

Université de Montréal, Faculté des Études Supérieures

# Contribution à l'Angiogenèse Tumorale des Cellules Souches Mésoenchymateuses et des Cellules Endothéliales

Par  
Ying-Ta Lee

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
comme exigence partielle  
pour l'obtention du degré de Maîtrise en Sciences en Physiologie

Septembre, 2003

Copyright, Ying-Ta Lee. 2003



W  
4  
U58  
2004  
v.028

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal, Faculté des Études Supérieures

Ce Mémoire intitulé :

Contribution à l'Angiogenèse Tumorale des  
Cellules Souches Mésenchymateuses et  
des Cellules Endothéliales :

Présenté par : Ying-Ta Lee

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Angelino Calderone  
Président rapporteur

Richard Béliveau  
Directeur de recherche

Stéphane Barrette  
Membre du jury

## Résumé

Le cancer est une des maladies les plus meurtrières que l'homme ait connues. Les cellules cancéreuses dépendent largement de la formation des vaisseaux capillaires à partir des vaisseaux sanguins pré-existants (angiogenèse) pour proliférer et envahir d'autres tissus par la métastase. La plupart des thérapies anti-cancéreuses existantes telles que la thérapie génique, la chimiothérapie et la radiothérapie ciblent ces cellules cancéreuses. Cependant, dû aux propriétés chimio et radio résistantes de certaines cellules cancéreuses, ces thérapies s'avèrent inefficaces et peuvent même entraîner des effets secondaires importants. Des études suggèrent de cibler plutôt l'angiogenèse tumorale pour augmenter l'efficacité de ces traitements en et réduire leurs effets secondaires.

Dans notre étude, nous rapportons que les propriétés angiogéniques des cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont activées de façon significative par une tension réduite en oxygène se rapprochant de celle observée à l'intérieur des masses tumorales. Ces propriétés angiogéniques sont régulées de façon autocrine et paracrine par des facteurs de croissance, et l'inhibition spécifique de la MT1-MMP antagonise cet effet. Nous rapportons aussi que l'irradiation active les propriétés angiogéniques des cellules endothéliales, ainsi que l'expression de la MT1-MMP, de la Cavéoline-1, et de l'Intégrine  $\beta 3$ , trois molécules indispensables au déroulement de l'angiogenèse. De plus, nous rapportons qu'un pré-traitement des cellules endothéliales aux agents anti-angiogéniques, en particulier l'EGCg, antagonise les propriétés angiogéniques et l'expression de ces molécules induites par l'irradiation. L'ensemble de notre étude suggère que, (i) les trois molécules mentionnées ci-dessus soient des cibles importantes dans le développement des thérapies anti-angiogéniques, que (ii) les MSC pourraient être utilisées comme vecteurs dans les thérapies géniques anti-cancéreuses, et que (iii) des traitements en synergie radiothérapie et agents anti-angiogéniques augmenteraient synergiquement l'efficacité totale de ces traitements conventionnels contre le cancer.

Mots Clés : Cancer, angiogenèse, MSC, cellules endothéliales, MT1-MMP, cavéoline-1, intégrine  $\beta 3$ , thérapies, EGCg.

## Abstract

Cancer is one of the most lethal diseases mankind has ever known. Cancer cells greatly depend on angiogenesis to grow into significantly large tumor masses and invade neighboring and distant tissues through metastasis. Most existing therapeutic approaches such as gene therapy, chemotherapy and radiotherapy are aimed against cancer cells. However, due to the high intrinsic resistance of certain cancer cells to radiotherapy and chemotherapy, these approaches have limited efficacy and dramatic side effects sometimes. There is increasing evidence suggesting that targeting tumor angiogenesis would greatly enhance these therapeutic alternatives, and diminish their side effects.

