=OH

Delphinidine

R3'=R5'=OH

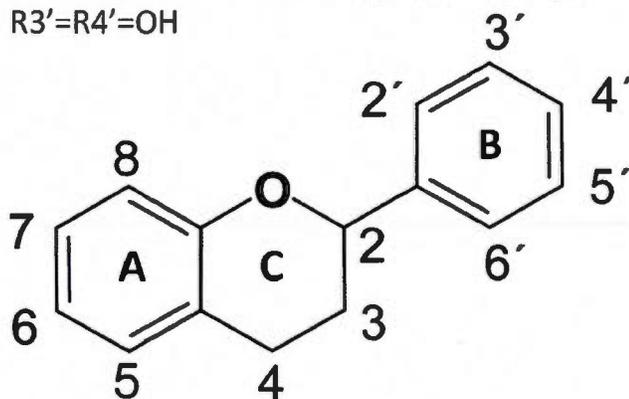
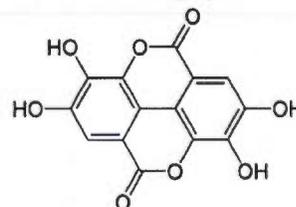
**Acide phénolique****Acide Éllagique**

Figure 1.10 Classification, structures et sources des cinq polyphénols alimentaires.

Classification des polyphénols (A) et structure des 5 polyphénols étudiés (B et C). Faisant partie de la classe des flavonoïdes et de la sous-classe des anthoxanthines, les deux flavones, lutéoline et apigénine sont retrouvées dans certains fruits et légumes tels que les céleris, les olives, les piments, le persil ainsi que dans les épices et herbes comme l'origan, le thym et le romarin. Un autre anthoxanthine, l'EGCG, qui est un flavanol présent dans plusieurs fruits tels les pommes, les abricots, raisins, pêches, poires et plusieurs baies. Il se retrouve aussi dans les fèves, les thés, les chocolats, le vin rouge ou blanc. L'anthocyanine delphinidine peut être consommé à partir de plusieurs baies, fraises, canneberges, jus de pomme grenade, prunes, rhubarbes, mais est aussi retrouvée dans le vin. Finalement l'acide éllagique, un acide phénolique hydroxybenzoïque dans les aliments tels que les fraises, framboises, jus de pomme grenade, jus de raisin rouge ou blanc et les graines de longanes (Ramos 2008) (Han et al, 2007).

Depuis que le rôle clef de l'angiogenèse a été établi dans la croissance tumorale, l'invasion et la métastase par Folkman, ce dernier a aussi introduit le concept thérapeutique « anti-angiogénèse » (Folkman, 1971; Cao et Langer, 2008). Le but des thérapies anti-angiogéniques, selon Folkman, est de réduire la toxicité, le risque de résistance et l'augmentation de l'efficacité des traitements anti-cancer (Folkman, 1999). Et depuis, de nombreux composés anti-angiogéniques ont été développés ayant des cibles différentes dont le premier qui fût d'origine naturelle cartilagineuse, est le Neovastat, et qui peut cibler des MMP ainsi que la voie du VEGF (Béliveau et al., 2002). D'autres ont aussi été développés dont Sunitinib, Sorafenib et Pazopanib et ciblant le VEGFR, PDGFR et le RET, qui est le récepteur du facteur neurotrophique de la lignée gliale (réarrangé au cours de la transfection) (Gordon et al., 2010). Il y a même une nouvelle approche et classe d'agents anti-angiogéniques puissants qui font surface, tels les agents disrupteurs vasculaires (VDA) ciblant directement la vasculature tumorale déjà établie (Siemann, 2011). Les propriétés anti-angiogéniques des différentes classes de polyphénols sont de plus en plus reconnues, mais les mécanismes par lesquels cette modulation s'effectue sont encore peu connus (Ramos, 2008). C'est le cas de plusieurs flavonoïdes utilisés dans le cadre de la présente recherche tels que l'apigénine (Api), la lutéoline (Lut) faisant partie de la sous-classe des flavones, l'EGCG de la sous-classe des flavanols, de la delphinidine (Dp) qui est une anthocyanidine, mais aussi d'acides phénoliques appartenant aux acides hydroxybenzoïque tel que l'acide éllagique (EA) (Figure 1.10B).

En effet, des recherches ont déjà montré que l'Api pouvait inhiber l'angiogenèse tumorale *in vivo* en diminuant l'expression de HIF-1 α et le VEGF, cependant il n'y est pas mentionné si elle se fait via STAT3 (Fang et al., 2007). L'approche *in vivo* s'est effectuée sur un modèle de cellules tumorales (prostate et ovaire) humaines dans les souris nues et par le test de la membrane allantochorion de poulet (CAM). Dans cette même étude, les résultats ont montré une inhibition similaire *in vitro* sur les cellules en culture cancéreuses de la prostate humaine, PC-3 et DU145, en conditions hypoxiques et normoxiques. D'autres études sur la Lut ont montré un effet inhibiteur, par un mécanisme PI3K/AKT dépendant, sur l'induction de la prolifération et de la survie des EC humaines de la veine ombilicale (HUVEC) activée par le VEGF (Bagli et al., 2004). L'EGCG, un composant majeur du thé vert, s'est déjà avéré avoir des propriétés anti-angiogéniques en régulant négativement HIF-1 α , VEGF, VEGFR1 et

VEGFR2 (Ramos, 2008). L'EGCG a déjà démontré aussi un effet inhibiteur sur la croissance des cellules HT29 humaines du carcinome du colon en régulant négativement le VEGF par la voie impliquant ERK 1/2 (Bagli et al., 2004). D'autres recherches, voulant contourner le problème de la résistance des vaisseaux matures de tumeurs aux inhibiteurs du VEGF ou ses récepteurs, ont pris pour cibles non seulement les EC, mais aussi les cellules périendothéliales (Bergers et al., 2003). Un exemple est l'activité de l'EA qui aurait démontré une propriété anti-angiogénique importante, car il inhibe le PDGFR des cellules musculaires lisses (CML) ainsi que l'activation du VEGFR2 induite par le VEGF chez les EC (Labrecque et al., 2005). La Dp a déjà présenté un effet antiprolifératif sur des EC (Martin et al., 2003) ainsi qu'une activité anti-angiogénique *in vitro* et *in vivo* par une inhibition de la phosphorylation du VEGFR2 et la régulation négative de l'activation des ERK 1/2 chez les EC (Lamy et al., 2006). Elle s'est montrée capable aussi de bloquer la signalisation au PDGFR et la différenciation morphogénique d'une coculture des EC/SMC en structures capillaires (Lamy et al., 2008b).

Toutefois, les études sur le métabolisme et les paramètres pharmacocinétiques des polyphénols étudiés sont encore insuffisantes (Gradolatto et al., 2005). Une difficulté additionnelle est la comparaison des données puisque les expériences sont souvent effectuées à des différentes doses, sur différentes espèces, différentes formules d'administration, voies d'administration ou d'autres conditions expérimentales distinctes. Il est important de mentionner que la plupart des polyphénols dans l'alimentation sont présents sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères et doivent être hydrolysés dans l'intestin pour être absorbés (Manach et al., 2004). La concentration des formes libres dans le plasma est habituellement très faible après ingestion (Manach et al., 2004), excepté pour les cathéchines du thé, tel l'EGCG, qui peuvent s'y retrouver à 77% sous formes inchangées ($n = 8$ sujets humains) (Lee et al., 2002). Dans une étude chez le rat ($n = 5$) où des extraits de Lut et d'Api ont été administrés par voie orale, on a montré qu'Api ($T_{max} = 3.9$ h; $C_{max} = \sim 17$ $\mu\text{g/mL}$) était absorbée plus efficacement que Lut ($T_{max} = 1.1$ h; $C_{max} = \sim 4$ $\mu\text{g/mL}$) (Chen et al., 2006). Selon cette même étude, les ASC (aires sous la courbe) montrent que la biodisponibilité d'Api relativement à celle de Lut est près de 10 fois supérieure, suggérant qu'Api est 10 fois mieux absorbée dans la circulation sanguine que Lut.

Une fois absorbés, les polyphénols conjugués dans la muqueuse intestinale, et plus tard dans le foie s'effectuent principalement de trois façons : par sulfonation, par méthylation et par glucuronidation. Cette dernière forme étant le polyphénol conjugué principal retrouvé en circulation (Manach et al., 2004)(Scalbert et Williamson, 2000). Des études *in vivo* ont montré qu'Api est métabolisée principalement en Lut en phase I et d'autres dérivés (conjugués gluronides, sulfonates et méthylates-Lut) en phase II (Gradolatto et al., 2005; Shimoi et al., 1998). Puis qu'après 10 jours, 24.8 % d'Api serait encore distribué dans le reste du corps ce qui suggère qu'Api s'accumule dans le tissu et s'élimine lentement (Chen et al., 2006; Gradolatto et al., 2005). En effet, le temps d'élimination plasmatique d'Api ($T_{1/2} = 3.4$) de l'organisme semble être supérieur à Lut ($T_{1/2} = 2.7$ h) (Chen et al., 2006). Il a déjà été reporté des $T_{1/2}$ beaucoup plus élevés pour Api ($T_{1/2} = 91.8$ h ; Gradolatto et al., 2005) comparativement à des valeurs qui varient peu pour la Lut ($T_{1/2} = 3.7$ h; Chen et al., 2010). L'élimination d'Api et Lut s'effectuant majoritairement par la voie urinaire (Gradolatto et al., 2005; Chen et al., 2006). Hormis la forme administrée (e.g. extraits, forme aglycones), le $T_{1/2}$ pour Lut semble être du même ordre de grandeur que pour les autres polyphénols étudiés : l'EA ($T_{1/2} = 5$ h; Lei et al., 2003); l'EGCG ($T_{1/2} = 3.7$ h; Lee et al., 2002) et la Dp ($T_{1/2} = 1.7$ h; Frank et al., 2003).

Bien que les polyphénols sont métabolisés par la microflore et les enzymes intestinales ainsi que dans les tissus, les métabolites et leurs effets biologiques ont été très peu étudiés (Larrosa et al., 2009; Manach et al., 2004; Kim et al., 1998). Comme mentionnées précédemment, les formes glycosylées sont rarement absorbées et retrouvées dans le plasma, à l'exception des anthocyanidines, qui sont principalement retrouvées sous formes glycosylées (Manach et al., 2004), telle la Delphinidine-3-glucoside. Cette dernière a démontré une activité anti-thrombotique et d'inhibition de l'activation et l'agrégation plaquettaire *in vitro* et *in vivo* (Yang et al., 2012). Plusieurs métabolites des polyphénols intestinaux qui sont retrouvés en grandes concentrations dans le plasma, tels que l'acide hydrocaféique, l'acide hydroxyferulique et l'acide 3,4-dihydroxyphylacétique sont possiblement à l'origine de certaines activités biologiques i.e. activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* (Larrosa et al., 2009). Les activités biologiques, telles qu'anti-inflammatoire et anti-tumorale des polyphénols est associée aussi, en partie, à leur potentiel antioxydant et au nombre de groupes fonctionnels contenant des hydroxyles substitués au noyau B (Figure 1.10C) (Shimoi et al., 1998; Han et al., 2007).

Des études ont suggéré que cette propriété antioxydante diminue avec la méthylation de groupements OH (Cao et al., 1997) et la glucoronidation (Shimoi et al., 1998). Certains métabolites d'Api glucoronidés paraissent avoir une activité anti-inflammatoire (Luo et al., 2008), et il a été même montré dans une étude chez le rat que les conjugués Lut-glucoronidés sont déconjugués par la β -glucuronidase libérée aux sites d'inflammations (Shimoi et al., 2001) ou sites tumoraux (Manach et al., 2004). Outre que des interactions avec des enzymes, telles que la méthyltransférase et la sulfotransférase, il a été reporté qu'il y aurait aussi des interactions entre des conjugués et des transporteurs; de médicaments, de P-glycoprotéines, d'anions organiques canaliculaires multispécifiques. Les polyphénols conjugués peuvent aussi inhiber le cytochrome P450, ce qui augmenterait possiblement la biodisponibilité de certains médicaments (Evans, 2000; Manach et al., 2004). La liste des cibles moléculaires potentielles des polyphénols dans la littérature est gigantesque et il serait difficile dans le cadre de ce travail de les énumérer tous (Gupta et al., 2010; Han et al., 2007; Aggarwal et Shishodia, 2006; Santangelo et al., 2007), contrairement aux cibles moléculaires de leurs métabolites qui sont peu ou pas documentées.

1.4.2 STAT3 comme cible anti-angiogénique

Le VEGF et ses récepteurs représentent une des meilleures voies de signalisation validées comme cible thérapeutique anti-angiogénique (Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2010). C'est pourquoi plusieurs recherches sur les polyphénols alimentaires et leurs propriétés anti-angiogéniques (ou les thérapies approuvées) concernent la voie du VEGF (Ferrara, 2010). Des centaines de milliers de patients ont bénéficié des traitements anti-angiogéniques par l'inhibition du VEGF, cependant l'efficacité limitée et l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs du VEGF demeurent problématiques (Carmeliet et Jain, 2011). Un des problèmes réside dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques qui est souvent associée à plusieurs cytokines, dont la principale, l'IL6 (Hodge et al., 2005). Une autre partie du problème réside au niveau de la résistance aux inhibiteurs angiogéniques qui peut être représentée selon deux types. La résistance par évaison adaptative qui peut se présenter de quatre façons différentes : (1) lorsqu'il y a activation/régulation positive de voies de signalisations pro-angiogéniques alternatives qui vont circonvenir le traitement et provoquer une néovascularisation et une

récidive tumorale. (2) Recrutement de cellules proangiogéniques dérivées de la moelle osseuse qui peuvent rendre la voie VEGF non nécessaire au soutien du processus angiogénique. (3) L'augmentation du nombre de cellules périendothéliales telles que les péricytes qui vont couvrir la vasculature tumorale et préserver leur intégrité, ce qui limite la nécessité de survie médiée par le VEGF. (4) L'activation de l'invasion tissulaire et la métastase permettant l'accès à un nouveau site qui ne nécessiterait pas à court terme la néovascularisation. Le deuxième type de résistance serait une non-réponse intrinsèque tumorale (Bergers et Hanahan, 2008). La résultante des principaux problèmes encourus est que les thérapies actuelles anti-angiogéniques prolongent la survie globale (overall survival; OS) des patients dans certains cas, tandis qu'elles peuvent avoir un effet minime dans d'autres (Carmeliet et Jain, 2011; Loges et al., 2010).

Ainsi, par son rôle crucial dans l'inflammation liée au cancer, STAT3 s'est révélé un médiateur critique dans l'angiogenèse tumorale et serait ainsi une cible potentielle pour le traitement et la prévention du cancer en bloquant ou en contournant ces mécanismes de résistance. Certains chercheurs admettent que les inhibiteurs de STAT3 représentent la prochaine génération de ciblage thérapeutique, car ils sont très spécifiques, ont un spectre d'activité très large et sont soupçonnés être peu toxiques et plus efficaces que plusieurs thérapies actuelles. Plusieurs approches ont été surlignées pour le ciblage thérapeutique de STAT3, dont la diminution de l'expression de ce dernier, la diminution de la phosphorylation de STAT3 et des récepteurs associés, la réduction du recrutement de STAT3 aux complexes récepteurs et sa dimérisation, ainsi que la diminution de sa liaison aux promoteurs (Jing et Tweardy, 2005). Il y a plusieurs bloqueurs de la phosphorylation de STAT3 incluant des peptides, oligonucléotides ainsi que des petites molécules. Un des inhibiteurs de la voie JAK/STAT3 qui est le plus connu est l'AG490, qui inhibe spécifiquement l'activation de JAK2 (Aggarwal et al., 2006a). Cependant, sa faible puissance d'action ($IC_{50} > 50 \mu M$) et sa faible stabilité empêchent son utilisation adéquate *in vivo* (Heimberger et Priebe, 2008). Plusieurs polyphénols dérivant de plantes sont aussi connus pour inhiber STAT3, ce qui inclut le curcuma, le resvératrol, le cucurbitacin, l'indirubin, le piceatannol, le parthenolide, le flavopiridol, le magnolol (Aggarwal et al., 2006a), ainsi que les polyphénols de la présente recherche (fig. 1.10B).

Cependant, il n'est pas toujours clair dans la littérature du type d'inhibition, directe ou indirecte ou alternatif de STAT3 par les polyphénols (Shodeinde and Barton, 2012; Aggarwal et al., 2006a). La majorité des polyphénols sont catégorisés comme inhibiteurs indirects de STAT3 lorsqu'ils vont perturber la signalisation en amont. Par exemple en interférant avec l'activité des tyrosines kinases, tels les JAK, Src, ABL qui sont responsables de l'activation de STAT3. Un bon exemple est le curcuma qui va inhiber; JAK2 (Natarajan and Bright, 2002), le Src (Reddy and Aggarwal, 1994), Erb2 (Hong et al., 1999) et l'EGFR (Korutla and Kumar, 1994), qui sont tous impliqués dans l'activation de STAT3 (Aggarwal et al., 2006a). Il y a aussi des polyphénols qui sont des inhibiteurs alternatifs de STAT3 en interagissant avec les régulateurs physiologiques négatifs de STAT3, tel que SOCS3 (Lamy et al., 2012), protéines inhibitrices des STAT3 activés (PIAS) et des phosphatases. Un exemple est le resvératrol et ces analogues qui inhibent l'activation de STAT3 par un mécanisme favorisant sa déphosphorylation par des PTP (Capiralla et al., 2012). Contrairement aux autres types d'inhibition, les inhibitions directes de l'activation de STAT3 par les polyphénols a été beaucoup moins reporté.

L'inhibition de STAT3 permettrait donc non seulement de réguler la transcription de plusieurs facteurs proangiogéniques en aval autres que le VEGF, mais aussi celle de la transduction du signal en amont de plusieurs de ces facteurs. Parmi les anthoxanthines étudiées, certaines recherches ont montré en effet que les flavones Lut et Api et l'EGCG pouvaient inhiber l'activation de STAT3. Cependant, peu de ces polyphénols ont montré une inhibition de l'angiogenèse modulée par une action sur la voie IL6/STAT3.

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique et hypothèses

Des études épidémiologiques suggèrent que l'inflammation chronique prédispose les individus à plusieurs types de cancers. Près de 20% des décès par cancers y sont associés. Un élément central reliant cette condition au cancer est STAT3, qui est impliqué dans plusieurs voies, dont celle des cytokines médiée par JAK/STAT3, qui est très importante. Dans la présente recherche, nous tentons de déterminer l'effet de 5 polyphénols d'origine alimentaire connus pour leurs activités anti-angiogéniques sur l'angiogenèse modulée par la cytokine IL6. L'hypothèse est que les anthoxanthines Lut, Api et l'EGCG ayant déjà montré des effets inhibiteurs de STAT3 seront les polyphénols anti-angiogéniques les plus efficaces. Dans un deuxième temps, nous tenterons d'évaluer si l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire par la ConA et l'expression de COX-2 chez les cellules souches mésenchymateuses implique l'activation de STAT3. L'hypothèse qui en découle serait que sachant que la MT1-MMP induit l'expression de COX-2 en réponse à la ConA et que STAT3 activé est un facteur de transcription de COX-2, il existerait possiblement une voie MT1-MMP/STAT3/COX-2 chez les MSC de souris.

2.2 Objectifs de recherche

L'angiogenèse est essentielle pour le développement de plusieurs types de cancers et le rôle crucial qu'occupe l'inflammation dans ce processus a été clairement établi. La formation de nouveaux vaisseaux implique plusieurs fonctions physiologiques telles que la survie, la prolifération, la migration et la tubulogénèse. Cela nécessite STAT3, qui relie l'inflammation au cancer et qui peut être stimulée par IL6, une cytokine pro-inflammatoire pléiotropique clef dans l'angiogenèse. Bien que plusieurs recherches aient démontré l'activité anti-inflammatoire et anti-angiogénique de nombreux polyphénols d'origine alimentaire, très peu ont montré une activité inhibitrice de l'angiogenèse modulée par l'inflammation par leur effet sur la voie

IL6/JAK/STAT3. Nos objectifs sont donc en premier lieu de mettre en lumière l'effet de cinq polyphénols; la lutéoline, l'apigénine, l'EGCG, la delphinidine et l'acide éllagique au niveau cellulaire sur certaines étapes du processus angiogénique et au niveau moléculaire en observant :

1. L'expression et l'activation des différentes composantes de la signalisation IL6/JAK/STAT3
2. La prolifération et la migration des cellules HUVEC's
3. La formation de structures de type capillaire sur un gel de Matrigel

Outre leur recrutement à plusieurs sites inflammatoires de plusieurs cancers, les MSC sont impliquées dans plusieurs des traits distinctifs reliés aux cancers. En produisant des cytokines, chimiokines ou autres facteurs, tel que l'IL6 et COX-2, les MSC contribuent à l'inflammation pro-tumorale sous-jacente aux fonctions physiologiques, incluant la résistance à la mort programmée, l'évasion anti-tumorale, l'angiogenèse, l'invasion tissulaire et la métastase. La MT1-MMP, par ses domaines extracellulaires et intracellulaires, contrôle plusieurs de ces fonctions. Son domaine cytoplasmique a été associé à différentes voies impliquées dans l'angiogenèse et la migration. Une étude récente a mis en évidence une signalisation MT1-MMP/IKK/NF-kB/COX-2 contribuant à un phénotype inflammatoire en réponse à la lectine ConA (Sina et al., 2010). Cependant, en connaissant le rôle de premier plan de la voie JAK/STAT3 dans l'inflammation, le but du deuxième volet de notre recherche a été de vérifier :

1. L'activation de la voie JAK/STAT3 en réponse à la lectine ConA
2. L'implication de la MT1-MMP dans l'activation de pSTAT3
3. La modulation de l'expression de COX-2 par l'activation de la MT1-MMP
4. La contribution de STAT3 dans l'expression de COX-2 suite à l'activation de la MT1-MMP

CHAPITRE III

ARTICLES

3.1 DIET-DERIVED POLYPHENOLS INHIBIT ANGIOGENESIS BY MODULATING THE INTERLEUKIN-6/STAT3 PATHWAY

Sylvie Lamy, Naoufal Akla, Amira Ouanouki, Simon Lord-Dufour and Richard Béliveau

Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Contributions des auteurs :

S. Lamy : Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures et rédaction du manuscrit.

N. Akla : Expérimentation et montages des figure 3 et 4B, analyse des résultats et participation à la rédaction du manuscrit

A. Ouanouki : Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures

S. Lord-Dufourd : Expérimentation et analyse des résultats

R. Béliveau : Financement, conception du projet

Lamy, S., N. Akla, A. Ouanouki, S. Lord-Dufour, and R. Béliveau. 2012. Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway. *Experimental Cell Research* 318 (13):1586-1596.

