

Université de Montréal

**Impact des cavines sur le phénotype invasif et
inflammatoire des cellules souches mésenchymateuses**

par

Bayader Annabi

Département de physiologie moléculaire et intégrative
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de MSc
en Physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Janvier 2016

© Bayader Annabi, 2016

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Impact des cavines sur le phénotype invasif et inflammatoire des cellules souches
mésenchymateuses

Présenté par :
Bayader Annabi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Réjean Couture, président-rapporteur
Borhane Annabi, directeur de recherche
Marc Lussier, membre du jury

Résumé

L'évolution d'une cellule tumorale initiée à une tumeur solide nécessite, à chaque étape, un microenvironnement favorable à sa survie et à sa croissance. Le microenvironnement tumoral est comparé à un foyer d'inflammation chronique dont la composition cellulaire et moléculaire est complexe. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) représentent l'un des principaux acteurs cellulaires présents. Elles migrent vers les sites tumoraux où elles soutiennent l'inflammation, l'angiogenèse et le développement tumoral en activant plusieurs voies de signalisation. Une des voies majeures qui contribuent à l'inflammation est la voie de signalisation NF- κ B. L'initiation de cette voie provient de la membrane cellulaire entre autres des cavéoles. Nous soumettons l'hypothèse que l'une des cavines, protéines associées aux cavéoles, modulerait le phénotype inflammatoire et/ou migratoire dans les CSM traitées à la cytokine TNF- α (facteur de nécrose tumorale α) en modulant la voie de signalisation NF- κ B. En effet, nous avons observé une régulation à la hausse de l'expression de la COX-2 (cyclooxygénase-2) et une diminution de l'expression d'I κ B qui sont synonymes de l'activation de la voie NF- κ B dans les CSM que nous avons traitées au TNF- α . Nous avons trouvé que le TNF- α induit la migration des CSM, et que la répression génique de la Cavine-2 augmente significativement la migration des CSM traitées par le TNF- α . La répression génique de la Cavine-2 vient aussi amplifier la tubulogenèse dans les CSM en réponse au TNF- α . D'un point de vue moléculaire, la répression génique de la Cavine-2 a montré une très forte amplification de l'expression protéique de la COX-2 dans les CSM en réponse au TNF- α . Dans ces mêmes cellules où la Cavine-2 a été réprimée, et suite à un traitement au TNF- α , le pic de phosphorylation est plus intense et la courbe de phosphorylation est plus prolongée dans le temps. Ces observations nous permettent d'affirmer que la Cavine-2 a un rôle répresseur sur l'expression de COX-2. Collectivement, nos résultats montrent que la Cavine-2 peut être proposée comme un gène suppresseur de tumeur et est de ce fait, une bonne cible thérapeutique dans les CSM qui permettraient d'agir à des stades précoces du développement tumoral.

Mots-clés : Cellules souches mésenchymateuses, cavines, inflammation, migration, TNF- α , COX-2, NF- κ B

Abstract

The evolution of an initiated tumor cell into a solid tumor requires at each stage a favorable microenvironment for its survival and growth. The tumor microenvironment is compared to a chronic inflammation site with a cellular and molecular complex composition. Mesenchymal stem cells (MSC) have important roles in tumor microenvironment. They migrate to tumor sites where they maintain the inflammation, angiogenesis and tumor development by activating multiple signaling pathways. One of the major pathways that contribute to inflammation is the NF- κ B signaling pathway. The initiation of this pathway comes from the cell membrane and caveolae. Our hypothesis is that one of cavins, proteins associated to caveolae, modulates the inflammatory phenotype and migration in MSC treated with TNF- α . We suggest that this process is modulated by a NF- κ B signaling pathway. Indeed, we observed an up-regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 (COX-2) and a decrease in the expression of I κ B which suggest that activation of the NF- κ B pathway is involved in the MSC treated with TNF. We found that the TNF- α induced migration in the MSC, and the knockout of Cavin-2 significantly increased migration of MSC treated with TNF- α . The silencing of Cavin-2 considerably increased tubulogenesis of MSC treated with TNF- α . At the molecular level, knockout of Cavin-2 showed a very strong amplification of protein expression of COX-2 in the MSC in response to TNF- α . In these same cells where Cavin-2 was repressed and treated with TNF- α , the peak of phosphorylation of pI κ B is more intense and the phosphorylation curve is sustained in time. These observations allow us to assert that Cavin-2 has a repressing role on the expression of COX-2. Collectively, our results show that the gene encoding Cavin-2 can be proposed as tumor suppressor gene. This study allowed us to identify new therapeutic targets: Cavins proteins.

Keywords : Mesenchymal stem cells, cavins, inflammation, migration, TNF- α , COX-2, NF- κ B

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	Erreur ! Signet non défini.
Liste des abréviations	vi
Chapitre1 –Introduction	1
1. Le cancer	2
1.1. Définition et statistiques	2
1.2. La cancérogenèse	2
1.3. La migration cellulaire	4
1.4. Angiogenèse tumorale	6
1.5. Inflammation et cancer	8
1.5.1. Les cytokines	11
1.5.1.1 Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α)	11
1.5.2. Voie de signalisation du NF- κ B induite par le TNF α	13
2. Les cellules souches	16
2.1. Définition	16
2.2. Classification	16
2.2.1. Selon le potentiel de différenciation	16
2.2.2. Selon l'origine	17
2.3. Les cellules souches mésenchymateuses	19
2.3.1. Définition	19
2.3.2. Cellules souches mésenchymateuses et cancer	20
2.3.2.1. Tropisme tumoral des CSM	21
2.3.2.2. Propriétés immunosuppressives des CSM	22
2.3.2.3. Effets anti-apoptotiques	23
2.3.2.4. Stimulation de l'angiogenèse	24
3. Les cavéoles et les cavines	26

3.1. Les cavéoles	26
3.1.1. Définition	26
3.1.2. Biogenèse des cavéoles	27
3.1.3. Les fonctions des cavéoles	30
3.2. Les cavéolines	32
3.3. Les cavines	33
3.3.1. Définition et structure	33
3.3.2. Cavines et cancer	37
4. Hypothèse et objectifs	38
Chapitre 2 – Article	40
Abstract	42
Introduction	43
Experimental procedures	45
Results	49
Discussion	51
Acknowledgments	53
Competing intrest	53
References	54
Figures legend	59
Figures	61
Figure 1	61
Figure 2	62
Figure 3	63
Figure 4	64
Chapitre 3 – Discussion, perspectives et conclusion	65
1. Discussion	- 66 -
6. Conclusion et perspective	- 71 -
Bibliographie	- 73 -

Liste des figures

<u>Figure 1. Étapes de la cancérogenèse</u>	4
<u>Figure 2. Étapes de la migration cellulaire</u>	6
<u>Figure 3. Étapes de l'angiogenèse</u>	7
<u>Figure 4. Rôles de l'inflammation dans la progression tumorale</u>	10
<u>Figure 5. TNFα et cancer</u>	12
<u>Figure 6. Voie de signalisation NF-κB induite par TNFα</u>	15
<u>Figure 7. Les cellules souches embryonnaires et adultes</u>	18
<u>Figure 8. Le devenir des cellules souches mésenchymateuses</u>	20
<u>Figure 9. Les effets immunomodulateurs des CSM in vitro</u>	23
<u>Figure 10. Interaction entre les cellules souches mésenchymateuses, les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales et la voie associée</u>	25
<u>Figure 11. Morphologie des cavéoles</u>	27
<u>Figure 12. Représentation schématique de la biogénèse des cavéoles</u>	29
<u>Figure 13. L'augmentation de la densité des cavéoles conduit à l'hyperactivation de la voie NF-κB</u>	31
<u>Figure 14. Structure des protéines cavines chez la souris</u>	34
<u>Figure 15. Fonctions des protéines cavines au sein des cavéoles</u>	36

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Protéine kinase B
CCL	Chemokine (C---C motif) ligand
CE	Cellules endothéliales
COX-2	Cyclooxygénase-2
CS	Cellule souche
CSD	<i>Caveolin scaffolding domain</i>
CSE	Cellule souche embryonnaire
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
CTxB	Sous-unité B de la toxine cholérique
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
iDC	Cellule dendritique immature
IDO	Indolamine 2,3-dioxygénase
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IKK	I κ B-kinase
IL	Interleukine
I κ B	Inhibiteur de κ B
JNK	<i>c-JUN NH2 terminal-kinase</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	Protéine kinase activée par signal mitogène
mDC	Cellule dendritique mature
MEC	Matrice extracellulaire
MLCK	<i>Calmodulin-dependent myosin light-chain kinase</i>

<i>MURC</i>	<i>Muscle-restricted coiled-coil protein</i>
<i>NF-κB</i>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<i>NK</i>	<i>Cellule tueuse naturelle (natural killer)</i>
<i>PDGF</i>	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
<i>PEDF</i>	<i>Pigment epithelium derived factor</i>
<i>PGE2</i>	<i>Prostaglandine E2</i>
<i>PI3K</i>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<i>PIP3</i>	<i>Phosphatidylinositol triphosphate</i>
<i>PKC</i>	<i>Protéine kinase C</i>
<i>PMA</i>	<i>Phorbol 12-myristate 13-acétate</i>
<i>PTRF</i>	<i>Polymerase transcript release factor</i>
<i>RIP</i>	<i>Receptor-interacting protein-kinase</i>
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i>
<i>SDPR</i>	<i>Serum deprivation protein response</i>
<i>SRBC</i>	<i>Srd-related gene product that binds to c-kinase</i>
<i>STAT</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<i>TACE</i>	<i>TNF-alpha converting enzyme</i>
<i>TAMs</i>	<i>Tumor-associated macrophages</i>
<i>TGF</i>	<i>Facteur de croissance transformant</i>
<i>Tie-2</i>	<i>Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains 2</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Facteur nécrosant tumoral alpha</i>
<i>TNF-R</i>	<i>Récepteur au TNF</i>
<i>TRADD</i>	<i>TNF receptor associated death domain</i>
<i>TRAF2</i>	<i>TNFR-associated factor 2</i>
<i>TSP</i>	<i>Thrombospondine-1</i>
<i>VCAM</i>	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
<i>VEGF</i>	<i>Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire</i>
<i>Wnt</i>	<i>Wingless-related integration site</i>

À mes parents

À l'âme de mon grand-père Makki

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur de recherche, Dr Borhane Annabi, qui m'a donné la chance de faire partie de son équipe de recherche. Je le remercie pour la confiance, la patience (surtout la patience), et la générosité qu'il m'a accordée.

Je remercie également tous les membres du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire pour les conseils et les discussions partagés. Je remercie spécialement Khadija Haidara et Sylvie Lamy d'avoir répondu à mes questions et je les remercie pour les mots d'encouragement. Un merci particulier à Cyndia Charfi pour son amitié, son incroyable gentillesse, son sourire et son soutien.

Je remercie le gouvernement Tunisien qui a financé mes études au Canada. J'en serai infiniment reconnaissante.

Je remercie mes parents et mes sœurs, pour leur amour inconditionnel, leur patience et leur soutien. C'est grâce à eux que je suis ici aujourd'hui.

Une pensée pour mon amie Amal, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, je te serai toujours reconnaissante.

Chapitre1 –Introduction

1. Le cancer

1.1. Définition et statistiques

L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit le cancer comme un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases (Organisation mondiale de la santé, 2015).

Selon l'OMS, le cancer est une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès en 2012. Le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70% environ au cours des deux prochaines décennies (OMS 2015). La société canadienne du cancer a reporté dans son rapport annuel de 2015, environ 2 Canadiens sur 5 développeront un cancer au cours de leur vie, et environ 1 sur 4 en succombera. Plus de 196 900 nouveaux cas sont estimés en 2015, dont 78 000 en mourront. Les cancers les plus fréquents au Canada sont les cancers du poumon, du sein, colorectal et de la prostate avec 51% des nouveaux cas. L'incidence est un peu plus élevée chez les hommes que chez les femmes. L'incidence varie aussi en fonction de l'âge, en effet, 89 % des Canadiens qui développent un cancer ont plus de 50 ans. Cependant, on note que 63 % des personnes survivent 5 ans après le diagnostic de la maladie, c'est un des meilleurs résultats mondiaux (Société canadienne du cancer, 2015).

1.2. La cancérogenèse

La genèse d'un cancer passe par trois étapes (Beckman et Loeb, 2005) (Figure 1). Elle commence par une phase d'initiation durant laquelle la cellule subit une mutation irréversible sous l'effet d'un cancérogène 'initiateur'. Le cancérogène peut être endogène tel que les Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS) qui sont le résultat du métabolisme oxydatif, ou exogène comme les UV, produits chimiques ou des virus (Trosko et Ruch, 1998). Il est important de signaler

qu'une cellule initiée n'est pas une cellule tumorale, car elle n'a pas les avantages de prolifération d'une cellule tumorale et qu'elle peut rester en état de quiescence sans donner de tumeur (Hanahan et Weinberg, 2000).

La cellule initiée peut entamer une phase de promotion pendant laquelle elle acquiert les avantages de prolifération et d'expansion. En effet, ces cellules vont chercher leur suffisance en facteurs de promotion (Hanahan et Weinberg, 2000). Elles peuvent augmenter la production de ces facteurs, comme pour les tumeurs thyroïdiennes qui surproduisent l'IGF (insulin-like growth factor) (Vella et al., 2001). Les cellules tumorales peuvent aussi augmenter la transduction du signal pour les facteurs de promotion ou encore augmenter la production des cellules adjacentes en ces facteurs. Les cellules tumorales vont se multiplier d'une manière anarchique et ne répondront plus aux signaux apoptotiques. Cette phase aboutit à la formation de la « tumeur primaire» qui est encore avasculaire (Hanahan et Weinberg, 2000).

Durant la phase de progression, les cellules tumorales continuent à proliférer tout en acquérant d'autres capacités. Les cellules deviendront invasives. En premier, elles perdent l'adhérence cellulaire. En effet, les cellules tumorales expriment des protéases qui vont dégrader les molécules d'adhérence tel que la β -caténine et la ε -cadhérine qui sont responsables de l'inhibition de contact, c'est-à-dire l'arrêt de multiplication d'une cellule quand elle est en contact avec une autre (Lochter et al., 1997; Crawford et al., 1999). Mais aussi, les cellules tumorales dégradent le tissu sain avoisinant en sécrétant les protéases matricielles (MMP) qui détruisent la membrane basale de la matrice extracellulaire (MEC) qui est le support d'intégrité des tissus. La masse tumorale devient de plus en plus importante et les cellules doivent s'approvisionner en oxygène et nutriments. C'est pour cela que la tumeur va mettre en place son propre réseau vasculaire. C'est la neoangiogenèse. Les cellules augmentent leur sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, vascular endothelial growth factor; FGF, fibroblast growth factor) et diminuent l'expression de facteurs anti-angiogéniques tel que la thrombospondine-1 (TSP) (Roberts et al., 2007) avec une suractivation des MMP (Shchors et Evan, 2007). Enfin, les cellules tumorales peuvent être à l'origine de tumeurs secondaires. Elles migrent et envahissent des ganglions pour former des métastases (Croce, 2008).

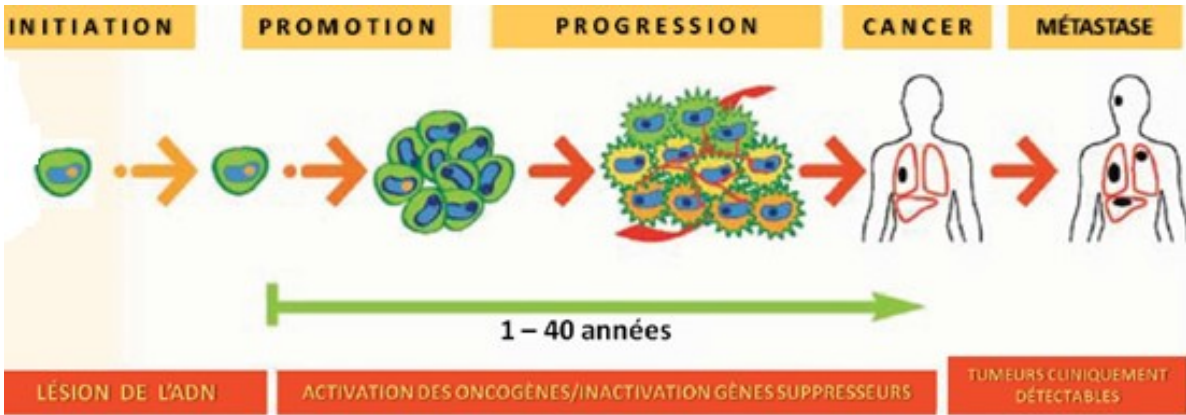


Figure 1. Étapes de la cancérogenèse. La première phase est l’initiation pendant laquelle la cellule subit des lésions irréversibles de son l’ADN. Ces cellules initiées vont proliférer pendant la phase de promotion. La phase de progression est caractérisée par la prolifération anarchique des cellules et par la mise en place du réseau vasculaire (Adapté de : Béliveau et Gingras, 2007).

1.3. La migration cellulaire

La migration, ou la motilité cellulaire, est la capacité de la cellule d’effectuer des mouvements. Elle est impliquée dans les processus physiologiques tels que l’embryogenèse, la cicatrisation, l’angiogenèse, comme elle peut être impliquée dans les processus pathologiques tels que l’inflammation et le développement tumoral. En effet, la migration intervient dans la vascularisation tumorale, on retrouve les cellules endothéliales (CE) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui migrent en réponse aux facteurs chimiotactiques relâchés par les cellules tumorales, elle intervient également dans l’invasion des tissus avoisinants et l’extension de la masse tumorale et elle régit l’émission des métastases. En effet, avec l’évolution tumorale, il y a une forte diminution ou une perte d’expression de E-Cadhérine qui est une molécule d’adhésion, le résultat est l’augmentation de la migration cellulaire (Kemler, 1993). Le microenvironnement tumoral est riche en facteurs de croissance tels que le HGF, FGF, IGF, TGF- β . Ces facteurs favorisent la dissémination des cellules tumorales à partir de leur foyer primaire par un processus connu sous le nom de la transition épithélio-mésenchymateuse : les cellules perdent leur phénotype épithélial et acquièrent un phénotype mésenchymal qui offre

une bonne motilité à la cellule (Thiery, 2002). La migration est une étape clé dans la progression tumorale. Mais comment une cellule migre-t-elle ?

La cellule migre en 4 étapes : extension du lamellipode, suivi par l'adhésion au substrat, ensuite la contraction de la cellule et détachement de la partie arrière (Parri et Chiarugi, 2010) (Figure 2). La cellule migre en réponse à une stimulation externe. Pour pouvoir migrer, elle doit en premier adopter une certaine conformation spatiale asymétrique avec une protrusion de la membrane vers l'avant. La protrusion est provoquée par l'assemblage des filaments d'actine sous l'effet des RhoGTPase, des phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) et phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Parri et Chiarugi, 2010). La cellule doit stabiliser cette protrusion en créant des points d'attache avec la MEC via les intégrines et les molécules d'adhésion (Galbraith et al., 2007). Ces dernières vont activer et concentrer les MMP du côté de la protrusion, ce qui conduit à la détérioration de la MEC et la libération de la cellule. Simultanément, la contraction de la cellule est assurée par la contraction des filaments d'actine et de myosine. En effet, la calmodulin-dependent myosin light-chain kinase (MLCK) va phosphoryler les chaînes légères de la myosineII ce qui induit la contraction du complexe actomyosine (Friedl et Wolf, 2003). Cette contraction est suivie du détachement des adhésions à l'arrière de la cellule.

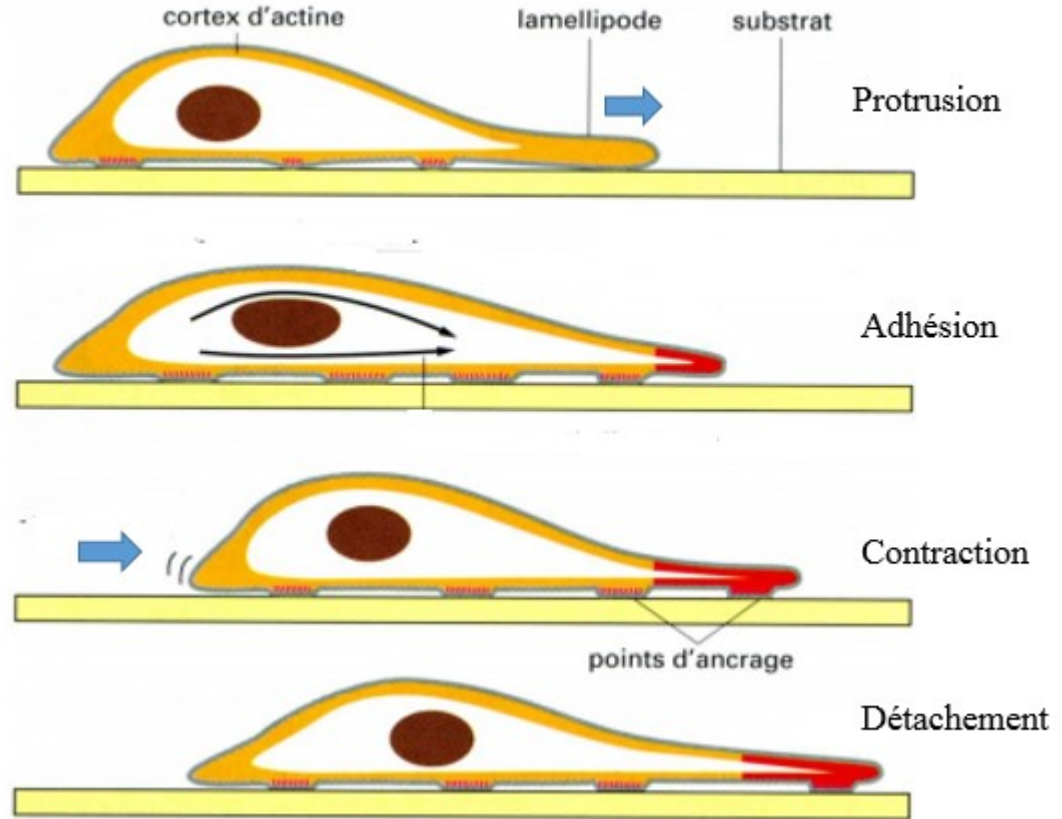


Figure 2. Étapes de la migration cellulaire. 1) Extension du lamellipode. 2) Adhésion du lamellipode au substrat. 3) Contraction de la cellule et détachement des adhésions à l'arrière. (Adapté de : Alberts et Johnson, 2002)

Les CSM sont recrutées aux foyers tumoraux, où elles vont contribuer au maintien de l'inflammation, à l'angiogenèse et donc au développement tumoral.