In this study, we report that bone marrow-derived stromal cells (MSC) angiogenic properties are significantly enhanced by a low oxygen tension condition similar to that found within tumor masses, that this phenomenon is subject to autocrine and paracrine regulation by angiogenic growth factors and that specific inhibition of MT1-MMP activity antagonizes this effect. We also report that radiation treatment enhances endothelial cell angiogenic properties and expression of important angiogenic modulators such as MT1-MMP, Caveolin-1, and Integrin  $\beta$ 3. Furthermore, we show that pre-treating endothelial cells with anti-angiogenic agents; especially EGCg, antagonizes radiation-induced angiogenic properties both at the cellular and molecular level. These observations suggest that (i) the three above-mentioned molecules would be primary targets for the development of new anti-angiogenic therapies, that (ii) MSC could be used as vectors for anti-cancer gene therapy, and that (iii) combined anti-angiogenic and radiation treatment would synergistically enhance the overall efficacy of these two conventional anti-cancer approaches.

Keywords: Cancer, angiogenesis, MSC, endothelial cell, MT1-MMP, Caveolin-1, Integrin  $\beta$ 3, therapeutic approaches, EGCg.

# Table de Matières

<b>Identification du jury</b> .....	<b>II</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>III</b>
<b>Summary</b> .....	<b>IV</b>
<b>Table de matières</b> .....	<b>V</b>
<b>Liste de figures</b> .....	<b>IX</b>
<b>Liste de tableaux</b> .....	<b>X</b>
<b>Liste des abréviations, sigles et acronymes</b> .....	<b>XI</b>
<b>Dédicace</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>XV</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Le cancer: renseignements généraux</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 L'angiogenèse</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Le contrôle de l'angiogenèse .....	<b>5</b>
1.2.2 L'angiogenèse tumorale .....	<b>9</b>
1.2.2.1 L'hypoxie et ses influences sur l'angiogenèse .....	<b>11</b>

1.2.3 La dégradation de la matrice extra-cellulaire .....	14
1.2.3.1 Les métalloprotéinases de la matrice extra-cellulaire .....	14
1.2.3.2 Les inhibiteurs des MMPs de type tissulaires .....	21
<b>1.3 La tubulogenèse .....</b>	<b>22</b>
1.3.1 La MMP de type membranaire 1 (MT1-MMP) .....	22
1.3.2 La cavéoline-1 .....	22
1.3.3 Les intégrines .....	23
<b>1.4 Les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale comme modèle     experimental .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5 Les cellules souches mésenchymateuses .....</b>	<b>28</b>
<b>1.6 L'apoptose .....</b>	<b>31</b>
1.6.1 La caspase-3 .....	32
<b>1.7 Les approches cliniques contre le cancer .....</b>	<b>34</b>
1.7.1 La radiothérapie .....	34
1.7.2 Les traitements anti-angiogéniques .....	35
1.7.3 Les traitements en synergie .....	39
 <b>2 Objectifs .....</b>	 <b>40</b>



<b>3 Matériel et méthodes</b>	<b>42</b>
3.1 Anticorps et produits chimiques	43
3.2 Culture cellulaire	43
3.3 Scénario d'hypoxie	44
3.4 Traitements des HUVEC aux agents anti-angiogéniques et à l'irradiation ...	44
3.5 Migration cellulaire	44
3.6 Essai de tubulogenèse sur matrigel	45
3.7 Essai d'adhérence	45
3.8 Test de prolifération	46
3.9 Zymographie	46
3.10 Dosage de protéine	46
3.11 Essai d'activité caspase-3	47
3.12 Immunobuvardage de type Western Blot	47
3.13 Isolation de l'ARN et amplification de l'ADNc par la méthode Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	47
3.14 Détection des protéines par FACS	48
3.15 Traitement statistique des données	48
<b>4 Résultats (Articles)</b>	<b>49</b>
Hypoxia promotes murine bone marrow-derived stromal cell migration and tube formation	50
Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the anti-angiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate	86

<b>5 Discussion</b> .....	<b>123</b>
<b>5.1 La régulation des propriétés angiogéniques des MSC par l'hypoxie</b> .....	<b>124</b>
<b>5.2 La modulation des propriétés angiogéniques des cellules endothéliales par l'irradiation</b> .....	<b>129</b>
<b>6 Conclusions et perspectives</b> .....	<b>134</b>
<b>7 Références</b> .....	<b>140</b>
<b>8 Annexe</b> .....	<b>152</b>