DIET-DERIVED POLYPHENOLS INHIBIT ANGIOGENESIS BY MODULATING THE
INTERLEUKIN-6/STAT3 PATHWAY

Sylvie Lamy, Naoufal Akla, Amira Ouanouki, Simon Lord-Dufour and Richard Béliveau

Authors' Affiliation: Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Running title: Inhibition of IL-6-induced angiogenesis by polyphenols

Keywords: Angiogenesis; IL-6; STAT-3; Polyphenol; endothelial cell; ERK

Financial support to RB: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada
[RGPIN3187-2011]. R.B. holds an Institutional Research Chair in Cancer Prevention and
Treatment from Université du Québec à Montréal (UQÀM)

Corresponding Author: Richard Béliveau, Laboratoire de Médecine Moléculaire,
Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Phone: +1 (514) 987-3000x8551; FAX: +1 (514) 987-
0246; E-mail: oncomol@nobel.si.uqam.ca

Abstract: 244 words

Text (include figure legends): 5270 words

References: 55

Figures: 6

Abbreviations: Api, apigenin; Dp, delphinidin; EA, ellagic acid; EC, endothelial cell;
EGCG, epigallocatechin-3 gallate; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FBS, fetal
bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HUVEC, human
umbilical vein endothelial cell; IL-6, interleukin-6; Lut, luteolin; MAPK, mitogen-activated
protein kinase; MMP, matrix metalloproteinase; SOCS, suppressor of cytokine signalling;
STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3.

ABSTRACT

Several epidemiological studies have indicated that abundant consumption of foods from plant origin is associated with a reduced risk of developing several types of cancers. This chemopreventive effect is related to the high content of these foods in phytochemicals, such as polyphenols, that interfere with several processes involved in cancer progression including tumor cell growth, survival and angiogenesis. In addition to the low intake of plant-based foods, increased body mass and physical inactivity have recently emerged as other important lifestyle factors influencing cancer risk, leading to the generation of low-grade chronic inflammatory conditions which are a key process involved in tumor progression. The objectives of the current study are to investigate the inhibitory effects of these polyphenols on angiogenesis triggered by an inflammatory cytokine (IL-6) and to determine the mechanisms underlying this action. We found that, among the tested polyphenols, apigenin and luteolin were the most potent angiogenesis inhibitors through their inhibitory effect on the inflammatory cytokine IL-6/STAT3 pathway. These effects resulted in modulation of the activation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 signalling triggered by IL-6, as well as in a marked reduction in the proliferation, migration and morphogenic differentiation of endothelial cells. Interestingly, these polyphenols also modulated the expression of IL-6 signal transducing receptor (IL-6R α) and the secretion of the extracellular matrix degrading enzyme MMP-2 as well as the expression of suppressor of cytokine signalling (SOCS3) protein. Overall, these results may provide important new information on the role of diet in cancer prevention.

INTRODUCTION

Various lifestyle factors, such as tobacco use, consumption of alcohol, exposure to environmental pollution and radiation, a high-calorie diet, obesity, physical inactivity, microbial and viral infections, can cause chronic inflammation and lead to increased risk of cancer [1]. The link between inflammation and cancer has recently been proposed to be the seventh hallmark of cancer [2], supported by epidemiological and experimental data [3] and by anti-inflammatory therapies that show efficacy in cancer prevention and treatment [4]. Recent efforts have shed new light on the molecular and cellular events linking inflammation and cancer [5]. Chronic inflammation has been linked to a series of steps involved in tumorigenesis, including cellular transformation, promotion, survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis [6].

The formation of a tumor-associated vasculature, a process called tumor angiogenesis, is a critical key step by which tumor cells stimulate the formation of a new blood vessel network that sustains the development of cancer by providing oxygen and nutrients to tumor cells [7]. This neovascularization occurs through a series of steps, including stimulation of endothelial cells (ECs) by autocrine and/or paracrine growth factors, proteolytic degradation of the basement membrane and surrounding extracellular matrix, EC migration and proliferation, and structural reorganization into a three-dimensionally tubular structure [8]. Angiogenesis is one of the molecular events bridging the gap between chronic inflammation and cancer growth and expansion [9]. This concept was reinforced by evidence that inhibition of inflammation by the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs prevented angiogenesis [10]. Recent studies have reported that the inflammatory cells infiltrating the tumor, which seem to be part of a normal

response to tissue remodeling, besides being a defense mechanism, can also excite and recruit ECs to stimulate angiogenesis, tumor progression and metastasis, and maintain tumor-promoting inflammation [11].

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine that controls many biological processes such as inflammation, differentiation of immune cells, and hepatic regeneration in response to diverse stimuli [12]. IL-6 also plays a crucial role in angiogenesis since it has been demonstrated that *in vivo* expression of IL-6 accompanies vascularization during wound healing, psoriasis and tumor growth [13]. Its biological activity is mediated through its binding to the membrane-bound glycoprotein IL-6 receptor chain (gp80), which is present on several target cells, including ECs. This leads to dimerization of the ubiquitously expressed gp130 and to the activation of several intracellular signal transduction events, including Janus-activated kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) signalling cascade [14]. Several studies have demonstrated the role of STAT3 as a mediator and biomarker in endothelial activation that regulates many aspects of angiogenesis [15]. For instance, constitutively activated STAT3 has been reported to up-regulate the expression of one of the most important mediators of neovascularization, vascular endothelial growth factor (VEGF), and thereby induces tumor angiogenesis [16]. The identification of molecules that interfere with IL-6 signalling at the EC level may thus be of considerable importance for the development of novel chemopreventive and chemotherapeutic approaches.

Epidemiological studies suggested that abundant consumption of foods from plant origin could decrease the incidence of many cancers [17], a chemopreventive effect that is related to the high content in these foods of several phytochemicals with potent anticancer properties [18]. Among them, polyphenols found in fruits, vegetables, tea, cocoa and wine have received considerable attention in recent years [19]. Following ingestion, these molecules are bioavailable to a variety of tissues [20, 21], and may thus exert their biological effects [18]. The beneficial health effects of these compounds have been attributed, in part, to their antioxidant properties, but there is now convincing evidence that these molecules also inhibit key processes associated with inflammation, tumor growth and angiogenesis [22]. Here, we attempted to determine whether angiogenesis induced by IL-6 is affected by polyphenols in human ECs, and to characterize the mechanisms involved. Five polyphenols were evaluated: delphinidin (an anthocyanidin from berries), epigallocatechin gallate (a catechin from green tea), ellagic acid (a phenolic acid from raspberries), apigenin and luteolin (flavones from parsley and celery). The rationale underlying the selection of these polyphenols was dictated by their known antiangiogenic activities [22]. Here, we report for the first time that some of these polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the IL-6 signalling pathways in ECs.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON) and serum was purchased from HyClone Laboratories (Logan, UT). Matrigel basement membrane matrix was obtained from Becton Dickinson Labware (Bedford, MA). Apigenin, delphinidin, ellagic acid and luteolin were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Human recombinant IL-6 was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The MEK kinase inhibitor PD98059 and the JAK family tyrosine kinase inhibitor AG490 were from Calbiochem (La Jolla, ON). The anti-phospho-gp130 (Ser 782)-R and anti-ERK-1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) (K-23) polyclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Antibodies for JAK1 (6G4), JAK2 (D2E12), STAT3 (79D7), SOCS3 (L210) and anti-phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), anti-phospho-JAK1 (Tyr 1002/1023), anti-phospho-JAK2 (Tyr 1007/1008) and anti-phospho-STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) polyclonal antibodies were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). Monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody was from Advanced Immunochemical (Long Beach, CA). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase-linked secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). All other reagents were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human dermal microvascular endothelial cells (HMVECs-d-Ad) were purchased from Clonetics (San Diego, CA). Cells were maintained in EC basal medium-2 (EBM-2; Lonza, Walkersville, MD) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) for HUVECs and 5% FBS for HMVECs and with EGM-2 growth factor mixture (Lonza). Cells used in this study were restricted to use between passage 3 and 6. They were cultured at 37°C under a humidified 95%–5% (v/v) mixture of air and CO₂. Cells were treated with vehicle or with polyphenols and stimulated with IL-6.

Migration assays

Transwells (8- μ m pore size; Costar) were precoated with 0.15% gelatin in phosphate buffered saline (PBS) by adding 600/100 μ L in the lower/upper chambers followed by overnight incubation at 4°C. The Transwells were then washed with PBS and assembled into 24-well plates. The upper chamber of each Transwell was filled with 50 μ L of cells (10^6 cells/mL) and HUVECs were allowed to adhere for 30 min. The monolayers were then treated for 2 h by adding 50 μ L of 2-fold concentrated polyphenol solution prepared in serum-free medium into the upper chamber and 600 μ L of the compound solution (1 \times) into the lower chamber. After 2 h, cell migration was initiated by adding 50 ng/mL IL-6 to the lower chamber. The plate was placed at 37°C in 5%CO₂/95% air for another 18 h. Cells that had migrated to the lower surface of the filters were fixed and stained, and migrations were then quantified as described previously [23].

Cell proliferation assay

Cell proliferation was determined by [³H]-thymidine incorporation assay. HUVECs were plated in 96-well plates at 10,000 cells/well in 200 μ L complete medium and incubated at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 h. Cells were rendered quiescent by incubation for 18 h in EBM-2 containing 2% FBS. Then cells were incubated with serum-free medium containing (or lacking) IL-6 (50 ng/mL) or polyphenols for 48 h. During the last 4 h of the incubation, [³H]-thymidine (PerkinElmer, Boston, MA) was added at 0.5 μ Ci/well at 37°C in 5% CO₂/95% air. Afterwards, cells were washed two times with PBS (37°C), fixed in EtOH/acetic acid (3:1) for 5-10 min and air dried. Incorporated [³H]-thymidine was extracted in Microscint™-O cocktail and measured in a TopCount microplate scintillation counter.

Cytotoxicity assays measuring LDH release

To assess the effect of polyphenols on cell viability, the presence of lactate dehydrogenase (LDH) (released by damage to the plasma membrane) was analyzed in the culture medium of HUVECs. Triplicate samples from the cell medium were taken after culture of the cells maintained in various concentrations of polyphenols in the presence or absence of IL-6 (50 ng/mL) for 48 h. LDH activity was measured at 30°C by a continuous optical test based on the extinction change of pyridine nucleotide at 340 nm as described by the manufacturer's instructions (Promega).

Western blot analysis

After treatment with polyphenols or synthetic inhibitors (PD98059 or AG490) for 18 h in 1% FBS, HUVECs or HMVECs were starved 30 min in EBM-2 before their stimulation with

IL-6 (100 ng/mL, 10 min). Following this, cells were washed once with ice-cold PBS containing 1 mM each of NaF and Na₃VO₄ and were incubated in the same medium for 30 min at 4°C. The cells were solubilized on ice in lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 1 mM EDTA, 1 mM ethyleneglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.5% (vol/vol) Nonidet P-40 and 1% (vol/vol) Triton X-100] and the resulting lysates (25 µg protein) were solubilized in Laemmli sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, and 0.00125% bromophenol blue], boiled for 4 min, and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes which were then blocked overnight at 4°C with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline/Tween 20 (TBS-T; 147 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 0.1% Tween 20). Membranes were further washed in TBS-T and incubated with the primary antibody in TBS-T containing 3% bovine serum albumin (BSA), followed by a 1 h incubation with HRP-conjugated anti-mouse antibodies in TBS-T containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized with an ECL detection system.

Gelatin zymography

To assess the level of the extracellular matrix degrading enzyme MMP-2 (proMMP-2) activity, quiescent HUVECs were serum-starved for 18 h in the presence or absence of IL-6 (100 ng/mL) or polyphenols (20 µM). The conditioned media were then collected and clarified by centrifugation. An aliquot (30 µL) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 1 mg/mL gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H₂O. The gels were further incubated at 37°C for 20 h in 200 mM NaCl/5 mM CaCl₂/ 0.02% Brij-35/ 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6), then stained with 0.1%

Coomassie Brilliant Blue R-250, followed by destaining in 10% acetic acid/30% methanol. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

Total RNA isolation and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

HUVECs were plated onto 55-cm² Petri dishes and exposed to EBM-2 medium with or without IL-6 (100 ng/mL) or polyphenols (20 µM). After 18-h treatment, total RNA was extracted from HUVECs using TRIzol reagent from Invitrogen (Burlington, ON) using standard procedures. RT-PCR reactions were performed using SuperScript™ One-Step RT-PCR from Invitrogen. The upstream and downstream primers used were as follows: for IL-6R: 5'-GCT CCT CTG CAT TGC CAT TG-3' and 5'-GCA TCT GGT CGG TTG TGG CT-3' (expected product 216 bp); for gp130: 5'-CTG TAT CAC AGA CTG GCA ACA AG-3' and 5'-GCA TTT GCT CTC TGC TAA GTT CC-3' (expected product 79 bp); and for GAPDH: 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' and 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3' (expected product 540 bp). RT-PCR conditions were optimized so that the gene products were obtained during the exponential phase of the amplification. Gene product amplification was performed for 35 cycles of PCR for GAPDH or 40 cycles of PCR for IL-6R or gp130 (94°C for 15 s, 55°C for 30 s, 70°C for 45 s) and amplification products were fractionated on 2% (w/v) agarose gels and visualized by ethidium bromide.

Endothelial cell tube formation assays

HUVECs were embedded within fibrin gels at a concentration of 10⁵ cells/ml using the fibrin gel *in vitro* angiogenesis assay kit (Millipore, Temecula, CA). In brief, 30 µL of fibrinogen solution was dispensed into each well of a 96-well plate and 20 µL of thrombin solution was added to the fibrinogen. This was allowed to solidify for 60 min at 37°C. Once

solid, the wells were incubated for 30 min with 100 μ L of cells (10,000 cells/well) in EBM-2 special medium (serum-free basal medium containing bovine serum albumin (BSA, 0.5%) and EGM-2 (0.5%)). After adhesion of the cells, HUVECs were then pretreated with IL-6 (250 ng/mL) in the presence or absence of polyphenols (20 μ M) for 18 h at 37°C. The same procedure was used to generate a second fibrin gel overlying the apical surface of the cells. This fibrin gel was allowed to polymerize for 10 min at 37°C following which 100 μ L of fresh EBM-2 special medium, supplemented with IL-6 and containing (or lacking) polyphenols, were added to each well. After 24 h, the cultures were photographed (100 X) using a Retiga 1300 camera and a Zeiss Axiovert S100 microscope.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using 1-way ANOVA with a post hoc Dunnett's test. Differences with $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Polyphenols inhibit IL-6-induced EC migration

Migration of ECs represents a critical step in angiogenesis, allowing cells to disseminate from pre-existing vessels and to form new vessels. To better understand the inhibitory action of polyphenols on the induction of *in vitro* angiogenesis, we first examined their effect on the chemotactic motility of HUVECs in the presence of the most common inflammatory cytokine, IL-6. Cells were allowed to adhere to gelatin-coated Transwells, were incubated with various concentrations of polyphenols and, after 2 h, IL-6 was added to the lower chamber as a chemoattractant. We studied the effect of polyphenols on cell migration only after IL-6 stimulation since, under control conditions, HUVEC apoptosis is induced by deprivation of growth factors [24, 25] whereas IL-6 has cytoprotective effects on HUVECs [26]. As shown in Fig. 1A, IL-6 stimulated cell migration; maximum activation was reached with ~50 ng/mL IL-6. The increase in cell migration was completely inhibited by four polyphenols: EGCG, Dp, Api and Lut (Fig. 1B). Each potent inhibitory polyphenol caused a dose-dependent inhibition of cell migration in the presence of IL-6 with a half-maximal inhibition (IC_{50}) of 16.8 μ M for EGCG (Fig. 1C), 14.4 μ M for Dp (Fig. 1D), 8.2 μ M for Api (Fig. 1E) and 3.6 μ M for Lut (Fig. 1F).

Polyphenols inhibit IL-6-induced EC proliferation

The proliferation of vascular ECs is another important event during angiogenesis [7]. In order to investigate whether polyphenols were able to inhibit EC proliferation in the presence of IL-6, [3 H]-thymidine incorporation was measured into HUVECs. As shown in Fig. 2A, 50

ng/mL IL-6 is sufficient to stimulate the synthesis of DNA in HUVECs. Our results revealed that all the polyphenols potently inhibited [³H]-thymidine incorporation in the presence of IL-6 (Fig. 2B) with the notable exception of EA, which was much less potent. In the presence of Lut, EGCG, Api and Dp, the EC IL-6 dependent proliferation was significantly reduced, in a concentration-dependent manner with IC₅₀ values of 9.9 μM (Fig. 2C), 7.5 μM (Fig. 2D), 7.2 μM (Fig. 2E), and 3.0 M (Fig. 2F), respectively. To clarify whether the observed reduction in proliferation of HUVECs resulted from increased cell death at higher concentrations, we studied the effects of polyphenols on cell viability. The release of LDH in the culture media of HUVECs was analyzed in the presence of 50 ng/mL IL-6. Fig. 2G shows that HUVECs were significantly more sensitive to the cytotoxic effects of EGCG (10 μM, 81% cell survival; 20 μM, 55% cell survival), EA (10 μM, 86% cell survival; 20 μM, 65% cell survival) and Dp (20 μM, 74% cell survival) compared to the control cells after 48 h of treatment. Therefore, these results could partially explain the inhibitory effects of EGCG, EA and Dp on cell proliferation at 20-25 μM. Nevertheless, Api and Lut did not induce significant cell death, confirming the specific antiangiogenic effects of these compounds on cell proliferation. Overall, the IL-6 induced growth of HUVECs was strongly inhibited by polyphenols.

Polyphenols inhibit IL-6-induced JAK/STAT3 and MAPK signalling pathways

To further investigate the cellular mechanisms involved in the inhibition of migration and growth by polyphenols, we next explored the potential involvement of two major signalling pathways: the JAK/STAT3 pathway and the MAPK pathway, both being involved in IL-6 mediated functions in several cell types [12]. Quiescent HUVECs were incubated for 18 h in EBM-2 medium containing 1% FBS in the presence or absence of polyphenols (20 μM). The medium was then replaced with fresh, serum-free medium without polyphenols for 30 min and

the cells were stimulated with IL-6 for 10 min. Protein expression and phosphorylation of the downstream signalling pathways targeted by polyphenol treatment were assessed by immunoblotting using specific antibodies. As shown in Fig. 3A, IL-6 caused a marked increase in the tyrosine phosphorylation state of STAT3 in untreated HUVECs, maximal activation being reached at 100 ng/mL. Moreover, this stimulation was rapid, being observed after as little as 5 min (Fig. 3B). Under these experimental conditions, Fig. 3C shows that polyphenols affected the relative levels of phosphorylation of JAK/STAT3 and MAP kinase, as determined by the ratio of unphosphorylated and phosphorylated proteins. We observed that Api and Lut were the most potent inhibitors; the phosphorylation of JAK1, as well as of JAK2 and STAT3, was significantly decreased. The phosphorylation of STAT3 was also inhibited by AG490, a specific JAK2 inhibitor, confirming that these effects are mediated through JAK/STAT pathway (Fig. 3D). Interestingly, these polyphenols activated the phosphorylation of ERK in the presence of IL-6 (2.1 X-fold for Api and 1.4 X-fold for Lut), whereas Dp, EGCG and EA diminished this event by ~51%, ~32% and ~44%, respectively. Pretreatment of ECs with an inhibitor of MEK (the direct upstream regulator for ERK-MAPK, PD98059), showed similar result to that obtained with Api and Lut on the phosphorylation of STAT3 (Fig. 3D), indicating that ERK pathway was also involved. In order to strengthen these results, we next used another EC model, HMVECs. As shown in Fig. 3E, Api and Lut are also capable of inhibiting completely STAT3 phosphorylation and stimulated ERK phosphorylation (1.7 X-fold for Api and 1.5 X-fold for Lut). Overall, these results suggest that the effects of these polyphenols toward the proliferation and the migration of ECs are indeed regulated through IL-6/STAT3/ERK signalling pathways.

Apigenin and luteolin affect STAT3 gene targets

STAT3, a member of the JAK-STAT signalling pathway, is a signal transducer and activator of transcription. Upon activation, STAT3 is phosphorylated at tyrosine residues by activated JAK kinases in receptor complexes, leading to its dimerization, nuclear translocation, and activation of the transcription of genes with STAT3 recognition sites in their promoters [27]. Since STAT3 modulates the transcription of a variety of genes involved in the regulation of angiogenesis, tumor invasion and metastasis such as MMPs [27, 28], we used gelatin zymography of the conditioned media of serum-starved HUVECs to assess whether the most potent inhibitors, Api and Lut, could affect pro-MMP-2 secretion. Fig. 4A shows that these two polyphenols effectively downregulated IL-6-induced proMMP-2 levels by ~60% and ~93%, respectively. We next investigated the effects of these polyphenols on another STAT-3 transcriptional target, the SOCS3 protein, a key negative regulator of IL-6 signalling pathways [29]. SOCS3 proteins are present in cells at very low levels but are rapidly transcribed after exposure of cells to cytokines. They act in a negative feedback loop to inhibit JAK activation. Since JAK/STAT3 signalling pathways are also inhibited by Api and Lut, we explored the hypothesis that SOCS3 mediates the inhibitory effects of these polyphenols on EC signalling. As shown in Fig. 4B, minimal SOCS3 induction by IL-6 (1.3 X-fold) was observed compared to untreated cells. However, Lut potently induced SOCS3 expression (3.9 X-fold) though this increase was not be observed following Api treatment.

Apigenin and luteolin reduce IL-6 receptor gene expression

To further investigate the mechanisms involved in the inhibitory actions of Api and Lut on the IL-6 signalling pathway, we next examined whether these polyphenols affected IL-6

receptor gene expression. RT-PCR analysis revealed that the IL-6-mediated increase of IL-6R α mRNA was reduced by Api and Lut (Fig. 5). Moreover, these polyphenols also attenuated the basal levels of the receptor. However, gene expression of the gp130 receptor was not affected.

Apigenin and luteolin inhibit IL-6-induced tube formation in 3D fibrin gels

In order to verify that Api and Lut could inhibit angiogenesis *in vitro*, we further investigated the antiangiogenic effects of these polyphenols on vessel formation in a 3D EC model, as previously described [23]. When IL-6 was added to HUVECs embedded in 3D fibrin gels, IL-6 led to the formation of elongated tube-like structures with lumina and invasive sprouts, compared to the control cells (Fig. 6, top panel). Using this model, we observed that Api and Lut potently inhibited IL-6-induced capillary-like structure formation by HUVECs (Fig. 6, bottom panel), confirming the specific antiangiogenic effects of these polyphenols on IL-6-induced angiogenesis.

DISCUSSION

A close association between inflammation and angiogenesis has recently been established and these processes are now recognized to play interdependent roles in orchestrating tumor development and growth [9, 10]. Although great advances have been made in understanding the functions of VEGF in promoting tumor angiogenesis, the issue as to whether growth factors and cytokines play a significant role in the VEGF regulation of angiogenic processes remains incompletely understood. Accumulating evidence suggests that IL-1 β , IL-6, transforming growth factor- β , and platelet-derived growth factor (PDGF)-B can participate in VEGF-mediated angiogenesis via diverse signalling pathways in human cancers [30, 31]. The role of IL-6 in angiogenesis is supported by a recent report showing that a peptide specifically binding to the IL-6R can inhibit vessel formation and tumor growth in severe combined immunodeficient mice [32]. In addition, multiple lines of evidence indicate that IL-6 is an important prognostic factor in angiogenic pathological disorders and cancer [33].