1.4. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est la mise en place d'un réseau vasculaire à partir des vaisseaux préexistants (Hanahan et Folkman, 1996). C'est un processus physiologique qui est important dans la réparation et la régénéscence tissulaires. La première phase de l'angiogenèse est la sensibilisation des CE par divers facteurs pro-angiogènes principalement par le Facteur de

croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). L'activation des CE conduit à la synthèse des MMP qui vont dégrader la MEC. Les CE vont migrer, proliférer et se différencier pour donner des néovaisseaux immatures. La maturation est assurée par l'angiopoïétine qui, en se liant sur son récepteur Tie-2 va remodeler la MEC en place de la paroi vasculaire (Benjamin et al., 1998) (Figure 3). Ce système est finement contrôlé par un équilibre de facteurs pro- et anti-angiogéniques appelé « Switch angiogénique ». Dans les conditions physiologiques, ce système est maintenu en équilibre (Papetti et Herman, 2002).

Dans les conditions pathologiques, le switch est interrompu, et la balance va tendre vers les facteurs pro-angiogènes. C'est le cas des tumeurs. Dans le microenvironnement tumoral, on trouve une surexpression des facteurs de croissance et des cytokines. En plus, le tissu tumoral est un tissu hypoxique, l'hypoxie induit l'expression du facteur HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) qui va entraîner une surexpression du VEGF (Fukumura et al., 1998).

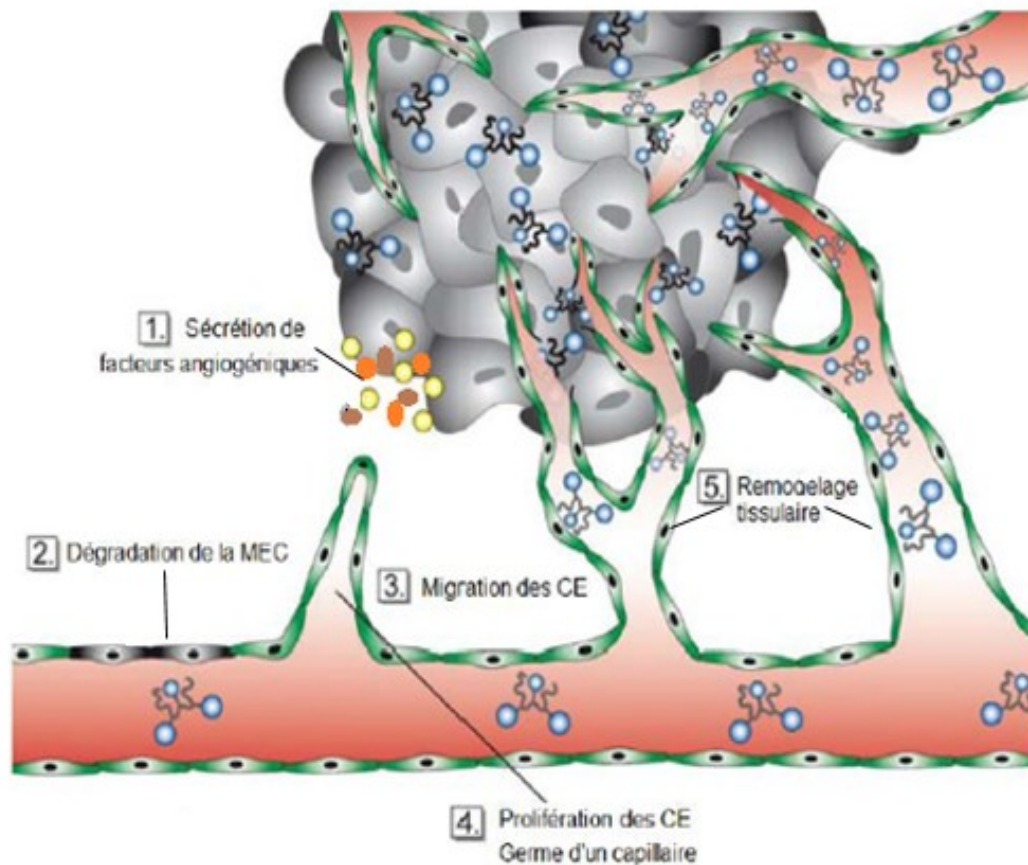


Figure 3. Étapes de l'angiogenèse. La sécrétion des facteurs angiogéniques et la dégradation de la MEC permettent l'activation des CE qui deviennent motiles et initient le bourgeonnement vasculaire. Les CE migrent et prolifèrent pour mettre en place un tubule primitif. Les CE recrutent ensuite les péricytes pour stabiliser le tubule formé et donner ainsi un tubule mature (Adapté de : Satchi-Fainaro et al., 2006).

1.5. Inflammation et cancer

L'inflammation est la base de la progression des cancers (Marx, 2004). C'est l'élément clé pour passer d'une phase de cancérogenèse à une autre (Mantovani et Pierotti, 2008) (Figure 4). En effet, une tumeur est comparée à «une plaie qui ne cicatrise jamais», c'est un foyer d'inflammation chronique (Dvorak, 1986). L'inflammation offre un microenvironnement utopique pour la prolifération des cellules tumorales. Le microenvironnement tumoral a une composition cellulaire et moléculaire complexe (Karin et Greten, 2005). En effet, ce dernier est riche en fibroblastes tumoraux qui sont responsables de la production des MMP, et riche aussi en cellules du système immunitaire leucocytes, lymphocytes et macrophages, notons que les macrophages, communément appelés macrophages TAMs (tumor-associated macrophages), jouent un rôle prépondérant dans le développement des tumeurs (Guruvayoorappan, 2008). Les TAMs sont une source importante en ROS et autres radicaux libres qui induisent des dérèglements de l'ADN, favorisent la mutagenèse et altèrent l'efficacité de réparation de dommages à l'ADN, supportant ainsi la phase d'initiation mais aussi la prolifération anarchique des cellules. D'autre part, les cellules inflammatoires larguent des quantités importantes de cytokines pro inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12), des chimiokines (IL-8), des prostaglandines ou des leucotriènes (essentiellement PGE2 et LTB4) et des MMPs. Ces produits vont stimuler la création de nouveaux vaisseaux sanguins qui irriguent la tumeur et qui permettent son accroissement. Ils activent également des facteurs de transcription et des voies de signalisation impliqués dans la prolifération et la survie des cellules comme les voies de Wnt, NF- κ B et Caspase. Diverses études suggèrent que NF- κ B joue un rôle crucial dans la carcinogenèse (Rayet et Gelinas, 1999), en plus il est activé dans 50% des cancers (Karin et

Greten, 2005). Cette voie peut être induite par les cytokines telles que le TNF- α , IL-1, les mitogènes qui se trouvent en abondance dans le microenvironnement tumoral. Une fois activé, le NF- κ B va augmenter la transcription d'autres modulateurs pro-inflammatoires comme la cyclooxygénase-2 (Plummer et al., 1999).

Il sera question dans les parties suivantes d'aborder l'activation de NF- κ B dirigée par la cytokine TNF- α .

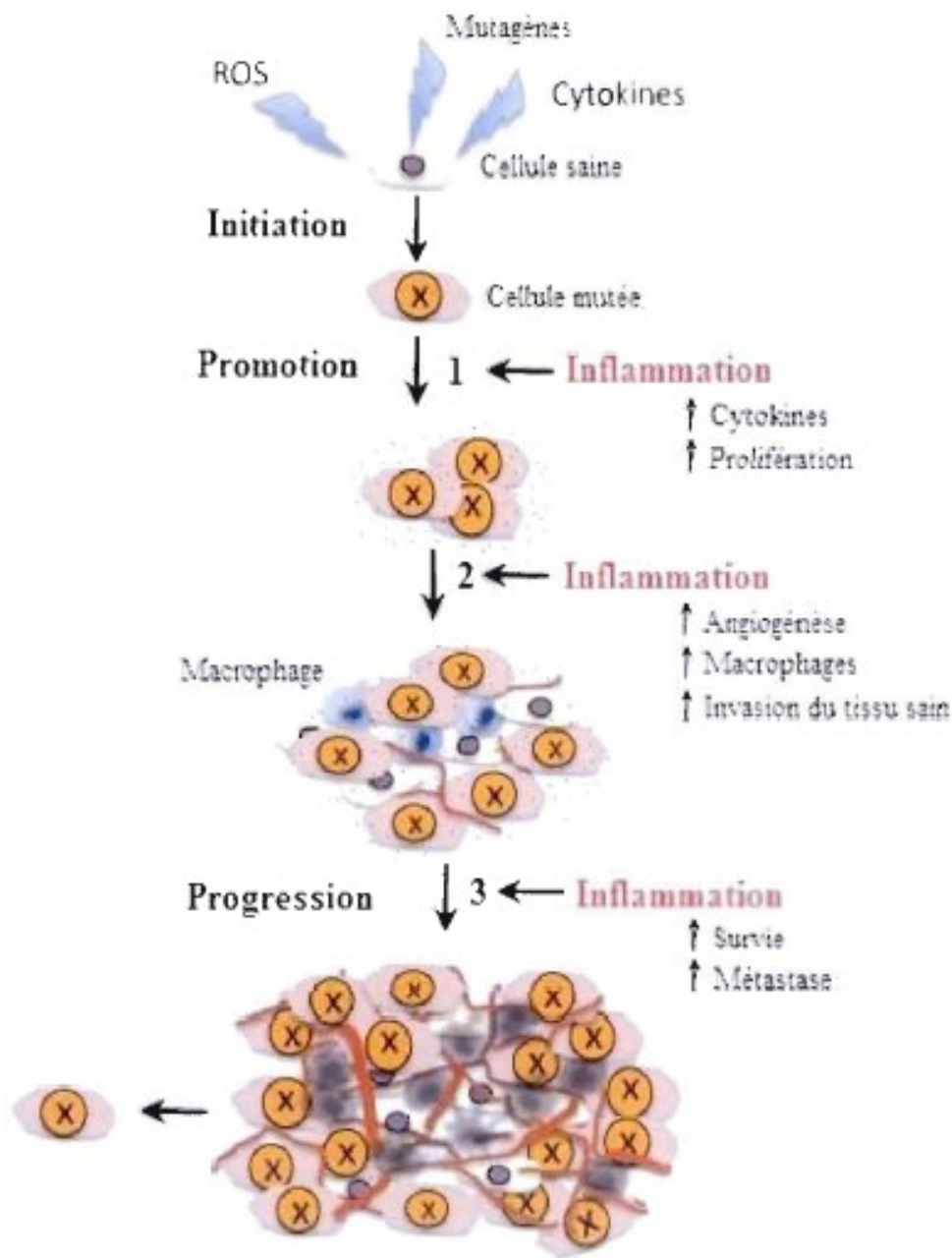


Figure 4. Rôles de l'inflammation dans la progression tumorale. L'inflammation agit à tous les stades de la cancérogenèse : elle contribue à l'initiation en provoquant des mutations. Elle induit la prolifération des cellules cancéreuses, et améliore leur survie. L'inflammation stimule également l'angiogenèse. Elle exerce également un effet immunosuppresseur locale, et maintient un microenvironnement favorable à la survie des cellules tumorales. (Adapté de : Grivenniko et al., 2010).

1.5.1. Les cytokines

Les cytokines sont des médiateurs pro-inflammatoires qui ont une structure protéique soluble avec une glycosylation variable et qui sont synthétisés par les cellules du système immunitaire. Ces molécules présentent des propriétés communes. En effet, elles se caractérisent par leur faible masse moléculaire (8-40 kDa), leur synthèse dans les conditions physiologiques est limitée, elle est mise en jeu lors d'une activation cellulaire. Ces molécules agissent à très faible concentration de l'ordre de pg/ml (Dinarello, 2000). Le facteur de nécrose tumorale TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire fortement exprimée dans les tumeurs, et joue un rôle majeur dans l'induction et le maintien de l'inflammation.

1.5.1.1 Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α)

Le TNF- α est une cytokine qui joue un rôle majeur dans l'inflammation. Elle est synthétisée par les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles NK (*natural killer*) activés (Hamaï et al., 2009). Le gène qui code pour cette cytokine est essentiellement régulé par le facteur nucléaire NF- κ B. En effet, le TNF- α peut exister sous deux formes : une forme membranaire formée de 233 acides aminés avec un poids moléculaire de (26 kDa) (Tang et al., 1996), qui clive sous l'effet de l'enzyme TACE (*TNF-alpha converting enzyme*) pour donner la forme soluble de 157 acides aminés (17 kDa) (Black et al., 1997). Le TNF- α peut se lier à deux récepteurs membranaires différents : le récepteur de type I (TNF-RI) et le récepteur de type II (TNF-RII) (Grell et al., 1998). Ces deux récepteurs ont des domaines extra cytoplasmiques similaires, mais des domaines intracellulaires différents (Idriss et Naismith, 2000). En effet, TNF-RI est pourvu d'un « *death domain* » qui peut induire un signal apoptotique, ce domaine est absent dans TNF-RII (Tartaglia et al., 1993). Notons aussi que les deux formes de TNF- α ont des affinités différentes pour ces récepteurs : la forme soluble du TNF- α va se lier préférentiellement au récepteur TNF-RI, tandis que la forme membranaire a plus d'affinité pour le récepteur TNF-RII. Lorsque le TNF- α se lie à son récepteur il peut activer trois voies de signalisation: les voies JNK/p38MAPK , NF- κ B et la voie apoptotique.

Le TNF- α joue, sans doute, un rôle capital dans l'inflammation et la progression des tumeurs (Figure 5). In situ, le TNF- α conduit au largage des radicaux libres tels que les ROS et le monoxyde d'azote (NO) par les cellules inflammatoires (Obermeier et al., 1999). Ces molécules vont d'une part endommager l'ADN donc favoriser l'initiation des cellules et leur prolifération, et d'autre part augmenter la vasodilatation et la perméabilité tissulaire favorisant ainsi d'avantage l'altération des tissus avoisinants (Jaiswal et al., 2000). Le TNF- α favorise le remaniement vasculaire et la néovascularisation des tumeurs en activant la transcription des MMP (MMP-1, -2, -9 et -3), responsables de la dégradation de la MEC, et en surexprimant les facteurs pro-angiogènes (VEGF, VCAM) (Yoshida et al., 1997).

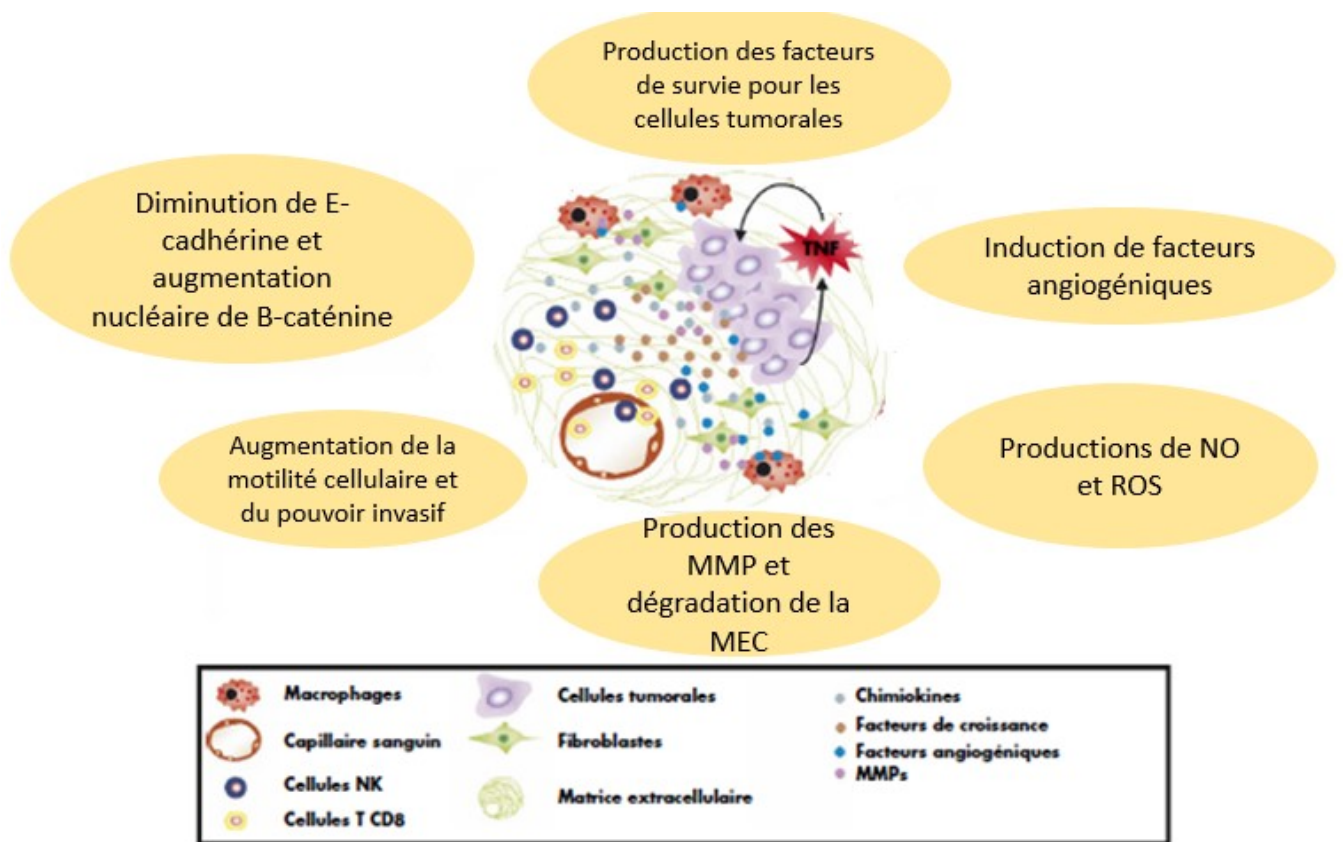


Figure 5. TNF- α et cancer. (Adapté de : Hamaï et al., 2009)

L'un des mécanismes d'action les plus puissants du TNF- α , est celui de l'induction de médiateurs lipidiques de l'inflammation (les médiateurs issus de la transformation des acides gras de la membrane plasmique). En effet, le TNF- α , en activant le NF- κ B, augmente la transcription de la COX-2. Cette enzyme dégrade l'acide arachidonique pour former les prostaglandines (surtout la PGE2) et les thromboxanes (Blackwell, 2010). La PGE2 a un fort pouvoir vasodilatateur, modifie la perméabilité vasculaire, inhibe l'apoptose et favorise les voies de survie cellulaire telles que RAS/MAPK et PI3K/AKT (Wang et Dubois, 2006) et diminue l'expression des molécules d'adhésion. Ainsi la COX-2 va promouvoir la croissance et l'invasion tumorale et l'émission des métastases. Ainsi la COX-2 est considérée comme un biomarqueur de l'inflammation et de la carcinogenèse.

1.5.2. Voie de signalisation du NF- κ B induite par le TNF- α

Le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) a été découvert en 1986 dans les cellules B comme un facteur régulant la transcription des chaînes légères κ des anticorps et c'est ce qui explique sa nomenclature (Sen et Baltimore, 1986). Plusieurs inducteurs peuvent activer ce facteur, essentiellement les cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-10), les lipopolysaccharides, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), les métabolites du stress oxydatif tels que les ROS et le H₂O₂ (Karin et Ben-Neriah, 2000). Dans ce qui suit, nous allons aborder le mode d'activation par le TNF- α .

La famille NF- κ B est composée de 5 protéines qui peuvent s'associer en homo ou hétérodimères, à savoir : p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65(RelA), RelB et c-Rel (Beg et Baldwin., 1993). Les dimères sont séquestrés dans le cytoplasme sous une forme inactive liée aux inhibiteurs de NF- κ B (I κ B). La liaison est assurée par le signal de localisation nucléaire qui se trouve dans le domaine REL des protéines NF- κ B. Notons que ce signal est aussi capable de lier l'ADN. On note que le dimère p50/p65 est le plus important, car les sous-unités p50 et p65 contiennent le domaine transactivateur TAD qui est responsable plus tard de l'activation de la transcription (Ghosh *et al.*, 1998; Karin and Ben-Neriah, 2000). La famille des I κ B comporte les protéines I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , p100 et p105. La protéine I κ B α est la plus

importante car sa partie N-terminale est riche en a.a phosphorylables (sérine, tyrosine et lysine) qui sont le substrat des kinases : les I κ B kinase (IKK). Dans ce dernier, on distingue une composante catalytique formée par les IKK α et β et une composante régulatrice NEMO qui est nécessaire à l'activation du complexe (DiDonato et al., 1997; Yamamoto et al., 2003).

Lorsque le TNF- α se lie à son récepteur TNF-R1, il y a mobilisation de la protéine TRADD (*TNF-R-Associated Death Domain*), qui va à son tour recruter la kinase RIP (*Receptor Interacting Protein*) et le TRAF2 (*TNF Related Associated Factor 2*) responsables de la phosphorylation du complexe IKK. Une fois activé, IKK va à son tour phosphoryler I κ B au niveau de sa partie N-terminale conduisant à sa dégradation. Le facteur NF- κ B, ainsi libéré, migre vers le noyau où il va réguler l'expression d'un grand nombre de gènes (Kelliher et al., 1998; Devin et al., 2000) (Figure 6).