# Liste des figures

<b>Figure 1.1. Coupe transversale du Glioblastome Multiforme</b> .....	<b>3</b>
<b>Figure 1.2. Transduction des signaux intracellulaires par divers modulateurs angiogéniques</b> .....	<b>7</b>
<b>Figure 1.3. L'équilibre angiogénique</b> .....	<b>8</b>
<b>Figure 1.4. L'angiogenèse tumorale</b> .....	<b>10</b>
<b>Figure 1.5. Structures générales des métalloprotéinases de la MEC</b> .....	<b>18</b>
<b>Figure 1.6. Activation de la proMMP-2</b> .....	<b>20</b>
<b>Figure 1.7. Différentiation des MSC en divers lignées mésenchymateuses</b> .....	<b>29</b>
<b>Figure 1.8. Apoptose vs Nécrose</b> .....	<b>33</b>
<b>Figure 1.9. Structures chimiques des catéchines du thé vert</b> .....	<b>37</b>
<b>Figure 5.1. Effets cellulaires et moléculaires de l'irradiation et de l'EGCg sur les cellules endothéliales</b> .....	<b>132</b>

# Liste des tableaux

**Tableau 1. Nomenclature des MMPs .....15**

## Liste des abréviations, sigles et acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
APAF-1	Protéine qui recrute la caspase aux récepteurs
BCA	Méthode utilisée pour le dosage des protéines
BCS	Sérum bovin
b-FGF	Facteur de croissance fibroblastique basique
BSA	Albumine sérique bovin
C6	Glioblastome de Rat
CAM	<i>Chick Allantoic Membrane</i> (Modèle <i>in vivo</i> pour tester l'angiogenèse)
COS-7	Cellules épithéliales rénales du singe vert africain
D54	Glioblastome humain
DEVD-AFC	7-amino-4-trifluorométhylcoumarin-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Aspartate-amide)
DMEM-HG	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium-High Glucose</i>
EBM-2	<i>Endothelial Base Medium</i>
EC	Épicathéchine
ECG	Épicathéchine gallate
ECGS	<i>Endothelial cell growth supplement</i> (additif de nutriments pour des cellules endothéliales)
EDG	<i>Endothelial differentiation gene</i> (Récepteur de la S-1-P)
EGC	Épigallocatechine
EGCg	Épigallocatechine gallate
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGR-1	<i>Early growth response-1</i> (Facteur de transcription)
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>

ET-1	Endothéline-1
FACS	<i>Flow cytometry cell sorting</i> (Méthode de triage cellulaire)
FAS	Récepteur serine-thréonine kinase qui induit l'apoptose
FASL	Agoniste du récepteur FAS
FBS	Sérum de veau fœtal
FGF	Facteur de croissance fibroblastique)
FGFR	Récepteur de FGF
GAPDH	Glycéraldehyde-3-Phosphate Déshydrogénase.
GLUT1	Transporteur de glucose
GPI	Inositol Glycophosphatidique
HAEC	Cellules endothéliales d'aorte humaine
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia inducible factor</i> (Facteur de transcription)
HMEC	Cellules endothéliales microvasculaires
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
LLC	<i>Lewis lung carcinoma</i> (carcinomes des poumons)
LN-229	Glioblastome humaine
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase de la MEC
MDR-1	<i>Multi-Drug Resistance</i>
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
MT-MMP	MMP de type membranaire
MT1-MMP	MMP de type membranaire 1
NO	Oxyde Nitrique
PC-3	Carcinome de la prostate
PBS	Tampon bi-phosphate salin
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandine F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PVDF	Polyvinylène difluorure
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction</i>
RTK	Récepteur tyrosine kinase
S-1-P	Sphingosine-1-phosphate

SDF-1	<i>Stromal cell derived factor-1</i> (Facteur de croissance)
SQ20B	Carcinomes squameux de larynx
TBST	Tampon Tris Salin avec détergent <i>Tween</i>
TCA	Acide trichloroacétique
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i> (Facteur de croissance)
TIMP	Inhibiteur tissulaire des MMPs
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> (Facteur pro-apoptotique)
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i> (enzyme protéolytique)
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du VEGF
VPF	Facteur de perméabilité vasculaire (une autre nomenclature du VEGF)

*En hommage à tous les  
individus qui luttent contre  
la souffrance et qui  
conservent l'espoir  
malgré tout*