Several reports, published during recent years, have highlighted the beneficial effects of phenolic compounds from various dietary sources for the prevention of chronic disorders such as cancer [18, 34]. Polyphenols have a wide range of biological activities and can influence many signalling pathways vital to cellular functions, including anti-inflammatory, antiangiogenic and antitumor mechanisms [6, 19, 22]. Here, our study highlights the antiangiogenic effects of polyphenols against angiogenesis induced by the pro-inflammatory cytokine IL-6. Among the polyphenols tested, Api and Lut seem to be the most potent inhibitors of IL-6 actions. We showed that Api and Lut reduced IL-6R α gene expression and that this effect was associated with an impairment of the downstream signalling events

triggered by this receptor, such as phosphorylation of the JAK/STAT3 and MAPK signalling pathways. Importantly, the inhibition of these IL-6-dependent events by both flavones was correlated with a marked reduction in the migratory and proliferation properties of HUVECs, two crucial events involved in the recruitment of these cells to neovessels. Indeed, the inhibitory effects of these flavones resulted in inhibition of the morphogenic differentiation of HUVECs into capillary-like structures in response to IL-6, confirming the specific antiangiogenic effects of Api and Lut on IL-6-induced angiogenesis. The fact that Dp and EGCG also affected two angiogenic steps, migration and proliferation, could be partly explained by their effect on IL-6/MAPK pathway and their potential antiangiogenic activities against VEGF and PDGF receptor phosphorylation, leading to suppression of angiogenesis [23, 35, 36].

IL-6 transcription factor STAT3 is known as an oncogene that is constitutively phosphorylated in many types of human cancer cell lines or primary tumors [16], implicating aberrant STAT3 signalling as an important process in malignant progression. STAT3 regulates cell proliferation and migration, and mediates vascular function [15]. Several natural agents known to be chemopreventive are quite effective in suppressing STAT3 activation [27]. Curcumin has been shown to inhibit the activity of proteins implicated in STAT3 phosphorylation such as JAK2 [37] and IL-6 [38]. Resveratrol was found to inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in human multiple myeloma cells [39] and ECs [40]. Lut has been shown to promote the degradation of STAT-3 in human hepatoma cells [41]. Moreover, Api and Lut inhibited hypoxia-induced STAT3 tyrosine phosphorylation in lung cancer squamous cell carcinoma [42]. Our data revealed that these flavones also antagonized the activation of STAT3 by IL-6 in ECs. However, Dp and EGCG had no effect on IL-6-induced

phosphorylation of STAT3, unlike the results of other studies which found that Dp and EGCG downregulated the activation of STAT3 induced by the HGF [43] and EGFR signalling pathways [44], respectively.

The phosphorylation of STAT3 modulates the transcription of a variety of genes involved in the regulation of critical cell functions, including differentiation, proliferation, apoptosis, inflammation, invasion, angiogenesis and metastasis [27]. These include MMPs, which play key roles in the processes of matrix remodeling, migration and EC sprouting during angiogenesis [45]. IL-6 can induce the expression and secretion of MMPs such as MMP-2 and MMP-9 in normal and tumor cells [46]. Consistent with these results, we detected an upregulation of pro-MMP-2 in ECs promoted by IL-6. Api and Lut inhibited this secretion, probably via inhibition of the phosphorylation state of STAT3 thus preventing its interaction with the MMP-2 promoter [28]. SOCS3, another target gene regulated by STAT3, is a key negative regulator of IL-6 signal transduction, particularly of the JAK/STAT signalling pathway [29]. Mechanisms by which SOCS3 regulates IL-6 signalling have been proposed; SOCS3 binds to the cytokine receptor through its SH2 domain and, to a lesser extent, to JAK kinases. This association allows it to interact with and inhibit the receptor-bound JAKs [29]. Reduced expression of SOCS3 has been observed in several human cancers and is associated with constitutive STAT3 activation, which contributes to tumor angiogenesis [15, 16]. Our results showed an overexpression of SOCS3 induced by Lut, compared to cells treated with Api. These results are consistent with a previous report indicating that EGCG inhibited SOCS1-regulated cell signalling [47]. It is noteworthy that Api and Lut differ at a hydroxyl group in the 3'-position of the B ring [48], which might account for their different actions shown here.

Further exploration of the mechanisms of action of Api and Lut indicated a downregulation of pJAKs and pSTAT3 levels as well as an upregulation of pERK levels, suggesting possible cross talk between signalling pathways. Interestingly, Api was also found to sustain the activation of ERK induced by epidermal growth factor stimulation in PC12 cells [49]. Several lines of evidence support a role for ERKs in both positive and negative effects on JAK/STAT signalling in several systems [50-52], where an inhibition of STAT3 activation by agents correlated with the phosphorylation of ERK. However, the molecular basis for the interaction of ERK and the JAK/STAT pathways still remains largely unknown. Some studies report that the mechanisms underlying inhibition of STAT3 activities include not only tyrosine but also serine phosphorylation of STAT3 [53, 54]. It is possible that the overexpression of ERK activation affected the homodimer formation of STAT3 and its DNA binding [54] through serine phosphorylation at the C-terminal site (S⁷²⁷) of STAT3, which is a good consensus for MAPK [55]. Further studies would be necessary to identify and characterize the serine/threonine kinases activated by IL-6 that are responsible for the serine phosphorylation of STAT3 in ECs.

In conclusion, our study showed that Api and Lut, upon stimulation by the pro-inflammatory cytokine IL-6, efficiently inhibited migration, proliferation and tubulogenesis of HUVECs, an inhibitory effect that was mediated through the JAK/STAT3 and MAPK signalling pathways. The results reported here provide new information regarding the inhibitory effects of polyphenols against angiogenesis and highlight the potency of dietary-derived polyphenols as practical chemopreventive agents.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

R.B. holds an Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment from Université du Québec à Montréal (UQÀM). This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to RB [RGPIN3187-2011]. We thank Julie Poirier and Nathalie Bousquet-Gagnon for their technical support.

REFERENCES

- [1] S. Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal, Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?, *Free Radic Biol Med* 49 (2010) 1603-1616.
- [2] F. Colotta, P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, A. Mantovani, Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability, *Carcinogenesis* 30 (2009) 1073-1081.
- [3] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, F. Balkwill, Cancer-related inflammation, *Nature* 454 (2008) 436-444.
- [4] E.R. Rayburn, S.J. Ezell, R. Zhang, Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy, *Mol Cell Pharmacol* 1 (2009) 29-43.
- [5] C. Porta, P. Larghi, M. Rimoldi, M.G. Totaro, P. Allavena, A. Mantovani, A. Sica, Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer, *Immunobiology* 214 (2009) 761-777.
- [6] S.C. Gupta, J.H. Kim, S. Prasad, B.B. Aggarwal, Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals, *Cancer Metastasis Rev* 29 (2010) 405-434.
- [7] J. Folkman, Angiogenesis, *Annu Rev Med* 57 (2006) 1-18.
- [8] S. Liekens, E. De Clercq, J. Neyts, Angiogenesis: regulators and clinical applications, *Biochem Pharmacol* 61 (2001) 253-270.
- [9] H. Kobayashi, P.C. Lin, Angiogenesis links chronic inflammation with cancer, *Methods Mol Biol* 511 (2009) 185-191.
- [10] A. Albini, F. Tosetti, R. Benelli, D.M. Noonan, Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention, *Cancer Res* 65 (2005) 10637-10641.
- [11] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646-674.
- [12] P.C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, F. Schaper, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem J* 374 (2003) 1-20.

- [13] S.H. Jee, C.Y. Chu, H.C. Chiu, Y.L. Huang, W.L. Tsai, Y.H. Liao, M.L. Kuo, Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways, *J Invest Dermatol* 123 (2004) 1169-1175.
- [14] P.C. Heinrich, I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, L. Graeve, Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem J* 334 (Pt 2) (1998) 297-314.
- [15] Z. Chen, Z.C. Han, STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis, *Med Res Rev* 28 (2008) 185-200.
- [16] G. Niu, K.L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L.M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, H. Yu, Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis, *Oncogene* 21 (2002) 2000-2008.
- [17] M. Wiseman, The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective, *Proc Nutr Soc* 67 (2008) 253-256.
- [18] Y.J. Surh, Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 768-780.
- [19] N.J. Kang, S.H. Shin, H.J. Lee, K.W. Lee, Polyphenols as small molecular inhibitors of signalling cascades in carcinogenesis, *Pharmacol Ther* 130 (2011) 310-324.
- [20] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Remesy, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am J Clin Nutr* 81 (2005) 230S-242S.
- [21] J.A. Ross, C.M. Kasum, Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety, *Annu Rev Nutr* 22 (2002) 19-34.
- [22] S. Ramos, Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways, *Mol Nutr Food Res* 52 (2008) 507-526.
- [23] S. Lamy, M. Blanchette, J. Michaud-Levesque, R. Lafleur, Y. Durocher, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras, R. Béliveau, Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation, *Carcinogenesis* 27 (2006) 989-996.

- [24] S. Araki, Y. Shimada, K. Kaji, H. Hayashi, Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation, *Biochem Biophys Res Commun* 168 (1990) 1194-1200.
- [25] H. Zoellner, M. Hofler, R. Beckmann, P. Hufnagl, E. Vanyek, E. Bielek, J. Wojta, A. Fabry, S. Lockie, B.R. Binder, Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells, *J Cell Sci* 109 (Pt 10) (1996) 2571-2580.
- [26] A.B. Waxman, K. Mahboubi, R.G. Knickelbein, L.L. Mantell, N. Manzo, J.S. Pober, J.A. Elias, Interleukin-11 and interleukin-6 protect cultured human endothelial cells from H₂O₂-induced cell death, *Am J Respir Cell Mol Biol* 29 (2003) 513-522.
- [27] B.B. Aggarwal, A.B. Kunnumakkara, K.B. Harikumar, S.R. Gupta, S.T. Tharakan, C. Koca, S. Dey, B. Sung, Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?, *Ann N Y Acad Sci* 1171 (2009) 59-76.
- [28] T.X. Xie, D. Wei, M. Liu, A.C. Gao, F. Ali-Osman, R. Sawaya, S. Huang, Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis, *Oncogene* 23 (2004) 3550-3560.
- [29] J. Schmitz, M. Weissenbach, S. Haan, P.C. Heinrich, F. Schaper, SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130, *J Biol Chem* 275 (2000) 12848-12856.
- [30] L.S. Angelo, R. Kurzrock, Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators, *Clin Cancer Res* 13 (2007) 2825-2830.
- [31] T. Cohen, D. Nahari, L.W. Cerem, G. Neufeld, B.Z. Levi, Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor, *J Biol Chem* 271 (1996) 736-741.
- [32] J.L. Su, K.P. Lai, C.A. Chen, C.Y. Yang, P.S. Chen, C.C. Chang, C.H. Chou, C.L. Hu, M.L. Kuo, C.Y. Hsieh, L.H. Wei, A novel peptide specifically binding to interleukin-6 receptor (gp80) inhibits angiogenesis and tumor growth, *Cancer Res* 65 (2005) 4827-4835.
- [33] T. Bachelot, I. Ray-Coquard, C. Menetrier-Caux, M. Rastkha, A. Duc, J.Y. Blay, Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients, *Br J Cancer* 88 (2003) 1721-1726.
- [34] A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit Rev Food Sci Nutr* 45 (2005) 287-306.

- [35] S. Lamy, E. Beaulieu, D. Labbe, V. Bedard, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras, R. Béliveau, Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signalling, *Carcinogenesis* 29 (2008) 1033-1041.
- [36] S. Lamy, D. Gingras, R. Béliveau, Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation, *Cancer Res* 62 (2002) 381-385.
- [37] W.Q. Li, F. Dehnade, M. Zafarullah, Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signalling pathway, *J Immunol* 166 (2001) 3491-3498.
- [38] N. Chakravarti, J.N. Myers, B.B. Aggarwal, Targeting constitutive and interleukin-6-inducible signal transducers and activators of transcription 3 pathway in head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin (diferuloylmethane), *Int J Cancer* 119 (2006) 1268-1275.
- [39] A. Bhardwaj, G. Sethi, S. Vadhan-Raj, C. Bueso-Ramos, Y. Takada, U. Gaur, A.S. Nair, S. Shishodia, B.B. Aggarwal, Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells, *Blood* 109 (2007) 2293-2302.
- [40] B.S. Wung, M.C. Hsu, C.C. Wu, C.W. Hsieh, Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation, *Life Sci* 78 (2005) 389-397.
- [41] K. Selvendiran, H. Koga, T. Ueno, T. Yoshida, M. Maeyama, T. Torimura, H. Yano, M. Kojiro, M. Sata, Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids, *Cancer Res* 66 (2006) 4826-4834.
- [42] E. Anso, A. Zuazo, M. Irigoyen, M.C. Urdaci, A. Rouzaut, J.J. Martinez-Irujo, Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1 independent mechanism, *Biochem Pharmacol* 79 (2010) 1600-1609.
- [43] D.N. Syed, F. Afaq, S. Sarfaraz, N. Khan, R. Kedlaya, V. Setaluri, H. Mukhtar, Delphinidin inhibits cell proliferation and invasion via modulation of Met receptor phosphorylation, *Toxicol Appl Pharmacol* 231 (2008) 52-60.
- [44] M. Masuda, M. Suzui, I.B. Weinstein, Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signalling pathways, gene expression, and

chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines, *Clin Cancer Res* 7 (2001) 4220-4229.

- [45] H.W. Schnaper, D.S. Grant, W.G. Stetler-Stevenson, R. Fridman, G. D'Orazi, A.N. Murphy, R.E. Bird, M. Hoythya, T.R. Fuerst, D.L. French, J.P. Quigley, H.K. Kleinman, Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro, *J Cell Physiol* 156 (1993) 235-246.
- [46] A.E. Kossakowska, D.R. Edwards, C. Prusinkiewicz, M.C. Zhang, D. Guo, S.J. Urbanski, T. Grogan, L.A. Marquez, A. Janowska-Wieczorek, Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas, *Blood* 94 (1999) 2080-2089.
- [47] B.J. Ripley, M. Fujimoto, S. Serada, T. Ohkawara, T. Nishikawa, F. Terabe, Y. Matsukawa, A. Stephanou, R.A. Knight, D.A. Isenberg, D.S. Latchman, T. Kishimoto, T. Naka, Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits cell signalling by inducing SOCS1 gene expression, *Int Immunol* 22 (2010) 359-366.
- [48] M. Leopoldini, I.P. Pitarch, N. Russo, M. Toscano, Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study, *J Phys Chem A* 108 (2004) 92-96.
- [49] F. Llorens, L. Garcia, E. Itarte, N. Gomez, Apigenin and LY294002 prolong EGF-stimulated ERK1/2 activation in PC12 cells but are unable to induce full differentiation, *FEBS Lett* 510 (2002) 149-153.
- [50] L. Song, B. Shen, Y. Li, Association and contribution of ERK to IL-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription in a human myeloma cell line, *Chin Med J (Engl)* 114 (2001) 954-957.
- [51] T.K. Sengupta, E.S. Talbot, P.A. Scherle, L.B. Ivashkiv, Rapid inhibition of interleukin-6 signalling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 11107-11112.
- [52] S. Ihara, K. Nakajima, T. Fukada, M. Hibi, S. Nagata, T. Hirano, Y. Fukui, Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin-6, *EMBO J* 16 (1997) 5345-5352.
- [53] Z. Wen, Z. Zhong, J.E. Darnell, Jr., Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation, *Cell* 82 (1995) 241-250.

- [54] X. Zhang, J. Blenis, H.C. Li, C. Schindler, S. Chen-Kiang, Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes, *Science* 267 (1995) 1990-1994.
- [55] J.N. Ihle, STATs: signal transducers and activators of transcription, *Cell* 84 (1996) 331-334.

LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1 - Effects of polyphenols on IL-6-induced migration of HUVECs. (A) HUVECs were stimulated for 18 h with various concentrations (0, 10, 50, 125 or 250 ng/mL) of IL-6. (B) Cells were pretreated for 2 h with 25 μ M of indicated polyphenols or with various concentrations of EGCG (C), Dp (D), Api (E) or Lut (F) before stimulation with IL-6 (50 ng/mL). After 20 h incubation with IL-6, migration was quantified by counting the cells that crossed the membrane to the lower side of the filter with optical microscopy at $\times 50$ magnification. The number of cells which migrated was compared to that observed with IL-6-treated cells. Values are means of three independent experiments ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ versus IL-6 alone); bars, \pm SEM.

Fig. 2 - Effects of polyphenols on IL-6-induced proliferation of HUVECs. (A) HUVECs were seeded into wells of a 96-well plate. After 24 h, cells were rendered quiescent by incubation for 18 h in low serum and then incubated with serum-free medium containing various concentrations (0, 10, 25, 50, 100 or 250 ng/mL) of IL-6 or indicated polyphenols (25 μ M) (B) or different concentrations of Lut (C), EGCG (D), Api (E) or Dp (F) in the presence of IL-6 (50 ng/mL) for 48 h. During the last 4 h of the incubation, 0.5 μ Ci/well [3 H]-thymidine was added to cells. The incorporated [3 H]-thymidine was extracted in MicroscintTM-O cocktail and measured in a TopCount microplate scintillation counter. (G) Cellular toxicity was estimated by analyzing the content of LDH in the culture medium of each well as described in

the Methods section. Values are means of three independent experiments ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ versus IL-6 alone); bars, \pm SEM.

Fig. 3 - Effects of polyphenols on IL-6 downstream signalling events in ECs. Quiescent HUVECs (A-D) or HMVECs (E) were incubated in 1% FBS containing (or lacking) 20 μ M of indicated polyphenols or 10 μ M of synthetic inhibitors (PD98059 or AG490) for 18 h. The medium was then replaced with serum-free medium in the presence or absence of various concentrations (10, 25, 50, 100 or 250 ng/mL) of IL-6 for 10 min (A) or 100 ng/mL IL-6 for different times of incubation (5, 10, 15 or 30 min) (B) or 100 ng/mL IL-6 for 10 min (C-E). After cell treatments, the extent of the phosphorylated forms of JAK1, JAK2, STAT3, ERK, along with their total protein level were monitored by immunoblotting using specific antibodies. Data are representative of three independent experiments.

Fig. 4 - Effects of apigenin and luteolin on STAT3 gene targets. (A) HUVECs were serum-starved and conditioned media isolated from control or IL-6-treated cells in the presence or absence of Api or Lut at 20 μ M. Zymography was performed by SDS-PAGE in gels containing gelatin, as described in the Methods section. Quantification of the extent of gelatin hydrolysis was performed by densitometry. Values are means of two independent experiments ($**p < 0.01$; $***p < 0.001$ versus IL-6 alone); bars, \pm SEM. (B) Western blot analysis of SOCS3 expression in HUVECs treated (or not) with Api or Lut at 20 μ M for 18 h before stimulation with IL-6 (100 ng/mL) for 10 min. Total GAPDH was used for normalization. Data are representative of three independent experiments.

Fig. 5 - Effects of apigenin and luteolin on IL-6 receptor gene expression. Total RNA was extracted from HUVECs and semi-quantitative RT-PCR performed as described in the Methods section. cDNA amplicons were resolved on an agarose gel in order to confirm single amplification products.

Fig. 6 - Effects of apigenin and luteolin on IL-6-induced tube formation of HUVECs in 3D fibrin gels. HUVECs were cultured within fibrin gels in medium containing (or lacking) Api or Lut at 20 μ M and stimulated with IL-6 (250 ng/mL) as described in the Methods section. After 24 h, cells were photographed ($\times 100$). The pictures shown are representative of three independent experiments.