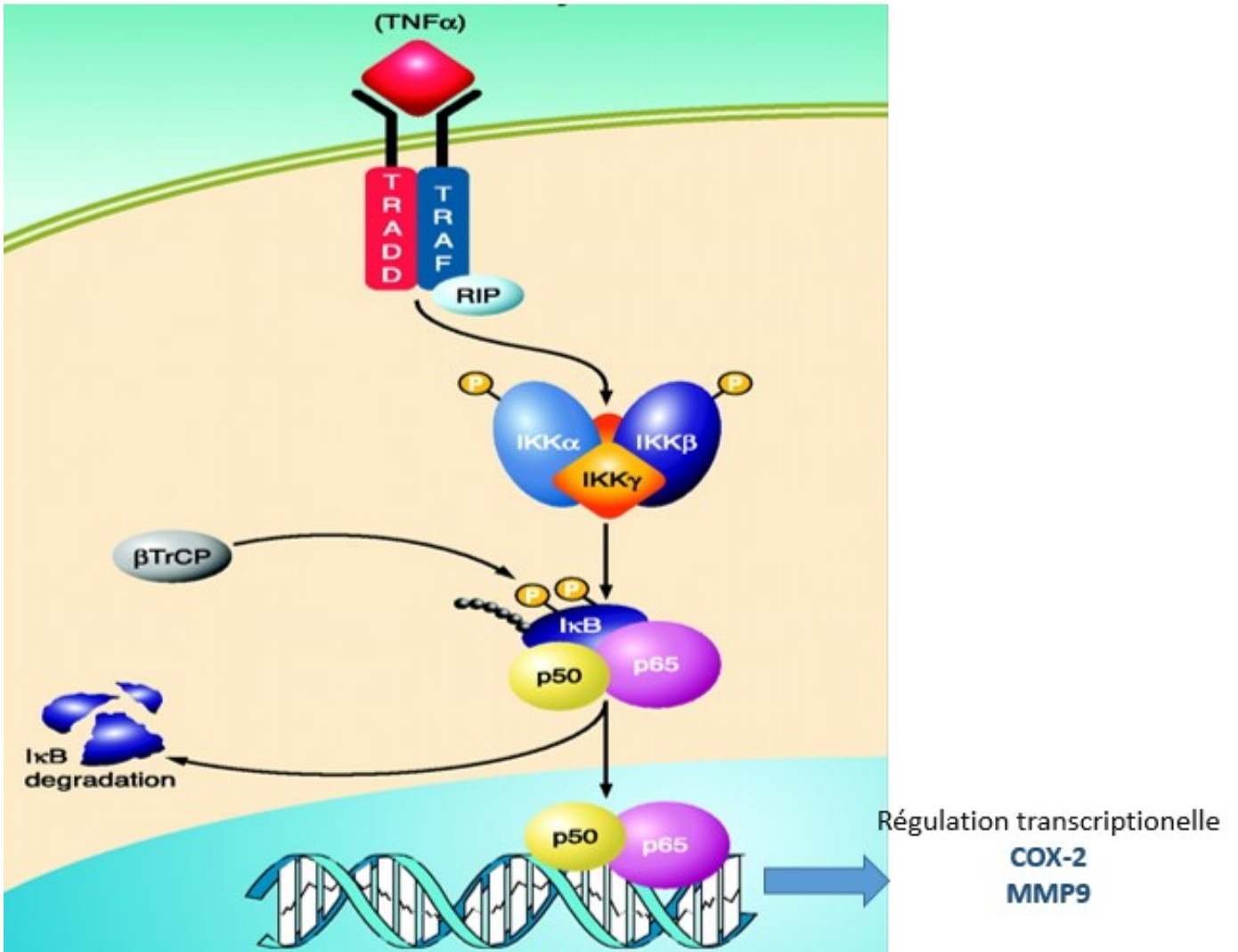


Figure 6. Voie de signalisation NF- κ B induite par TNF- α . Le TNF- α , en se liant à son récepteur, va recruter les protéines TRADD, TRAF et RIP, qui activent IKKs. IKK phosphoryle I κ B, p65/p50 est libéré et transloqué au noyau afin de réguler la transcription de plusieurs gènes parmi lesquels COX-2 et MMP9 (Adapté de : Bakkar et Guttridge, 2010).

2. Les cellules souches

2.1. Définition

Les cellules souches (CSs) sont des cellules indifférenciées qui se distinguent essentiellement par deux propriétés: la clonogénicité et la plasticité. La clonogénicité désigne le pouvoir des cellules à s'autorenouveler en cellules filles identiques à la cellule mère par une division symétrique. La plasticité, quant à elle, indique la capacité de la cellule à se différencier. C'est le résultat d'une division asymétrique qui aboutit, d'une part, à une cellule souche identique à la cellule mère et d'autre part à une cellule spécialisée (Verfaillie, 2002; Sasportas et al., 2009).

2.2. Classification

2.2.1. Selon le potentiel de différenciation

Les CSs sont subdivisées en 4 catégories en fonction de leur plasticité (Smith, 2006; Nichols et Smith, 2009). On distingue les CSs totipotentes qui correspondent au stade morula, qui peut aller jusqu'à 8 cellules et qui dure de un à trois jours après la fécondation. Ces cellules sont à l'origine de tous les tissus embryonnaires, mais aussi les annexes extra-embryonnaires.

La deuxième catégorie est les CSs pluripotentes. Ces cellules correspondent au stade blastocyste, qui peut aller de 16 à 32 cellules et qui dure du cinquième au quatorzième jour après la fécondation. Une cellule pluripotente est capable de donner tous les types cellulaires mais elle est incapable de se différencier en cellules extra-embryonnaires (Thomson et al., 1998; Takahashi et al., 2007).

On distingue également les CSs multipotentes. Ce sont des cellules différenciées mais qui possèdent tout de même une certaine plasticité, et génèrent d'autres types cellulaires (Verfaillie, 2009).

La dernière catégorie est les CSs unipotentes. Ces cellules sont spécialisées. Elles peuvent s'autorenouveler, et si elles se différencient, elles ne peuvent donner qu'un seul type cellulaire (Slack, 2000) C'est le cas des cellules souches du foie et de la peau (Schmelzer et al., 2007).

2.2.2. Selon l'origine

Les CSs peuvent être classées en deux classes selon leurs origines : des CSs embryonnaires et des CS adultes (Figure 7). Les CSs embryonnaires (CSE) sont retrouvées chez l'embryon âgé de moins de 7 jours : elles correspondent aux cellules multipotentes et pluripotentes. Les CSE sont considérées comme un bon modèle pour comprendre les mécanismes complexes impliqués dans le développement de cellules spécialisées et dans la mise en place d'organes. Leur clonogénicité et leur plasticité permettent la production *in vitro* d'un nombre illimité de types cellulaires distincts, ce qui a ouvert de nouveaux horizons pour la médecine régénérative et cellulaire (Thomson et al., 1998; Bishop et al., 2002).

Les CSs adultes, quant à elles, sont retrouvées chez l'embryon qui a dépassé le stade blastocyste, dans les différents tissus chez le fœtus et aussi chez l'adulte. Elles correspondent aux CSs multipotentes et unipotentes (Wagers et Weissman, 2004; Young et Black, 2004).

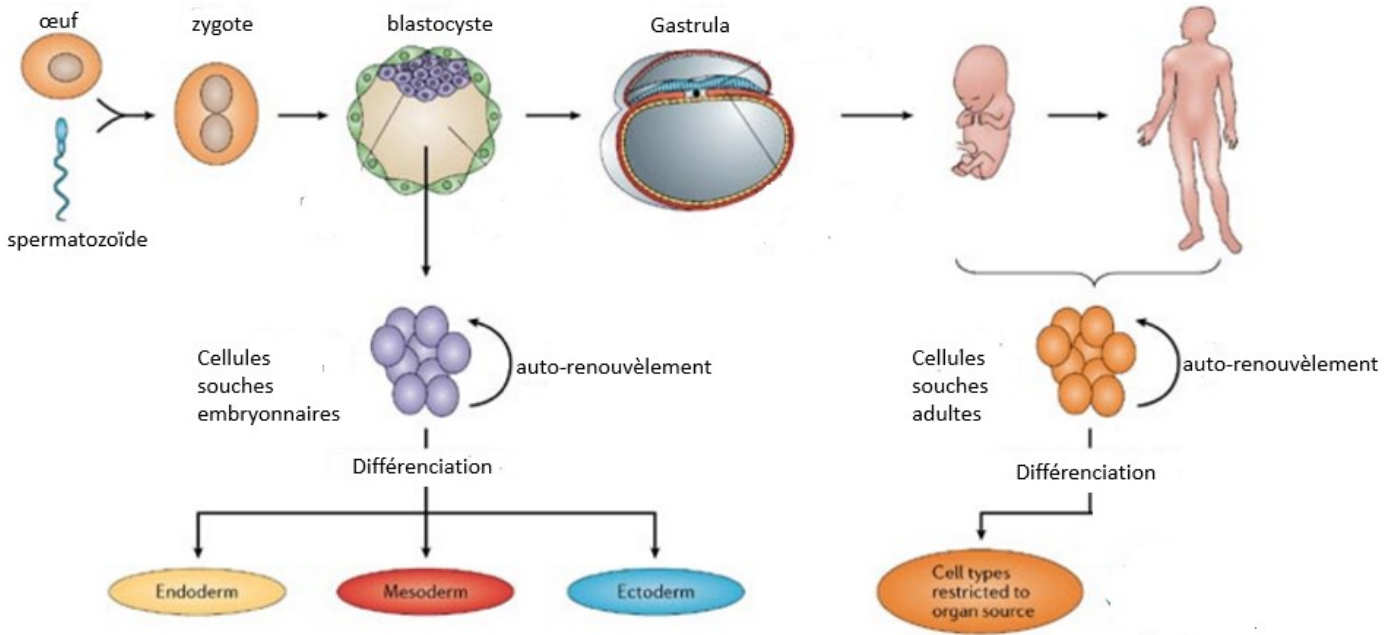


Figure 7. Les cellules souches embryonnaires et adultes. La fusion du spermatozoïde et de l'ovule lors de la fécondation humaine établit un zygote diploïde et initie une série de divisions cellulaires qui conduisent à un embryon multicellulaire. Le stade de blastocyste est caractérisé par la présence d'une cavité avec une masse cellulaire externe et une masse cellulaire interne. Les CSs embryonnaires sont dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste. Les CSs embryonnaires mises en culture sont capables de s'auto-renouveler sans différenciation et aussi de se différencier en tout type cellulaire: endodermique, ectodermique et mésodermique utilisant des signaux appropriés. *In utero*, les implants des blastocystes et l'ensemble des trois couches germinales embryonnaires sont formés au cours de la gastrulation. Les CSs somatiques sont présentes dans de nombreux tissus fœtaux et post-natals. Les CSs somatiques sont également capables de s'auto-renouveler et de se différencier en divers types cellulaires en fonction de l'organe d'origine. La mesure dans laquelle elles sont capables de se différencier en types de cellules de lignées de substitution est controversée (Adapté de : O'Connor et Crystal, 2006).

2.3. Les cellules souches mésenchymateuses

2.3.1. Définition

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules souches adultes multipotentes donnant naissance aux cellules du mésoderme, c'est-à-dire qu'elles se différencient pour donner les tissus conjonctifs du squelette (os, cartilage, tendon, tissus adipeux, muscle, cellules stromales) (Figure 8). D'une manière plus contestée, elles peuvent générer des cellules d'origine non mésodermique, tels les hépatocytes ou les cellules neuronales. Les CSM sont retrouvées en abondance au niveau du cordon ombilical, de la moelle osseuse, du tissu adipeux et de la peau (Minguell et al., 2001; Dazzi et al., 2006; Bianco et al., 2008).

Trois critères nécessaires ont été fixés par la société internationale des cellules souches tissulaires et mésenchymateuses pour caractériser les CSM :

- Le pouvoir d'adhérence au plastique (Castro-Malaspina et al., 1980).
- L'absence des marqueurs de surface des CE ou hématopoïétiques (Hamada et al., 2005 ; Porada et Almeida-Porada, 2010).
- La capacité de se différencier *in vivo* en chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes. (Barry et Murphy, 2004; Baksh, 2004; Motaln et al., 2010).

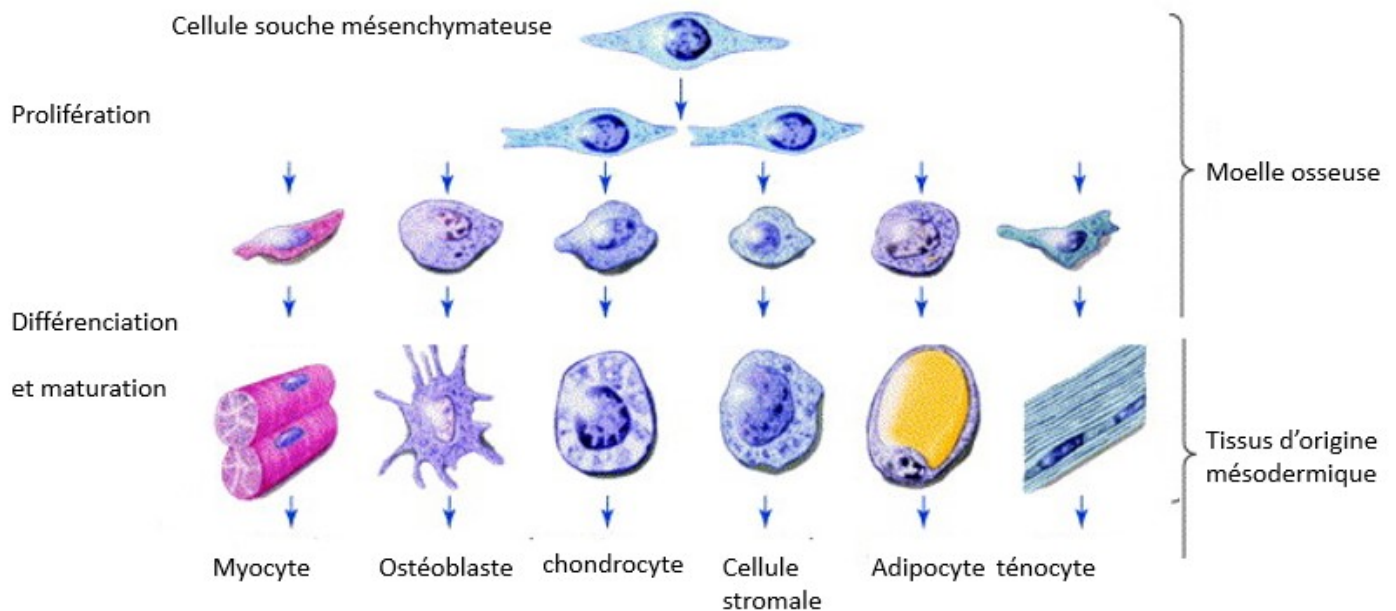


Figure 8 : Le devenir des cellules souches mésenchymateuses. Les cellules souches mésenchymateuses sont multipotentes et possèdent la capacité de proliférer et de se différencier en différents types de cellules dépendamment de leur environnement. Elles peuvent également être redirigées d'une lignée à une autre. (Adapté de : Risbud et Sittinger, 2002)

2.3.2. Cellules souches mésenchymateuses et cancer

Les CSM sont impliquées dans la progression de différents types de cancer. En effet, dans une variété de modèles de tumeurs expérimentales, la co-transplantation de CSM soutient la croissance tumorale, la colonisation de la moelle osseuse, les métastases, et l'évasion du système immunitaire (Djouad et al., 2003; Reagan et Ghobrial, 2012). De nombreuses études ont montré que les CSM perfusées migrent préférentiellement vers les sites de développement de tumeur (Spaeth et al., 2008). Au niveau de la tumeur, les CSM, par leurs propriétés intrinsèques immunosuppressives et anti-inflammatoires, peuvent aider les cellules tumorales à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et annuler la réponse immune thérapeutique adoptive. Les CSM favorisant l'angiogenèse tumorale et en recrutant des cellules progénitrices, ainsi elles favorisent le développement tumoral. Notons qu'elles sont aussi impliquées dans la

formation de métastases et dans l'induction des phénotypes de résistance aux médicaments anti-cancéreux (Karnoub et al., 2007).

2.3.2.1. Tropisme tumoral des CSM

Le tropisme est la capacité des CSs résidant dans un tissu "niche", de migrer activement en réponse à des chimiokines et cytokines. En effet, après une injection systémique des CSM à des souris, ces cellules se greffent et restent détectables au niveau des foyers inflammatoires et dans les sites développant des tumeurs (Motaln et al., 2010). De nombreux groupes ont montré que les CSM peuvent migrer vers différents types de tumeurs telles que les gliomes (Spaeth et al., 2008), le myélome multiple (Uchiyama et al., 1993), les tumeurs hépatocellulaires, les carcinomes, les cancers du sein (Visvader et Lindeman, 2008), les carcinomes du côlon (Shinagawa, 2010), les cancers ovariens (Mader et al., 2009) et les carcinomes du poumon (Hall et al., 2007).

En effet, une tumeur est comparée à « une plaie qui ne cicatrise jamais » (Dvorak, 1986). C'est un foyer d'inflammation chronique qui produit en continue des signaux d'alerte tels les cytokines, chimiokines et des facteurs de croissances, qui sont des attracteurs puissants pour de nombreux types de cellules tel que les CSM. Les principaux facteurs relargués dans le microenvironnement tumoral, sont IFN, TNF- α , IL-6, IL-8, le TGF, le HGF, le PDGF, le VEGF et CXCL12 (Wynn et al., 2004; Dwyer et al., 2010; Halpern et al., 2011).

Des travaux ont démontré que la régulation de la migration des CSM vers la tumeur est similaire à celle des leucocytes, c'est-à-dire régulée par les intégrines et les molécules d'adhésion (Dwyer et al., 2010). Les cytokines, les sélectines et les récepteurs aux chimiokines qui sont impliqués dans la mobilisation des leucocytes : roulement, adhérence et transmigration de la circulation sanguine aux tissus cibles, sont aussi exprimés au sein des CSM (Dwyer et al., 2010).

2.3.2.2. Propriétés immunosuppressives des CSM

Les CSM sont connues pour le pouvoir immunomodulateur et immunosuppresseur qu'elles exercent sur toutes les cellules de l'immunité (lymphocytes, phagocytes et granulocytes) (Kode et al., 2009). En effet, les CSM inhibent directement les cellules dendritiques. Il s'en suit une inhibition de la prolifération des lymphocytes T induite par ces dernières. Notons aussi que l'inhibition des lymphocytes peut être directe (Augello et al., 2005). Leur action s'exerce également sur les lymphocytes T et elle est expliquée par le largage de facteurs solubles immunosuppresseurs tels que la prostaglandine E2 (PGE2), le TGF, l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO), le NO, la galectine-1 et -3, le leukemia inhibitory factor (LIF), l'HLA-G5 (Nasef et al., 2006; Nauta et Fibbe, 2007; Krampera et al., 2003; Lim et al., 2010). Par ailleurs, les CSM privilégient un phénotype anti-inflammatoire en jouant sur la production des cytokines par les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les cellules Tueuses Naturelles (NK). Elles réduisent leur production d'INF- γ et d'IL-12 qui sont pro inflammatoires, et augmentent celles d'IL-4 et IL-10 qui sont anti-inflammatoires (Loebinger et Janes, 2010). Ainsi, elles diminuent la prolifération et le pouvoir immunogène des cellules NK et diminuent aussi la prolifération des lymphocytes T et la formation des lymphocytes T cytotoxiques (Spaggiari et al., 2006). Enfin, les CSM en sécrétant la PGE, inhibent la différenciation des lymphocytes B, diminuant ainsi la production d'immunoglobulines. (Corcione et al., 2006) (Figure 9).

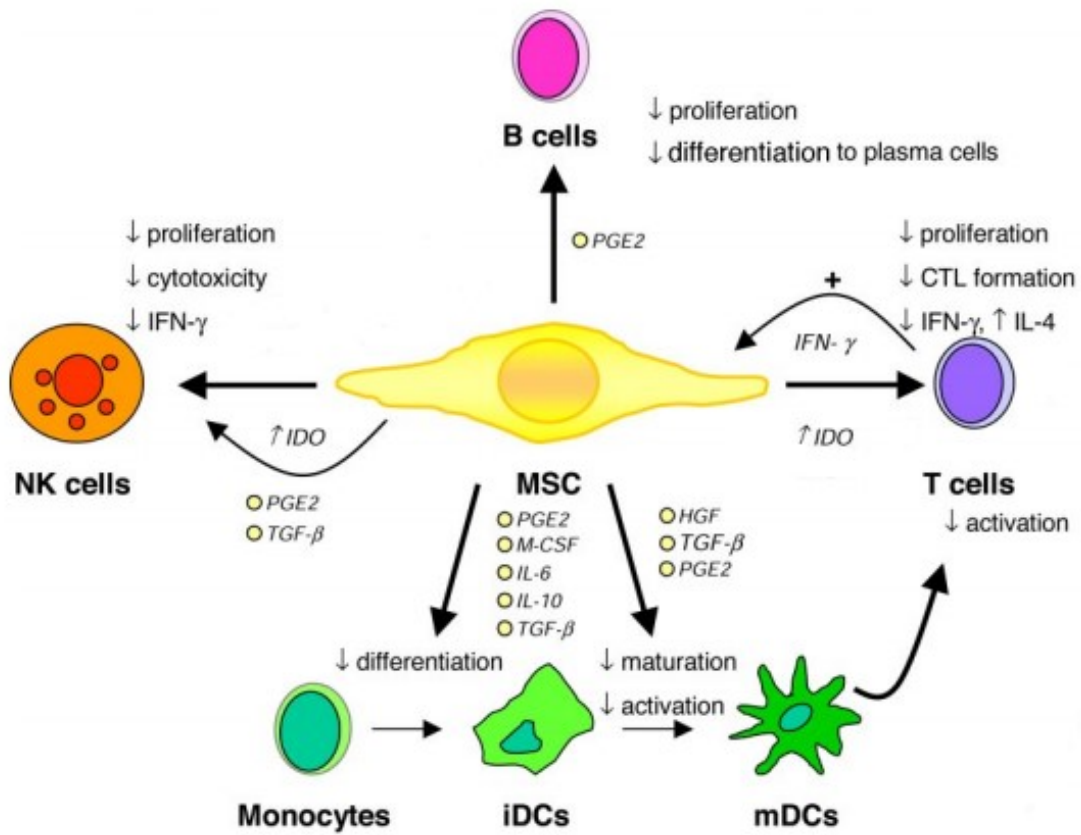


Figure 9: Les effets immunomodulateurs des CSM *in vitro*. Les CSM diminuent la différenciation des lymphocytes B. Elles inhibent la différenciation et la formation des lymphocytes T. Les CSM inhibent également la prolifération et la cytotoxicité des cellules tueuses naturelles. Dans les monocytes, les CSM inhibent leur différenciation en cellules dendritiques (Adapté de : Nauta et Fibbe 2007).