# Remerciements

Accomplir un grand objectif tel que contribuer à l'avancement de l'humanité par la science requiert une motivation immense, une discipline et une persévérance de fer, du travail fort, et de la chance. Malgré tout, nous ne pouvons y parvenir sans l'encouragement et l'assistance des collègues. Au cours de mes deux ans comme chercheur étudiant, des personnes extraordinaires dans ce laboratoire ont grandement contribué à une excellente expérience de carrière et de vie que j'ai eu la chance de recevoir. Je remercie premièrement le bon dieu grâce à qui j'ai eue la chance de les rencontrer. J'aimerais aussi remercier le Dr Richard Béliveau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, me donner un environnement de travail optimal et pour son grand encouragement depuis le début, et le Dr Borhane Annabi qui m'a encouragé, conseillé et orienté minutieusement dans mes travaux.

Je souhaite aussi remercier Emmanuelle Naud, Anthony Pilorget, Sebastien Thibeault, Charles Martel et Sandra Turcotte pour leur participation à mes travaux. Je suis très reconnaissant envers le Dr Édith Beaulieu, Madame Nicole Lafontaine et mademoiselle Constance Gagnon pour leur assistance technique dans mes travaux. Mes remerciements vont aussi au Dr Christian Ché pour ses précieux conseils tout au long de la rédaction de ce mémoire, Martin Gendron, Christophe Deckers, et Simon Trudel pour leur constant soutien moral, et mes collègues de travail pour leur amitié et hospitalité envers moi. Finalement, j'aimerais remercier ma famille pour son constant soutien et encouragement, le Groupe de Thérapie Expérimentale du Cancer, la Fondation Charles-Bruneau de l'hôpital Ste-Justine, la Société de Recherche sur le Cancer et la Fondation de l'UQÀM pour leur soutien financier dans cette étude, et les évaluateurs pour le temps précieux qu'ils ont consacré à la correction de ce mémoire.

## Chapitre 1

# **INTRODUCTION**

## 1.1 Le cancer : renseignements généraux

Nos tissus et organes sont composés de cellules. Dépendamment de leur origine et de leur fonction, elles s'organisent pour former des tissus tels les muscles, l'estomac, le cœur, le foie et autres. Généralement, les fonctions telles que la division, la prolifération et la mort cellulaire sont contrôlées de façon cyclique et ordonnée par les noyaux cellulaires selon les différents besoins physiologiques. Par exemple, lorsqu'un groupe de cellules est trop vieux pour continuer à fonctionner, leurs gènes activent la mort cellulaire physiologique (apoptose), et les cellules à proximité se multiplient (mitose) pour les remplacer, et une fois cet objectif accompli, elles arrêtent de proliférer. Des facteurs environnementaux telle la pollution, l'irradiation, les aliments faisant partie de notre diète, et les pathogènes comme les virus peuvent gravement altérer cette régulation génique des fonctions cellulaires, soit en altérant leur ADN, soit leur mécanismes de réparation. Des prédispositions génétiques, ainsi que l'âge des individus ont aussi une influence significative sur ces mécanismes régulateurs. Si cette altération mène à la mort spontanée d'un petit nombre de cellules, les conséquences sont généralement minimales. Par contre, si cette altération mène à une prolifération incontrôlée des cellules, elles peuvent alors avoir des effets pathologiques néfastes. Elles se multiplieront de façon non contrôlée, et formeront éventuellement des masses tissulaires qu'on appelle des tumeurs (Molecular biology of the cell 2<sup>nd</sup> edition, Alberts *et al*).

Les tumeurs sont qualifiées comme étant bénignes ou malignes. Les tumeurs bénignes poussent en principe localement et n'envahissent pas à distance. Les tumeurs malignes, quant à elles, envahissent éventuellement les tissus avoisinants et distants, causant ainsi le cancer, une maladie mortelle. Les tissus avoisinants sont alors envahis par l'extension directe des cellules tumorales malignes; en voyageant par les vaisseaux sanguins et lymphatiques ces cellules peuvent également former des tumeurs malignes secondaires, ou des métastases à des tissus distants. Ce ne sont pas tous les cancers qui sont à l'origine d'une tumeur. La leucémie, par exemple, se manifeste par des cellules cancéreuses circulant dans le sang et des tissus d'où elles prennent naissance. De plus, les différents types de cancer peuvent avoir des phénotypes très variés. Par exemple, le cancer du poumon et le cancer du sein sont très différents en ce qui

concerne la prolifération de leurs cellules tumorales respectives, et leurs réponses aux différents traitements (American Cancer Society ; <http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp>).