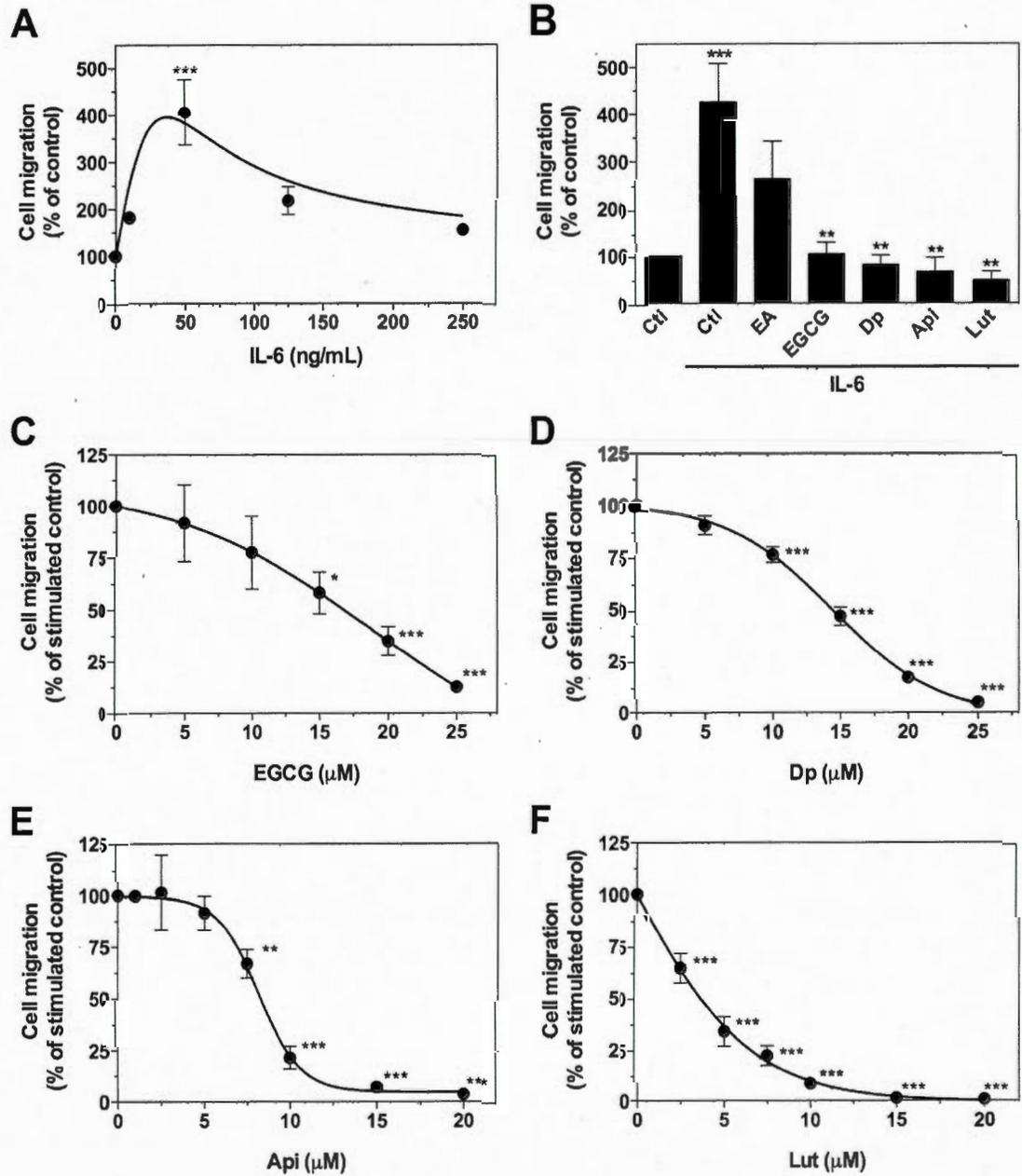


Figure 1

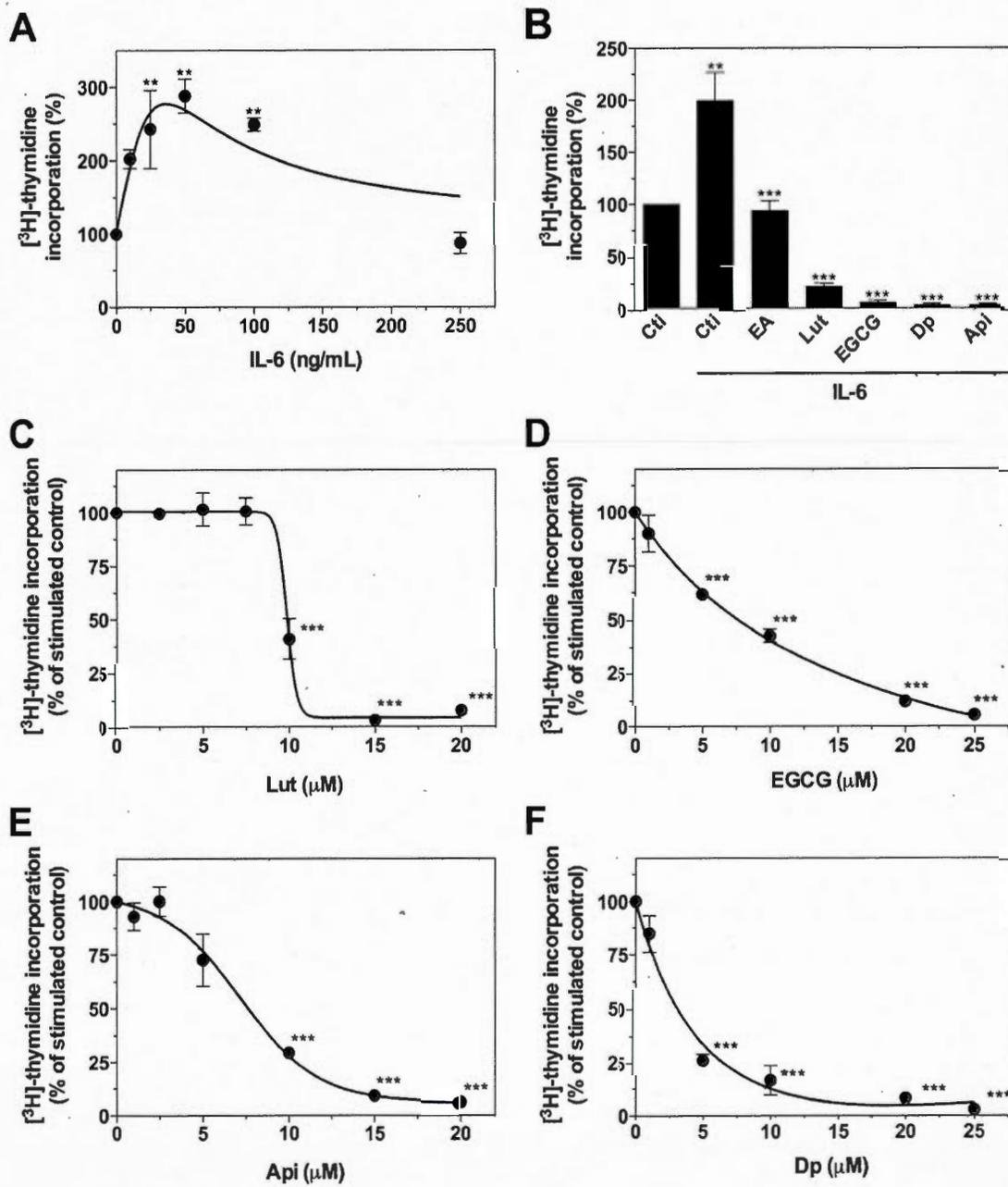


Figure 2

G

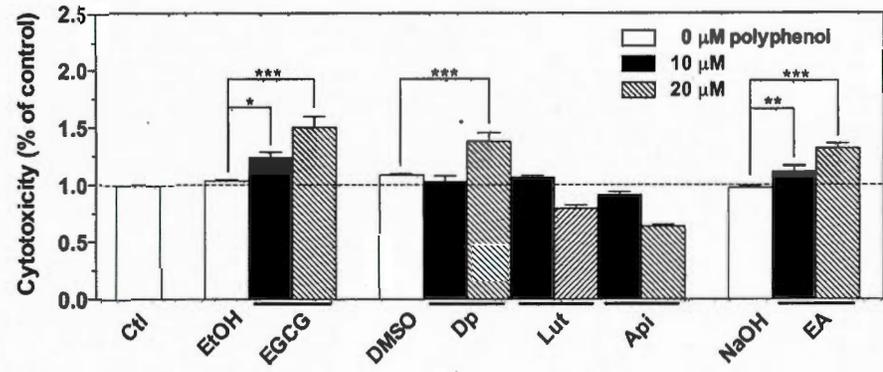


Figure 2 (Cont'd)

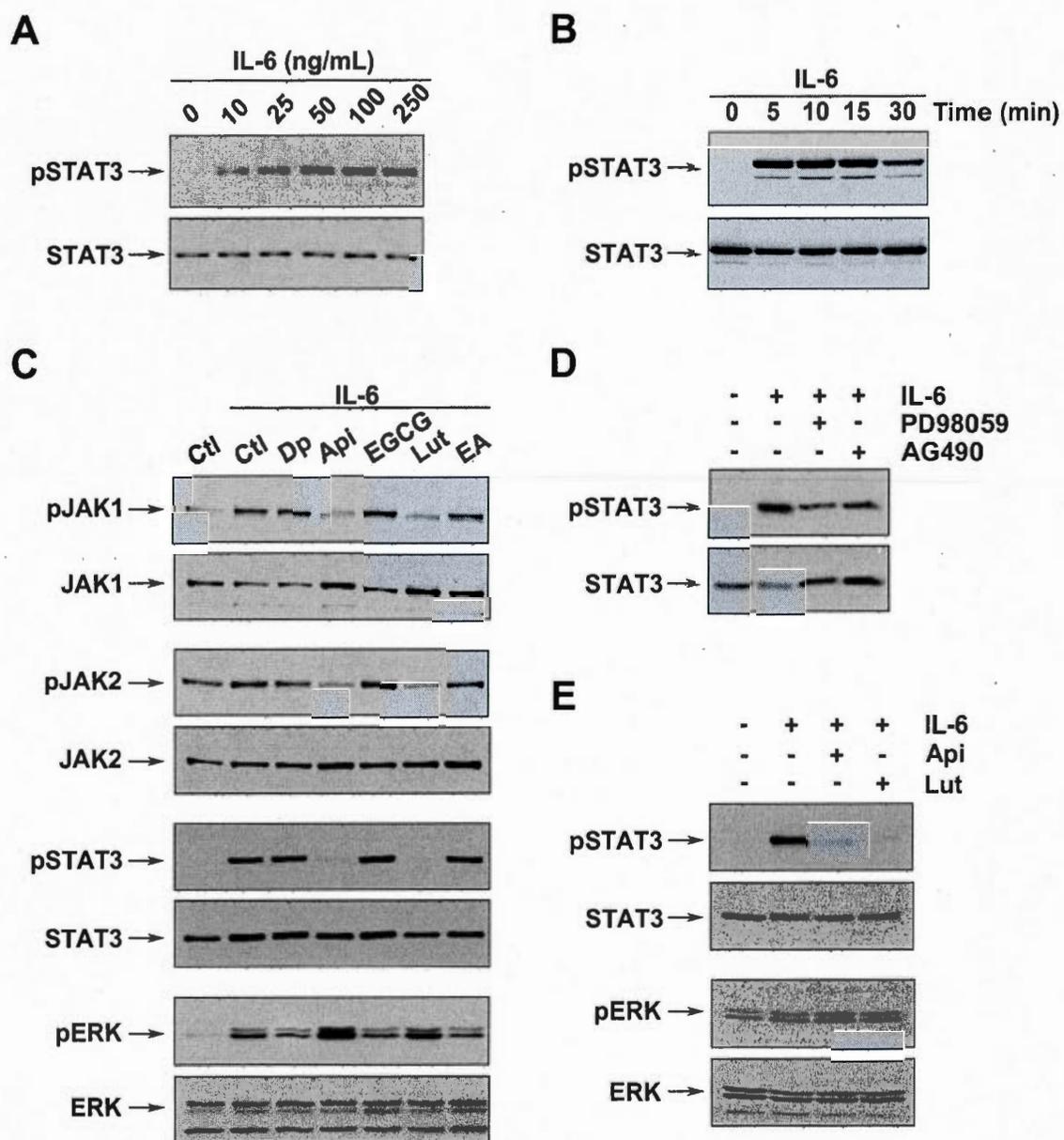


Figure 3

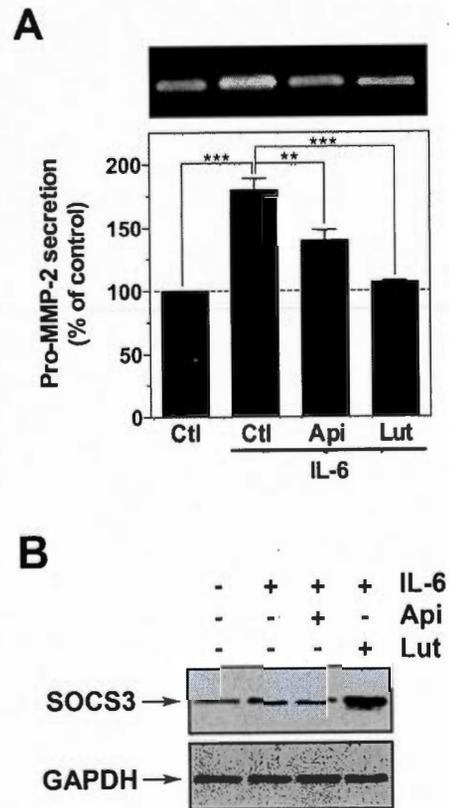


Figure 4

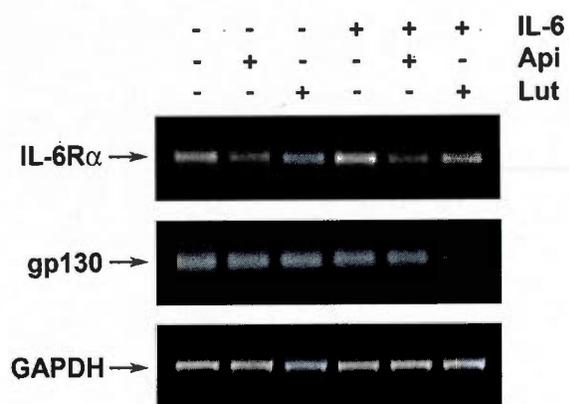


Figure 5

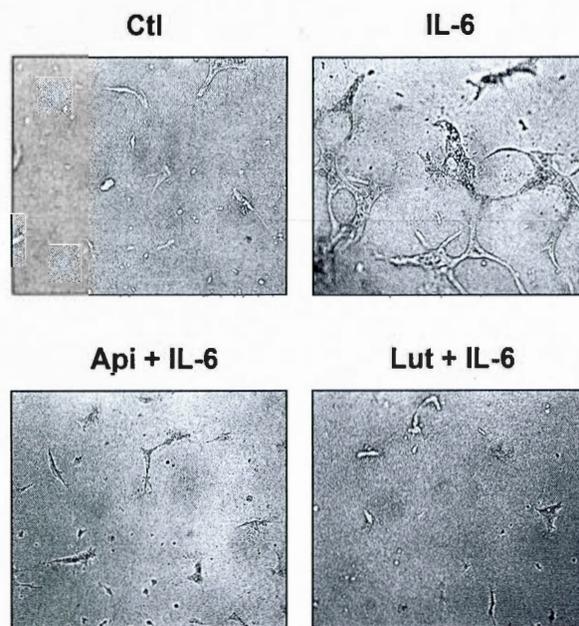


Figure 6

CHAPITRE IV

ARTICLE

4.1 CONCANAVALIN-A TRIGGERS INFLAMMATORY RESPONSE THROUGH
JAK/STAT3 SIGNALLING AND MODULATES MT1-MMP REGULATION OF COX-2 IN
MESENCHYMAL CELLS

Naoufal Akla, Jonathan Pratt and Borhane Annabi

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED, Département de
Chimie, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada*

Contributions des auteurs :

N. Akla : Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit

J. Pratt : Expérimentation, analyse des résultats

B. Annabi: Financement, analyse des résultats, conception du projet, rédaction du manuscrit

Akla, N., J. Pratt, and B. Annabi. Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Experimental Cell Research*

CONCAVALIN-A TRIGGERS INFLAMMATORY RESPONSE THROUGH
JAK/STAT3 SIGNALLING AND MODULATES MT1-MMP REGULATION OF COX-2 IN
MESENCHYMAL CELLS

Naoufal Akla, Jonathan Pratt and Borhane Annabi

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED, Département de Chimie,
Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada

Correspondence should be directed to :

Borhane Annabi, PhD, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à
Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; Phone : (514)
987-3000 ext 7610; Fax : (514) 987-0246; E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Key words : Mesenchymal stromal cells, STAT3, MT1-MMP, inflammation

ABSTRACT

Pharmacological targeting of inflammation through STAT3 and NF κ B signalling pathways is associated with cyclooxygenase (COX)-2 inhibition and believed to play a crucial role in prevention and therapy of cancer. Recently, bone marrow-derived mesenchymal stem cell (MSC) chemotaxis and cell survival were shown to be regulated, in part, by the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), an MMP not only involved in MSC migration, but also in transducing NF κ B intracellular signalling pathways regulating COX-2 expression. Whether STAT3 regulation by MT1-MMP also contributes to the expression balance of COX-2 in MSC is currently unknown. In this study, we show that STAT3 phosphorylation was triggered in MSC treated with the MT1-MMP inducer lectin Concanavalin-A (ConA), and that this phosphorylation was abrogated by the JAK2 inhibitor AG490. MT1-MMP gene silencing significantly inhibited STAT3 phosphorylation and this was correlated with reduced proMMP-2 activation and COX-2 expression. On the other hand, STAT3 gene silencing rather potentiated ConA-induced COX-2 expression. Collectively, we provide evidence for a new MT1-MMP/JAK/STAT3 signalling axis that may, in part, explain how MT1-MMP contributes to proinflammatory intracellular signalling. We also postulate that a balance between JAK/STAT and IKK/I κ B/NF κ B signalling pathways exists in COX-2 regulation. Given that MSC are avidly recruited within inflammatory microenvironment and experimental vascularizing tumors, these mechanistic observations support a possible dual control of cell adaptation by MT1-MMP that may enable MSC to be active participants within inflamed tissues.

INTRODUCTION

Mesenchymal stromal cells (MSC), most commonly isolated from the bone marrow, are a population of pluripotent adult stem cells that can differentiate into many mesenchymal phenotypes [1, 2]. In fact, recruitment of MSC by experimental vascularizing tumours resulted in the incorporation of MSC within the tumor architecture [3, 4] which, combined to intrinsic immunomodulatory mechanisms, implies that they must also respond to inflammation- and tumour-derived growth factor cues [5, 6]. Chronic inflammation has been found to mediate a wide variety of diseases including neoplasms [7]. Among the gene products involved in the induction of the inflammatory process, cyclooxygenase (COX)-2 has been shown to have a close relationship with tumorigenesis [8]. Our understanding of the oncogenic adaptation of MSC within an inflammatory microenvironment however lacks the identification of molecular contributors and characterization of inflammation-mediated signalling pathways.

While most of the matrix metalloproteinases (MMP) are secreted, MT1-MMP is a membrane-associated MMP regulated by hypoxia [9] and, aside from its well-known role in the activation of proMMP-2 and intrinsic proteolytic activity towards extracellular matrix (ECM) molecules, drives MSC mobilization [10, 11]. More importantly, its cytoplasmic domain was recently shown to link adaptor protein p130Cas [12], MTCBP-1 [13], 3BP2 [14], and Src-mediated events through the phosphorylation of its intracellular domain [15]. In light of such scaffolds taking place in MT1-MMP cellular signalling, MT1-MMP functions associated with

platelet-mediated calcium mobilization [16], regulation of cell death/survival bioswitch[17,18], and regulation of proinflammatory signalling including COX-2 have been reported [19, 20].

In the present study, we used the lectin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin-A, ConA), one of the most abundant lectins known, enables one to mimic biological lectin/carbohydrate interactions that regulate ECM protein recognition. As such, ConA is well known to also induce MT1-MMP which correlated to high COX-2 levels in gliomas with increasing histological grade [21]. Early proinflammatory cellular signalling processes triggered by ConA in the regulation of COX-2 in gliomas, demonstrated *in vitro* an IKK/NFkB-dependent pathway linking MT1-MMP-mediated intracellular signalling to the induction of COX-2 [20]. Given that JAK/STAT is also involved in COX-2 regulation, we further evaluated the possible contribution of MT1-MMP signalling to inflammation adaptation of MSC. Given MSC contribute to solid tumour development, an inflammatory signalling balance may ultimately account for some of the therapy resistance phenotype of glioblastoma.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The MEK kinase inhibitor PD98059 and the JAK family tyrosine kinase inhibitor AG490 were from Calbiochem (La Jolla, ON). The anti-ERK-1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) (K-23) polyclonal antibody was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Anti-STAT3 (79D7) and anti-phospho-STAT3 (Tyr 705) polyclonal antibodies were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). The polyclonal antibody where purchased from chemicon (Temecula, CA) and generated against the MT1-MMP catalytic domain. Monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody was from Advanced Immunochemical (Long Beach, CA). The polyclonal antibody against COX-2 was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

Cell cultures: This study was approved by the "Comité Institutionnel des Risques Biologiques" through the delivery of a written certificate (#10-CIRB-53.3.5). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) were isolated from the whole femur and tibia bone marrow of C57BL/6 female mice; cells were cultured and characterized by flow cytometry as previously described [25]. Serum starvation is classically performed by culturing the cells in

high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GibcoBRL) and 100 units/ml Penicillin/Streptomycin, and from which the 10% inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) was removed.

Immunoblotting procedures : Cells from MSC were lysed and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes and immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence as described previously [22].

Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR : Total RNA was extracted from MSC monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA): MT1-MMP (Mm_Mmp14_1_SG QT01064308), β-Actin (Mm_Actb_2_SG QT01136772). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, β-Actin RNA, were measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene

and those of β -Actin RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

Transfection method and RNA interference : MSC were transiently transfected with 20 nM siRNA against STAT3 (Mm_Stat3_1 FlexiTube siRNA, SI01435287), MT1-MMP (Mm_Mmp14_2 HP siRNA, SI00177800), or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA). Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes.

Statistical data analysis : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures.

RESULTS

Concanavalin-A triggers STAT3 phosphorylation. In order to first assess whether any JAK/STAT3 signalling pathway is inducible, MSC were serum-starved and cultured in the presence of 30 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin-A (ConA) for up to 24 hours. Cells were harvested and lysates used to evaluate the extent of STAT3 phosphorylation (Fig.1A). We found that ConA indeed significantly triggered STAT3 phosphorylation reaching a maximal value at 2 hours of treatment (Fig.1B). When increasing ConA concentrations were tested on MSC (Fig.2A), a dose-dependent increase in STAT3 phosphorylation was observed and reached a plateau at 30 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.2B). Interestingly, treatment with the matrix metalloproteinase catalytic inhibitor actinonin (zymography not shown; see Sina et al., 2010) in which its activity was unable to reverse ConA-induced STAT3 phosphorylation, suggesting that induction of the JAK/STAT pathway requires some specific intracellular cell surface-mediated signalling (Fig.2A).

STAT3 phosphorylation by Concanavalin-A is controlled through JAK and MAPK signalling pathways. We next moved on to delineate the potential signalling pathways and kinases involved in ConA-mediated STAT3 phosphorylation. MSC were serum-starved, pre-treated for 30 minutes with the JAK family tyrosine kinase inhibitor AG490, the p38/MAPK inhibitor SB203580, the MEK kinase inhibitors PD98059 and U0126, and the PI3K inhibitor LY294002, and then stimulated with ConA for 2 hours. STAT3 phosphorylation (Fig.3A) was found significantly diminished by AG490 and U0126 pharmacological agents (Fig.3B). This confirms that JAK and MEK transduce ConA-mediated STAT3 phosphorylation.

MT1-MMP gene silencing abrogates Concanavalin-A-mediated STAT3 phosphorylation, proMMP-2 activation and COX-2 expression. Given the crucial intracellular signalling role that MT1-MMP exerts in ConA-mediated cell surface binding, we next assessed its possible contribution to STAT3 phosphorylation. MT1-MMP gene silencing was first validated by qRT-PCR (Fig.4A), and then cells treated with increasing concentrations of ConA (Fig.4B). While total STAT3 levels did not change, those of STAT3 phosphorylation were significantly abrogated when MT1-MMP expression was silenced (Fig.4C). Abrogation of the MT1-MMP/STAT3 signalling axis was further correlated to that of MT1-MMP-dependent proMMP-2 activation and to ConA-induced intracellular COX-2 expression (Fig.5A). Indeed, functional downregulation of MT1-MMP at the cell surface was found to efficiently inhibit proMMP-2 activation as assessed by gelatin zymography and confirms the efficiency in MT1-MMP silencing (Fig.5B). Moreover, ConA-induced intracellular COX-2 expression was also found inhibited when MT1-MMP expression was silenced (Fig.5C).

STAT3 gene silencing potentiates Concanavalin-A-induced COX-2 expression. We next wished to assess the direct impact of STAT3 on ConA-mediated COX-2 expression and proMMP-2 activation. STAT3 gene expression was transiently silenced and MSC treated with increasing concentrations of ConA (Fig.6A). While STAT3 protein expression was abrogated, we found that ConA-induced COX-2 expression was significantly potentiated within cells that had low STAT3 expression (Fig.6B). STAT3 silencing did not affect ConA-induced proMMP-2 activation suggesting that MT1-MMP cell surface expression/function were not altered (Fig.6C).

DISCUSSION

Recent progress that has been made in our understanding towards inflammatory signalling cascades has identified a series of novel promising targets, notably in pathways involving NF- κ B and JAK/STAT transcription factors [23]. As inflammation is crucial for glioblastoma progression, it is also believed that a subset of primary glioblastomas, the most common and aggressive primary brain cancer [24], derive from transformed stem cells that possess MSC-like properties and partial phenotypic aspects of the MSC nature within the tumours' hypoxic and inflammatory environment [25]. Accordingly, exogenously delivered human MSC were found to be recruited and to adapt within human gliomas after intravascular delivery [4]. More recently, molecular markers associated with MSC were found to characterize the brain tumour-initiating cells involved in the development of hypoxic solid tumours such as glioblastomas [25].

Important biological properties of MSC have prompted for their clinical application given their ability to home to sites of inflammation following tissue injury and to perform immune response modulation [26]. However, homing of MSC to tumours is also believed to be among the earliest phenomenon of MSC-cancer interactions, as was recently reported in a mouse model where injected human MSC preferentially migrated to implanted human tumours [3, 5], and where cotransplantation of MSC with melanoma cells in mice enhanced tumour engraftment and growth [9]. This suggests that MSC are active participants in the development of hypoxic solid tumours, and that adaptive cellular conditions have significant pathological implications towards hypoxic solid tumour development and proliferation of glioma stem like

cells implicating a potential coordinated role for both JAK/STAT- and NF κ B-regulated expression of COX-2 in inflammation [27]. Isolation of cancer stem-like cells (CSC) from glioblastoma cell line U87MG has been reported [19, 28], and NF κ B-mediated COX-2 regulation by MT1-MMP demonstrated in glioma CSC [19].