Par ce pouvoir immunosuppresseur, les CSM permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à la réponse immunitaire favorisant ainsi la croissance tumorale et l'initiation de métastase.

2.3.2.3. Effets anti-apoptotiques

Au sein d'un microenvironnement inflammatoire ou tumoral, les CSM n'induisent pas l'apoptose (Tögel et al., 2007). Au contraire, elles favorisent la survie cellulaire et entraînent

des altérations de la prolifération (bloquage en phase G0/G1 du cycle cellulaire) et de la fonctionnalité des cellules cibles (Ménard et Tarte, 2011). L'action anti-apoptotique serait médiée par IGF-1, VEGF et HGF, qui sont des facteurs de croissance produits par les CSM (Tögel et al., 2007).

2.3.2.4. Stimulation de l'angiogenèse

Huang et ses collaborateurs ont procédé à une étude comparative des xénogreffes de cellules tumorales de la lignée HT-29 (cancer colorectale) seules, comparées avec des xénogreffes de HT-29 avec des CSM. Ils ont trouvé que les CSM favorisent la croissance tumorale et l'angiogenèse. En effet les xénogreffes de cellules tumorales en présence de CSM ont une densité des microvaisseaux augmentée, avec une mobilisation plus importante des cellules progénitrices endothéliales (EPC) par la moelle osseuse. Cet effet serait dû à la sécrétion accrue d'IL-6 par les CSM qui augmente la production d'endothelin-1 dans les cellules cancéreuses et qui à son tour va activer ERK et AKT afin de recruter les cellules endothéliales et donc stimuler l'angiogenèse (Huang et al., 2013) (Figure 10).

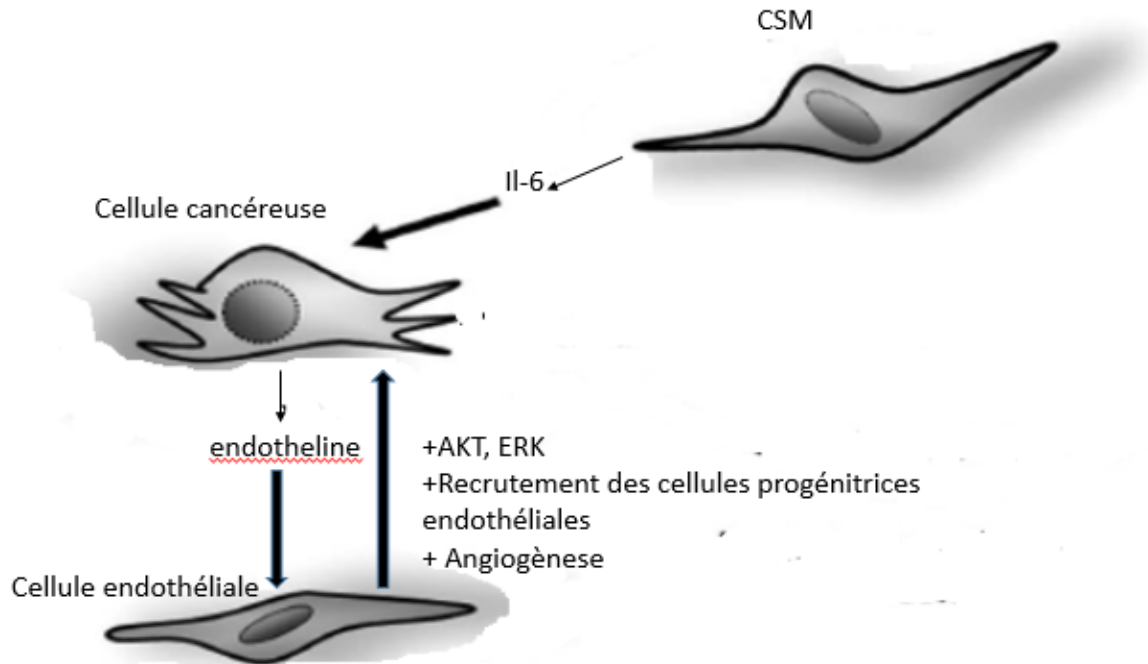


Figure 10: Interaction entre les cellules souches mésenchymateuses, les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales et la voie associée. Les CSM qui se trouvent dans le microenvironnement tumoral larguent l'IL-6 en grande quantité, ce qui favorise de recrutement des CE par les cellules cancéreuses via la voie de signalisation AKT/ERK (Adapté de : Huang et al., 2013).

De même, les CSM favorisent la néovascularisation des tumeurs en produisant des facteurs pro-angiogéniques comme l'angiopoïétine-1, le VEGF, HGF et IGF (Tögel et al., 2007), IL-6 et TNF- α et l'activateur du plasminogène. L'ensemble de ces facteurs vont sensibiliser les CE de manière à soutenir la vasculogénèse et l'angiogénèse tumorale, mais aussi certains peuvent agir directement sur les cellules cancéreuses en favorisant leur prolifération (Tang et al., 1996). Les CSM sont recrutées par les tumeurs, où elles vont exercer leurs différentes actions en activant plusieurs voies de signalisation. L'initiation de ces signaux provient de la membrane cellulaire, entre autres, des cavéoles.

3. Les cavéoles et les cavines

3.1. Les cavéoles

3.1.1. Définition

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique qui ont un diamètre allant de 60 à 80 nm (Simons et Ikonen, 1997). Elles ont été décrites pour la première fois par Palade en 1953 (Palade, 1953). Elles ont une structure riche en lipides : sphingolipides et cholestérol et en protéines : cavéolines et cavines. À la surface membranaire, les cavéoles ont une forme vésiculaire, mais elles peuvent aussi être regroupées en rosette, ou elles adoptent une forme tubulaire (Parton et Simons, 2007).

Leur abondance, spécialement dans certains types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les CE et les adipocytes, a longtemps suscité l'intérêt des scientifiques qui cherchaient à comprendre leurs fonctions cellulaires (Razani et al., 2002) (Figure 11). Les cavéoles sont impliquées dans l'endocytose, la transcytose (Nabi et Le, 2003), la signalisation du calcium et la transduction du signal (Wanaski et al., 2003). Elles ont été également utilisées par les pathogènes, en tant que porte d'entrée directe pour les cellules (Rosenberger et al., 2000).

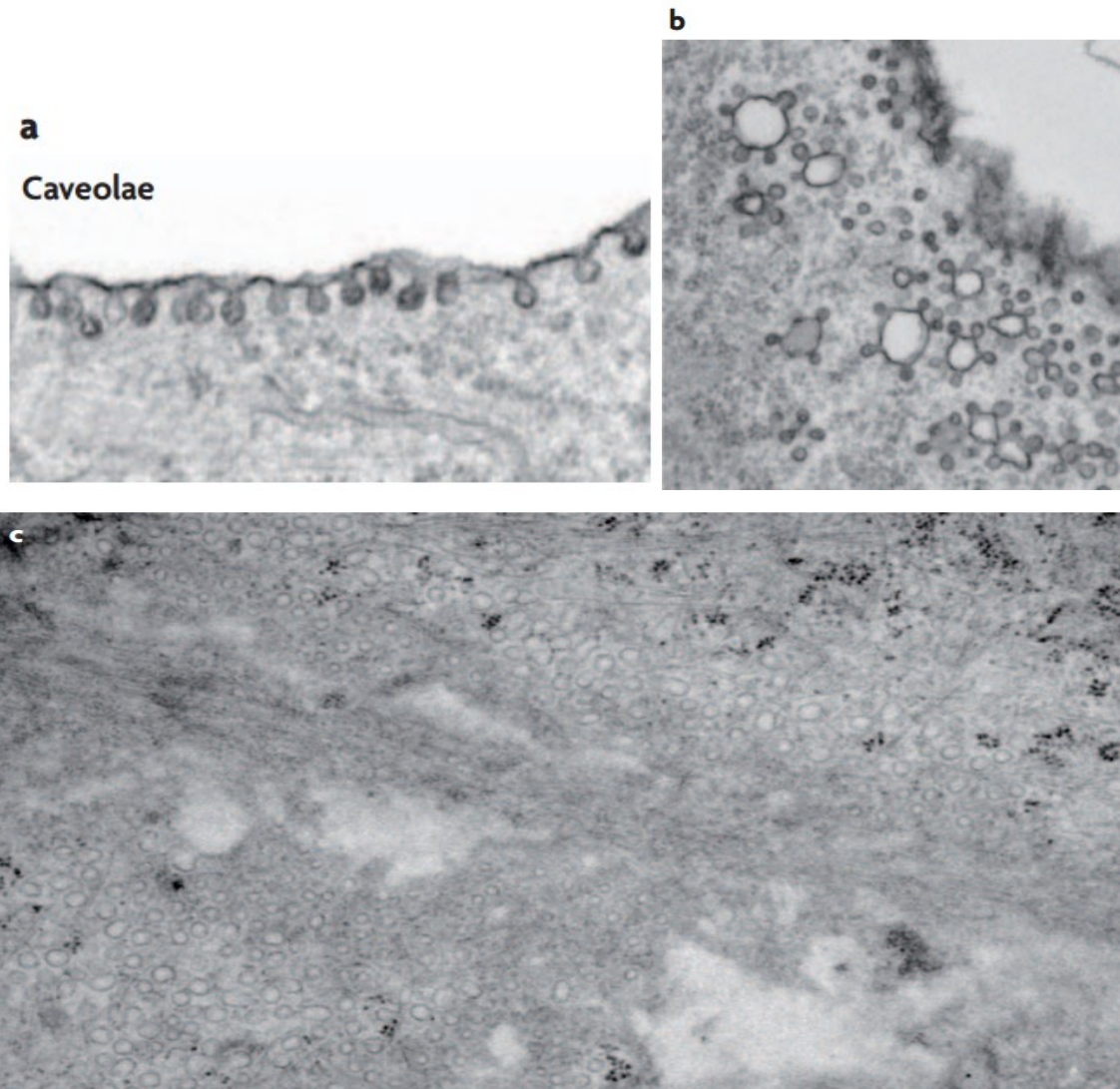


Figure 11 : Morphologie des cavéoles. Les cavéoles ont classiquement des structures vésiculaires (a) ou regroupées en rosettes (b). Dans les fibroblastes, les cavéoles sont particulièrement abondantes (c) (Parton et Simons, 2007).

3.1.2. Biogenèse des cavéoles

Les cavéolines sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique, où elles vont ensuite subir une première oligomérisation, donnant naissance à des oligomères de 7 à 14 cavéolines, formés majoritairement de cavéoline-1 (Parton et Simons, 2007). Ces complexes

vont se retrouver ensuite au niveau de l'appareil de Golgi où ils vont subir une deuxième oligomérisation (Pol et al., 2005). En effet, ils vont interagir pour donner des oligomères de grande masse moléculaire formés de 144 cavéolines. Les oligomères vont subir une palmitoylation avant d'être transporté vers la membrane plasmique par des vésicules d'exocytose (Pol et al., 2005). Le cholestérol est nécessaire pour le trafic des cavéolines vers la membrane. En effet, le traitement des cellules par la cyclodextrine ou la nystatine, éléments qui lient le cholestérol, conduit à la perte d'expression des cavéoles membranaires (Rothberg et al., 1992). Les cavines se regroupent à l'état basal, dans le cytoplasme, sous forme d'oligomères de 40 à 60 protéines, ces complexes vont joindre les cavéolines au niveau de la membrane cytoplasmique pour former le manteau des cavéoles (Bastiani et al., 2009) (Figure 12).

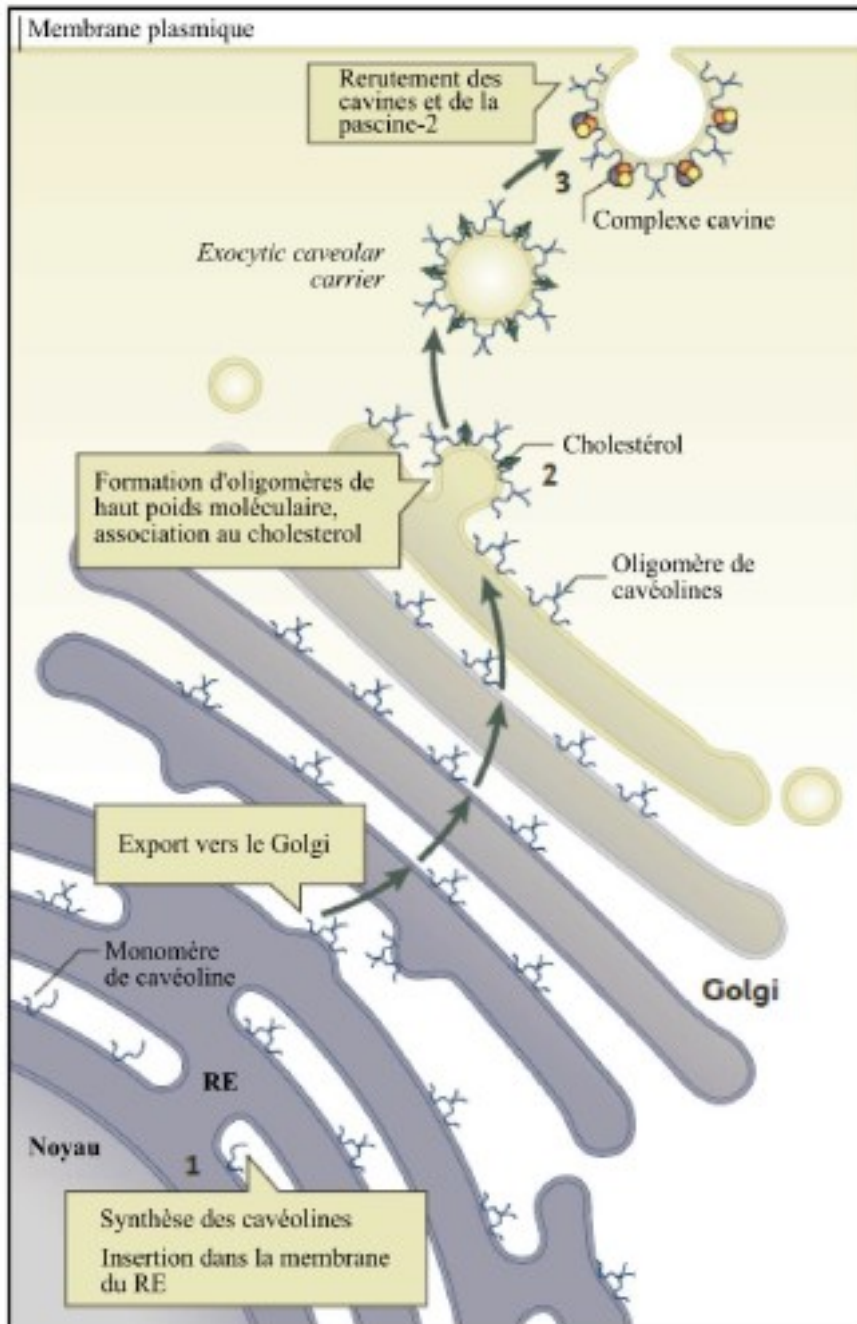


Figure 12 : Représentation schématique de la biogénèse des cavéoles. Les cavéolines seront au début oligomérisées dans le RE ensuite dans l'appareil de Golgi. La mobilisation des cavéolines vers la membrane plasmique est dépendante du cholestérol. Ensuite les complexes cavines seront recrutés. (Adapté de : Parton et del Pozo, 2013).

3.1.3. Les fonctions des cavéoles

Depuis la découverte des cavéoles, il a été suggéré que ces organelles jouent un rôle dans l'endocytose, mais aussi d'autres rôles, tel que la transduction du signal, l'homéostasie calcique, l'homéostasie du cholestérol et dans la réponse au stress mécanique. La voie d'endocytose dépendante de la clathrine était considérée comme l'unique voie d'internalisation utilisée par les cellules. Le développement de techniques de biologie moléculaire a permis de déterminer une autre voie d'endocytose indépendante de la clathrine et impliquant les cavéoles. L'internalisation de diverses particules passe par les cavéoles, tel que le transport de l'albumine (Ghitescu et al., 1986), de l'insuline (King et Johnson, 1985), des LDL modifiées (Frank et al., 2009), des chémokines (Mueller et al., 2002) et des agents pathogènes comme la sous-unité B de la toxine cholérique (CTxB) ou le virus simien 40 (SV40) (Pelkmans et Helenius, 2002). Les cavéoles font appel à plusieurs molécules de signalisation et régulent un grand nombre de voies de signalisation cellulaires.

Mis à part l'endocytose, les cavéoles jouent un rôle important dans l'initiation des voies de signalisation. En effet, les cavéoles forment une plateforme de signalisation, elles permettent d'assembler de multiples molécules de signalisation, mais aussi, de réguler les voies de signalisation grâce au CSD « *Caveolin Scaffolding Domain* » des cavéolines qui joue un rôle modulateur sur les voies de signalisation. Nous pouvons citer l'exemple des récepteurs couplés à une protéine G, avec les sous-unités $G\alpha$, qui se trouvent en abondance dans les cavéoles. Le CSD interagit avec la $G\alpha$ (la sous unité activatrice de la Protéine G), il en résulte une inhibition de l'échangeur GDP/GTP, donc moins d'activation de la protéine G (Li et al., 1995). Plusieurs autres protéines sont inhibées après une interaction avec le CSD, par exemple les récepteurs tyrosines kinases tel que l'épidermal growth factor receptor (EGFR) (Couet et al., 1997) ou le platelet-derived growth factor receptor (PDGF) (Yamamoto et al., 1999, mais aussi les tyrosines kinases Src, la protéine kinase A, la protéine kinase $C\alpha$ et MEK1 (Couet et al., 1997). D'une manière générale et à l'exception des récepteurs à l'insuline (IR), le CSD des cavéolines est considéré comme un inhibiteur universel des kinases. Dans le cas des IR, la liaison au CSD a un effet stimulateur sur cette voie de signalisation (Pessin et Saltiel, 2000). Gong et al se sont

intéressés aux rôles des cavéoles sur la voie de signalisation NF- κ B. Ils ont démontré que dans les cellules du cancer de l'œsophage, il y'a une surexpression des cavéoles due à la diminution des miR-138. L'augmentation de l'expression des cavéoles augmente le recrutement du TNFR et IKK dans des radeaux lipidiques, ce qui active la voie de signalisation NF- κ B, ce qui conduit par conséquent à l'accélération de la progression tumorale (Gong et al., 2013) (Figure 13).

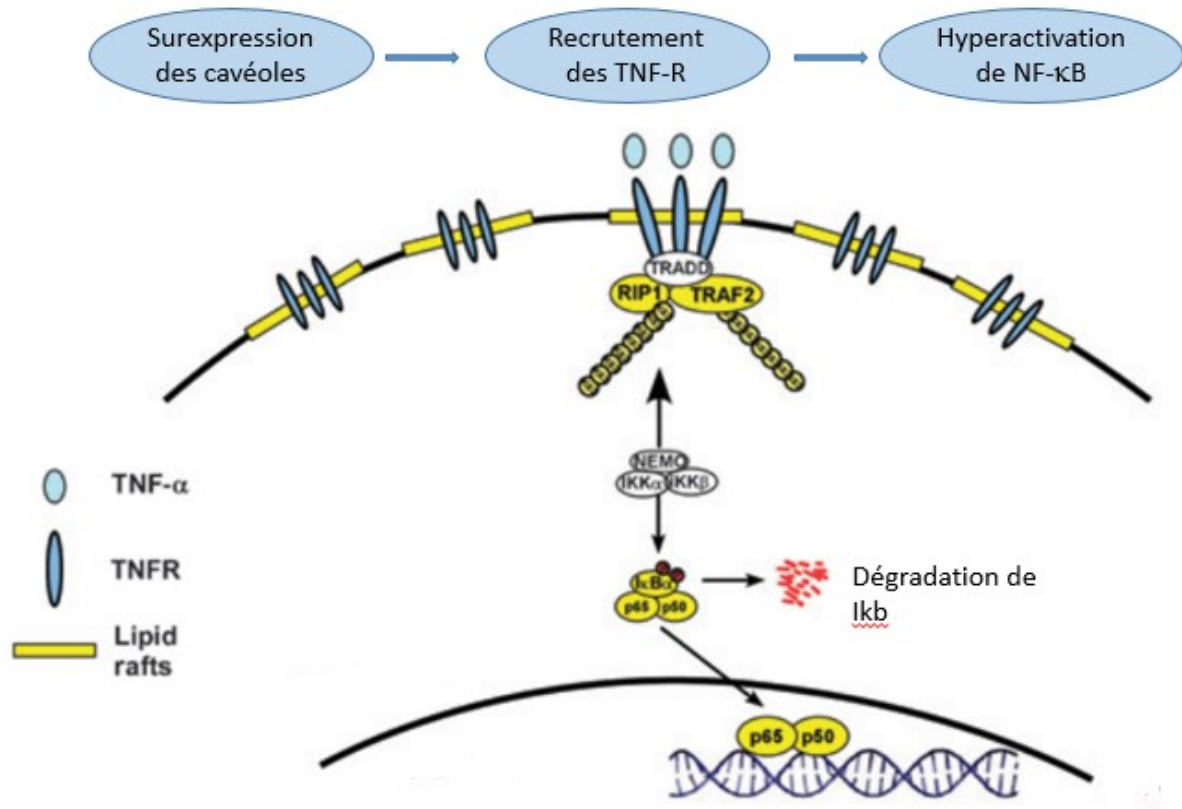


Figure 13 : L'augmentation de la densité des cavéoles conduit à l'hyperactivation de la voie NF- κ B. Suite à la surexpression des cavéoles le recrutement du TNFR et IKK dans des radeaux lipidiques est accru, donc hyperactivation de la voie de signalisation NF- κ B et promotion des tumeurs (Adapté de : Gong et al., 2013).