Même si les individus de tout âge peuvent développer cette maladie, on trouve plus de 77% des cas de cancer chez les gens âgés de 55 ans et plus. Au Canada 136,900 cas de cancer ont été rapportés, dont 66,200 sont décédés en 2002. Le cancer le plus fréquent chez l'homme est le cancer de la prostate, alors que chez la femme, c'est le cancer du sein. Toutefois, pour les deux sexes le plus meurtrier demeure le cancer du poumon. Malgré des progrès réalisés dans les traitements actuels des cancers grâce aux recherches intensives qui y ont été consacrées, la fréquence de certains types de cancers, comme ceux du poumon ou du sein, continue de grimper (Société Canadienne du Cancer; <http://www.cancer.ca/ccs/internet/cancer>).



**Fig1.1. Coupe transversale du Glioblastome Multiforme.** Le Glioblastome Multiforme est une forme de tumeur cérébrale très maligne caractérisée par une forte vascularisation, ainsi qu'une densité élevée des cellules gliales souvent très polymorphes, et des régions à nécroses focales entourées par un arrangement palissadique des cellules tumorales.

Il y a aussi d'autres cancers qui ont beaucoup attiré l'attention publique incluant celui du système nerveux central qui représente 20% des cancers chez les enfants. En particulier, le glioblastome multiforme (Fig 1.1) est la forme la plus fréquente des tumeurs cérébrales; il est aussi connu pour son taux prolifératif élevé et sa résistance face à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. C'est une tumeur maligne très invasive qui se répand facilement à travers le cerveau mais qui ne manifeste des métastases ailleurs que très rarement. L'histologie de la tumeur de glioblastome est généralement caractérisée par une forte vascularisation, ainsi qu'une densité élevée des cellules gliales souvent très polymorphes, et des régions à nécroses focales entourées par un arrangement palissadique des cellules tumorales, d'où le nom glioblastome multiforme (<http://www.emedicine.com/NEURO/topic147.htm>).