Along with vesicular trafficking evidence for a role for MT1-MMP in endoplasmic reticulum stress induction, COX-2 expression was found regulated, in part, through MT1-MMP [29]. In human glioblastoma, COX-2 performs important functions in tumorigenesis [30] and inhibitors of eicosanoid biosynthesis have been shown to suppress cell proliferation and to promote astrocytic differentiation [31]. Since COX-2 protein is overexpressed in the majority of gliomas, it is therefore considered an attractive therapeutic target [32, 33]. Paradoxically, the effectiveness of direct COX-2 inhibitors on glioma cell proliferation and radioresponse enhancement has been shown to be independent of COX-2 protein expression [34]. This evidence suggests that alternate initiator molecules, possibly involving cell surface transducing mechanisms, are associated with therapy resistance and involved in the regulation of COX-2 expression. Whether MT1-MMP or any cell surface carbohydrate structures, are involved in such regulation remains to be confirmed. Nevertheless, it becomes tempting to suggest that targeting MT1-MMP pleiotropic intracellular transducing functions that, among other targets, lead to COX-2 expression may help design or optimize current therapeutic strategies.

Finally, studies have indicated the ability of stem cell populations, including MSC, to inhibit or downregulate immune responses *in vitro* and *in vivo* [35]. MSC have recently been

reported to inhibit naive and memory antigen-specific T cells [36]. The immunosuppressive qualities of MSC, which may facilitate evasion of the immune system by a tumour, may in part involve major histocompatibility complex (MHC) class I. Interestingly, phenotypic characterization of MSC by flow cytometry showed expression of MHC class I alloantigens, but failed to elicit T cell proliferative responses due to active suppressive mechanisms [37]. Recently, shedding of the tumour cell surface MHC class I chain-related molecule A by MT1-MMP was demonstrated to regulate sensitivity of tumour cells to NK cell killing, a process which may add to tumour immune evasion and contribute to tumour progression [38]. Such cell surface proteolytic activity of MT1-MMP was also shown in MSC to contribute to cleavage of CD44, another cell adhesion molecule expressed at the cell surface of MSC, and to promote cell migration [39, 40].

MSC present a promising tool for cell therapy as proven effective in pre-clinical studies. In fact, they are currently being tested in US FDA-approved clinical trials for myocardial infarction, stroke, meniscus injury, limb ischemia, graft-versus-host disease and autoimmune disorders [41]. Clinical trials for MSC injection into the central nervous system (CNS) to treat traumatic brain injury and stroke are also currently ongoing. Whether inflammatory alterations of MSC may influence endogeneous or exogenously transplanted MSC biodistribution fate remains however to be better investigated. Intravenous infusion of MSC was found to reduce brain damage after transient global cerebral ischemia *in vivo* [42], possibly through neuroprotective features of MSC likely to occur through some paracrine inflammatory regulation mechanisms [43]. In support to the MSC paracrine recruitment, MSC

transplantation provided trophic support to an ischemia/reperfusion injured liver model by stimulating regeneration [44].

In conclusion, our study provides unexpected original molecular evidence linking the intracellular signalling functions of MT1-MMP to the JAK/STAT pathway. Furthermore, we document a new molecular signalling axis balance through the intracellular domain of MT1-MMP in COX-2 expression, and which supports, in part, the oncogenic and immunomodulatory adaptive mechanisms that could eventually be targeted in MSC's contribution to hypoxic tumour development.

Acknowledgments : BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). JP is a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) awardee. This study was funded by a grant from the NSERC to BA.

REFERENCES

- 1 Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
- 2 Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, et al. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393-395.
- 3 Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, et al. (2002) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62:3603-3608.
- 4 Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, et al. (2005) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65:3307-3318.
- 5 Annabi B, Naud E, Lee YT, Eliopoulos N, 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. *J Cell Biochem* 91:1146-1158.
- 6 Birnbaum T, Roider J, Schankin CJ, Padovan CS, Schichor C, et al. (2007) Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol* 83:241-247.
- 7 Sethi G, Shanmugam MK, Ramachandran L, Kumar AP, Tergaonkar V. Multifaceted link between cancer and inflammation. *Biosci Rep*. 2012 Feb;32(1):1-15.
- 8 Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011 Nov;96(1-4):27-36

- 9 Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, et al. (2003) Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 21:337-347.
- 10 Annabi B, Thibeault S, Lee YT, Bousquet-Gagnon N, Eliopoulos N, et al. (2003) Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp Hematol.* 31:640-649
- 11 Karow M, Popp T, Egea V, Ries C, Jochum M, et al. (2009) Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion and MMP expression. *J Cell Mol Med* 13:2506-2520.
- 12 Gingras D, Michaud M, Di Tomasso G, Béliveau E, Nyalendo C, et al. (2008) Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells. *FEBS Lett* 582:399-404.
- 13 Uekita T, Gotoh I, Kinoshita T, Itoh Y, Sato H, Shiomi T, Okada Y, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12734-43.
- 14 Proulx-Bonneau S, Guezguez A, Annabi B. A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* 2011;6(6):e21511.
- 15 Nyalendo C, Michaud M, Beaulieu E, Roghi C, Murphy G, et al. (2007) Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem* 282:15690-15699.

- 16 Fortier S, Labelle D, Sina A, Moreau R, Annabi B (2008) Silencing of the MT1-MMP/G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells. *FEBS Lett* 582:799–804.
- 17 Belkaid A, Fortier S, Cao J, Annabi B (2007) Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signalling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* 9:332–430.
- 18 Fortier S, Touaibia M, Lord-Dufour S, Galipeau J, Roy R, et al. (2008) Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology* 18:195–204.
- 19 Annabi B, Laflamme C, Sina A, Lachambre MP, Béliveau R (2009) A MT1-MMP/NF-kappaB signalling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. *J Neuroinflammation* 6:8.
- 20 Sina A, Proulx-Bonneau S, Roy A, Poliquin L, Cao J, et al. (2010) The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway. *J Cell Commun Signal* 4:31-38.
- 21 Nakada M, Kita D, Futami K, Yamashita J, Fujimoto N, Sato H, Okada Y. Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *J Neurosurg.* 2001 Mar;94(3):464-73.
- 22 Lord-Dufour S, Copland IB, Levros Jr LC, Post M, Das A, et al. (2009) Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1alpha: Targeting

- G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 27:489-497.
- 23 Ivanenkov YA, Balakin KV, Lavrovsky Y. Small molecule inhibitors of NF- κ B and JAK/STAT signal transduction pathways as promising anti-inflammatory therapeutics. *Mini Rev Med Chem*. 2011 Jan;11(1):55-78
- 24 Van Meir EG, Hadjipanayis CJ, Norden AD, Shu HK, Wen PY, et al. (2010) Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60:166-193.
- 25 Tso CL, Shintaku P, Chen J, Liu Q, Liu J, et al. (2006) Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res* 4:607-619.
- 26 Shihua Wang, Xuebin Qu, Robert Chunhua Zhao Clinical applications of mesenchymal stem cells *Journal of Hematology & Oncology* 2012, 5:19 (30 April 2012)
- 28 Yu SC, Ping YF, Yi L, Zhou ZH, Chen JH, Yao XH, Gao L, Wang JM, Bian XW. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett*. 2008 Jun 28;265(1):124-34.
- 29 Proulx-Bonneau S, Pratt J, Annabi B. A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. *J Neurooncol*. 2011 Aug;104(1):33-43.
- 30 Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, et al. (2000) Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 60:883-887.
- 31 Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, et al. (1999) Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem* 274:15030-15040.

- 32 Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA (1999) Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem* 274:22679-22685.
- 33 Sperandio S, Fortin J, Sasik R, Robitaille L, Corbeil J, et al. (2009) The transcription factor Egr1 regulates the HIF-1alpha gene during hypoxia. *Mol Carcinog* 48:38-44.
- 34 Deryugin, EI, Soroceanu L, Strongin AY (2002) Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. *Cancer Res* 62:580-588.
- 35 Batten P, Rosenthal NA, Yacoub MH (2007) Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:1343-1356.
- 36 Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, et al. (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101:3722-3729.
- 37 Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, et al. (2005) T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 12:47-57.
- 38 Liu G, Atteridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD (2010) The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol* 184:3346-3350.
- 39 Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, et al. (2001) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153:893-904.

- 40 Annabi B, Thibeault S, Moumdjian R, Béliveau R. Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem.* 2004 May 21;279(21):21888-96.
- 41 Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, et al. (2010) Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med.* 5:933-946.
- 42 Perasso L, Cogo CE, Giunti D, Gandolfo C, Ruggeri P, et al. (2010) Systemic administration of mesenchymal stem cells increases neuron survival after global cerebral ischemia *in vivo* (2VO). *Neural Plast.* 2010:534925.
- 43 Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D (2011) Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 24:59-64.
- 44 Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, Iwasaki J, Kasahara N, et al. (2011) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLoS One.* 6:e19195.

FIGURE LEGENDS

Fig.1 : Concanavalin-A triggers transient STAT3 phosphorylation. Subconfluent MSC were serum-starved and treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin-A for up to 24 hours. (A) Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with anti-phospho-STAT-3 and anti-STAT-3 antibodies as described in the Methods section. (B) Densitometric measurements were performed and represent the values from pSTAT-3/STAT-3 ratio.

Fig.2 : Concanavalin-A triggers dose-dependent STAT3 phosphorylation. Subconfluent MSC were serum-starved and treated with increasing Concanavalin-A concentrations for 2 hours. (A) Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with anti-phospho-STAT-3 and anti-STAT-3 antibodies as described in the Methods section. (B) Densitometric measurements were performed and represent the values from pSTAT-3/STAT-3 ratio.

Fig.3 : STAT3 phosphorylation by Concanavalin-A is controlled through JAK and MAPK signalling pathways. Subconfluent MSC were serum-starved and pre-treated for 30 minutes with the indicated pharmacological inhibitors (10 μM), followed by a 2 hours treatment with 30 $\mu\text{g/ml}$ of Concanavalin-A. (A) Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with anti-phospho-STAT-3 and anti-STAT-3 antibodies as described in the Methods section. (B) Densitometric measurements were performed and represent the values from pSTAT-3/STAT-3 ratio.

Fig.4 : MT1-MMP gene silencing abrogates Concanavalin-A-mediated STAT3 phosphorylation. MSC were transiently transfected with scrambled sequences (siScr) or MT1-MMP siRNA (siMT1-MMP) as described in the Methods section. (A) Subconfluent transfected MSC were serum-starved and treated with 30 µg/ml of Concanavalin-A for 2 hours. Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with anti-phospho-STAT-3 and anti-STAT-3 antibodies as described in the Methods section. (B) Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess MT1-MMP gene expression and confirm gene downregulation. (C) Densitometric measurements were performed and represent the values from pSTAT-3/STAT-3 ratio.

Fig.5 : MT1-MMP gene silencing abrogates Concanavalin-A-mediated proMMP-2 activation and COX-2 expression. MSC were transiently transfected with scrambled sequences (siScr) or MT1-MMP siRNA (siMT1-MMP) as described in the Methods section. (A) Subconfluent transfected MSC were serum-starved and treated with increasing Concanavalin-A concentrations for 24 hours. Conditioned media was isolated and gelatin zymography performed as described in the Methods section to assess the extent of proMMP-2 activation. Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with anti-COX-2 and anti-STAT-3 antibodies as described in the Methods section. Densitometric measurements were performed for (B) MMP-2 / proMMP-2 activation ratio, and for (C) COX-2 / STAT-3 ratio.

Fig.6 : STAT3 gene silencing potentiates Concanavalin-A-induced COX-2 expression.

MSC were transiently transfected with scrambled sequences (siScr) or STAT-3 siRNA (siSTAT-3) as described in the Methods section. Subconfluent transfected MSC were serum-starved and treated with increasing Concanavalin-A concentrations for 24 hours. (A) Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with anti-STAT-3, anti-COX-2 and anti-ERK antibodies as described in the Methods section. (B) Densitometric measurements were performed and represent the values from COX-2 / ERK ratio. (C) Conditioned media was isolated and gelatin zymography performed as described in the Methods section to assess the extent of proMMP-2 activation.

Fig.7 : Schematic representation of MT1-MMP dual transcriptional regulation role of lectin-induced inflammation. Concanavalin-A treatment of MSC requires MT1-MMP cell surface functions that ultimately trigger activation of latent proMMP-2 into active MMP-2 and lead to extracellular matrix (ECM) degradation. MT1-MMP is thought to also signal intracellular JAK/STAT- and IKK/I κ B/NF- κ B-mediated transcriptional regulation of COX-2 gene expression leading to the acquisition of an inflammatory phenotype. According to our current hypothesis, silencing of the JAK/STAT signalling amplifies MT1-MMP capacity to trigger COX-2 expression, therefore establishing the IKK/I κ B/NF- κ B signalling pathway as the major contributor to MT1-MMP-mediated inflammation.

Fig.1

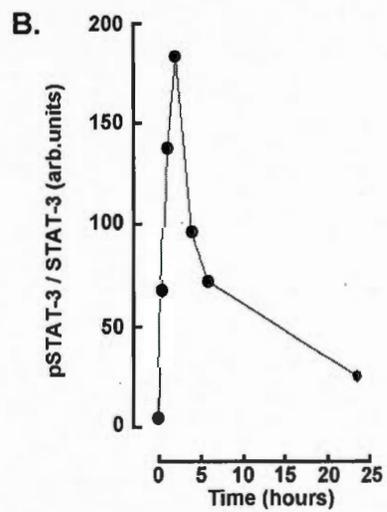
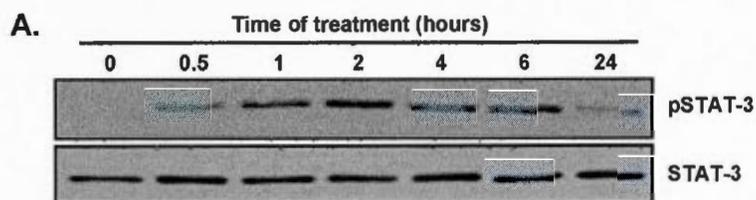


Fig.2

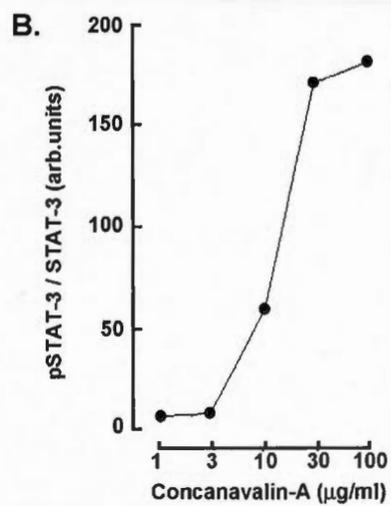
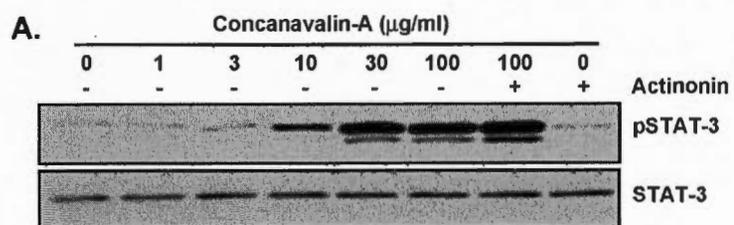


Fig.3

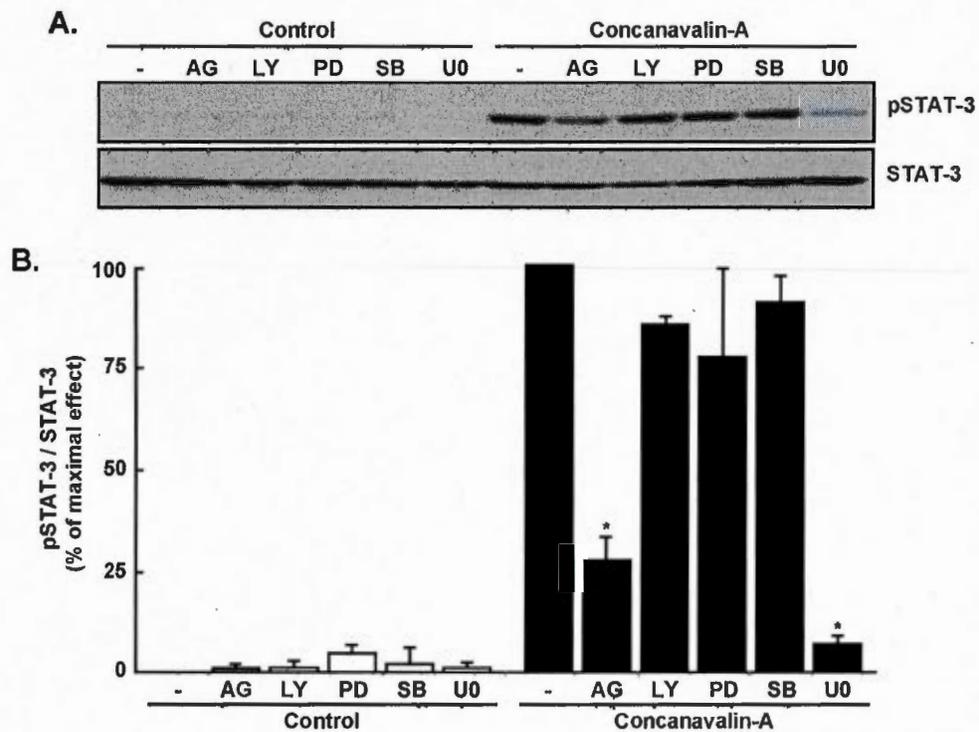


Fig.4

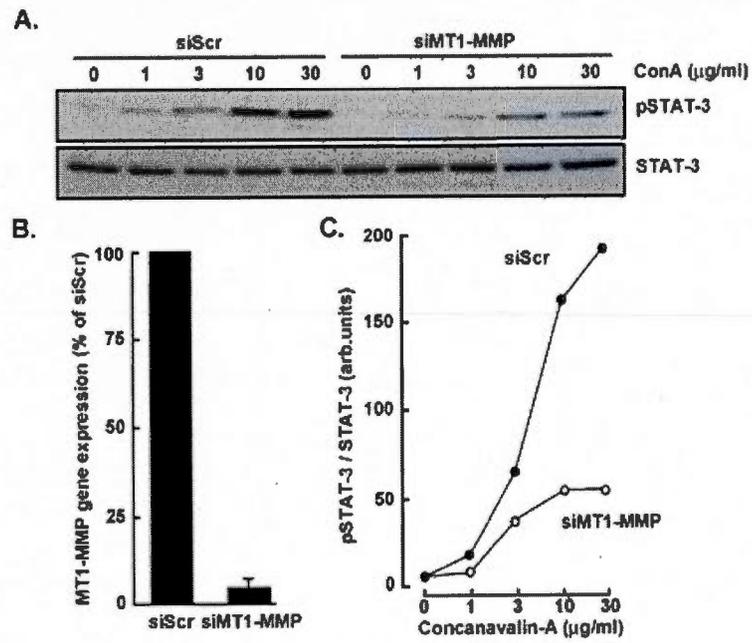


Fig.5

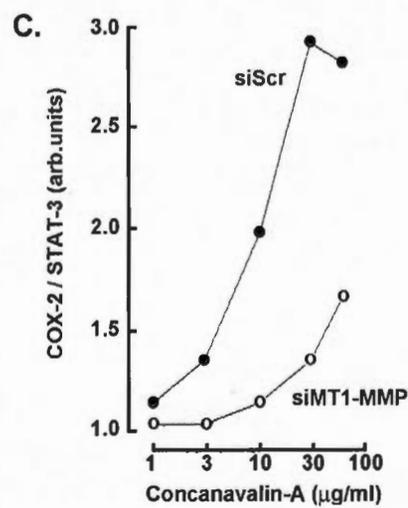
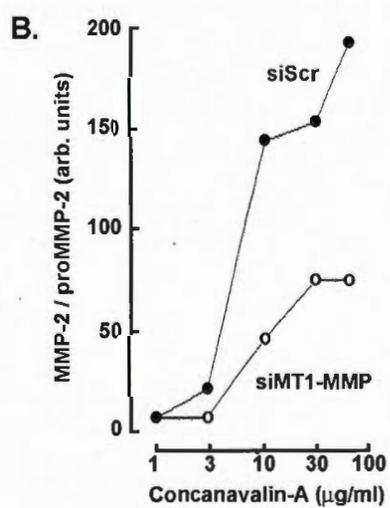
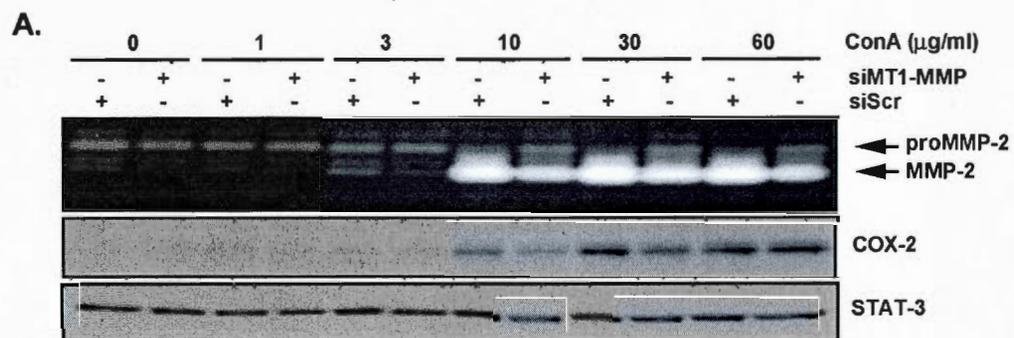


Fig.6

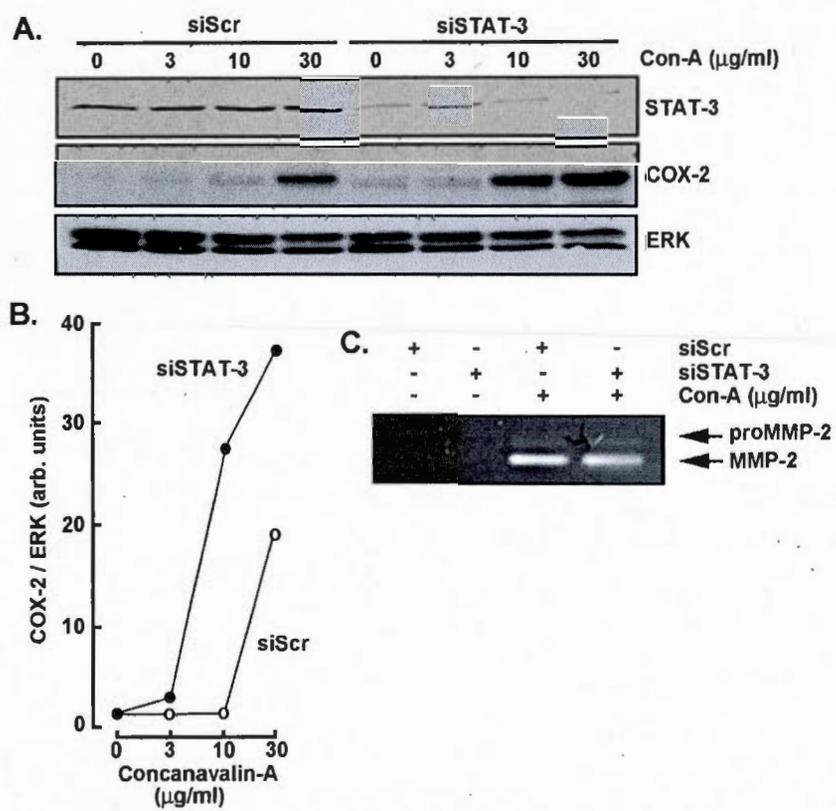
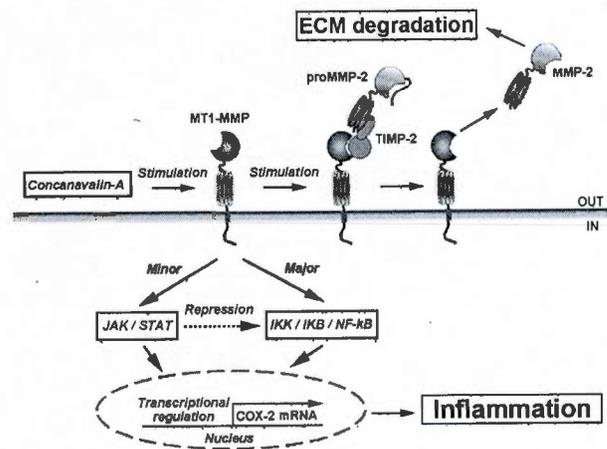


Fig.7



CHAPITRE V

DISCUSSION

5.1 Inhibition de l'angiogenèse modulée par l'inflammation

L'activation de STAT3, par des cytokines tel que l'IL6, joue un rôle de médiateur important qui relie l'inflammation à l'angiogenèse tumorale (Hanahan et Weinberg, 2011; Yu et al. 2009; Su et al., 2005; Aggarwal et Gehlot, 2009). Bien que plusieurs polyphénols ont montré une activité anti-angiogénique (Ramos et al., 2008), peu ont démontré cette activité lorsqu'elle est modulée par l'inflammation sur la voie IL6/JAK/STAT3.