Les cavéoles jouent d'autres rôles dans les cellules. En effet, elles régulent la réponse cellulaire au stress mécanique : lorsque la tension membranaire augmente, les cavéoles changent de conformation spatiale et s'aplatissent (Sinha et al., 2011), diminuant ainsi les forces exercées sur la membrane cellulaire. Aussitôt que le stress mécanique est levé, les cavéoles retrouvent leur forme initiale.

Les cavéoles sont des acteurs du métabolisme lipidique. Dans les adipocytes, les cavéoles et les cavéolines assurent le transport du cholestérol (Murata et al., 1995). D'autre part, les cavéoles participent en partie à la synthèse de triglycérides. Il a été prouvé également que la diminution de l'expression de cavéoline-1 altère la réponse lipolytique dans les adipocytes (Le Lay et al., 2009).

3.2. Les cavéolines

Les cavéolines, forment avec les cavines, les protéines associées aux cavéoles. Il existe trois isoformes de cavéolines. La cavéoline-1 est retrouvée dans tous les types cellulaires. Elle joue un rôle crucial dans la formation des cavéoles; l'inhibition de son expression conduit à la disparition des cavéoles. On distingue deux isoformes cavéolines-1 α et β (Scherer et al., 1994). Au niveau de sa structure la cavéoline-1 est caractérisée par CSD qui lui permet d'interagir avec les autres cavéolines et avec de multiples protéines impliquées dans la signalisation (Sargiacomo et al., 1993). La cavéoline-2 est aussi exprimée dans tous les tissus. Elle a la même répartition que la cavéoline-1 avec laquelle elle s'associe pour former des hétéro-oligomères (Scherer et al., 1996). Son expression n'est pas indispensable pour la formation des cavéoles (Parolini et al., 1999). La cavéoline-3 est exprimée exclusivement dans les cellules musculaires. Dans ces cellules, la cavéoline-3 est indispensable et responsable à elle seule de former les cavéoles (Li et al., 1998).

3.3. Les cavines

3.3.1. Définition et structure

Les cavines forment la deuxième famille de protéines de soutien des cavéoles. Cette famille regroupe 4 isoformes, cavine-1 (polymerase transcript release factor, PTRF), cavine-2 (serum deprivation protein response, SDPR), cavine-3 (srd-related gene product that binds to c-kinase, SRBC), et cavine-4 (muscle-restricted coiled-coil protein, MURC), qui ont été récemment documentés et jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des cavéolines et dans la morphologie des cavéoles (Figure 14).

Pour ce qui est de leur structure, les cavines présentent une homologie structurale, avec une structure secondaire en hélice α , deux domaines conservés, appelés régions hélicoïdales :

- Un domaine N-terminal conservé, ou encore appelé 'coiled-coil', ce domaine permet l'interaction cavine-cavine. Cette structure incorpore les motifs courts 'leucine zipper', qui sont riches en résidus leucine, et ont une implication importantes pour le recrutement des cavines et la formation du manteau cavéolaire (Kovtun et al., 2015).
- Une deuxième région hélicoïdale, qui est essentielle à la formation des gros oligomères de cavines, mais dont les mécanismes en question demeurent mal élucidés (Kovtun et al., 2014).

Ces deux régions sont séparées par trois régions désordonnées qui ne sont pas bien conservées au niveau de la séquence, mais partagent des profils en acides aminés semblables. Ces domaines sont riches en motifs PEST (séquences enrichies en proline, acide glutamique, serine et thréonine) qui ont une sensibilité protéolytique (Bastiani et al., 2009). L'abondance particulière de ces motifs, suggère que la dégradation protéolytique joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie et des fonctions des cavines (Bastiani et al., 2009; Kovtun et al 2015). Notons aussi que ces protéines présentent des dizaines de sites de phosphorylations distribués essentiellement au niveau des régions désordonnées. Après une stimulation des

adipocytes, les cavines ont été rapidement phosphorylées (Aboulaich et al., 2011), suggérant que leur régulation est liée aux voies de signalisation cellulaire et que la mobilisation des cavéoles est reliée à l'activité des kinases (Pelkmans et Zerial, 2005). Le poids moléculaire de la cavine-1 est estimé à 55 KDa, 72 KDa pour la cavine-2 et 43 KDa pour les cavines-3 et-4 (Briand et al., 2011).

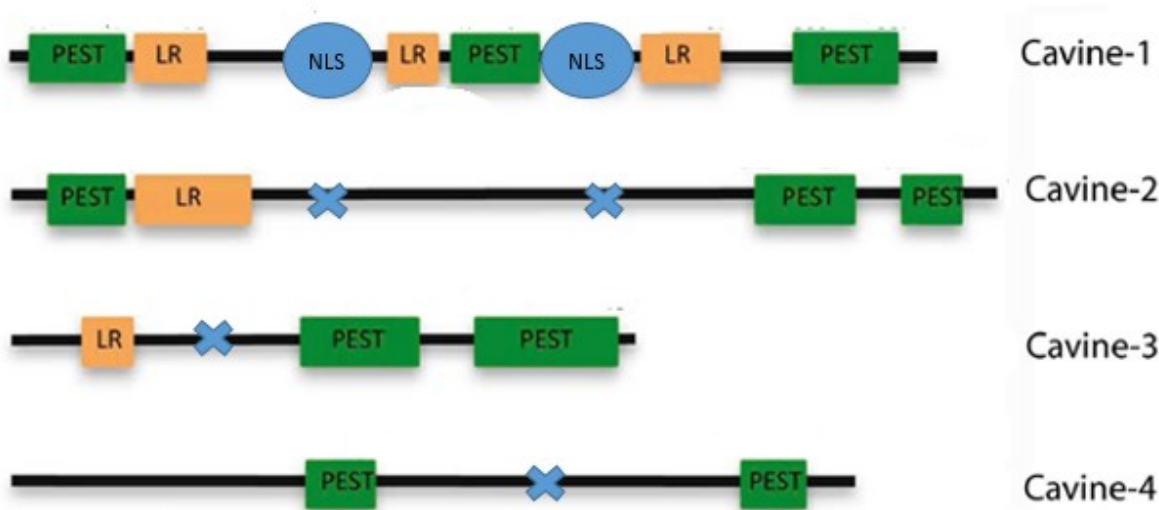


Figure 14 : Structure des protéines cavines chez la souris. Domaines putatifs PEST (vert), les régions riches en leucine (LR; orange), et des séquences de localisation nucléaire (NLS; jaune) sont présentés avec des numéros d'acides aminés indiqués (Bastiani et al., 2009).

La cavine-1 a été la première cavine identifiée (Gustincich et al., 1999). Dès sa découverte, un lien entre l'expression de cavine-1, Cav-1 et les cavéoles était établi. En effet, des études ont montré sa colocalisation et sa codistribution avec Cav-1 dans le tissu adipeux et dans les radeaux lipidiques (Hill et al., 2008). La régulation de la biodisponibilité de Cav-1 par cavine-1 a été démontrée *in vitro*. En effet, une surexpression de cavine-1 conduit à une augmentation des niveaux de Cav-1, tandis que la délétion génétique de cavine-1 entraîne une perte globale de cavéoles par diminution de la disponibilité de toutes les protéines cavéolines, la dyslipidémie, la réduction du tissu adipeux, et l'intolérance au glucose. Dans les cellules PC3 du cancer de la prostate, qui expriment à leur surface cav-1 mais n'expriment ni cavine-1 ni les

cavéoles, une induction de l'expression de PTRF est suffisante pour provoquer la formation des cavéoles (Hill et al., 2008). Ces études ont permis de conclure quant au rôle de cavine-1 comme stabilisateur des cavéoles (Figure 15).

La cavine-2 a été identifiée par Gustincich et Schneider en 1993 qui l'ont nommée SDPR pour *serum deprivation protein response*, du fait qu'elle est déclenchée après une privation en sérum (Gustincich et Schneider, 1993). En 1998, Mineo et al ont isolé la protéine de SDPR et ont démontré qu'elle lie la protéine kinase C (PKC) et qu'elle se localise dans les cavéoles. Les travaux de Hansen et al en 2009 ont permis de comprendre les fonctions de la cavine-2 au sein des cavéoles (Hansen et al., 2009). En effet, la diminution de l'expression génique de SDPR conduit à une baisse du nombre des cavéoles, expliquée par la perte de l'expression de cavine-1 et de cavéoline-1. Cela suggère que les niveaux d'expression de cavine-2, cavine-1 et cavéoline-1 sont corrélés. La surexpression de cavine-2 n'affecte pas le nombre de cavéoles, mais va déformer les cavéoles en favorisant une forme tubulaire. Cela permet de déduire que cavine-2 contrôle la morphologie des cavéoles (Hansen et al., 2009) (Figure 15).

La cavine-3 est une protéine cavéolaire qui était initialement identifiée comme étant une protéine liant la phosphatidylsérine et comme un substrat de PKC. De même pour Cavin-2, son expression est induite après une privation de sérum (Aboulaich et al., 2004; McMahon et al., 2009). La diminution de l'expression de cavine-3 altère le trafic vésiculaire et l'endocytose, suggérant que la cavine-3 régule l'internalisation des cavéoles (McMahon et al., 2009) (Figure 15).

La cavine-4 est une protéine restreinte aux cellules musculaires, où elle colocalise avec Cav-3 (Ogata *et al.*, 2008). Il a été documenté que la synthèse de cavine-4 est accrue pendant la myogenèse. La diminution de l'expression génique de la cavine-4 régule à la baisse la différenciation des cellules musculaires C2C12 (Bastiani *et al.*, 2009). Cependant, le rôle de cavine-4 au sein des cavéoles demeure mal documenté.

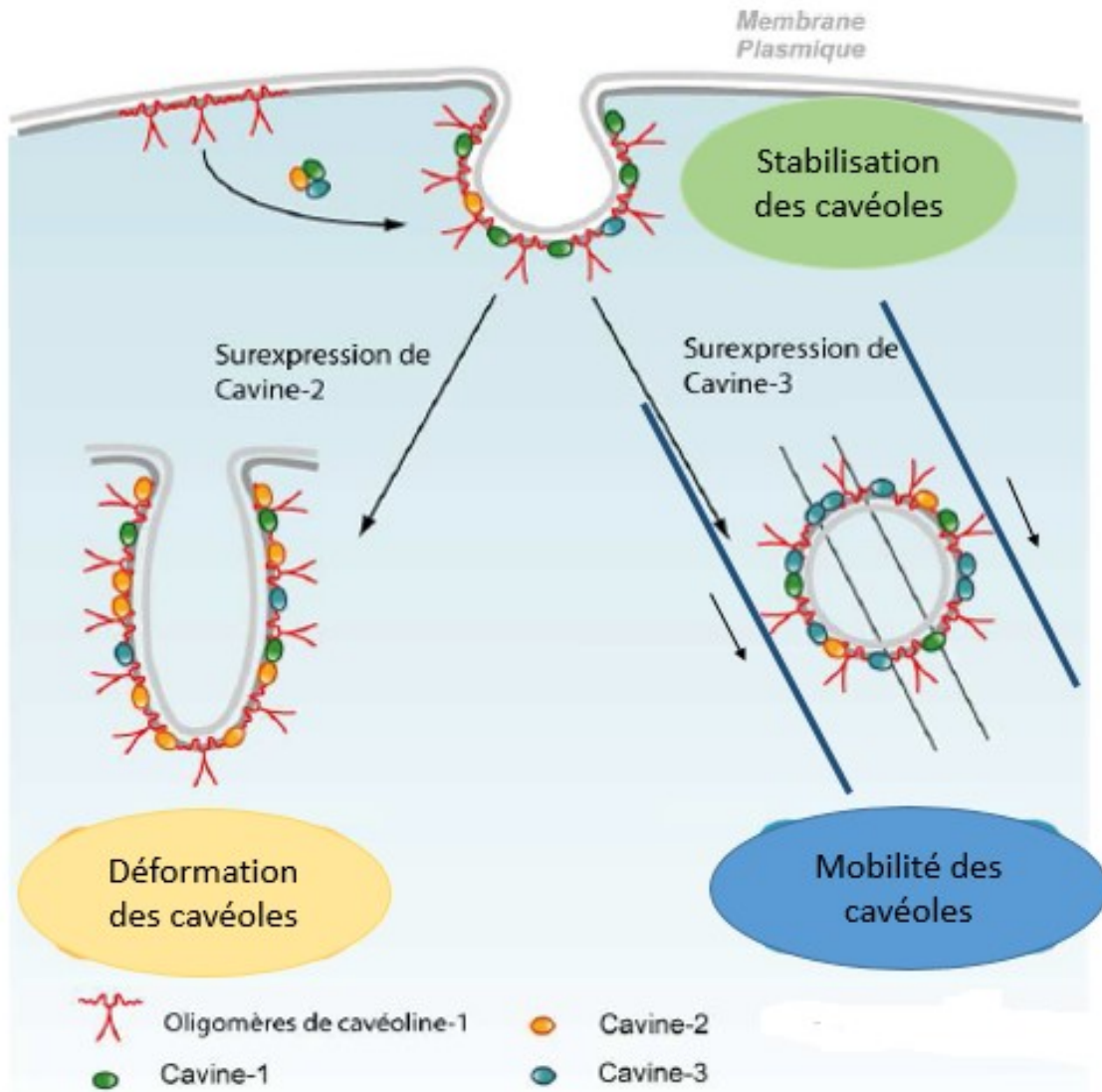


Figure 15 : Fonctions des protéines cavines au sein des cavéoles. Le complexe des cavines s'associe aux cavéoles invaginées au niveau de la membrane plasmique. La surexpression des cavines modifie la quantité, la morphologie et la dynamique des cavéoles. La surexpression de cavine-2 induit la formation de tubules tandis que la surexpression de cavine-3 augmente la mobilité des cavéoles. (Adapté de : Briand et al., 2011).

3.3.2. Cavines et cancer

Les rôles des cavéolines et des cavines dans la régulation du cancer sont maintenant bien reconnus. En effet, des mutations touchant ces protéines ont été retrouvées dans plusieurs types de cancer (Gupta et al., 2014). La cavine-1, dépendamment du type et des conditions des cellules cancéreuses, peut être soit pro- ou anti-oncogène. En effet, il a été documenté que dans les cellules cancéreuses pancréatiques, la cavine-1 est primordiale pour que la Cav-1 exerce l'effet pro-oncogène. Dans ces cellules, cavine-1 colocalise avec Cav-1, et stabilise leur expression et leurs fonctions en diminuant leur internalisation et leur dégradation lysosomale (Liu et al., 2014). Dans ce cadre, une déplétion génique en cavine-1 inhibe l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses du pancréas ce qui suggère que l'interruption de l'interaction cavine-1 / Cav-1 pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse pour le cancer du pancréas (Liu et al., 2014). L'étude de la cavine-1 dans le cadre du cancer du sein a montré qu'elle est essentielle pour la résistance aux médicaments anti-cancéreux dans ces cellules (Yi et al., 2013). D'autres recherches ont pu mettre en évidence le rôle suppresseur de tumeur de cavine-1. En effet, l'expression de cavine-1 est diminuée dans les cancers de la prostate (Gould et al., 2010). L'induction expérimentale de l'expression de cavine-1 dans ces cellules cancéreuses de la prostate PC3, diminue la prolifération, la migration et la différenciation *in vitro* et *ex vivo* des cellules endothéliales, et diminue la densité des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques irriguant la tumeur chez la souris (Nassar et al., 2013). La cavine-1 diminue également la migration des cellules PC3 en diminuant la production de MMP9 donc diminue le pouvoir invasif des PC3 (Aung et al., 2011). À noter que tous ces effets sont indépendants de la formation des cavéoles et de l'expression des cavéolines.

Des études ont montré que la cavine-2 joue essentiellement un rôle suppresseur de tumeur. En effet, l'expression de la cavine-2 est significativement diminuée dans les cancers et les tumeurs mammaires, rénales et de la prostate (Bai et al., 2012; Li et al., 2008). Un examen de l'expression des gènes dans la lignée PC-3 par micro-puces d'ADN a révélé que l'expression de cavines -2 est diminuée lors de l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire (Tenta et al., 2007).

La cavine-3 est nettement diminuée, voir inhibée dans les lignées de cancer du sein, des ovaires et des poumons. Cette diminution est due à l'hyperméthylation du promoteur (Xu et al., 2001, Tong et al., 2010). Une perte d'expression du gène codant pour la cavine-3 est notée dans les métastases cérébrales secondaires à un cancer du sein (Wikman et al., 2012). Une étude menée dans notre laboratoire a démontré que dans les cellules cancéreuses de fibrosarcome HT1080, la surexpression de la cavine-3 diminue la migration en régulant à la baisse l'expression de MMP-9, une métalloprotéinase responsable de la dégradation de la MEC (Toufaily et al., 2014).

4. Hypothèse et objectifs

À travers la cancérogenèse, partant de la phase d'initiation jusqu'au développement d'une tumeur et à l'émission des métastases, le microenvironnement tumoral est déterminant pour la survie et la croissance des cellules tumorales. De ce fait, le microenvironnement tumoral est devenu une piste pour la prédiction et le traitement des cancers. Par conséquent, l'étude des différentes composantes cellulaires et moléculaires de ce microenvironnement, ainsi que leurs interactions et leurs implications dans l'évolution de la tumeur, est devenue une priorité dans notre laboratoire.

Il a été prouvé que les CSM participent activement au processus de cancérogenèse. En effet, elles ont la capacité de se mobiliser et de migrer sélectivement vers les foyers tumoraux sous l'effet des cytokines secrétées par les cellules tumorales. *In situ*, les CSM participent à l'angiogenèse tumorale en recrutant les CPE, elles promeuvent également la prolifération des cellules cancéreuses en sécrétant les facteurs de croissance et favorisent également la survie cellulaire en la déviant la réponse immunitaire. Les CSM exercent ces différentes actions en mettant en jeu diverses voies de signalisation intracellulaires. Une des voies de signalisation les plus déployées est la voie de signalisation NF- κ B. La compartimentalisation des signaux de l'initiation de cette voie provient de la membrane cellulaire. Une étude a prouvé l'importance des cavéoles dans la régulation du facteur de transcription NF- κ B, mais le mécanisme d'action demeure inconnu. Nous soumettons l'hypothèse que l'une des cavines, protéines associées aux

cavéoles, modulerait la voie de signalisation NF- κ B dans les MSC traitées au TNF- α , modulant ainsi le phénotype inflammatoire et le phénotype invasif dans les CSM.

Les objectifs de notre recherche sont d'étudier :

- La migration des CSM en présence du TNF- α
- L'effet des cavines sur la migration cellulaire en présence et en absence de TNF- α
- L'effet des cavines sur l'expression protéique et génique des COX-2 et la voie NF- κ B induite par TNF- α
- L'effet des cavines sur la formation de structures capillaires 3D des CSM

Chapitre 2 – Article

Probing into Cavin functions in the inflammation and migration phenotypes of TNF-activated mesenchymal stromal cells

Bayader Annabi^{1,2} and Borhane Annabi¹

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de recherche BIOMED, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada and ²Département de Physiologie moléculaire et intégrative, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montreal, Canada

Running header : Cavin-2 regulates TNF signalling

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; ERK, extracellular signal-regulated kinase; I κ B, inhibitor of kappa B; MMP, matrix metalloproteinase; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; TNF, tumour necrosis factor

Abstract

Mesenchymal stromal cells (MSCs) possess tumor-homing ability, opening up the possibility of applications in the targeted delivery of anti-cancer genes to tumors. In support, preactivating MSCs with the inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF)- α was recently found to enhance their tumor-suppressive properties. Although tumors are recognized as non-healing wounds within inflammatory tissue, the molecular regulators of TNF-mediated homing behavior of MSCs to sites of injury or inflammation remain poorly understood. In this study, we specifically assessed the impact of the cavolar proteins Cavin-1, Cavin-2, and Cavin-3 on TNF-induced inflammation and migration of human MSCs. We found that all *Cavin-1*, *-2* and *-3* transcripts were expressed in MSCs, TNF induced a global dose-dependent MSC migration, which was correlated with a dose-dependent increase in *Cavin-1* and *-3*, as well as a decrease in *Cavin-2* gene expression profiles. TNF triggered cyclooxygenase (COX)-2 expression, whereas the specific siRNA-mediated gene silencing of *Cavin-2* resulted in an amplified COX-2 expression and migratory response. This effect was, in part, explained through a sustained nuclear factor-kappa B (NF- κ B) phosphorylation status and to an increased inhibitor of kappa B (I κ B) decrease in cells where *Cavin-2* expression was silenced. Interestingly, increased TNF-mediated three dimensional capillary-like structure formation was also observed in siCavin-2-transfected MSCs. Collectively, our results highlight a crucial suppressive role for Cavin-2 in the regulation of TNF-activated MSCs inflammation and migration phenotypes. Given tumors are recognized as non-healing wounds with inflammatory tissue, our observations further support the concept that MSCs can be mobilized to target tumors' inflammatory microenvironment.

1. Introduction

Caveolae are specialized cholesterol- and sphingolipid-enriched plasma membrane invaginations, which, in cancer cells, regulate oncogenic functions through multiple signaling cascades.¹ Among these functions, roles of caveolae in mechanosensing, vesicular trafficking, and shuttling of molecules through the cell have been described.²⁻⁵ Caveolae have also been ascribed functions in many physiological events, such as wound healing, embryonic development and tissue regeneration,^{6,7} and in pathological settings such as cancer progression and metastasis.⁸ Cancer cell invasion, which involves several cellular processes including disruption of cell adhesion, degradation of the extracellular matrix (ECM) and regulation of cell invasion of blood and lymph vessels,⁹ has also been shown, in part, to require caveolae.