## 1.2 L'angiogenèse

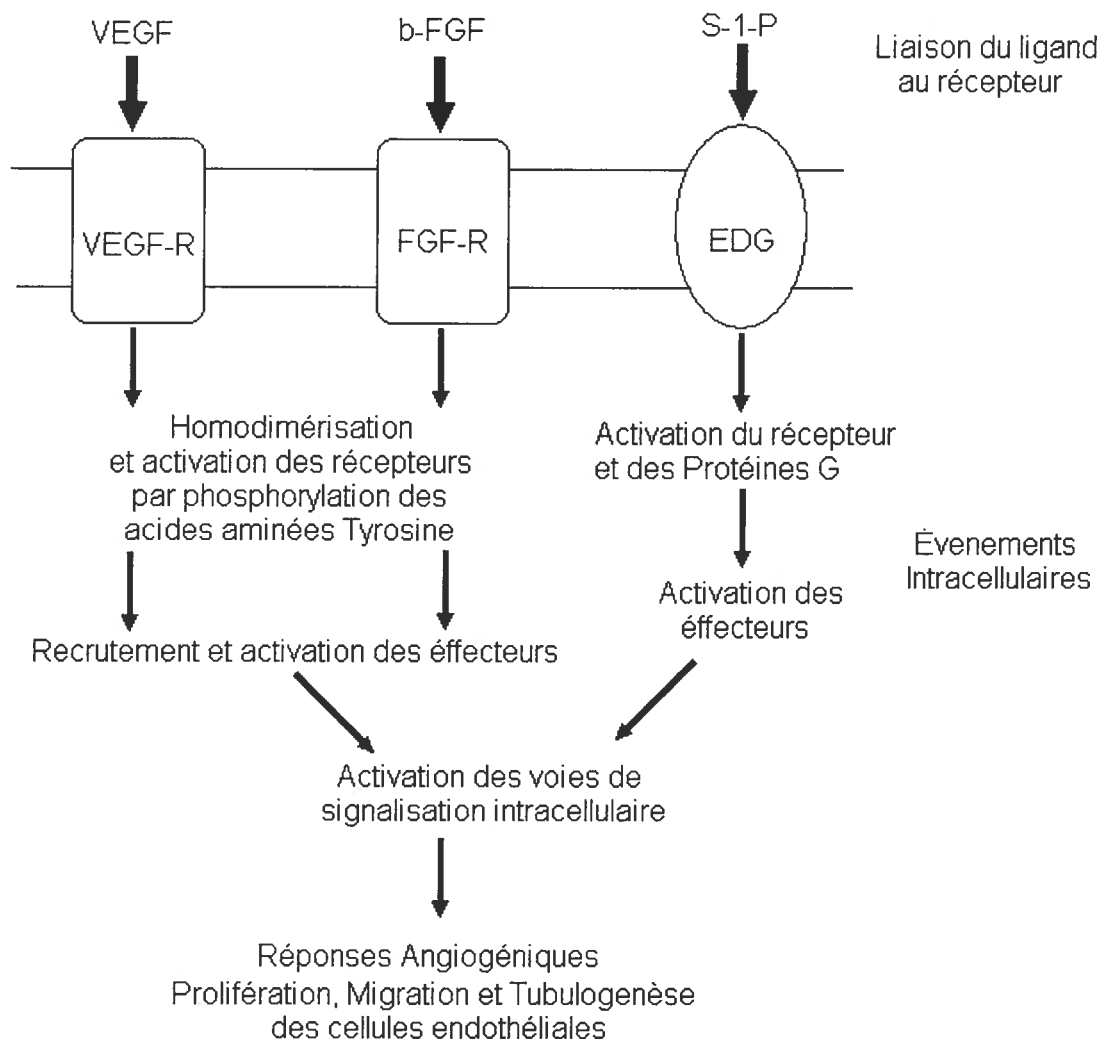
L'angiogenèse est un terme définissant la formation des nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants; elle diffère de la vasculogenèse qui dénote la formation des nouveaux vaisseaux à partir de précurseurs mésenchymateux. L'angiogenèse est un processus important impliqué dans plusieurs autres processus physiologiques comme la mise en place de l'appareil cardiovasculaire et la formation des réseaux vasculaires propre à chaque organe dans l'embryon, la cicatrisation et la réparation des tissus endommagés, et l'adaptation musculaire aux exercices physiques (1).

### 1.2.1 Le contrôle de l'angiogenèse

L'angiogenèse est sous contrôle étroit de deux classes de molécules qui sont réciproquement antagonistes: les facteurs de croissance pro angiogéniques connus sous le nom de « on-switches », et les inhibiteurs physiologiques de l'angiogenèse, connus sous le nom des « off-switches » (The Angiogenesis Foundation; <http://www.angio.org/>).

Parmi les « on-switches » majeurs utilisés lors de notre étude, on trouve: le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance fibroblastique basique (b-FGF), et la Sphingosine-1-phosphate (S-1-P) (2, 3, 4). Le VEGF est aussi connu sous le nom de facteur de perméabilité vasculaire (VPF) car il augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cette glycoprotéine homodimérique de 45 KDa existe sous 5 différents isoformes, VEGF-1, VEGF-2, VEGF-3, VEGF-4 et VEGF-5 (5). Son expression génique dépend du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor-1-alpha) (6, 7) qui est activé suite à une baisse du niveau d'oxygène physiologique, et de l'implication de l'EGR-1 (Early Growth Response-1) (8), un autre facteur transcriptionnel qui est activé par diverses conditions de stress cellulaire incluant aussi l'hypoxie (9). Trois récepteurs à activité tyrosine kinases, VEGFR-1, VEGFR-2, et VEGFR-3 reconnaissent ce facteur de croissance comme ligand (1). Lorsque le VEGF se lie à chacun de ces récepteurs, il induit un changement de conformation qui mène à l'homodimérisation des récepteurs et induit une cascade de signalisation intracellulaire pour initier des réponses moléculaires et cellulaires spécifiques. Le VEGFR-2 est exclusivement