Nos résultats indiquent principalement que Lut et Api ont l'activité anti-angiogénique la plus puissante. Ces deux flavones inhibent trois étapes du processus angiogénique, la prolifération et la migration cellulaire, ainsi qu'une des étapes les plus déterminantes, la différenciation morphogénique des HUVEC en structures de type capillaire induites par l'IL6. L'essai de la libération du LDH a révélé que ces effets ne sont pas dus à une cytotoxicité aux traitements. Les mécanismes moléculaires appuyant cette inhibition au niveau cellulaire montrent qu'elle se fait par l'inhibition de la phosphorylation des kinases JAK1, JAK2 et de la phosphorylation de STAT3 avec une inhibition presque totale de la phosphorylation en Y⁷⁰⁵ de STAT3 (Figure 5.1), ce qui est reconnu comme un élément essentiel à sa dimérisation et à sa translocation nucléaire. Il y a aussi une inhibition possible par la voie des MAPK, car il y a corrélation avec la phosphorylation d'ERK. Cependant la communication-croisée s'effectuant entre les voies MAPK et JAK/STAT3 activées par IL6 demeure à être élucidée. En effet, il est possible que la phosphorylation d'ERK soit responsable d'une régulation négative de la phosphorylation en Y⁷⁰⁵ de STAT3 par une activation de STAT3 en S⁷²⁷ (Chung et al., 1997) ce qui réduirait son homodimérisation et sa translocation au noyau pour amorcer la transcription (Huang, 2007). La génération d'un anticorps contre la pS⁷²⁷-STAT3 aurait appuyé cette hypothèse. Il est aussi à noter que ces deux flavones ont régulé négativement l'expression de l'ARNm de l'IL6R. Ainsi il serait probable que cet effet d'inhibition sur la phosphorylation de STAT3 soit régulé en

amont des kinases par une régulation négative de la traduction du récepteur IL6R, le tout impliquant probablement une cascade d'inhibition de Lut et Api par IL6R/JAK/STAT3.

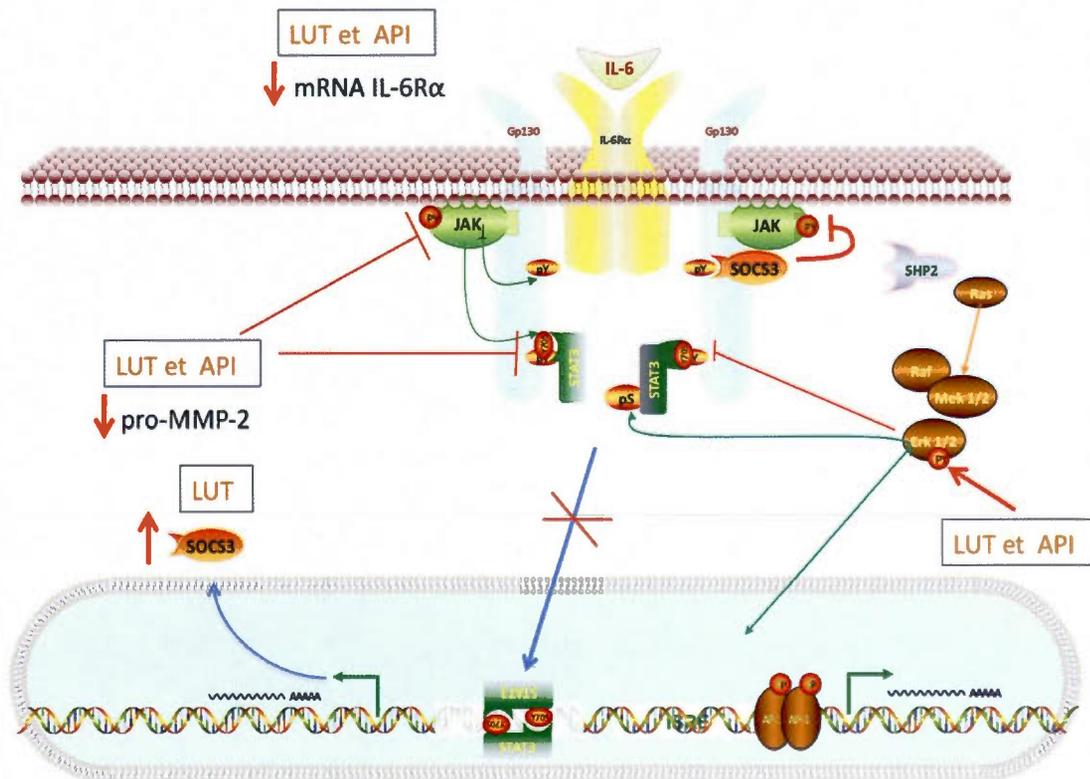


Figure 5.1 Schéma récapitulatif de l'inhibition de la voie IL6/STAT3 par Api et Lut.

Les deux polyphénols, Api et Lut ont montré qu'ils inhibent la voie IL6/STAT3 par une inhibition de l'activation de STAT3 et celles des JAK1 et JAK2 ; par une régulation négative de l'expression de l'ARN messager du récepteur à l'IL6 (mRNA IL6R α) et celle de la proMMP2. Ils augmentent aussi l'activation d'ERK1/2. Le mécanisme de Lut diffère de celui d'Api puisqu'il régule positivement l'expression de SOCS3 qui va se lier au récepteur gp130 et inhiber l'activation des JAK. En conséquence, l'inhibition de la transduction du signal empêche la dimérisation de STAT3 et de sa translocation aux noyaux pour exercer son rôle de transcription de gènes important dans l'inflammation et l'angiogenèse.

Mis à part la spécificité cellulaire, ces résultats d'inhibition de l'angiogenèse par Api et Lut concordent avec certains des résultats ultérieurs et pourraient fournir un rationnel pour des études subséquentes. En effet, il a déjà été démontré qu'Api pouvait inhiber l'angiogenèse tumorale *in vivo* en diminuant l'expression de HIF-1 α et de VEGF sans mettre en évidence le rôle de STAT3 (Fang et al., 2007). De façon plus importante, une autre étude plus récente basée sur une lignée cellulaire cancéreuse pulmonaire (H157) a dévoilé que les flavonoïdes, incluant Lut et Api, inhibaient en condition hypoxique la phosphorylation en Y⁷⁰⁵ de STAT3 et que cette inhibition de STAT3 corrélait avec l'inhibition du VEGF indépendamment de HIF-1 α (Ansó et al., 2010). Ceci est compréhensible puisque STAT3 est connu pour être capable de médier la transcription du VEGF seul ou en association à HIF-1 au promoteur (Niu et al., 2002; Chen and Han, 2008). Bien que l'expression du VEGF et son implication dans l'angiogenèse soit reconnue, un avantage essentiel à l'inhibition de IL6/STAT3 permettrait donc de réguler la transcription de plusieurs facteurs proangiogéniques et pro-inflammatoires autre que le VEGF. Une autre étude, bien qu'elle soit dans un contexte autre qu'oncologique et concordant avec l'aspect moléculaire à notre étude, a montré que Lut inhibait la voie JAK2/STAT3 *in vitro* et *in vivo* suivant des stimulations à l'IL6 (Parker-Athill et al., 2009). L'étude a été conduite chez la souris à l'aide du modèle d'activation de l'immunitaire maternelle (AIM) par l'IL6 et de cultures primaires de cellules neuronales. Différemment de nos résultats, il a été remarqué dans certains articles que Lut pouvait inhiber l'angiogenèse par l'ubiquitination de la forme phosphorylée STAT3 en Y⁷⁰⁵ (Selvendiran et al., 2006). Cependant dans notre étude, les niveaux de STAT3 totaux n'ont pas démontré de variations significatives. Un autre résultat qui a été observé lors de notre étude et qui est conforme avec une activité anti-angiogénique est qu'Api et Lut inhibent l'expression de la proMMP2, Lut la régulant négativement jusqu'aux niveaux basaux du Ctrl sans IL6. En effet, cela est conforme à la voie IL6/STAT3 qui est impliquée dans la régulation positive ainsi que la transcription de plusieurs gènes impliquant des MMP comme la MMP2 (Aggarwal et al., 2006a). Une autre étude a montré que Lut pouvait également inhiber directement l'activité de la MMP2 (Ende et Gebhardt, 2004).

Il est possible que les mécanismes d'action anti-angiogénique modulés par l'IL6 entre Api et Lut diffèrent. Un indice reflétant des mécanismes distincts des polyphénols étudiés pourrait provenir des profils d'inhibitions de la migration et de la prolifération (voir figure 1C à 1F et

2C à 2F), car ces fonctions cellulaires résultent des mécanismes moléculaires précis qui peuvent tous impliquer l'inhibition de STAT3. Un des principaux résultats démontrant cette divergence est l'expression accrue, lors du traitement avec Lut, du suppresseur de la signalisation aux cytokines-3 (SOCS3) qui est un rétro-inhibiteur endogène spécifique du récepteur gp130 et de la voie de plusieurs cytokines telle que l'IL6 (Yoshimura, 2009). En effet, SOCS3 est un des médiateurs permettant de réguler négativement l'activité constitutive de STAT3 dans l'angiogenèse tumorale (Yoshimura et al., 2007) en supprimant les réactions inflammatoires à la source de pathologies progressives dans lesquelles l'IL6 joue un rôle important (Yoshimura, 2009). Cette différence d'expression par le traitement avec Lut pourrait être attribuable à la seule différence structurale d'une hydroxylation en moins (en position 3' du noyau B) (Figure 1.10 C). Une façon d'éclairer cet aspect différentiel serait d'examiner les conditions précises lors de la production de SOCS3. En effet, Api semble inhiber plus directement la voie JAK/STAT3, car SOCS3 étant un gène cible de STAT3 est moins exprimé lors du traitement par Api que Lut. Sous un autre aspect, il se pourrait que les mécanismes d'inhibitions moléculaires sur de courtes durées à l'IL6 diffèrent de ceux de l'inhibition des fonctions physiologiques qui se sont faits sur de plus longues durées i.e. stimulation 10 min (figure 3; article I) comparées à 20h (migration) ou 48h (prolifération). Les EC peuvent sécréter du PDGF de façon constante sur de longues périodes et puisqu'Api est connu pour interférer directement avec l'activité kinase du PDGFR (Lamy et al., 2008b), il se pourrait ainsi qu'il inhibe l'activation de JAK/STAT3 (Vij et al., 2008; Guan et al., 2012). Cela serait d'autant plus probable puisque l'IL6 peut stimuler la production du PDGF endogène affectant certaines fonctions physiologiques (Ikeda et al., 1991).

L'EA, l'EGCG et la Dp ont tous montré une inhibition de l'induction de la prolifération et de la migration par l'IL6. Cependant, les deux flavonoïdes EGCG et Dp ont présenté des inhibitions importantes permettant d'abaisser ou maintenir le niveau basal de ces deux fonctions physiologiques en présence d'IL6. Bien qu'aucun de ces polyphénols n'ait inhibé l'activation de STAT3 induite par l'IL6, les propriétés anti-angiogéniques de l'EGCG, elles, sont bien connues (Ramos, 2008; Bagli et al., 2004). Des études ont en effet déjà indiqué que l'EGCG régula négativement la phosphorylation de STAT3 par d'autres voies que celle de l'IL6, celle associée à une inhibition de la phosphorylation de l'EGFR (Masuda et al., 2001). Il se pourrait cependant que l'inhibition de la voie IL6/STAT3 soit dépendante du modèle cellulaire, car des

études ont montré chez des cellules cancéreuses gastriques que l'EGCG inhibe non seulement la phosphorylation de STAT3 induite par l'IL6, mais inhibe aussi la tubulogénèse sur matrigel (Zhu et al., 2011). Bien que son effet inhibiteur sur la prolifération et la migration des EC est mis en évidence dans la présente recherche, la Dp a déjà dévoilé une activité antiproliférative des EC (Martin et al., 2003). Peu d'études ont exposé l'effet de l'anthocyanidine Dp ou l'EA sur l'activation de STAT3 induite par l'IL6 et l'angiogénèse. Cependant, il a été remarqué que Dp aurait une activité inhibitrice sur deux facteurs de transcription, soit NF- κ B et sur la phosphorylation de STAT3 en réponse au HGF (Syed et al., 2008), ce qui est d'importance, car STAT3 et NF- κ B peuvent s'associer pour transcrire plusieurs gènes pro-inflammatoires, dont l'IL6 même (Yu et al. 2009). L'effet antiprolifératif de l'EGCG, Dp et EA pourrait être du en partie à leur cytotoxicité sur les HUVEC observées à partir de 10 μ M. Ainsi, selon nos résultats la Dp, l'EGCG et l'EA pourraient être de bons inhibiteurs dans les premières étapes dans le processus angiogénique.

Des études des relations structure-activité (SAR), ont déterminé que l'hydroxylation du noyau benzène A (en position 5' et 7') ainsi que le noyau B (en position 4') pourrait compter pour l'activité anti-angiogénique de Lut et Api (Figure 5.2) (Ansò et al., 2010). Cependant, si l'on déduit les relations structure-activité par une comparaison de nos résultats trouvés en Lut et Api et celles de résultats trouvés dans la littérature avec les flavones Chrysin et la Wogonine, ces dernières n'ayant aucun groupement hydroxyle sur le noyau B, ont déjà présenté une activité anti-angiogénique par l'inhibition de la voie IL6/STAT3 (Lin et al., 2010; Lin et al., 2012). Cela suggère évidemment que l'activité inhibitrice de cette voie ne nécessite pas l'hydroxylation de ce noyau. Une autre étude sur des cellules humaines de glioblastomes, qui est un des meilleurs modèles cellulaires pour étudier l'inhibition pharmacologique de la voie IL6/STAT3 (Michaud-Levesque et al., 2012), a dévoilé que la Quercétine ayant une structure voisine à Lut avec un R3= OH de plus sur le noyau C, inhibe la voie IL6/STAT3 et régule négativement la MMP2. L'examen structural de la Dp et l'EGCG, qui n'ont pas démontré une inhibition sur la voie IL6/JAK/STAT3, nous révèle qu'ils ont les groupements communs aux autres flavonoïdes (OH en position R5 et R7 noyau A), mais n'ont pas le groupement carboxyle sur le noyau C. Ainsi, l'activité inhibitrice des flavonoïdes sur la voie IL6/JAK/STAT3 semble nécessiter le groupement carboxyle sur le noyau C, mais ne requiert pas nécessairement une

hydroxylation sur le noyau B. Il ne faut pas oublier cependant que les effets peuvent être dus aux métabolites ou autres produits du métabolisme.

Bien que la biodisponibilité de ces deux flavones pourrait être faible, les concentrations utilisées d'IL6 (>50 ng/mL) sont du même ordre que celles du niveau retrouvé dans certaines conditions inflammatoires reliées au cancer, ainsi que d'un point de vue nutritionnel les niveaux d'Api et Lut dans le sérum pourraient être atteints par un régime spécifique pour un effet optimal d'inhibition de l'IL6/STAT3 (Robak et al., 1999; Verbeek et al., 2004). Cependant, une approche métronomique, qui est l'administration fréquente et continue de faibles doses de médicaments (Kerbel et Kamen, 2004), serait plus adaptée, car pour certaines conditions inflammatoires chroniques les concentrations d'IL6 sont beaucoup plus faibles (ordre du pg/mL) (Eder et al., 2009). Cela permettrait une inhibition angiogénique et un effet chimiopréventif sur de longues périodes avec une alimentation normale équilibrée qui procure déjà un niveau respectable d'Api et de Lut dans le sérum sans toutefois excéder $\sim 1\mu\text{M}$ (Scalbert et Williamson, 2000; Verbeek et al., 2004). En combinaison avec d'autres traitements anti-cancer, cette inhibition permettrait ainsi une diminution de la résistance thérapeutique.

5.2 La MT1-MMP : Contributeur à l'inflammation

La MT1-MMP contrôle plusieurs fonctions des MSC qui sont recrutées aux sites d'inflammations chroniques et peuvent y contribuer pour ainsi favoriser le cancer (Figure 1.8) (Bergfeld et Declerk, 2010). Récemment, il a été démontré chez les cellules de glioblastomes humaines U87, que la MT1-MMP, induisait l'expression de COX-2 par un mécanisme IKK γ /NF- κ B, en réponse à la ConA (Sina et al., 2010). Cependant, aucune recherche à notre connaissance n'a montré l'implication de l'activation de STAT3 par la MT1-MMP en réponse à la ConA.

Ainsi, dans la présente étude on a tenté de vérifier l'hypothèse qui en découle et d'élucider si la signalisation cytoplasmique par la MT1-MMP est médiée par l'activation de la voie JAK/STAT3 contribuant au phénotype inflammatoire. Principalement, cette étude confirme que la MT1-MMP régule, en réponse à la lectine ConA, le phénotype pro-inflammatoire des cellules MSC de souris par l'activation de STAT3, et cela s'effectue de façon indépendante du site catalytique de la MT1-MMP puisque l'actinonin n'a pas été en mesure de renverser cette activation. Ce qui implique potentiellement une communication-croisée entre deux voies dont celle d'intérêt JAK2/STAT3. Ceci suggère que l'induction de cette voie nécessite probablement une signalisation intracellulaire médiée à la surface cellulaire. Sur un second plan, il sera discuté de l'impact du double rôle possible de STAT3 phosphorylé ou non en tant que médiateur dans l'expression de COX-2 impliquant la MT1-MMP en réponse à la ConA.

Dans les étapes initiales, l'optimisation des paramètres cinétiques et de concentrations efficaces à une activation de STAT3 par la ConA ont été établis à 2h et à une concentration de 30 μ g/mL. Cette dernière a été choisie selon un maximum d'efficacité pour minimiser les variations dans l'activation de STAT3 produites par des changements de concentrations en ConA. L'utilisation de l'ARN interférent visant l'expression de la MT1-MMP a permis d'observer une diminution de 73 % dans l'efficacité d'induction de l'activation de STAT3 par la ConA, sans changement significatif dans sa puissance d'action. Ce qui est compréhensible puisqu'il y aurait théoriquement selon la méthode, moins de MT1-MMP à la surface membranaire pour assumer la transduction du signal, résultant en un abaissement de l'efficacité

sans changement dans la potentialisation ou puissance d'action de l'agoniste. Une explication possible des événements dans la transduction du signal amenant la phosphorylation de STAT3 selon nos données est que celle-ci s'effectue probablement par deux voies, dont celle d'intérêt JAK/STAT3. Justifiant ceci est l'observation des résultats obtenus lors de l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques qui ont montré qu'AG490, qui est spécifique à JAK2 (Chiba et al., 2012; Davoodi-Semiromi et al., 2012; Hodge et al., 2005; Luo and Laaja, 2004), inhibe près de 60 % de la phosphorylation de STAT3 induite par la lectine.

Un peu moins clair est le rôle qu'occupe pSTAT3 dans la potentialisation de l'expression de COX-2 par la ConA. De façon inattendue, l'utilisation de l'ARN interférent avec STAT3 a montré une amplification de l'expression de COX2 par la MT1-MMP en réponse à la ConA. Il serait pertinent de mentionner que non seulement le facteur de transcription NF-kB a un rôle important dans l'expression de COX-2 (Sina et al., 2010; Nakao et al., 2002) mais que pSTAT3 peut aussi lier le promoteur de COX-2 et transcrire ce dernier (Lo et al., 2010) et peut-être le potentialiser. Sachant que la majorité des signaux inflammatoires reliés au cancer sont régulés par l'activation de ces deux facteurs de transcription (Li et al., 2011). Il est possible que l'interaction entre NF-kB et la phosphorylation de STAT3 puisse co-réguler plusieurs facteurs oncogéniques et inflammatoires (Yu et al., 2009; Lee et al., 2009a) et soit importante dans la potentialisation de l'expression de COX-2. Pour récapituler, STAT3 contribuerait de deux façons dans la médiation de l'induction de l'expression de COX-2 par la ConA. Lorsque non-phosphorylé, STAT3 aurait un rôle dans la répression de l'induction de COX-2 possiblement par une inhibition de l'activation d'IKK et de par sa phosphorylation il participerait par association au NF-kB à la potentialisation de l'induction de COX-2. Cet équilibre régulé par les MT1-MMP permettrait l'adaptation des MSC à un environnement inflammatoire pro-tumoral. Bien que les voies de JAK/STAT3 et IKK/IkB/NF-kB semblent coopérer dans la régulation transcriptionnelle de COX-2, la voie JAK/STAT3 semble avoir aussi un rôle de répression. L'invalidation de la voie JAK/STAT3 par l'ARN interférent, qui amplifie la capacité d'induction de COX2 par la MT1-MMP, établit la signalisation IKK/IkB/NF-kB comme voie majeure d'induction de COX2 médiée par la MT1-MMP et l'acquisition d'un phénotype inflammatoire (Figure 7; article 2). L'élucidation de l'interaction entre pSTAT3 et le NF-kB

impliqué dans la régulation transcriptionnelle de COX2 et celle de l'inhibition possible de la voie IKK/I κ B/NF- κ B par STAT3 seraient d'importants projets futurs.

Ayant examiné les voies impliquées dans cette signalisation médiée par la MT1-MMP en réponse à la ConA, il serait intéressant d'examiner plus précisément, selon la littérature disponible, des possibilités au niveau du domaine cytoplasmique médiant entre autres l'activation de STAT3. Cependant, il reste à souligner que peu d'entre elles ont mis en évidence l'implication de la MT1-MMP, et en particulier par son domaine cytoplasmique, dans l'inflammation et l'activation de STAT3. Il est à noter que plusieurs de ces voies peuvent nécessiter des tyrosines kinases qui ne sont pas associées à des récepteurs, entre autres le Src. Cependant, comme il a été mentionné plus tôt, il n'y a pas de motifs de reconnaissance habituels sur le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP ce qui fait que les mécanismes impliqués dans l'activation des cascades de signalisation restent à être élucidés (Gingras et Béliveau, 2010). Une approche expérimentale intéressante par cytométrie en flux permettrait d'étudier les effets sur la signalisation par l'utilisation de fluorochromes-libellés à des anticorps spécifiques reconnaissant la pY⁵⁷³ (ou dirigées vers d'autres protéines intracellulaires; pJAK, pSTAT3, COX2, SOCS3) après avoir perméabilisé la membrane (e.g. saponine). À cet effet les résultats peuvent être exprimés de façon semi-quantitatifs, en unité MESF, pour la quantité de MSC produisant la ou les protéine(s) ou en pourcentage de cellules produisant la protéine(s) recherchée(s) (Schuerwegh et al., 2001). Aussi en relation avec l'autre volet de la présente recherche, il serait également possible par la même méthode de mesurer l'effet des polyphénols sur la phosphorylation et l'expression de ces mêmes protéines.