More recently, it has been suggested that coat proteins called cavins not only work together with caveolins to regulate the formation of caveolae, but also have the potential to transmit signals dynamically from caveolae to various cellular destinations.¹⁰ Of the four cavin proteins, PTRF/cavin-1 has been shown to mediate the reduction of MMP-9 production, independent of caveolar formation, and has been reported to decrease metastatic PC3 prostate cancer cell migration.^{11,12} Altogether, these observations support the notion that control of MMP-9 expression/secretion occurs through caveolar components or through caveolae-mediated signaling. MMP-9 transcriptional regulation is already, in fact, considered to be triggered by cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α through transcriptional factors including SP-1, AP-1 and NF- κ B.¹³

Several studies have pointed out dual roles for the other cavin proteins.¹⁴ Cavin-2 also known as SDPR, for serum deprivation protein response, and cavin-3 SRBC, as it is an Sdr-related gene product that binds to c-kinase. Cavin-4 MURC, for muscle restricted coiled-coiled protein. Cavin-2 shares 20% homology with cavin-1, and a decrease in cavin-2 expression leads to a decrease in caveolar formation and numbers. It is also localized at the plasma membrane, along with caveolin-1 and cavin-1.¹⁵ Cavin-3 was first identified as a substrate of PKC delta and is located in a tumor suppressor region at chromosome 11p15.5, which is lost in breast, prostate and pancreatic cancer cells.¹⁶ Cavin-4 expression is restricted to skeletal and cardiac myocytes.¹⁷

Mesenchymal stromal cells (MSCs), most commonly isolated from the bone marrow, are a population of pluripotent adult stem cells that can differentiate into many mesenchymal phenotypes.^{18,19} In fact, recruitment of MSCs by experimental vascularizing tumours resulted in the incorporation of MSCs within the inflammatory tumor architecture^{20,21} which, combined to intrinsic immunomodulatory mechanisms, implies that they must also respond to tumour-derived growth factor or cytokine cues.^{22,23} Consequently, homing of MSCs to tumours is thought to be among the earliest phenomenon of MSC-cancer interactions, as was recently reported in a mouse model where injected human MSCs could be found preferentially migrating to implanted human melanoma tumours.²⁰ Subsequently, studies have shown MSCs homing to tumours and even to sites of metastasis.²⁴ Furthermore, cotransplantation of MSCs with melanoma cells in mice enhanced tumour engraftment and growth.²⁵ These data are in agreement with observations that vascular progenitors derived from bone marrow stromal cells are recruited by tumours both *in vivo* and *in vitro*.²²

The sum of this evidence, in line with their increased ability to migrate under an atmosphere of low oxygen,²⁶ suggests further that MSCs are active participants in the development of hypoxic solid tumours. In the current study we questioned the involvement of each of the cavin family members in the pro-inflammatory TNF-mediated response of MSCs.

2. Materials and methods

2.1. *Materials*

Tumor necrosis factor (TNF)- α was from EMD Millipore (Gibbstown, NJ), sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Perkin Elmer (Waltham, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against I κ B and phosphorylated I κ B were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). Dilutions of 1:1,000 was used for immunoblotting, and 1:200 for immunofluorescence. The monoclonal antibody against GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

2.2. *Cell migration assay using the xCELLigence biosensor system*

Cell migration assay experiments were carried out using the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument of the xCELLigence system (Roche Diagnostics). MSC were trypsinized and 20,000 cells/well were seeded onto CIM-Plates 16 (Roche Diagnostics). These plates are similar to conventional Transwells (8 μ m pore size), with gold electrode arrays on the bottom side of the membrane to provide a real-time measurement of cell migration. Prior to cell seeding, the underside of the wells from the upper chamber was coated with 25 μ L of 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 hour at 37°C. PMA was dissolved in serum-free culture medium and added to the upper wells, while the lower chamber was filled with 10% FCS medium to act as a chemoattractant. Cell migration was monitored for 8 hours. The impedance values were measured by the RTCA DP Instrument software and were expressed in arbitrary units as the Relative Cell Migration Index. Each experiment was performed in quadruplicate.

2.3. *Immunoblotting procedures*

Following treatments or transfection, MSCs were washed with PBS and lysed with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Triton) in the presence of phosphatase and protease inhibitors on ice for 30 minutes. Cell debris was pelleted by centrifugation for 10 min at high speed. Protein concentration was quantified using a micro bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc). Proteins from control and treated cells were separated by Sodium dodecyl sulfate (SDS)–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were then blocked overnight at 4°C with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with primary antibodies directed against COX-2 (1/10,000), IκB, phosphorylated IκB (1/1,000), or GAPDH (1/1,500). Washing was then performed in TBST, followed by a 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/10,000) or anti-mouse IgG (1/5,000) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by Western Lightning Enhanced Chemiluminescence Pro (Perkin Elmer).

2.4. Cell cultures

Human MSC were obtained from marrow biopsies of volunteers undergoing hip replacement and isolated by Ficoll gradient. Cells were plated in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GibcoBRL) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) and 100 units/ml Penicillin/Streptomycin. After 5-7 days of incubation in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂, the nonadherent hematopoietic cells were discarded. Adherent MSC were further grown on non-coated culture dishes and maintained over 14 passages. Analysis by flow cytometry performed at passage 14 revealed that MSC expressed CD44, yet were negative for CD45, CD31, KDR/flk1 (VEGF-R2), flt-4 (VEGF-R3), and Tie2 (angiopoietin receptor) (data not shown). Serum starvation was performed by culturing the cells in high αMEM, 2 mM L-glutamine, and 100 units/ml Penicillin/Streptomycin from which the inactivated fetal bovine serum was omitted.

2.5. *Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR*

Total RNA was extracted from MSCs 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): Cavin-1 (Hs_CAV1_1_SG, QT00001533), β-Actin (Hs_ACTB_2_SG, QT01680476), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247), PPIA (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137), Cavin-2 (Hs_CAV2_1_SG, QT00068754), Cavin-3 (Hs_CAV3_1_SG, QT00001414). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, β-Actin/GAPDH/PPIA 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/GAPDH/PPIA RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$. Semi-quantitative PCR was performed to examine amplification products and amplicons resolved on 1.8% agarose gels containing 1 µg/ml ethidium bromide.

2.6. *Transfection method and RNA interference*

Subconfluent (30-50%) MSCs were transiently transfected for 24 hours in serum-free media and with 20 nM siRNA against Cavin-1 (human Hs_CAV1_7 FlexiTube siRNA, SI02662338), Cavin-2 (human Hs_CAV2_6 HP siRNA, SI03648841), Cavin-3 (HS_CAV3_5 FlexiTube siRNA, SI02223221), 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.

2.7. *Capillary-like structure formation assay*

Induction of tubulogenesis was performed using Matrigel. Matrigel was thawed on ice to prevent premature polymerization; aliquots of 50 μ l were plated into individual wells of 96-well tissue culture plates (Costar) and allowed to polymerize at 37°C for at least 60 minutes. Cells were removed from confluent cultures by treatment with trypsin 0.05%-EDTA 0.53 mM. The cells were washed in serum-containing medium then resuspended to 10⁶ cells/ml. Into each culture well was added 100- μ l cell suspension with or without TNF 100 μ M. Each control or TNF treatment was assayed in duplicate, and all experiments were performed at least three times. For quantitation of tube formation, the total length of the tubes formed in a unit area was digitized and measured using ECLIPSE software. For each test, five randomly chosen areas were measured and averaged.

3. Results

3.1. *TNF triggers global MSCs migration and regulates Cavin gene transcription.*

We first wished to document the potential interrelationship between MSCs migration and Cavin expression upon that TNF treatment. Cell migration response to TNF was assessed and found to be increased in a dose-dependent manner (Fig.1A). When plotted at 8 hours of migration, cell migration was starting to plateau between 30-100 μ M TNF (Fig.1B). Cavin gene expression profiling was also performed using total RNA isolated from control (Fig.1C) and TNF-treated cells (Fig.1D). We found that all three *Cavin-1*, *Cavin-2*, and *Cavin-3* transcripts were expressed in MSC as a single specific amplicon was generated upon qRT-PCR on an agarose gel (Fig.1C). *Cavin-1* and *Cavin-3* transcript levels were found to significantly increase in response to TNF, while that of *Cavin-2* dose-dependently decreased upon TNF treatment (Fig.1D). Altogether, our data confirm that TNF exerted a cellular effect by inducing cell migration, and that it was able to differentially modulate Cavin expression in MSCs. We next wished to investigate the potential impact of Cavins on TNF response.

3.2. *Silencing of Cavin-2, but not Cavin-1 or -3, potentiates TNF-mediated COX-2 expression and cell migration.*

MSC were next transiently transfected with siRNA in order to silence *Cavin-1*, *-2*, and *-3* gene expression. Gene silencing specificity was validated by qRT-PCR, and found to effectively reduce gene expression between 75%-90% (Fig.2A). When cyclooxygenase (COX)-2, a pro-inflammatory biomarker known to be induced by TNF, expression was assessed, we found that neither *Cavin-1* nor *Cavin-3* gene silencing altered TNF-induced COX-2 expression (Fig.2B). In contrast, silencing *Cavin-2* was rather found to potentiate TNF-mediated COX-2 induction (Fig.2B). When MSC migration was assessed, none of the three *Cavins* gene silencing affected basal migration (Fig.2C, open circles). However, TNF-mediated MSC migration was induced in siScrambled, siCavin-1 and in siCavin-3 transfected cells, whereas it was potentiated in MSCs where *Cavin-2* gene expression was reduced (Fig.2C, closed circles). Our observations suggest that *Cavin-2* exerts a pivotal role in TNF-mediated signalling in MSCs as its expression represses TNF signalling.

3.3. *TNF-mediated NF- κ B signaling is sustained upon Cavin-2 gene silencing.*

In order to next document the possible mechanisms responsible for increased TNF-induced MSC migration and COX-2 expression upon *Cavin-2* silencing, we decided to examine the phosphorylation status of I κ B and its subsequent proteasomal degradation. MSCs were transiently transfected with siScrambled or siCavin-2, then treated with TNF and lysates harvested at the indicated times. We found that TNF effectively triggered I κ B phosphorylation at 5 minutes, and that this subsequently led to I κ B degradation as expected (Fig.3, upper panels). In contrast, *Cavin-2* silencing systematically resulted in a more rapid (<5 min) I κ B phosphorylation which, in turn, also led to a rapid decrease in I κ B (Fig.3, lower panels). Such data suggest that increased translocation to the nucleus of the p50 and p60 NF- κ B subunits may lead to sustained and/or increased COX-2 transcription and protein expression, as well as to increased MSC migration.

3.4. *Cavin-2 gene silencing alters 3D-capillary-like structure formation of MSCs.*

We have observed that MSCs possess angiogenic properties as they were able to generate capillary-like structures *in vitro*, and that this process was regulated at the molecular level by a specific membrane-bound MMP, namely membrane-type (MT)1-MMP and by S1P.^{27,28} Given TNF is able to increase MSC migration and that *Cavin-2* regulated such response, we next questioned whether tubulogenesis was also altered. Increasing quantities of MSCs were seeded on top of Matrigel and tubulogenesis assessed within 6 hours as described in the Methods section. We found that significant tubulogenesis was observed between 40,000-80,000, reached a plateau at 100,000 cells (Fig.4A), and that TNF was able to increase such process (Fig.4B). When *Cavin-2* gene expression was silenced and tubulogenesis measured at sub-saturating cell density (40,000 cells), we found that TNF, similarly to its effect on cell migration and COX-2 expression, again amplified MSCs tube formation as compared to control (siScrambled) cells (Fig.4C).

4. Discussion

Assessment of MSC *in vitro* migration and tubulogenesis classically involves strategies to prime the cells, such as in response to serum-derived growth factors or to specific cytokines.²⁹ Given the lack of an inflammatory-like *in vitro* microenvironment components and extracellular growth factor-mediated cues, treatments with TNF- α was privileged to mimic and trigger a pro-inflammatory response. While TNF signal transducing events are, in part, believed to take place through caveolae components,³⁰ the role of Cavin proteins unfortunately remains undocumented.

Phorbol esters such as PMA have also been used to prime cell migration and are also able to trigger a pro-inflammatory phenotype.³¹ They are generally used to either trigger secretion of ECM hydrolytic enzymes such as MMPs or to initiate signaling pathways that affect cell migration.^{32,33} While several signaling pathways have been well documented, the effective balance of the NF- κ B pathway in MSC may again be suggested. Accordingly, a human fibrosarcoma cell line responded to PMA in part through increased secretion of MMP-9,³⁴ the secretion of which is classically correlated with pro-inflammatory,^{35,36} pro-angiogenic and metastatic processes.³⁷ Intriguingly and although both MMP-9 expression and cell migration can effectively be triggered *in vitro* upon a defined PMA treatment, the overall effect that was actually measured was, in fact, a diminished cell migration index, in part consequent to the increased expression of the tumor suppressor Cavin-3.³⁴

Our current study rather provides new insight into the inflammatory suppressive functions of Cavin-2. While Cavin-1 and Cavin-3 expression can be dose-dependently induced by TNF, their respective silencing does not alter TNF-induced MSC migration nor COX-2 expression. In support, Cavin-1 and Cavin-3 expression were also induced by TNF in airway smooth muscles cells.³⁸ In contrast, we found that endogenous Cavin-2 expression is the only that is decreased upon TNF treatment, while its silencing led to an amplified TNF-mediated MSC migration, tubulogenesis, and COX-2 expression. Silencing of *Cavin-2* expression was in fact shown to alter NF- κ B pathway in part explaining TNF- α effects. We conclude that Cavin-

2 exerts a suppressive role against the pro-inflammatory action of TNF since its silencing allows for increased TNF effects. Cavin-2 affects formation of large caveolae, and accumulating evidence suggests that Cavin-2 is present in many cellular types; however, its clinical relevance is however still unknown. Cavin-2 was recently suggested to regulate Caveolin-1 expression leading to slow oral squamous cell carcinoma (OSCC) proliferation by inactivation of the extracellular regulated kinase (ERK) pathway.³⁹ Cavin-2 may therefore be a possible key regulator of OSCC progression via a Cavin-2/Caveolin-1/ERK pathway and a potential therapeutic target for developing new treatments for OSCCs. Further investigations on the roles of Cavin-2 will be required in inflammatory and angiogenic settings.

Metabolic impacts may also be expected upon modulation of Cavin-2 expression. Indeed, hypoxia was recently shown to inhibit Cavin-2 expression in adipocytes and to alter caveolae formation.⁴⁰ This leads to the inhibition of insulin signaling and the establishment of insulin resistance. Interestingly, downregulation of Cavin-2 upon hypoxia correlates with increased hypoxic MSC endogenous tubulogenesis.²⁶ Whether such Cavin-2 decrease also modulates MSC angiogenic phenotype deserves further investigations.

Acknowledgments

This study was funded by a grant #288249 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

Competing interest

The authors disclose no potential conflicts of interest.

References

1. Carver, L. A., & Schnitzer, J. E. (2003). Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nature Reviews Cancer*, 3(8), 571-581.
2. Liu, J., Oh, P., Horner, T., Rogers, R. A., & Schnitzer, J. E. (1997). Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 7211-7222.
3. Shaul, P. W., & Anderson, R. G. (1998). Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 275(5), L843-L851.
4. Shenoy-Scaria, A. M., Dietzen, D. J., Kwong, J., Link, D. C., & Lublin, D. M. (1994). Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *The Journal of cell biology*, 126(2), 353-363.
5. Parton, R. G., & Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(3), 185-194.
6. Gómez-González, B., & Escobar, A. (2009). Altered functional development of the blood–brain barrier after early life stress in the rat. *Brain research bulletin*, 79(6), 376-387.
7. Baker, N., & Tuan, R. S. (2013). The less-often-traveled surface of stem cells: caveolin-1 and caveolae in stem cells, tissue repair and regeneration. *Stem Cell Res Ther*, 4(4), 90.
8. Senetta, R., Stella, G., Pozzi, E., Sturli, N., Massi, D., & Cassoni, P. (2013). Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(3), 325-336.
9. Massey, K. A., & Schnitzer, J. E. (2010). Caveolae and cancer. In *Angiogenesis*

Inhibition (pp. 217-231). Springer Berlin Heidelberg.

10. Parton, R. G., & del Pozo, M. A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(2), 98-112..
11. Aung, C. S., Hill, M. M., Bastiani, M., Parton, R. G., & Parat, M. O. (2011). PTRF–cavin-1 expression decreases the migration of PC3 prostate cancer cells: Role of matrix metalloproteinase 9. *European journal of cell biology*, 90(2), 136-142.
12. Hill, M. M., Daud, N. H., Aung, C. S., Loo, D., Martin, S., Murphy, S., & Pilch, P. F. (2012). Co-regulation of cell polarization and migration by caveolar proteins PTRF/Cavin-1 and caveolin-1. *PLoS one*, 7(8), e43041.
13. Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 37(6), 375-536.
14. Gupta R, Toufaily C, Annabi B. (2014) Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer. *Biochimie*. 107:188-202.
15. Chaudhary, N., Gomez, G. A., Howes, M. T., Lo, H. P., McMahon, K. A., Rae, J. A., & Parton, R. G. (2014). Endocytic crosstalk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis. *PLoS Biol*, 12(4), e1001832.
16. McMahon, K. A., Zajicek, H., Li, W. P., Peyton, M. J., Minna, J. D., Hernandez, V. J., & Anderson, R. G. (2009). SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *The EMBO journal*, 28(8), 1001-1015.
17. Bastiani, M., Liu, L., Hill, M. M., Jedrychowski, M. P., Nixon, S. J., Lo, H. P., & Gygi, S. P. (2009). MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar

complexes. *The Journal of cell biology*, 185(7), 1259-1273.

18. Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, et al. (2007) Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res* 13:5020-5027.
25. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, et al. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102:3837-3844.

26. 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.
27. 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.* 31:640-9.
28. Jones GE. (2000) Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 68:593-602.
29. D'Alessio A, Al-Lamki RS, Bradley JR, Pober JS. (2005) Caveolae participate in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and internalization in a human endothelial cell line. *Am J Pathol.* 166:1273-82.
30. Gabler, W. L., Bullock, W. W., & Creamer, H. R. (1993). Phorbol myristate acetate induction of chemotactic migration of human polymorphonuclear neutrophils. *Inflammation*, 17(4), 521-530.
31. Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. (1993) Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J.* 296 (Pt 3):803-809.
32. Hwang, Y. P., Yun, H. J., Kim, H. G., Han, E. H., Choi, J. H., Chung, Y. C., & Jeong, H. G. (2011). Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC α /ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Toxicology letters*, 203(1), 9-19.
33. Toufaily C, Charfi C, Annabi B, Annabi B. (2014) A Role for the Cavin-3/Matrix

Metalloproteinase-9 Signaling Axis in the Regulation of PMA-Activated Human HT1080 Fibrosarcoma Cell Neoplastic Phenotype. *Cancer Growth Metastasis*. 7:43-51.

34. Annabi, B., Lord-Dufour, S., Vézina, A., & Béliveau, R. (2012). Resveratrol targeting of carcinogen-induced brain endothelial cell inflammation biomarkers MMP-9 and COX-2 is Sirt1-independent. *Drug Target Insights*, 6, 1..
35. Annabi, B., Vaillancourt-Jean, E., & Béliveau, R. (2013). MT1-MMP expression level status dictates the in vitro action of lupeol on inflammatory biomarkers MMP-9 and COX-2 in medulloblastoma cells. *Inflammopharmacology*, 21(1), 91-99.
36. McCawley, L. J., & Matrisian, L. M. (2001). Tumor progression: defining the soil round the tumor seed. *Current Biology*, 11(1), R25-R27.
37. Sathish V, Thompson MA, Sinha S, Sieck GC, Prakash YS, Pabelick CM. (2014) Inflammation, caveolae and CD38-mediated calcium regulation in human airway smooth muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1843(2):346-51.
38. Unozawa M, Kasamatsu A, Higo M, Fukumoto C, Koyama T, Sakazume T, Nakashima D, Ogawara K, Yokoe H, Shiiba M, Tanzawa H, Uzawa K. (2015) Cavin-2 in oral cancer: A potential predictor for tumor progression. *Mol Carcinog*. (in press)
39. Regazzetti, C., Dumas, K., Lacas-Gervais, S., Pastor, F., Peraldi, P., Bonnafous, S., & Tran, A. (2014). Hypoxia inhibits cavin-1 and cavin-2 expression and down-regulates caveolae in adipocytes. *Endocrinology*, 156(3), 789-801.

Figure legends

Fig.1 : TNF triggers global MSC migration and regulates Cavin gene transcription. A) MSC were harvested and the rate of cell migration monitored in real-time in response to increasing TNF concentrations using the xCELLigence system. Representative plots from two experiments measuring impedance responses are shown for each condition. (B) Plot of cell migration at time = 8 hours is shown in response to each TNF concentration used. (C) Total RNA was extracted from MSC and qRT-PCR performed as described in the Methods section. Amplicons of Cavins were migrated on an agarose gels and show a single product. GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PPIA, peptidyl prolyl isomerase A. (D) *Cavin-1*, *Cavin-2*, and *Cavin-3* gene expression was assessed in serum-starved MSC upon a 24 hours treatment with the indicated TNF concentrations.

Fig.2 : Silencing of Cavin-2, but not Cavin-1 or -3, potentiates TNF-mediated COX-2 expression and cell migration. MSC were transiently transfected with specific siRNA against each of the *Cavin-1*, *-2*, or *-3* genes as described in the Methods section. A) Total RNA was extracted and *Cavin* gene silencing efficacy and specificity assessed by qRT-PCR. B) MSC were treated with 100 μ M TNF for 24 hours and COX-2 expression immunodetected in lysates as described in the Methods section. GAPDH expression serves as loading control. C) Transfected-MSCs were harvested and cell migration in control (open circles) or in response to TNF 100 μ M (closed circles) assessed as described in the Methods section.