exprimé dans les cellules endothéliales et son activation par le VEGF induit l'angiogenèse par la hausse de la prolifération et le développement du réseau capillaire des cellules endothéliales (5) (Fig 1.2). Le b-FGF, aussi appelé FGF-2, a un mécanisme d'action similaire au VEGF (1). Ce facteur de croissance de 155 acides aminés est le ligand du récepteur FGF-R, dont 4 sous-types ont été caractérisés : FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3, et FGF-R4 (10), qui sont aussi des récepteurs tyrosine kinases comme les récepteurs des VEGF. Le b-FGF augmente la prolifération cellulaire et la migration cellulaire entre autres par l'induction de l'expression des intégrines. Il est également impliqué dans la manipulation des fibres d'actine et dans la réorganisation du cytosquelette cellulaire (Fig 1.2). La S-1-P n'est pas un facteur de croissance comme le VEGF ou le b-FGF, mais plutôt un sphingolipide polaire, synthétisé par modification biochimique de la sphingomyéline. Elle est produite dans des cellules en réponse à divers stimuli comme les facteurs de croissance et les cytokines. Elle se lie aux récepteurs EDG (Endothelial Differentiation Gene), une famille des récepteurs couplés aux protéines G, dont EDG-1, EDG-3, EDG-5, EDG-6, et EDG-8. Lorsqu'elle se lie à ses récepteurs, des protéines G sont recrutées au niveau du récepteur et agissent sur d'autres effecteurs, qui déclenchent des réponses cellulaires. Plusieurs groupes de chercheurs ont rapporté que la S-1-P augmente la prolifération, la survie, et la migration des cellules endothéliales (Fig 1.2). Elle est aussi une molécule de signalisation impliquée dans la modulation intracellulaire du calcium (11).



**Fig 1.2. Transduction des signaux intracellulaires par divers modulateurs angiogéniques.** L'activation des récepteurs du VEGF (VEGFR), du b-FGF (FGF-R) et du S-1-P (EDG) par leurs ligands respectifs induit la transduction des signaux intracellulaires qui mène à l'activation éventuelle des réponses angiogéniques dans les cellules endothéliales. Les récepteurs tyrosine kinases sont représentés par des rectangles arrondis, et les récepteurs couplés aux protéines G par des ellipses.

Les effets commentés ci-dessus proviennent des études effectuées *in vitro*. *In vivo*, toutes ces molécules peuvent interagir entre elles, ou avec d'autres régulateurs de l'angiogenèse. Il est très probable que le VEGF et le b-FGF interagissent lors des phases de prolifération et de migration (1).



Parmi les « off-switches » majeurs, on trouve: l'Angiostatine (un fragment du plasminogène), l'Endostatine (un fragment de collagène XVIII), et les Inhibiteurs de métalloproteinases ou TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases). Les mécanismes par lesquels cette classe de molécules peuvent inhiber l'angiogénèse peuvent être divers: soit en inhibant la prolifération cellulaire, soit en activant l'apoptose, soit en bloquant la migration cellulaire. Les TIMPs inhibent l'angiogénèse en bloquant l'activité des MMPs, qui sont indispensables à la migration cellulaire et à la formation de réseaux vasculaires (12).

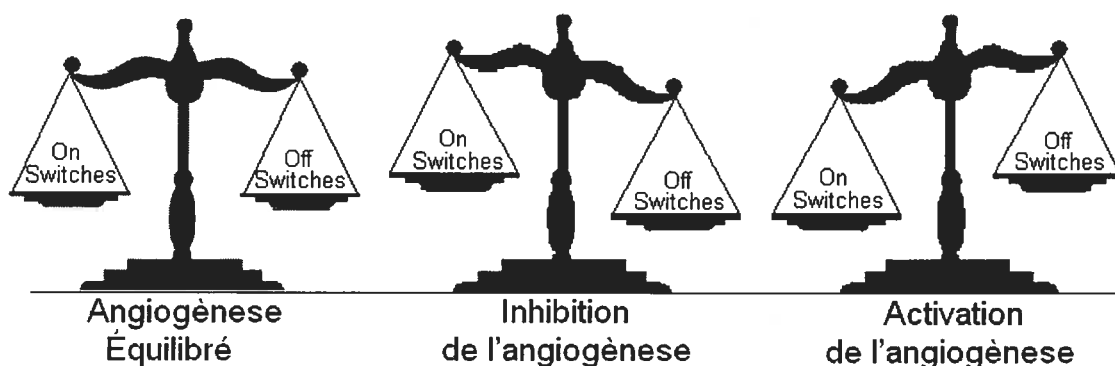


Fig 1.3. **L'équilibre angiogénique.** L'angiogénèse est régulée de façon réciproque par des activateurs (On Switches) et des inhibiteurs (Off Switches) de l'angiogénèse.