Toutefois, la MT1-MMP peut s'associer à plusieurs protéines membranaires ou cytoplasmiques, pour ainsi activer STAT3. La phosphocavéoline-1 interagit spécifiquement avec la MT1-MMP (Labrecque et al., 2004; Gingras et Béliveau, 2010) et une diminution de son expression entraînerait une augmentation de la phosphorylation de STAT3 (Jasmin et al., 2006). Autre exemple : une fois que le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP phosphorylé en Y⁵⁷³ (P-Y⁵⁷³), il y aurait interaction avec la protéine adaptatrice p130Cas phosphorylée (Gingras et al., 2008; Gingras et Béliveau, 2010). Une corrélation inverse existe entre la phosphorylation de p130Cas et pSTAT3 en Y⁷⁰⁵ (Byers et al., 2009). Cependant, la recherche

d'explication sur un lien entre le domaine cytoplasmique et l'activation probable de la voie JAK/STAT3 impliquant des récepteurs à cytokines dans la présente étude pourrait être fournie par le fait que la MT1-MMP pourrait s'associer à des récepteurs et activer STAT3 (Lee et al., 2009b). Parmi les exemples, on retrouve un clivage du récepteur de surface CD44 par la MT1-MMP activant STAT3 (Jung et al., 2011). La MT1-MMP peut aussi s'associer avec le VEGFR2 et le Src qui régulerait l'expression du VEGF (Eisenach et al., 2010). Cette production de VEGF pourrait être dépendante aussi à une P-Y⁵⁷³ de la MT1-MMP (Nyalendo et al., 2007). Donc, il y aurait dans cet exemple des interactions à deux niveaux, membranaire et cytoplasmique, amenant la transcription du VEGF qui peut être, rappelons-le, transcrit par STAT3.

Or selon ces exemples, il serait probable que la MT1-MMP puisse ainsi former un complexe avec un récepteur à cytokines, en réponse à la ConA pour ainsi activer JAK/STAT3. Il est possible parallèlement que cette association implique la P-Y⁵⁷³ de la MT1-MMP et soit un élément essentiel impliquant cette voie pro-inflammatoire. En effet la P-Y⁵⁷³ a un rôle déjà connu dans plusieurs fonctions physiologiques, incluant la prolifération, la survie, la migration et l'invasion, et que cette activation se fait de façon dépendante à une tyrosine kinase Src (Nyalendo et al., 2010; Nyalendo et al., 2009; Nyalendo et al., 2007). Ainsi, puisque la tyrosine kinase Src peut activer la MT1-MMP en P-Y⁵⁷³, cela pourrait être fait aussi par les tyrosines kinases JAK. Dans notre travail, la voie Ras/MAPK médiant l'activation de STAT3 pourrait être expliquée par une étude qui a montré que les résidus ⁵⁷³YCQR⁵⁷⁶ du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP sont impliqués dans l'activation de la voie Ras-MEK-ERK (Gingras et Béliveau, 2010). De façon intéressante, tout comme dans notre recherche, cette signalisation ne nécessiterait pas l'activité protéase de la MT1-MMP, mais qui requerrait la liaison de l'inhibiteur TIMP2/MT1-MMP (D'Alessio et al., 2008).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous démontrons pour la première fois que la MT1-MMP régule le phénotype pro-inflammatoire des cellules MSC de souris par l'activation de STAT3 en P-Y⁷⁰⁵ de façon indépendante de sa fonction catalytique en réponse à la ConA. L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques suggère que cela implique probablement la communication-croisée entre deux voies principales, celle de JAK/STAT3 et celle des Ras/MAPK. Cette dernière impliquant probablement le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP, ce qui est moins clair pour la voie JAK/STAT3 où l'interaction pourrait se faire au niveau membranaire aussi avec des récepteurs à cytokines. Aussi important d'un point de vue fondamental est l'observation que STAT3 ou pSTAT3 montrent une double action en réponse à la lectine; pSTAT3 étant relié à l'inflammation, STAT3 aurait un effet anti-inflammatoire en diminuant l'induction de l'expression de COX-2. D'autres études fourniraient davantage d'information sur la probable contribution de pSTAT3 dans le rôle potentialisateur de la MT1-MMP sur l'expression de COX-2 en réponse à la ConA. En particulier des approches par mutagenèse dirigée ciblant le résidu Y⁵⁷³ du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP. Aussi, il serait intéressant de vérifier par les mêmes méthodes l'effet d'autres inhibiteurs pharmacologiques et des siRNA sur les fonctions physiologiques des MSC. Le rôle impliquant la MT1-MMP dans plusieurs fonctions physiologiques reliées au cancer est bien établi. Cette recherche met en évidence l'implication de la MT1-MMP dans les conditions inflammatoires, médiées par STAT3, favorisant ces fonctions. Ainsi, ces résultats attribuent à la MT1-MMP un potentiel accru comme cible future dans le traitement et la prévention de l'inflammation reliée au cancer.

Ces résultats suggèrent aussi que STAT3 joue un grand rôle dans les mécanismes pharmacologiques des flavonoïdes et en particulier de certains flavones au niveau des EC. Dans cette étude, il a été démontré que l'activation angiogénique par l'IL6 des HUVEC a été inhibée par la lutéoline et l'apigénine. Cette activité anti-angiogénique s'est montrée efficace au niveau de la prolifération, la migration ainsi que la formation tubulaire et s'effectue par une régulation négative de la voie IL6R/JAK 1-2/STAT3, où il a été observé une inhibition presque totale de l'activation de STAT3 en Y⁷⁰⁵. Étant donné que par l'alimentation il y a souvent des combinaisons de ces anthoxanthines, il serait intéressant d'observer leurs activités anti-

angiogéniques synergiques additives ou de potentialisation *in vivo* et *in vitro*. Une approche expérimentale *in vivo* serait cruciale pour supporter les affirmations de la présente recherche. Par exemple, l'utilisation d'un modèle de souris AIM/IL6 ayant été préalablement injectées de cellules tumorales humaines et traitées avec les phytochimiques Lut et Api pour ainsi en vérifier, après biopsie des tumeurs, la densité des microvaisseaux sanguins (MDV) par cytométrie et quantifier le pourcentage d'EC dans les tissus tumoraux (Baeten et al., 2002). Par leurs effets anti-angiogéniques et régulateurs de l'inflammation, ces deux polyphénols dérivant de l'alimentation représentent donc, de bons candidats thérapeutiques dans la prévention et le traitement de cancers associés à l'inflammation impliquant l'angiogenèse. Ainsi, comme le disait le père de la médecine, Hippocrate, sur l'alimentation «*Que ton aliment soit ton médicament et que ton aliment soit ton remède* » permet d'apprécier, considérant les connaissances médicales d'aujourd'hui, ce qui était connu il y a des milliers d'années et pouvant mettre en perspective certains problèmes des temps modernes.

RÉFÉRENCES

- ACS. 2011. The history of cancer. In American cancer society. [en direct] Février 2012 [Réf. 2011]. Disponible sur le World Wide Web <URL: www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>.
- Aggarwal, B.B., and P. Gehlot. 2009. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol* 9:351-369.
- Aggarwal, B.B., G. Sethi, K.S. Ahn, S.K. Sandur, M.K. Pandey, A.B. Kunnumakkara, B. Sung, and H. Ichikawa. 2006a. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci* 1091:151-169.
- Aggarwal, B.B., S. Shishodia, S.K. Sandur, M.K. Pandey, and G. Sethi. 2006b. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72:1605-1621.
- Aggarwal, B.B., and S. Shishodia. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 71:1397-1421.
- Allavena, P., and A. Mantovani. 2012. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical & Experimental Immunology* 167:195-205.
- Anilkumar, N., T. Uekita, J.R. Couchman, H. Nagase, M. Seiki, and Y. Itoh. 2005. Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. *FASEB J* 19:1326-1328.
- Annabi, B., C. Laflamme, A. Sina, M.P. Lachambre, and R. Béliveau. 2009. A MT1-MMP/NF-kappaB signalling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. *J Neuroinflammation* 6:8.
- Annabi, B., S. Thibeault, Y.T. Lee, N. Bousquet-Gagnon, N. Eliopoulos, S. Barrette, J. Galipeau, and R. Béliveau. 2003. Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp Hematol* 31:640-649.
- Ansó, E., A. Zuazo, M. Irigoyen, M.C. Urdaci, A. Rouzaut, and J.J. Martínez-Irujo. 2010. Flavonoids inhibit hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression by a HIF-1 independent mechanism. *Biochemical Pharmacology* 79:1600-1609.
- Auletta, J.J., R.J. Deans, and A.M. Bartholomew. 2012. Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. *Blood* 119:1801-1809.

- B. Linju Yen, M.-L.Y. 2008. mesenchymal stem cells and cancer - for better or for worse? *Journal of Cancer Molécule* 4:5-8.
- Babon, Jeffrey J., Nadia J. Kershaw, James M. Murphy, Leila N. Varghese, A. Laktyushin, Samuel N. Young, Isabelle S. Lucet, Raymond S. Norton, and Nicos A. Nicola. 2012. Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity. *Immunity* 36:239-250.
- Baeten CIM, Wagstaff J, Verhoeven ICL, Hillen HFP, Griffioen AW. 2002. *Br J Cancer* 87: 344-7
- Bagli, E., M. Stefanidou, L. Morbidelli, M. Ziche, K. Psillas, C. Murphy, and T. Fotsis. 2004. Luteolin Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis; Inhibition of Endothelial Cell Survival and Proliferation by Targeting Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activity. *Cancer Research* 64:7936-7946.
- Béliveau, R., D. Gingras, E.A. Kruger, S. Lamy, P. Sirois, B. Simard, M.G. Sirois, L. Tranqui, F. Baffert, É. Beaulieu, V. Dimitriadou, M.-C. Pépin, F. Courjal, I. Ricard, P. Poyet, P. Falardeau, W.D. Figg, and É. Dupont. 2002. The Antiangiogenic Agent Neovastat (Æ-941) Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Biological Effects. *Clinical Cancer Research* 8:1242-1250.
- Berdasco, M., and M. Esteller. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 19:698-711.
- Bergers, G., and L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-410.
- Bergers, G., and D. Hanahan. 2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8:592-603.
- Bergers, G., S. Song, N. Meyer-Morse, E. Bergsland, and D. Hanahan. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111:1287-1295.
- Berkow, M.H. 2000. Basics of geriatric care: Biology of aging. Merck manual of geriatrics. In Beers, Third edition (Whithouse Station, PA: Merck Research Laboratories), page 3
- Bergfeld, S.A., and Y.A. DeClerck. 2010. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29:249-261.
- Bertolotti, R., and K. Ozawa. 2008. Autologous and cancer stem cell gene therapy. World Scientific,

- Birnbaum, T., J. Roider, C.J. Schankin, C.S. Padovan, C. Schichor, R. Goldbrunner, and A. Straube. 2007. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol* 83:241-247.
- Bosch, A.L., and V. Felipo. 2003. New trends in cancer for the 21st century. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Bouffi, C., C. Bony, G. Courties, C. Jorgensen, and D. Noël. 2010. IL-6-Dependent PGE2 Secretion by Mesenchymal Stem Cells Inhibits Local Inflammation in Experimental Arthritis. *PLoS One* 5:e14247.
- Bromberg, J. 2002. Stat proteins and oncogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 109:1139-1142.
- Bromberg, J., and J.E. Darnell. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19:2468-2473.
- Byers, L.A., B. Sen, B. Saigal, L. Diao, J. Wang, M. Nanjundan, T. Cascone, G.B. Mills, J.V. Heymach, and F.M. Johnson. 2009. Reciprocal regulation of c-Src and STAT3 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 15:6852-6861.
- Calle, E.E., and M.J. Thun. 2004. Obesity and cancer. *Oncogene* 23:6365-6378.
- Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior. 1997. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22:749-760.
- Cao, Y., and R. Langer. 2008. A review of Judah Folkman's remarkable achievements in biomedicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:13203-13205.
- Capiralla, H., V. Vingtdeux, J. Venkatesh, U. Dreses-Werringloer, H. Zhao, P. Davies, and P. Marambaud. 2012. Identification of potent small-molecule inhibitors of STAT3 with anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Journal* n/a-n/a.
- Caplan, A.I., and J.E. Dennis. 1996. Mesenchymal stem cells: Progenitors, progeny, and pathways. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 14:193-201.
- Carmeliet, P., and R.K. Jain. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298-307.
- Cavallaro, U., and G. Christofori. 2004. Multitasking in tumor progression: signalling functions of cell adhesion molecules. *Ann NY Acad Sci* 1014:58-66.
- Cavallo, F., C. De Giovanni, P. Nanni, G. Forni, and P.L. Lollini. 2011. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 60:319-326.
- Celsus, A.C. 1838. *Traité de médecine*. Traduction par M. Gautret

- Chen, T., Li, X.-Y. Lu, H.-D. Jiang, and S. Zeng. 2006. Absorption and Excretion of Luteolin and Apigenin in Rats after Oral Administration of Chrysanthemum morifolium Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:273-277.
- Chen, X., L. Liu, Z. Sun, Y. Liu, J. Xu, S. Liu, B. Huang, L. Ma, Z. Yu, and K. Bi. 2010. Pharmacokinetics of luteolin and tetra-acetyl-luteolin assayed by HPLC in rats after oral administration. *Biomed Chromatogr* 24:826-832.
- Chen, Y., N.B. Nixon, P.T. Dawes, and D.L. Matthey. 2012. Influence of variations across the MMP-1 and -3 genes on the serum levels of MMP-1 and -3 and disease activity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 13:29-37.
- Chen, Z., and Z.C. Han. 2008. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Med Res Rev* 28:185-200.
- Chiba, Y., K. Goto, and M. Misawa. 2012. Interleukin-13-induced activation of signal transducer and activator of transcription 6 is mediated by an activation of Janus kinase 1 in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Rep* 64:454-458.
- Chung, J., E. Uchida, T.C. Grammer, and J. Blenis. 1997. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17:6508-6516.
- Closa, D., Y. Motoo, and J.L. Iovanna. 2007. Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine. *World J Gastroenterol* 13:170-174.
- Coker, M.L., J.R. Jolly, C. Joffs, T. Etoh, J.R. Holder, B.R. Bond, and F.G. Spinale. 2001. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H543-551.
- Condeelis, J., and J.W. Pollard. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-266.
- Corcione, A., F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G.L. Mancardi, V. Pistoia, and A. Uccelli. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107:367-372.
- D'Alessio, S., G. Ferrari, K. Cinnante, W. Scheerer, A.C. Galloway, D.F. Roses, D.V. Rozanov, A.G. Remale, E.S. Oh, S.A. Shiryayev, A.Y. Strongin, G. Pintucci, and P. Mignatti. 2008. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism. *J Biol Chem* 283:87-99.
- Dai, L.J., M.R. Moniri, Z.R. Zeng, J.X. Zhou, J. Rayat, and G.L. Warnock. 2011. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer Lett* 305:8-20.

- Dalwadi, H., K. Krysan, N. Heuze-Vourc'h, M. Dohadwala, D. Elashoff, S. Sharma, N. Cacalano, A. Lichtenstein, and S. Dubinett. 2005. Cyclooxygenase-2-dependent activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11:7674-7682.
- Davoodi-Semiromi, A., C.H. Wasserfall, C.Q. Xia, R.M. Cooper-DeHoff, M. Wabitsch, M. Clare-Salzler, and M. Atkinson. 2012. The tyrphostin agent AG490 prevents and reverses type 1 diabetes in NOD mice. *PLoS One* 7:e36079.
- de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews. Cancer* 6:24-37.
- Dechow, T.N., L. Pedrazzini, A. Leitch, K. Leslie, W.L. Gerald, I. Linkov, and J.F. Bromberg. 2004. Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10602-10607.
- DeVita, V.T., T.S. Lawrence, and S.A. Rosenberg. 2008. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Dreesen, O., and A.H. Brivanlou. 2007. Signalling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* 3:7-17.
- Dvorak, H.F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650-1659.
- Dwyer, R.M., S.M. Potter-Beirne, K.A. Harrington, A.J. Lowery, E. Hennessy, J.M. Murphy, F.P. Barry, T. O'Brien, and M.J. Kerin. 2007. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res* 13:5020-5027.
- Eder, K., N. Baffy, A. Falus, and A. Fulop. 2009. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation Research* 58:727-736.
- Efeyan, A., and M. Serrano. 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6:1006-1010.
- Eisenach, P.A., C. Roghi, M. Fogarasi, G. Murphy, and W.R. English. 2010. MT1-MMP regulates VEGF-A expression through a complex with VEGFR-2 and Src. *J Cell Sci* 123:4182-4193.
- Ende, C., and R. Gebhardt. 2004. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med* 70:1006-1008.

- Evans, A.M. 2000. Influence of Dietary Components on the Gastrointestinal Metabolism and Transport of Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring* 22:131-136.
- Fan, T.P., J.C. Yeh, K.W. Leung, P.Y. Yue, and R.N. Wong. 2006. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends Pharmacol Sci* 27:297-309.
- Fang, J., Q. Zhou, L.Z. Liu, C. Xia, X. Hu, X. Shi, and B.H. Jiang. 2007. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression. *Carcinogenesis* 28:858-864.
- Feng, B., and L. Chen. 2009. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm* 24:717-721.
- Feron, O. 2009. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 92:329-333.
- Ferrara, N. 2010. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21:21-26.
- Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-676.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.
- Folkman, J. 1999. Angiogenesis research: from laboratory to clinic. *Forum (Genova)* 9:59-62.
- Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams. 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133:275-288.
- Fortier, S., M. Touaibia, S. Lord-Dufour, J. Galipeau, R. Roy, and B. Annabi. 2008. Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology* 18:195-204.
- Frank, T., M. Netzel, G. Strass, R. Bitsch, and I. Bitsch. 2003. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Can J Physiol Pharmacol* 81:423-435.
- Fujita, S., M. Watanabe, T. Kubota, T. Teramoto, and M. Kitajima. 1995. Alteration of expression in integrin β 1-subunit correlates with invasion and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Letters* 91:145-149.
- Gabay, C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2:S3.

- Galderisi, U., A. Giordano, and M.G. Paggi. 2010. The bad and the good of mesenchymal stem cells in cancer: Boosters of tumor growth and vehicles for targeted delivery of anticancer agents. *World J Stem Cells* 2:5-12.
- Gao, H., W. Priebe, J. Glod, and D. Banerjee. 2009. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium. *Stem Cells* 27:857-865.
- Gao, S.P., and J.F. Bromberg. 2006. Touched and moved by STAT3. *Sci STKE* 2006:pe30.
- Georgiou, N.A., J. Garssen, and R.F. Witkamp. 2011. Pharma–nutrition interface: The gap is narrowing. *European Journal of Pharmacology* 651:1-8.
- Gimbrone, M.A., Jr., S.B. Leapman, R.S. Cotran, and J. Folkman. 1972. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 136:261-276.
- Gingras, D., and R. Béliveau. 2010. Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803:142-150.
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M.P. Lachambre, B. Annabi, and R. Béliveau. 2001. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* 507:231-236.
- Gingras, D., M. Michaud, G. Di Tomasso, E. Béliveau, C. Nyalendo, and R. Béliveau. 2008. Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells. *FEBS Lett* 582:399-404.
- Giuliani, M., N. Oudrhiri, Z.M. Noman, A. Vernochet, S. Chouaib, B. Azzarone, A. Durrbach, and A. Bennaceur-Griscelli. 2011. Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood* 118:3254-3262.
- Goodsell, D.S. 2000. The Molecular Perspective: Cyclooxygenase-2. *The Oncologist* 5:169-171.
- Gordon, M.S., D.S. Mendelson, and G. Kato. 2010. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. *International Journal of Cancer* 126:1777-1787.
- Goss, K.H., and M. Kahn. 2011. Targeting the Wnt Pathway in Cancer. Springer
- Gradolatto, A., J.P. Basly, R. Berges, C. Teyssier, M.C. Chagnon, M.H. Siess, and M.C. Canivenc-Lavier. 2005. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab Dispos* 33:49-54.

- Gray, M.J., J. Zhang, L.M. Ellis, G.L. Semenza, D.B. Evans, S.S. Watowich, and G.E. Gallick. 2005. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 24:3110-3120.
- Greaves, M., and C.C. Maley. 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481:306-313.
- Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G.-Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann, and M. Karin. 2009. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer cell* 15:103-113.
- Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883-899.
- Gupta, G.P., and J. Massague. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679-695.
- Gupta, S.C., J.H. Kim, S. Prasad, and B.B. Aggarwal. 2010. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev* 29:405-434.
- Han, C., A.J. Demetris, D.B. Stolz, L. Xu, K. Lim, and T. Wu. 2006. Modulation of Stat3 activation by the cytosolic phospholipase A2alpha and cyclooxygenase-2-controlled prostaglandin E2 signalling pathway. *J Biol Chem* 281:24831-24846.
- Han, X., T. Shen, and H. Lou. 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8:950-988.
- Hanahan, D., and J. Folkman. 1996. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Hansen-Petrik, M.B., M.F. McEntee, B. Jull, H. Shi, M.B. Zemel, and J. Whelan. 2002. Prostaglandin E(2) protects intestinal tumors from nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced regression in Apc(Min/+) mice. *Cancer Res* 62:403-408.
- Hata, A.N., and R.M. Breyer. 2004. Pharmacology and signalling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 103:147-166.
- Hayflick, L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62:1180-1190.

- Hayflick, L., and P.S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
- Heimberger, A.B., and W. Priebe. 2008. Small molecular inhibitors of p-STAT3: novel agents for treatment of primary and metastatic CNS cancers. *Recent Pat CNS Drug Discov* 3:179-188.
- Hillion, J., S. Dhara, T.F. Sumter, M. Mukherjee, F. Di Cello, A. Belton, J. Turkson, S. Jaganathan, L. Cheng, Z. Ye, R. Jove, P. Aplan, Y.W. Lin, K. Wertzler, R. Reeves, O. Elbahlouh, J. Kowalski, R. Bhattacharya, and L.M. Resar. 2008. The high-mobility group A1a/signal transducer and activator of transcription-3 axis: an achilles heel for hematopoietic malignancies? *Cancer Res* 68:10121-10127.
- Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19:2548-2556.
- Hodge, D.R., E.M. Hurt, and W.L. Farrar. 2005. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41:2502-2512.
- Hong, R.L., W.H. Spohn, and M.C. Hung. 1999. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. *Clin Cancer Res* 5:1884-1891.
- Houghton, J., C. Stoicov, S. Nomura, A.B. Rogers, J. Carlson, H. Li, X. Cai, J.G. Fox, J.R. Goldenring, and T.C. Wang. 2004. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306:1568-1571.
- Hsu, P.P., and D.M. Sabatini. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134:703-707.
- Huang, S.-P., M.-S. Wu, C.-T. Shun, H.-P. Wang, M.-T. Lin, M.-L. Kuo, and J.-T. Lin. 2004. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *Journal of Biomedical Science* 11:517-527.
- Huang, S. 2007. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signalling pathway: clinical implications. *Clin Cancer Res* 13:1362-1366.
- Ikeda, U., M. Ikeda, T. Oohara, A. Oguchi, T. Kamitani, Y. Tsuruya, and S. Kano. 1991. Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol* 260:H1713-1717.
- Ingham, P.W., and A.P. McMahon. 2001. Hedgehog signalling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059-3087.