Fig.3 : TNF-mediated NF- κ B signaling is sustained upon Cavin-2 gene silencing. MSC were transiently transfected with A) a scrambled siRNA sequence, or B) a specific siRNA against *Cavin-2*. Cells were then treated with 100 μ M TNF for the indicated time and I κ B, phosphorylated I κ B, or GAPDH expression immunodetected in lysates as described in the Methods section.

Fig.4 : Cavin-2 gene silencing alters 3D-capillary-like structure formation of MSC. A) Increasing quantity of MSC was seeded ontop of Matrigel and tubulogenesis left to proceed for 6 hours as described in the Methods section. B) Quantification of the 3D-capillary-like structures was performed as described in the Methods section. Data is from a representative experiment, and each point is the mean of 4 distinct fields. C) Transient gene silencing was performed in control (siScrambled) and siCavin-2-transfected MSC, then followed by tubulogenesis assay as described above.

Figure 1

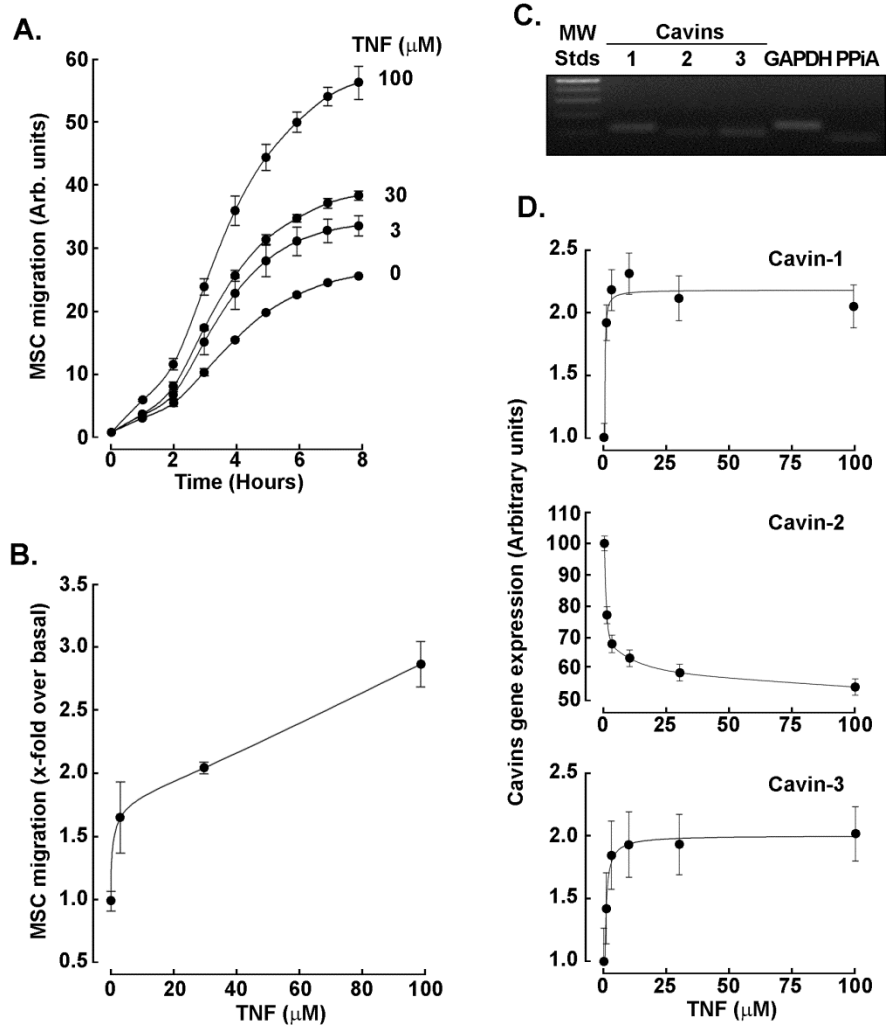


Figure 2

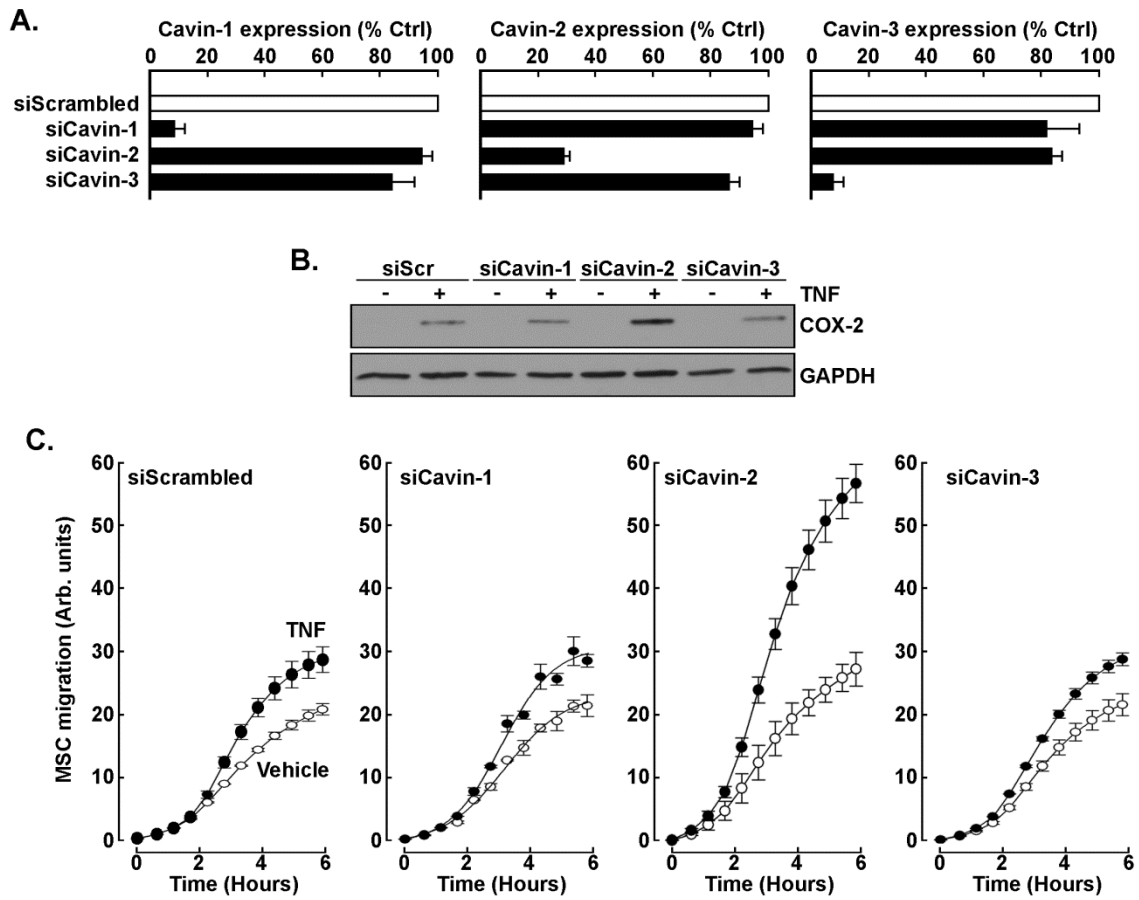


Figure 3

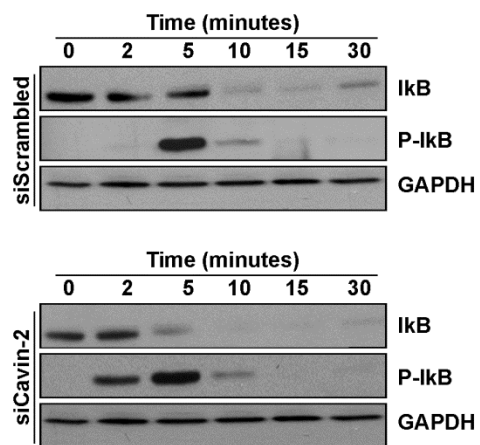
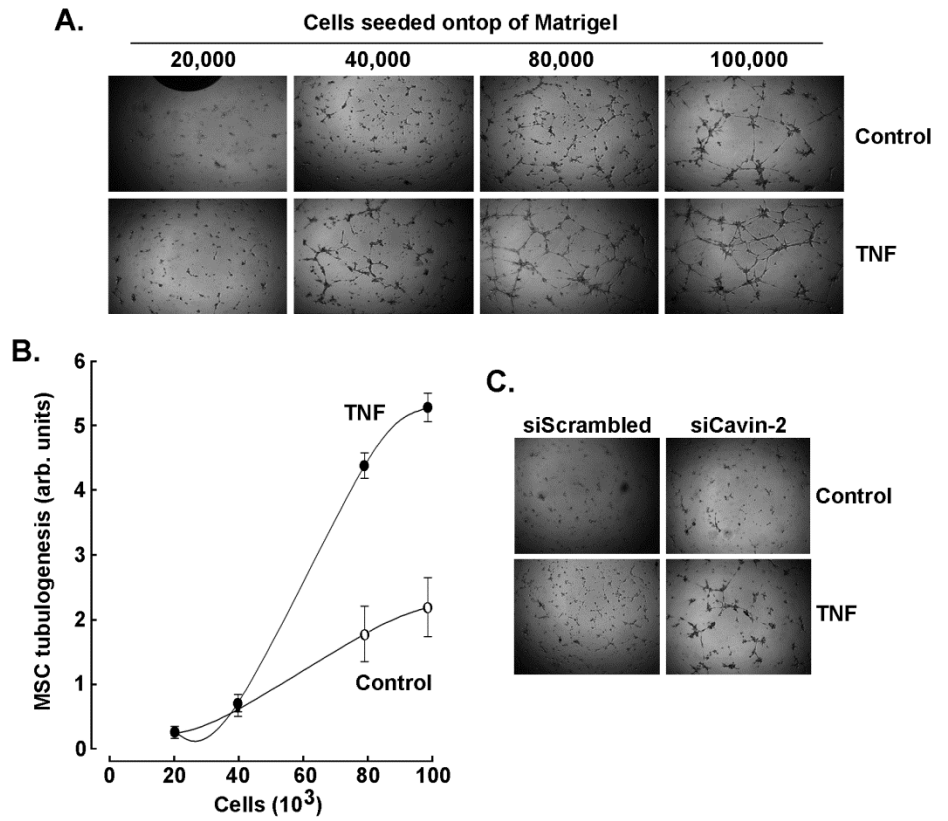


Figure 4



Chapitre 3 – Discussion, perspectives et conclusion

1. Discussion

Le processus inflammatoire est l'élément clé pour passer d'une phase de cancérogenèse à une autre (Mantovani et Pierotti, 2008; Marszalek et al., 2012). Le microenvironnement tumoral est un foyer d'inflammation chronique dont la composition est comparée à "une soupe inflammatoire". En effet, il est doté d'une composition cellulaire et moléculaire complexe. Diverses cellules, à côté des cellules cancéreuses, contribuent activement au maintien et au développement tumoral tels que les CSs, les CEs, les fibroblastes et les cellules inflammatoires (Alison et al., 2011). Il est maintenant admis que les CSMs jouent un rôle très important dans le développement tumoral. En effet, les CSM ont un tropisme pour les sites de développement de tumeur (Spaeth et al., 2008). *In situ*, les CSM favorisent la croissance tumorale et l'angiogenèse en sécrétant l'IL-6 qui va favoriser la mobilisation des EPC par la moelle osseuse. Notons aussi que les CSM produisent un ensemble de facteurs pro-angiogéniques et pro-inflammatoires comme l'angiopoïétine-1, le VEGF, HGF et IGF (Tögel et al., 2007), IL-6 et TNF- α et l'activateur du plasminogène. Ces facteurs vont soutenir l'inflammation, l'angiogenèse tumorale (Feng et Chen, 2009; Xu et al., 2009) et la prolifération des cellules tumorales. Rappelons que les CSM sont dotées de propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires qui offrent aux cellules tumorales un échappatoire à la réponse immunitaire de l'hôte. Ces données nous ont incités à utiliser les CSM comme modèle pour cette étude.

Parmi les principaux acteurs inflammatoires, nous pouvons citer la cytokine pro-inflammatoire TNF- α et l'enzyme COX-2 qui jouent un rôle capital dans le développement tumoral et dont l'expression est inter reliée. En effet, le TNF- α induit la transcription des gènes encodant pour COX-2 en activant les voies de signalisation impliquées dans le développement tumoral tels que la voie de signalisation NF- κ B, qui joue un rôle axial dans l'inflammation, la prolifération et l'invasion tumorale et d'autre part, les voies JNK/p38MAPK. Au fait, il a été prouvé que dans les CSM, la réponse au TNF- α est causée par la voie de signalisation NF- κ B et non par les voies JNK/p38MAPK (Crisostomo et al., 2008), ce qui nous a orienté à s'intéresser à la voie NF- κ B. À la lumière de ces données, nous avons utilisé le TNF- α comme inducteur de

la transcription et de l'expression protéique COX-2 qui est notre biomarqueur de l'inflammation pour étudier la voie de signalisation NF- κ B.

L'induction de l'inflammation nécessite des voies de signalisation. La compartimentalisation des signaux de l'initiation provient de la membrane. Les cavéoles jouent un rôle important dans la voie de signalisation NF- κ B. En effet, il a été démontré qu'il y a une surexpression des cavéoles dans les cellules cancéreuses ce qui augmente le recrutement du TNFR et IKK dans ces radeaux lipidiques. Il en résulte la suractivation de la voie de signalisation NF- κ B, ce qui conduit par conséquent à l'accélération de la progression tumorale (Gong et al., 2013). Attendu que plusieurs études confirment le rôle important que jouent les protéines cavines dans les processus physiologiques et pathologiques tel que la cancérogenèse, mais dont les mécanismes d'action demeurent mal élucidés, nous suggérons qu'elles contribuent à la régulation de la voie de signalisation NF- κ B dans les cellules CSM par effet paracrine.

Dans un premier temps, nous avons examiné l'induction de COX-2 dans les CSMs traitées au TNF- α . Nous avons confirmé que la régulation se fait au niveau génique mais pas protéique. En effet, l'expression génique mesurée en qPCR de COX-2 augmente graduellement avec la dose de TNF- α , mais nous n'avons pas observé d'induction protéique de COX-2. L'éventuelle contribution de la voie NF- κ B sur l'augmentation de l'expression de COX-2 a suscité notre curiosité. Nous avons prouvé cette contribution par la diminution de l'expression protéique d'I κ B α . En effet, et comme on a déjà vu dans l'introduction, le traitement des cellules par le TNF- α active les protéines TRADD, RIP, TRAF2, et FADD qui se situent en amont des kinases IKK. Les IKK viendront par la suite phosphoryler I κ B conduisant à sa diminution (Chen et Goeddel, 2002; Blonska et al., 2005). Le facteur NF- κ B, ainsi libéré, migre vers le noyau où il va réguler la transcription d'un grand nombre de gènes (Kelliher et al., 1998; Devin et al., 2000) parmi lesquels COX-2. L'augmentation de l'expression génique de COX-2 et la diminution de l'expression protéique d'I κ B montre l'activation de la voie NF κ B. L'absence de l'expression protéique de COX-2 suggère éventuellement une régulation post transcriptionnelle de l'ARNm pour COX-2. Parallèlement dans ces mêmes cellules, nous étions curieux de savoir comment un traitement au TNF- α qui nous permet de mimer le microenvironnement tumoral,

influencera l'expression génique des Cavines-1, -2 et -3. Nous avons trouvé que le TNF- α régule l'expression des Cavines-1 et 3 légèrement à la hausse. Par contre, nous avons remarqué une diminution de 50% de l'expression de cavine-2. Une autre étude faite dans les cellules tumorales de la prostate, et concordant avec les résultats que nous avons obtenus dans les CSMs, a montré que l'expression de la cavine -2 est régulée à la baisse lorsque la cellule entame le cycle cellulaire (Tenta et al., 2007). Il a été rapporté aussi que l'expression de cavine-2 est diminuée dans les tumeurs mammaires, rénales et de la prostate (Bai et al., 2012; Li et al., 2008).

Dans notre étude, nous suggérons que les cavines, ou l'une des cavines, moduleraient la voie de signalisation NF- κ B dans les CSM traitées au TNF- α , modulant ainsi le phénotype inflammatoire et migratoire dans ces cellules. Pour explorer le rôle des cavines, nous avons utilisé une méthode qui consiste à réprimer leur expression génique à l'aide de siRNA. Nous avons procédé par la suite à étudier l'effet de la délétion génétique de chaque cavine à l'échelle moléculaire sur l'axe signalétique NF- κ B et à l'échelle cellulaire en mesurant la migration cellulaire.

Il a été documenté que le TNF- α stimule la fonction paracrine des CSMs pour l'angiogenèse. Cet effet est produit par IL-6 et IL-8 et a comme résultat l'induction de la migration des EPC (Kwon et al., 2013). Mais à notre connaissance, l'effet du TNF- α sur l'indice de la migration des CSMs n'est pas encore démontré. Nous avons alors procédé à mesurer la migration dans les CSMs activées par le TNF- α . Nous avons observé que le TNF- α augmente d'une façon dose-dépendante l'index relatif de la migration des CSM, confirmant le caractère angiogénique du TNF- α . Ensuite, nous avons exploré l'effet des cavines sur la migration cellulaire +/- TNF- α . En réprimant l'expression génique des cavines, le niveau de base de migration n'a pas changé. Par contre, fait intéressant, la diminution de l'expression génique de cavine-2 augmente significativement la migration des CSMs traitées au TNF- α . Aucun effet n'a été observé avec les cavines-1 et-3. Cela suggère que la cavine-2 freine le pouvoir invasif des CSMs.

Ensuite, la possible implication des cavines dans la régulation de la voie NF- κ B dans les CSM activées au TNF- α a suscité notre intérêt. Pour cela, nous avons étudié l'effet de la répression génique de chacune des cavines sur l'expression protéique de COX-2, notre biomarqueur de l'inflammation, suite à un traitement de 24 heures au TNF- α (un minimum de 24 heures est nécessaire afin d'observer l'expression de la protéine COX-2). De façon inattendue, l'utilisation de l'ARN interférant avec Cavine-2 a montré une très forte amplification de l'expression protéique de COX-2 dans les CSM en réponse au TNF- α . Cela suggère que Cavine-2 a un rôle dans la répression de l'induction de COX-2 induite par le TNF- α dans les CSM. Il est pertinent de rappeler qu'il y a plusieurs voies de signalisation autre que le facteur de transcription NF- κ B qui peuvent réguler la transcription de COX-2 mais dans les CSM la réponse au TNF- α est causée par la voie NF- κ B (Crisostomo et al., 2008) et c'est ce qui explique notre intérêt pour cet axe signalétique. Par ailleurs, la stimulation in vitro des CSM, où la Cavine-2 est réprimée, avec le TNF- α , démontre une amplification de la phosphorylation de la protéine I κ B α comme le pic de phosphorylation est plus intense et la courbe de phosphorylation est plus prolongée dans le temps. Le mécanisme impliqué est la modification de la cinétique de phosphorylation d'I κ B α résultant d'une inhibition de l'activation d'IKK.

Par ailleurs, il est connu que les CSM donnent des pseudo-tubules sur un matrigel et que ce processus est régulé par la MMP membranaire MTI-MMP (Ghajar et al., 2006). Étant donné que la Cavine-2 a régulé la migration dans les CSM traitées au TNF- α , il serait intéressant d'évaluer la contribution possible de Cavine-2 dans la formation des structures capillaires en aval de MTI-MMP. Nous avons montré que le TNF- α augmente la tubulogenèse dans les CSM, et que l'inhibition de l'expression génique de Cavine-2 amplifie encore la formation des capillaires.

Nous pouvons avancer que la migration cellulaire et la tubulogenèse, dans les CSM où la Cavine-2 est réprimée, est augmentée à la suite de l'inhibition d'une signalisation produite par la Cavine-2 et qui entrave la phosphorylation de I κ B α régulant la transcription de COX-2. La perte de la Cavine-2 vient altérer la capacité de la cellule à générer une signalisation optimale initiée par les récepteurs membranaires. Rappelons qu'aucune autre étude n'a été effectuée

jusqu'à présent pour explorer le rôle des protéines cavines dans les CSM. Mais, dans un même esprit, Aung et al ont étudié l'effet des différentes cavines sur la migration dans les cellules cancéreuses de prostate PC-3, et ils ont trouvé qu'une surexpression de la cavine-1 diminue la migration des cellules cancéreuses et diminue leur pouvoir invasif en modulant l'expression de MMP (Aung et al., 2011).

Nos données suggèrent donc que la Cavin-2 module la phosphorylation de $\text{IKB}\alpha$ diminuant ainsi l'expression de COX-2, qui à son tour réduit la migration des CSM. Ce qui confirme le rôle de modulateur de l'inflammation et anti-migratoire de la cavine-2. La protéine cavine-2 serait une bonne cible thérapeutique dans les CSM qui permettrait d'agir à des stades précoces du développement tumoral.