- Itoh, Y., and M. Seiki. 2004. MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation. *Trends Biochem Sci* 29:285-289.
- Itoh, Y., and M. Seiki. 2006. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol* 206:1-8.
- Jaccoud, S. 1875. Nouveau dictionnaire de médecine et de chirurgie pratiques. J.B. Baillière.
- Jackson, J.R., M.P. Seed, C.H. Kircher, D.A. Willoughby, and J.D. Winkler. 1997. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 11:457-465.
- Jasmin, J.-F., I. Mercier, F. Sotgia, and M.P. Lisanti. 2006. SOCS proteins and caveolin-1 as negative regulators of endocrine signalling. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17:150-158.
- Jee, S.H., C.Y. Chu, H.C. Chiu, Y.L. Huang, W.L. Tsai, Y.H. Liao, and M.L. Kuo. 2004. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol* 123:1169-1175.
- Jing, N., and D.J. Tweardy. 2005. Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 16:601-607.
- Jo, D., D. Liu, S. Yao, R.D. Collins, and J. Hawiger. 2005. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med* 11:892-898.
- Jung, J.E., H.G. Lee, I.H. Cho, D.H. Chung, S.H. Yoon, Y.M. Yang, J.W. Lee, S. Choi, J.W. Park, S.K. Ye, and M.H. Chung. 2005. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J* 19:1296-1298.
- Jung, T., W. Gross, and M. Zoller. 2011. CD44v6 coordinates tumor matrix-triggered motility and apoptosis resistance. *J Biol Chem* 286:15862-15874.
- Karin, M., and F.R. Greten. 2005. NF-[kappa]B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5:749-759.
- Karnoub, A.E., A.B. Dash, A.P. Vo, A. Sullivan, M.W. Brooks, G.W. Bell, A.L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, and R.A. Weinberg. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557-563.
- Kerbel, R.S., and B.A. Kamen. 2004. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 4:423-436.

- Kim, D.H., E.A. Jung, I.S. Sohng, J.A. Han, T.H. Kim, and M.J. Han. 1998. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res* 21:17-23.
- Kisseleva, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein, and C.W. Schindler. 2002. Signalling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285:1-24.
- Korutla, L., and R. Kumar. 1994. Inhibitory effect of curcumin on epidermal growth factor receptor kinase activity in A431 cells. *Biochim Biophys Acta* 1224:597-600.
- Kortylewski, M., H. Xin, M. Kujawski, H. Lee, Y. Liu, T. Harris, C. Drake, D. Pardoll, and H. Yu. 2009. Regulation of the IL-23 and IL-12 Balance by Stat3 Signalling in the Tumor Microenvironment. *Cancer cell* 15:114-123.
- Kovacic, J.C., R. Gupta, A.C. Lee, M. Ma, F. Fang, C.N. Tolbert, A.D. Walts, L.E. Beltran, H. San, G. Chen, C. St Hilaire, and M. Boehm. 2010. Stat3-dependent acute Rantes production in vascular smooth muscle cells modulates inflammation following arterial injury in mice. *J Clin Invest* 120:303-314.
- Krauss, G. 2008. Biochemistry of signal transduction and regulation. Wiley-VCH.
- Kuper, H., H.O. Adami, and D. Trichopoulos. 2000. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 248:171-183.
- Labrecque, L., S. Lamy, A. Chapus, S. Mihoubi, Y. Durocher, B. Cass, M.W. Bojanowski, D. Gingras, and R. Béliveau. 2005. Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. *Carcinogenesis* 26:821-826.
- Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras, and R. Béliveau. 2004. Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 279:52132-52140.
- Lamy, S., N. Akla, A. Ouanouki, S. Lord-Dufour, and R. Béliveau. 2012. Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway. *Experimental Cell Research* 318 (13):1586-1596.
- Lamy, S., E. Beaulieu, D. Labbe, V. Bedard, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras, and R. Béliveau. 2008a. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signalling. *Carcinogenesis* 29:1033-1041.
- Lamy, S., V. Bedard, D. Labbe, H. Sartelet, C. Barhomeuf, D. Gingras, and R. Beliveau. 2008b. The dietary flavones apigenin and luteolin impair smooth muscle cell migration and VEGF expression through inhibition of PDGFR-beta phosphorylation. *Cancer Prev Res (Phila)* 1:452-459.

- Lamy, S., M. Blanchette, J. Michaud-Levesque, R. Lafleur, Y. Durocher, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras, and R. Béliveau. 2006. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis* 27:989-996.
- Lanza, R.P. 2004. Handbook of Stem Cells. Elsevier Academic, page 212-214
- Larrosa, M., C. Luceri, E. Vivoli, C. Pagliuca, M. Lodovici, G. Moneti, and P. Dolaro. 2009. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular Nutrition & Food Research* 53:1044-1054.
- Lawrence, H.S., and F.T. Valentine. 1970. Transfer factor and other mediators of cellular immunity. *Am J Pathol* 60:437-452.
- Lazebnik, Y. 2010. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 10:232-233.
- Le Blanc, K., F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M.E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R.M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, and O. Ringden. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371:1579-1586.
- Lee, H., A. Herrmann, J.H. Deng, M. Kujawski, G. Niu, Z. Li, S. Forman, R. Jove, D.M. Pardoll, and H. Yu. 2009a. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer cell* 15:283-293.
- Lee, J.L., M.J. Wang, and J.Y. Chen. 2009b. Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44. *J Cell Biol* 185:949-957.
- Lee, M.-J., P. Maliakal, L. Chen, X. Meng, F.Y. Bondoc, S. Prabhu, G. Lambert, S. Mohr, and C.S. Yang. 2002. Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 11:1025-1032.
- Lehti, K., J. Lohi, H. Valtanen, and J. Keski-Oja. 1998. Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface. *Biochem J* 334 (Pt 2):345-353.
- Lei, F., D.-M. Xing, L. Xiang, Y.-N. Zhao, W. Wang, L.-J. Zhang, and L.-J. Du. 2003. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *Journal of Chromatography B* 796:189-194.
- Levy, D.E., and C.-k. Lee. 2002. What does Stat3 do? *The Journal of Clinical Investigation* 109:1143-1148.

- Li, N., Sergei I. Grivennikov, and M. Karin. 2011. The Unholy Trinity: Inflammation, Cytokines, and STAT3 Shape The Cancer Microenvironment. *Cancer cell* 19:429-431.
- Lim, C.P., and X. Cao. 2001. Regulation of Stat3 activation by MEK kinase 1. *J Biol Chem* 276:21004-21011.
- Lin, W.W., and M. Karin. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117:1175-1183.
- Liu, Y., Z.-p. Han, S.-s. Zhang, Y.-y. Jing, X.-x. Bu, C.-y. Wang, K. Sun, G.-c. Jiang, X. Zhao, R. Li, L. Gao, Q.-d. Zhao, M.-c. Wu, and L.-x. Wei. 2011. Effects of Inflammatory Factors on Mesenchymal Stem Cells and Their Role in the Promotion of Tumor Angiogenesis in Colon Cancer. *Journal of Biological Chemistry* 286:25007-25015.
- Lo, H.W., X. Cao, H. Zhu, and F. Ali-Osman. 2010. Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signalling axes. *Mol Cancer Res* 8:232-245.
- Loges, S., T. Schmidt, and P. Carmeliet. 2010. Mechanisms of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy and Development of Third-Generation Anti-Angiogenic Drug Candidates. *Genes & Cancer* 1:12-25.
- Lu, C., X.Y. Li, Y. Hu, R.G. Rowe, and S.J. Weiss. 2010. MT1-MMP controls human mesenchymal stem cell trafficking and differentiation. *Blood* 115:221-229.
- Luo, C., and P. Laaja. 2004. Inhibitors of JAKs/STATs and the kinases: a possible new cluster of drugs. *Drug Discov Today* 9:268-275.
- Luo, J.L., H. Kamata, and M. Karin. 2005. IKK/NF-kappaB signalling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 115:2625-2632.
- Luo, P., Z. Zhang, T. Yi, H. Zhang, X. Liu, and Z. Mo. 2008. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology* 119:232-237.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, and L. Jimenez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727-747.
- Manton, K.G., I. Akushevich, and J. Kravchenko. 2009. Cancer Mortality and Morbidity Patterns in the U.S. Population: An Interdisciplinary Approach. Springer.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444.
- Markowitz, S.D., and A.B. Roberts. 1996. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:93-102.

- Martey, C.A., S.J. Pollock, C.K. Turner, K.M. O'Reilly, C.J. Baglole, R.P. Phipps, and P.J. Sime. 2004. Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L981-991.
- Martin, S., L. Favot, R. Matz, C. Lugnier, and R. Andriantsitohaina. 2003. Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2. *Biochem Pharmacol* 65:669-675.
- McAdam, B.F., F. Catella-Lawson, I.A. Mardini, S. Kapoor, J.A. Lawson, and G.A. FitzGerald. 1999. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:272-277.
- Michaud-Levesque, J., N. Bousquet-Gagnon, and R. Beliveau. 2012. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Exp Cell Res* 318(8):925-35
- Moss, N.M., Y. Liu, J.J. Johnson, P. Debiase, J. Jones, L.G. Hudson, H.G. Munshi, and M.S. Stack. 2009. Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Endocytosis Regulates the Transition between Invasive versus Expansive Growth of Ovarian Carcinoma Cells in Three-Dimensional Collagen. *Molecular Cancer Research* 7:809-820.
- Mossman, B.T., D.W. Kamp, and S.A. Weitzman. 1996. Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers. *Cancer Invest* 14:466-480.
- Mustelin, T., T. Vang, and N. Bottini. 2005. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol* 5:43-57.
- Nakao, S., Y. Ogtata, E. Shimizu, M. Yamazaki, S. Furuyama, and H. Sugiya. 2002. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 238:11-18.
- Natarajan, C., and J.J. Bright. 2002. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol* 168:6506-6513.
- Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:220-228.
- Newman, D.J., and G.M. Cragg. 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* 70:461-477.

- Newman, D.J., and G.M. Cragg. 2012. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75:311-335.
- Newman, R.E., D. Yoo, M.A. LeRoux, and A. Danilkovitch-Miagkova. 2009. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8:110-123.
- Nickoloff, B.J., Y. Ben-Neriah, and E. Pikarsky. 2005. Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? *J Invest Dermatol* 124:x-xiv.
- Niu, G., K.L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L.M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, and H. Yu. 2002. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21:2000-2008.
- Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras, and R. Beliveau. 2007. Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem* 282:15690-15699.
- Nyalendo, C., H. Sartelet, S. Barrette, S. Ohta, D. Gingras, and R. Beliveau. 2009. Identification of membrane-type 1 matrix metalloproteinase tyrosine phosphorylation in association with neuroblastoma progression. *BMC Cancer* 9:422.
- Nyalendo, C., H. Sartelet, D. Gingras, and R. Béliveau. 2010. Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase tyrosine phosphorylation blocks tumor progression in mice. *Anticancer Res* 30:1887-1895.
- O'Sullivan, L.A., C. Liongue, R.S. Lewis, S.E. Stephenson, and A.C. Ward. 2007. Cytokine receptor signalling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 44:2497-2506.
- OMS. 2008. Le nombre de cas de cancer augmente-t-il ou diminue-t-il dans le monde? In [en direct] Janvier 2012 [Réf. du 4 avril 2008]. Disponible sur le World Wide Web <URL: www.who.int/features/qa/15/fr/index.html>.
- Onguchi, T., K.Y. Han, J.H. Chang, and D.T. Azar. 2009. Membrane type-1 matrix metalloproteinase potentiates basic fibroblast growth factor-induced corneal neovascularization. *Am J Pathol* 174:1564-1571.
- Oswald, J., S. Boxberger, B. Jorgensen, S. Feldmann, G. Ehninger, M. Bornhauser, and C. Werner. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22:377-384.
- Pagé, M. 1984. Le cancer, maladie de la vie. Presses de l'Université du Québec.

- Parker-Athill, E., D. Luo, A. Bailey, B. Giunta, J. Tian, R.D. Shytle, T. Murphy, G. Legradi, and J. Tan. 2009. Flavonoids, a prenatal prophylaxis via targeting JAK2/STAT3 signaling to oppose IL-6/MIA associated autism. *J Neuroimmunol* 217:20-27.
- Peek, R.M., Jr., and J.E. Crabtree. 2006. Helicobacter infection and gastric neoplasia. *J Pathol* 208:233-248.
- Pervan, V., L.H. Cohen, and T. Jaftha. 1995. *Oncology for Health-Care Professionals*. Juta Academic.
- Proulx-Bonneau, S., J. Pratt, and B. Annabi. 2011. A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. *J Neurooncol* 104:33-43.
- Pugh, C.W., and P.J. Ratcliffe. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9:677-684.
- Radichev, I.A., A.G. Remacle, S.A. Shiryayev, A.N. Purves, S.L. Johnson, M. Pellecchia, and A.Y. Strongin. 2010. Biochemical characterization of the cellular glycosylphosphatidylinositol-linked membrane type-6 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 285:16076-16086.
- Ramos, S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 52:507-526.
- Reddy, S., and B.B. Aggarwal. 1994. Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Lett* 341:19-22.
- Riaud, X., L.P. Fischer, and A. Fabre. 2010. *De grands medecins meconnus*. L'Harmattan.
- Ries, C., V. Egea, M. Karow, H. Kolb, M. Jochum, and P. Neth. 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109:4055-4063.
- Robak, T., A. Wierzbowska, M. Blasinska-Morawiec, A. Korycka, and J.Z. Blonski. 1999. Serum levels of IL-6 type cytokines and soluble IL-6 receptors in active B-cell chronic lymphocytic leukemia and in cladribine induced remission. *Mediators Inflamm* 8:277-286.
- Robert, J. 2010. *Signalisation Cellulaire Et Cancer: Un Manuel Pour les Etudiants Et les Oncologues*. Springer.
- Rouzer, C.A., and L.J. Marnett. 2009. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research* 50:S29-S34.

- Rundhaug, J.E. 2005. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9:267-285.
- Sakurai, A., C. Doci, and J.S. Gutkind. 2012. Semaphorin signalling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. *Cell Res* 22:23-32.
- Santangelo, C., R. Vari, B. Scazzocchio, R. Di Benedetto, C. Filesi, and R. Masella. 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 43:394-405.
- Scalbert, A., and G. Williamson. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073S-2085S.
- Schindler, C., D.E. Levy, and T. Decker. 2007. JAK-STAT Signalling: From Interferons to Cytokines. *Journal of Biological Chemistry* 282:20059-20063.
- Schneider, D.T., I.B. Brecht, T.A. Olson, and A. Ferrari. 2012. Rare Tumors in Children and Adolescents. Springer London, Limited.
- Schuerwegh AJ, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. 2001. *Cytometry* 46: 172-6
- Schwab, M. 2001. Encyclopedic Reference of Cancer. Springer.
- Selvendiran, K., H. Koga, T. Ueno, T. Yoshida, M. Maeyama, T. Torimura, H. Yano, M. Kojiro, and M. Sata. 2006. Luteolin Promotes Degradation in Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Human Hepatoma Cells: An Implication for the Antitumor Potential of Flavonoids. *Cancer Research* 66:4826-4834.
- Shimoi, K., N. Saka, R. Nozawa, M. Sato, I. Amano, T. Nakayama, and N. Kinae. 2001. Deglucuronidation of a Flavonoid, Luteolin Monoglucuronide, during Inflammation. *Drug Metabolism and Disposition* 29:1521-1524.
- Shodeinde, A.L., and B.E. Barton. 2012. Potential use of STAT3 inhibitors in targeted prostate cancer therapy: future prospects. *Onco Targets Ther* 5:119-125.
- Shuai, K., and B. Liu. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3:900-911.
- Siemann, D.W. 2011. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treatment Reviews* 37:63-74.
- Sina, A., S. Proulx-Bonneau, A. Roy, L. Poliquin, J. Cao, and B. Annabi. 2010. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway. *J Cell Commun Signal* 4:31-38.

- Solinas, G., G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86:1065-1073.
- Sounni, N.E., L. Devy, A. Hajitou, F. Frankenke, C. Munaut, C. Gilles, C. Deroanne, E.W. Thompson, J.M. Foidart, and A. Noel. 2002. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J* 16:555-564.
- Spaeth, E.L., J.L. Dembinski, A.K. Sasser, K. Watson, A. Klopp, B. Hall, M. Andreeff, and F. Marini. 2009. Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *PLoS One* 4:e4992.
- Stagg, J. 2008. Mesenchymal stem cells in cancer. *Stem Cell Rev* 4:119-124.
- Studeny, M., F.C. Marini, R.E. Champlin, C. Zompetta, I.J. Fidler, and M. Andreeff. 2002. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62:3603-3608.
- Su, J.L., K.P. Lai, C.A. Chen, C.Y. Yang, P.S. Chen, C.C. Chang, C.H. Chou, C.L. Hu, M.L. Kuo, C.Y. Hsieh, and L.H. Wei. 2005. A novel peptide specifically binding to interleukin-6 receptor (gp80) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 65:4827-4835.
- Sun, B., K.H. Roh, J.R. Park, S.R. Lee, S.B. Park, J.W. Jung, S.K. Kang, Y.S. Lee, and K.S. Kang. 2009. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model. *Cytotherapy* 11:289-298, 281 p following 298.
- Sun, X.Y., J. Nong, K. Qin, G.L. Warnock, and L.J. Dai. 2011. Mesenchymal stem cell-mediated cancer therapy: A dual-targeted strategy of personalized medicine. *World J Stem Cells* 3:96-103.
- Sverdlov, M., A.N. Shajahan, and R.D. Minshall. 2007. Tyrosine phosphorylation-dependence of caveolae-mediated endocytosis. *J Cell Mol Med* 11:1239-1250.
- Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3801-3804.
- Tang, H., T. Nishishita, T. Fitzgerald, E.J. Landon, and T. Inagami. 2000. Inhibition of AT1 Receptor Internalization by Concanavalin A Blocks Angiotensin II-induced ERK Activation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* 275:13420-13426.

- Tili, E., J.J. Michaille, D. Wernicke, H. Alder, S. Costinean, S. Volinia, and C.M. Croce. 2011. Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4908-4913.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno, and M. Seiki. 2001. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol* 155:1345-1356.
- Vandaele, S. 2006. Le masque de la banalité: le champ sémantique de l'évaluation thérapeutique. In Bulletin terminologique de l'industrie pharmaceutique.
- Verbeek, R., A.C. Plomp, E.A. van Tol, and J.M. van Noort. 2004. The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem Pharmacol* 68:621-629.
- Vij, N., A. Sharma, M. Thakkar, S. Sinha, and R.R. Mohan. 2008. PDGF-driven proliferation, migration, and IL8 chemokine secretion in human corneal fibroblasts involve JAK2-STAT3 signalling pathway. *Mol Vis* 14:1020-1027.
- Vona-Davis, L., and D.P. Rose. 2009. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:193-201.
- Wang, D., and R.N. Dubois. 2006. Prostaglandins and cancer. *Gut* 55:115-122.
- Wang, D., H. Wang, Q. Shi, S. Katkuri, W. Walhi, B. Desvergne, S.K. Das, S.K. Dey, and R.N. DuBois. 2004. Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer cell* 6:285-295.
- Wang, M., W. Zhang, P. Crisostomo, T. Markel, K.K. Meldrum, X.Y. Fu, and D.R. Meldrum. 2007. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production. *J Mol Cell Cardiol* 42:1009-1015.
- Wang, X., and R.D. Klein. 2007. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor secretion in prostate cancer cells through EP2 receptor-mediated cAMP pathway. *Mol Carcinog* 46:912-923.
- Wang, Z., Z. Kang, Y. Zhang, W. Tse, and K.D. Bunting. 2012. Mutation of STAT1/3 binding sites in gp130(FXXQ) knock-in mice does not alter hematopoietic stem cell repopulation or self-renewal potential. *Am J Stem Cells* 1:146-153.
- Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein. 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 8:519-530.

- Welte, T., S.S.M. Zhang, T. Wang, Z. Zhang, D.G.T. Hesslein, Z. Yin, A. Kano, Y. Iwamoto, E. Li, J.E. Craft, A.L.M. Bothwell, E. Fikrig, P.A. Koni, R.A. Flavell, and X.-Y. Fu. 2003. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: A critical role of STAT3 in innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:1879-1884.
- Williams, C.S., and R.N. DuBois. 1996. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270:G393-400.
- Xie, T.-x., D. Wei, M. Liu, A.C. Gao, F. Ali-Osman, R. Sawaya, and S. Huang. 2004. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23:3550-3560.
- Yang, J., X. Liao, M.K. Agarwal, L. Barnes, P.E. Auron, and G.R. Stark. 2007. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev* 21:1396-1408.
- Yang, L., L. Wang, H.K. Lin, P.Y. Kan, S. Xie, M.Y. Tsai, P.H. Wang, Y.T. Chen, and C. Chang. 2003. Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305:462-469.
- Yang, Y., Z. Shi, A. Reheman, J.W. Jin, C. Li, Y. Wang, M.C. Andrews, P. Chen, G. Zhu, W. Ling, and H. Ni. 2012. Plant Food Delphinidin-3-Glucoside Significantly Inhibits Platelet Activation and Thrombosis: Novel Protective Roles against Cardiovascular Diseases. *PLoS One* 7:e37323.
- Yasukawa, H., M. Ohishi, H. Mori, M. Murakami, T. Chinen, D. Aki, T. Hanada, K. Takeda, S. Akira, M. Hoshijima, T. Hirano, K.R. Chien, and A. Yoshimura. 2003. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 4:551-556.
- Yoon, S., S.U. Woo, J.H. Kang, K. Kim, H.J. Shin, H.S. Gwak, S. Park, and Y.J. Chwae. 2011. NF-kappaB and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells. *Oncogene* .
- Yoshimura, A. 2009. Regulation of cytokine signalling by the SOCS and Spred family proteins. *Keio J Med* 58:73-83.
- Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7:454-465.
- Yoshimura, A., H. Nishinakamura, Y. Matsumura, and T. Hanada. 2005. Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Research & Therapy* 7:100 - 110.
- Yoshimura, A., and H. Yasukawa. 2012. JAK's SOCS: A Mechanism of Inhibition. *Immunity* 36:157-159.

- Yu, H., and R. Jove. 2004. The STATs of cancer [mdash] new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4:97-105.
- Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9:798-809.
- Yu, M., E.T. Bowden, J. Sitlani, H. Sato, M. Seiki, S.C. Mueller, and E.W. Thompson. 1997. Tyrosine phosphorylation mediates ConA-induced membrane type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 57:5028-5032.
- Yuan, Z.L., Y.J. Guan, D. Chatterjee, and Y.E. Chin. 2005. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 307:269-273.
- Yue, P., X. Zhang, D. Paladino, B. Sengupta, S. Ahmad, R.W. Holloway, S.B. Ingersoll, and J. Turkson. 2011. Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signalling promote enhanced colony-forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene*.
- Zischek, C., H. Niess, I. Ischenko, C. Conrad, R. Huss, K.W. Jauch, P.J. Nelson, and C. Bruns. 2009. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 250:747-753.
- Zitvogel, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, and G. Kroemer. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8:59-73.