6. Conclusion et perspective

Nous sommes arrivés à effectuer une preuve moléculaire originale inattendue reliant les protéines associées aux cavéoles, les cavines, à la voie de signalisation NF- κ B dans un modèle cellulaire original que sont les CSM. Dans notre étude, nous avons prouvé que le TNF- α augmente d'une façon dose-dépendante l'index relatif de la migration des CSM. Fait intéressant, une répression génique de l'expression de la Cavine-2 augmente significativement la migration et la tubulogénèse des CSM traitées par le TNF- α affirmant le rôle anti-migratoire de la cavine-2 dans les CSM. Nous démontrons pour la première fois aussi que la cavine-2 module le phénotype inflammatoire dans les CSM humaines par la modulation de la voie NF- κ B en altérant la cinétique de phosphorylation d'I κ B α et en inhibant la famille des IKK. À la lumière de nos résultats, nous proposons le gène codant pour la cavine-2 comme un gène suppresseur de tumeur. En effet, et à notre connaissance, aucune autre étude n'a été effectuée sur le rôle des cavines dans les CS. Mais d'autres études, dans un contexte oncologique, ont prouvé le rôle suppresseur de tumeur de la cavine-2, dont l'expression est inhibée dans les tumeurs mammaires, rénales et de la prostate (Bai et al., 2012; Li et al., 2008). Dans la littérature, la cavine-3 est aussi reconnue pour son rôle suppresseur de tumeur. Des mutations sur le gène codant pour la cavine-3 ont été détectées dans quelques lignées cancéreuses, notons que son expression est régulée à la baisse dans les lignées du cancer du sein, des ovaires et des poumons (Xu et al., 2001). Les résultats que nous avons obtenus viennent appuyer ces observations. Cette étude nous a permis de définir de nouvelles cibles thérapeutiques : les protéines cavines.

Nous avons montré que la cavine-2 a un rôle répresseur sur l'expression de COX-2 dans les CSM activées au TNF- α . Le mécanisme impliqué est la modification de la cinétique de phosphorylation d'I κ B α qui résulterait d'une inhibition de l'activation d'IKK. Il serait intéressant d'étudier les variations de IKK et l'effet de la cavine-2 sur l'expression protéique des IKK. Il serait aussi intéressant de voir l'effet de la surexpression des cDNA plasmidiques encodant les cavines, et d'évaluer l'expression génique de COX-2 et protéique de COX-2 et I κ B et pI κ B suite à un traitement au TNF- α . Il serait approprié de déterminer comment les cavines régulent l'expression génique de COX-2, donc de déterminer les facteurs nucléaires qui régulent

la transcription de COX-2 et la migration à l'aide de "GENE ARRAY". Durant ce travail, nous avons étudié l'effet de la répression génique des cavines une à une séparément. Il serait enfin, très intéressant de voir l'effet de l'inhibition simultanée de l'expression des trois cavines sur le phénotype inflammatoire et invasif dans les CSM.

Par ailleurs, la répression génique de la cavine-2 peut éventuellement avoir un effet sur les cavéoles et l'expression de surface du récepteur au TNF- α ce qui permettrait d'expliquer en partie l'effet que nous avons obtenu. Il serait pertinent de mesurer en cytométrie de flux l'effet du traitement au TNF- α et de l'inhibition de l'expression de cavine-2 sur les récepteurs au TNF- α .

Bibliographie

Aboulaich, N., Chui, P. C., Asara, J. M., Flier, J. S. and Maratos-Flier, E. (2011). Polymerase I and transcript release factor regulates lipolysis via a phosphorylation-dependent mechanism. *Diabetes*, 60, 757-765.

Aboulaich, N., Vainonen, J. P., Strålfors, P., & Vener, A. V. (2004). Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochemical Journal*, 383(2), 237-248.

Alberts, B., & Johnson, A. (2002). J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Molecular biology of the cell*, 1259-1264.

Alison, M. R., Lim, S. M., & Nicholson, L. J. (2011). Cancer stem cells: problems for therapy? *The Journal of pathology*, 223(2), 148-162.

Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., & Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European journal of immunology*, 35(5), 1482-1490.

Aung, C. S., Hill, M. M., Bastiani, M., Parton, R. G., & Parat, M. O. (2011). PTRF-cavin-1 expression decreases the migration of PC3 prostate cancer cells: Role of matrix metalloproteinase 9. *European journal of cell biology*, 90(2), 136-142.

Bai, L., Deng, X., Li, Q., Wang, M., An, W., Gao, Z., & Cong, Y. S. (2012). Down-regulation of the cavin family proteins in breast cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 113(1), 322-328.

Bakkar, N., & Guttridge, D. C. (2010). NF- κ B signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiological reviews*, 90(2), 495-511.

Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8(3), 301-316.

Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(4), 568-584.

Bastiani, M., Liu, L., Hill, M. M., Jedrychowski, M. P., Nixon, S. J., Lo, H. P., Abankwa, D., Luetterforst, R., Fernandez-Rojo, M., Breen, M. R. et al. (2009). MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J. Cell Biol.* 185, 1259-1273.

Beckman, R. A., & Loeb, L. A. (2005, December). Genetic instability in cancer: theory and experiment. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 15, No. 6, pp. 423-435). Academic Press.

Beg, A. A., & Baldwin, A. S. (1993). The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & development*, 7(11), 2064-2070.

Béliveau, R., & Gingras, D. (2007). Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian Family Physician*, 53(11), 1905-1911.

Benjamin, L. E., Hemo, I., & Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*, 125(9), 1591-1598.

Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*, 2(4), 313-319.

Bishop, A. E., Buttery, L. D., & Polak, J. M. (2002). Embryonic stem cells. *The Journal of pathology*, 197(4), 424-429.

Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., & Nelson, N. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour necrosis factor-R from cells. *Nature*, 385(6618), 729-733.

Blackwell, K. A., Raisz, L. G., & Pilbeam, C. C. (2010). Prostaglandins in bone: bad cop, good cop?. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(5), 294-301.

Blonska, M., Shambharkar, P. B., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B., & Lin, X. (2005). TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 43056-43063.

Briand, N., Dugail, I., & Le Lay, S. (2011). Cavin proteins: New players in the caveolae field. *Biochimie*, 93(1), 71-77.

Castro-Malaspina, H., Gay, R. E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D & Moore, M. A. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 56(2), 289-301.

Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296(5573), 1634-1635.

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., & Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107(1), 367-372.

Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T. and Lisanti, M. P. (1997). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 6525- 6533.

Crawford, H. C., Fingleton, B. M., Rudolph-Owen, L. A., Goss, K. J. H., Rubinfeld, B., Polakis, P., & Matrisian, L. M. (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of β -catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, 18(18), 2883-2891.

Crisostomo, P. R., Wang, Y., Markel, T. A., Wang, M., Lahm, T., & Meldrum, D. R. (2008). Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B-but not JNK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294(3), C675-C682.

Croce, C.M. (2008) Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine*, 358, 502-11.

Dahlin, K., Mager, E. M., Allen, L., Tigue, Z., Goodglick, L., Wadehra, M., & Dobbs, L. (2004). Identification of genes differentially expressed in rat alveolar type I cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(3), 309-316.

Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P., & Roberts, I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood reviews*, 20(3), 161-171.

Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., & Liu, Z. G. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, 12(4), 419-429.

DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., & Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 388(6642), 548-554.

Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest journal*, 118(2), 503-508.

Djouad, F., Ponce, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., & Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102(10), 3837-3844.

Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, 315(26), 1650-1659.

Dwyer, R. M., Khan, S., Barry, F. P., O'Brien, T., & Kerin, M. J. (2010). Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res Ther*, 1(3), 25.

Feng, B., & Chen, L. (2009). Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator?. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 24(6), 717-721.

Frank, P. G., Pavlides, S., & Lisanti, M. P. (2009). Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell and tissue research*, 335(1), 41-47.

Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 362-374.

Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E. C., Lu, N., & Seed, B. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*, 94(6), 715-725.

Galbraith, C. G., Yamada, K. M., & Galbraith, J. A. (2007). Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science*, 315(5814), 992-995.

Ghajar, C. M., Blevins, K. S., Hughes, C. C., George, S. C., & Putnam, A. J. (2006). Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis in mechanically viable prevascularized tissues via early matrix metalloproteinase upregulation. *Tissue engineering*, 12(10), 2875-2888.

Ghitescu, L., Fixman, A., Simionescu, M., & Simionescu, N. (1986). Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *The Journal of cell biology*, 102(4), 1304-1311.

Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16(1), 225-260.

Gong, H., Song, L., Lin, C., Liu, A., Lin, X., Wu, J., & Li, J. (2013). Downregulation of miR-138 sustains NF- κ B activation and promotes lipid raft formation in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 19(5), 1083-1093.

Gould, M. L., Williams, G., & Nicholson, H. D. (2010). Changes in caveolae, caveolin, and polymerase 1 and transcript release factor (PTRF) expression in prostate cancer progression. *The Prostate*, 70(15), 1609-1621.

Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., & Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 570-575.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.

Gupta, R., Toufaily, C., & Annabi, B. (2014). Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer. *Biochimie*, 107, 188-202.

Guruvayoorappan, C. (2008). Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link?. *Integrative cancer therapies*, 7(2), 90-95.

Gustincich, S., & Schneider, C. (1993). Serum deprivation response gene is induced by serum starvation but not by contact inhibition. *Cell growth and differentiation*, 4, 753-753.

Gustincich, S., Vatta, P., Goruppi, S., Wolf, M., Saccone, S., Della Valle, G & Schneider, C. (1999). The Human Serum Deprivation Response Gene (SDPR) Maps to 2q32–q33 and Codes for a Phosphatidylserine-Binding Protein. *Genomics*, 57(1), 120-129.

Hall, B., Andreeff, M., & Marini, F. (2007). The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. In *Bone Marrow-Derived Progenitors* (pp. 263-283). Springer Berlin Heidelberg.

Halpern, J. L., Kilbarger, A., & Lynch, C. C. (2011). Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor. *Cancer letters*, 308(1), 91-99.

Hamada, H., Kobune, M., Nakamura, K., Kawano, Y., Kato, K., Honmou, O., & Niitsu, Y. (2005). Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer science*, 96(3), 149-156.

Hamaï, A., Muret, J., Cavalcanti, A., Bonvalot, S., & Chouaïb, S. (2009). Le facteur de nécrose tumorale: de la biologie à la thérapie oncologique. *Hématologie*, 15(4), 291-304.

Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*, 86(3), 353-364.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.

Hansen, C. G., Bright, N. A., Howard, G., & Nichols, B. J. (2009). SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nature cell biology*, 11(7), 807-814.

Hill, M. M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S. J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V. M., Martin, S. et al. (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132, 113-124.

Huang, W. H., Chang, M. C., Tsai, K. S., Hung, M. C., Chen, H. L., & Hung, S. C. (2013). Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene*, 32(37), 4343-4354.

Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s). *Microscopy research and technique*, 50(3), 184-195.

Jaiswal, M., LaRusso, N. F., Burgart, L. J., & Gores, G. J. (2000). Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer research*, 60(1), 184-190.

Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual review of immunology*, 18(1), 621-663.

Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), 749-759.

Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W. & Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563.

Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., & Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity*, 8(3), 297-303.

Kemler, R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends in Genetics*, 9(9), 317-321.

King, G. L., & Johnson, S. M. (1985). Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science*, 227(4694), 1583-1586.

Kode, J. A., Mukherjee, S., Joglekar, M. V., & Hardikar, A. A. (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 11(4), 377-391.

Kovtun, O., Tillu, V. A., Ariotti, N., Parton, R. G., & Collins, B. M. (2015). Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *Journal of cell science*, 128(7), 1269-1278.

Kovtun, O., Tillu, V. A., Jung, W., Leneva, N., Ariotti, N., Chaudhary, N., & Harrop, S. J. (2014). Structural insights into the organization of the cavin membrane coat complex. *Developmental cell*, 31(4), 405-419.

Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., & Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101(9), 3722-3729.

Kwon, Y. W., Heo, S. C., Jeong, G. O., Yoon, J. W., Mo, W. M., Lee, M. J., & Kim, J. H. (2013). Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2136-2144.

Le Lay, S., Blouin, C. M., Hajduch, E. and Dugail, I. (2009). Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 514-518.

Li, S., Galbiati, F., Volonte, D., Sargiacomo, M., Engelman, J. A., Das, K., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P. (1998). Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett.* 434,127-134.

Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J. E., Hansen, S. H., & Lisanti, M. P. (1995). Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *Journal of Biological Chemistry*, 270(26), 15693-15701.

Li, X., Jia, Z., Shen, Y., Ichikawa, H., Jarvik, J., Nagele, R. G., & Goldberg, G. S. (2008). Coordinate suppression of Sdpr and Fhl1 expression in tumors of the breast, kidney, and prostate. *Cancer science*, 99(7), 1326-1333.

Lim, J. H., Kim, J. S., Yoon, I. H., Shin, J. S., Nam, H. Y., Yang, S. H., & Park, C. G. (2010). Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node. *The Journal of Immunology*, 185(7), 4022-4029.

Liu, L., Xu, H. X., Wang, W. Q., Wu, C. T., Chen, T., Qin, Y., & Xu, Y. F. (2014). Cavin-1 is essential for the tumor-promoting effect of caveolin-1 and enhances its prognostic potency in pancreatic cancer. *Oncogene*, 33(21), 2728-2736.

Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., & Bissell, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *The Journal of cell biology*, 139(7), 1861-1872.

Loebinger, M. R., & Janes, S. M. (2010). Stem cells as vectors for antitumour therapy. *Thorax*, 65(4), 362-369.

Mader, E. K., Maeyama, Y., Lin, Y., Butler, G. W., Russell, H. M., Galanis, E., & Peng, K. W. (2009). Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clinical Cancer Research*, 15(23), 7246-7255.

Mantovani, A., & Pierotti, M. A. (2008). Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer letters*, 267(2), 180-181.

Marszałek, A., Szyłberg, Ł., Wiśniewska, E., & Janiczek, M. (2012). Impact of COX-2, IL-1 β , TNF- α , IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel. *Pol J Pathol*, 63, 221-227.

Marx, J. (2004). Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science*, 306(5698), 966-968.

McMahon, K. A., Zajicek, H., Li, W. P., Peyton, M. J., Minna, J. D., Hernandez, V. J., & Anderson, R. G. (2009). SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *The EMBO journal*, 28(8), 1001-1015.

Ménard, C., & Tarte, K. (2011). Immunosuppression et cellules souches mésenchymateuses Mieux comprendre une propriété thérapeutique majeure. *médecine/sciences*, 27(3), 269-74.

Mineo, C., Ying, Y. S., Chapline, C., Jaken, S., & Anderson, R. G. (1998). Targeting of protein kinase C α to caveolae. *The Journal of cell biology*, 141(3), 601-610.

Minguell, J. J., Erices, A., & Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 226(6), 507-520.

Motaln, H., Schichor, C., & Lah, T. T. (2010). Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*, 116(11), 2519-2530.

Mueller, A., Kelly, E., & Strange, P. G. (2002). Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood*, 99(3), 785-791.

Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V., & Simons, K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(22), 10339-10343.

Nabi, I. R., & Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology*, 161(4), 673-677.

Nasef, A., Chapel, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Lopez, M., Mathieu, N., & Fouillard, L. (2006). Identification of IL-10 and TGF- α Transcripts Involved in the Inhibition of T-Lymphocyte Proliferation During Cell Contact With Human Mesenchymal Stem Cells. *Gene expression*, 13(4-5), 217-226.

Nassar, Z. D., Moon, H., Duong, T., Neo, L., Hill, M. M., Francois, M & Parat, M. O. (2013). PTRF/Cavin-1 decreases prostate cancer angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncotarget*, 4(10), 1844-1855.

Nauta, A. J., & Fibbe, W. E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110(10), 3499-3506.

Nichols, J., & Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell stem cell*, 4(6), 487-492.

Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Schölmerich, J., Gross, V., & Falk, W. (1999). Interferon-gamma (IFN- γ)-and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clinical and experimental immunology*, 116(2), 238.

O'Connor, T. P., & Crystal, R. G. (2006). Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 261-276.

Ogata, T., Ueyama, T., Isodono, K., Tagawa, M., Takehara, N., Kawashima, T & Oh, H. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Molecular and cellular biology*, 28(10), 3424-3436.

Palade, G. E. (1953). Fine structure of blood capillaries. *Journal of Applied Physics* 24,1424.

Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(5), C947-C970.

Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J. A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P. E., Mora, R. et al. (1999). Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J. Biol. Chem.* 274, 25718-25725.

Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal*, 8(23), 10-1186.

Parton, R. G. and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185-194.

Parton, R. G., & del Pozo, M. A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*,14(2), 98-112.

Pelkmans, L., & Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic*, 3(5), 311-320.

Pelkmans, L., and Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436, 128-133.

Pessin, J. E., & Saltiel, A. R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 165.

Plummer, S. M., Holloway, K. A., Manson, M. M., Munks, R. J., Kaptein, A., Farrow, S., & Howells, L. (1999). Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*, 18(44), 6013-6020.

Pol, A., Martin, S., Fernandez, M. A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C. and Parton, R. G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol. Biol. Cell* 16, 2091-2105.

Porada, C. D., & Almeida-Porada, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 62(12), 1156-1166.

Rayet, B., & Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49), 6938-6947.

Razani, B., Woodman, S. E., & Lisanti, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological reviews*, 54(3), 431-467.

Reagan, M. R., & Ghobrial, I. M. (2012). Multiple myeloma mesenchymal stem cells: characterization, origin, and tumor-promoting effects. *Clinical Cancer Research*, 18(2), 342-349.

Risbud, M. V., & Sittinger, M. (2002). Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation. *TRENDS in Biotechnology*, 20(8), 351-356.

Roberts, D. D., Isenberg, J. S., Ridnour, L. A., & Wink, D. A. (2007). Nitric oxide and its gatekeeper thrombospondin-1 in tumor angiogenesis. *Clinical cancer research*, 13(3), 795-798.

Rosenberger, C. M., Brumell, J. H., & Finlay, B. B. (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Current Biology*, 10(22), R823-R825.

Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., & Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), 673-682.

Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti, M. P. (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 122, 789-807.

Sasportas, L. S., Kasmieh, R., Wakimoto, H., Hingtgen, S., van de Water, J. A., Mohapatra, G., & Shah, K. (2009). Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4822-4827.

Satchi-Fainaro, R., Duncan, R., & Barnes, C. M. (2006). Polymer therapeutics for cancer: current status and future challenges. In *Polymer Therapeutics II* (pp. 1-65). Springer Berlin Heidelberg.

Scherer, P. E., Lisanti, M. P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastick, C. C., and Lodish, H. F. (1994). Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol* 127, 1233-1243.

Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H. F., & Lisanti, M. P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(1), 131-135.

Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H. L., & Kulik, M. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *The Journal of experimental medicine*, 204(8), 1973-1987.

Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47(6), 921-928.

Sgambato, A., & Cittadini, A. (2010). Inflammation and cancer: a multifaceted link. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 14(4), 263-8.

Shchors, K., & Evan, G. (2007). Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer?. *Cancer research*, 67(15), 7059-7061.

Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Higashi, Y., & Chayama, K. (2010). Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *International journal of cancer*, 127(10), 2323-2333.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., & Morone, N. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402-413.

Slack, J. M. (2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 287(5457), 1431-1433.

Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441(7097), 1060-1060.

Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., & Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene therapy*, 15(10), 730-738.

Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4), 1484-1490.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872.

Tang, P., Hung, M. C., & Klostergaard, J. (1996). Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, 35(25), 8216-8225.

Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., & Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74(5), 845-853.

Tenta, R., Katopodis, H., Chatziioannou, A., Pilalis, E., Calvo, E., Labrie, F., & Koutsilieris, M. (2007). Microarray analysis of survival pathways in human PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Genomics-Proteomics*, 4(4), 309-317.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442-454.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147.

Tögel, F., Weiss, K., Yang, Y., Hu, Z., Zhang, P., & Westenfelder, C. (2007). Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(5), F1626-F1635.

Tong, S. Y., Ki, K. D., Lee, J. M., Kang, M. J., Ha, T. K., Chung, S. I., & Lee, S. K. (2010). Frequent inactivation of hSRBC in ovarian cancers by promoter CpG island hypermethylation. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 89(5), 629-635.

Toufaily, C., Charfi, C., Annabi, B., & Annabi, B. (2014). A role for the Cavin-3/Matrix metalloproteinase-9 signaling axis in the regulation of PMA-Activated Human HT1080 fibrosarcoma cell neoplastic phenotype. *Cancer growth and metastasis*, 7, 43.

Trosko, J. E., & Ruch, R. J. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci*, 3(3), d208-236.

Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D., & Anderson, K. C. (1993). Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*, 82(12), 3712-3720.

Vella, V., Sciacca, L., Pandini, G., Mineo, R., Squatrito, S., Vigneri, R., & Belfiore, A. (2001). The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Molecular Pathology*, 54(3), 121.

Verfaillie, C. (2009). Pluripotent stem cells. *Transfusion clinique et biologique*, 16(2), 65-69.

Verfaillie, C. M. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in cell biology*, 12(11), 502-508.

Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 755-768.

Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5), 639-648.

Wanaski, S. P., Ng, B. K., & Glaser, M. (2003). Caveolin scaffolding region and the membrane binding region of SRC form lateral membrane domains. *Biochemistry*, 42(1), 42-56.

Wang, D., & DuBois, R. N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut*, 55(1), 115-122.

Wikman, H., Sielaff-Frimpong, B., Kropidlowski, J., Witzel, I., Milde-Langosch, K., Sauter, G., & Pantel, K. (2012). Clinical relevance of loss of 11p15 in primary and metastatic breast cancer: association with loss of PRKCDBP expression in brain metastases. *PloS one*, 7(10), e47537.

Wynn, R. F., Hart, C. A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C. A., Wraith, J. E., & Bellantuono, I. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 104(9), 2643-2645.

Yamamoto, M., Toya, Y., Jensen, R. A., & Ishikawa, Y. (1999). Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Experimental cell research*, 247(2), 380-388.

Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., & Gaynor, R. B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK- α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*, 423(6940), 655-659.

Yi, J. S., Mun, D. G., Lee, H., Park, J. S., Lee, J. W., Lee, J. S., & Ko, Y. G. (2013). PTRF/cavin-1 is essential for multidrug resistance in cancer cells. *Journal of proteome research*, 12(2), 605-614.

Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., & Kuwano, M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), 4015-4023.

Young, H. E., & Black, A. C. (2004). Adult stem cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 276(1), 75-102.

Xu, W. T., Bian, Z. Y., Fan, Q. M., Li, G., & Tang, T. T. (2009). Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer letters*, 281(1), 32-41.

Xu, X. L., Wu, L. C., Du, F., Davis, A., Peyton, M., Tomizawa, Y., & Bowcock, A. M. (2001). Inactivation of human SRBC, located within the 11p15. 5-p15. 4 tumor suppressor region, in breast and lung cancers. *Cancer research*, 61(21), 7943-7949.