Généralement, il y a un équilibre physiologique entre les « on-switches » et les « off-switches ». Lorsque cet équilibre favorise les « on-switches », l'angiogénèse est activée, et lorsque l'équilibre penche en faveur des « off-switches », elle est inhibée (Fig 1.3). Un exemple classique d'angiogénèse physiologique serait la guérison des blessures. Suite à une chirurgie, les tissus près de la plaie secrèteraient et activeraient les « on-switches » et inhiberaient les « off-switches » pour induire et recruter les vaisseaux sanguins voisins à former des ramifications capillaires vers leur site. Ceci faciliterait le recrutement des plaquettes pour guérir la plaie, l'apport des substances nutritives et de l'oxygène pour la survie des cellules près de la zone affectée, et l'accès aux globules blancs pour combattre les microbes qui entrent par la plaie.

Lorsque l'angiogenèse atteint un équilibre, les niveaux et l'activité des « on-switches » baissent et celles des « off-switches » augmentent pour freiner le processus de néovascularisation.

Le contrôle adéquat de l'angiogenèse est indispensable au bon fonctionnement du corps. Une perte de son contrôle pourrait engendrer des conditions pathophysiologiques sévères. L'angiogenèse insuffisante serait causée par une sous-production des facteurs de croissance pro-angiogéniques. Elle se caractérise par la formation de vaisseaux sanguins très rudimentaires qui altèrent la bonne circulation sanguine, causant de sérieux dommages à des tissus dépendants de celle-ci. Elle entraînerait des conditions comme: des guérisons de plaies ralenties, l'infarctus, et la maladie coronarienne. L'angiogenèse excessive serait causée par une surproduction des facteurs de croissance pro-angiogéniques au point de surpasser les effets des inhibiteurs angiogéniques physiologiques. Dans ce cas, les vaisseaux sanguins forment des réseaux très développés, endommageant des tissus normaux et nourrissant des tissus malades. Ce scénario est observé dans des conditions pathologiques comme l'arthrite rhumatoïde, l'aveuglement diabétique, le psoriasis et le cancer (The Angiogenesis Foundation; <http://www.angio.org/>).

### **1.2.2 L'angiogenèse tumorale**

Lorsqu'une cellule saine devient cancéreuse, ses besoins en nutriments et en oxygène augmentent de façon importante, elle s'engage alors dans un cycle de prolifération incontrôlé. Initialement, elle produit une masse tumorale de petite taille, due aux quantités limitées de nutrition et d'oxygène du milieu environnant. Une fois ces réserves épuisées, la masse tumorale doit se trouver une autre source de provisions plus grande pour poursuivre sa croissance. Elle produit et secrète donc des facteurs de croissance angiogéniques, qui activent le recrutement des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins environnants (Fig 1.4). Suite à des stimuli pro-angiogéniques, l'angiogenèse est déclenchée dans les vaisseaux vasculaires et se développe en quatre étapes consécutives:

- Le bourgeonnement implique l'apparition des petites masses de cellules endothéliales sur la surface extérieure des vaisseaux, préférentiellement des capillaires et des veinules. Ces bourgeons, d'abord pleins de cellules, creusent rapidement des lumières se terminant en cul-de-sac.
- Par la migration des cellules endothéliales, ces bourgeons vont par la suite, s'allonger vers la tumeur, la source du stimulus angiogénique.
- L'organisation des cellules endothéliales en un réseau capillaire une fois qu'elles atteignent la source du stimulus.
- Finalement, une adaptation permanente du réseau vasculaire aux besoins de son nouvel environnement se produit. C'est un processus nommé le remodelage.

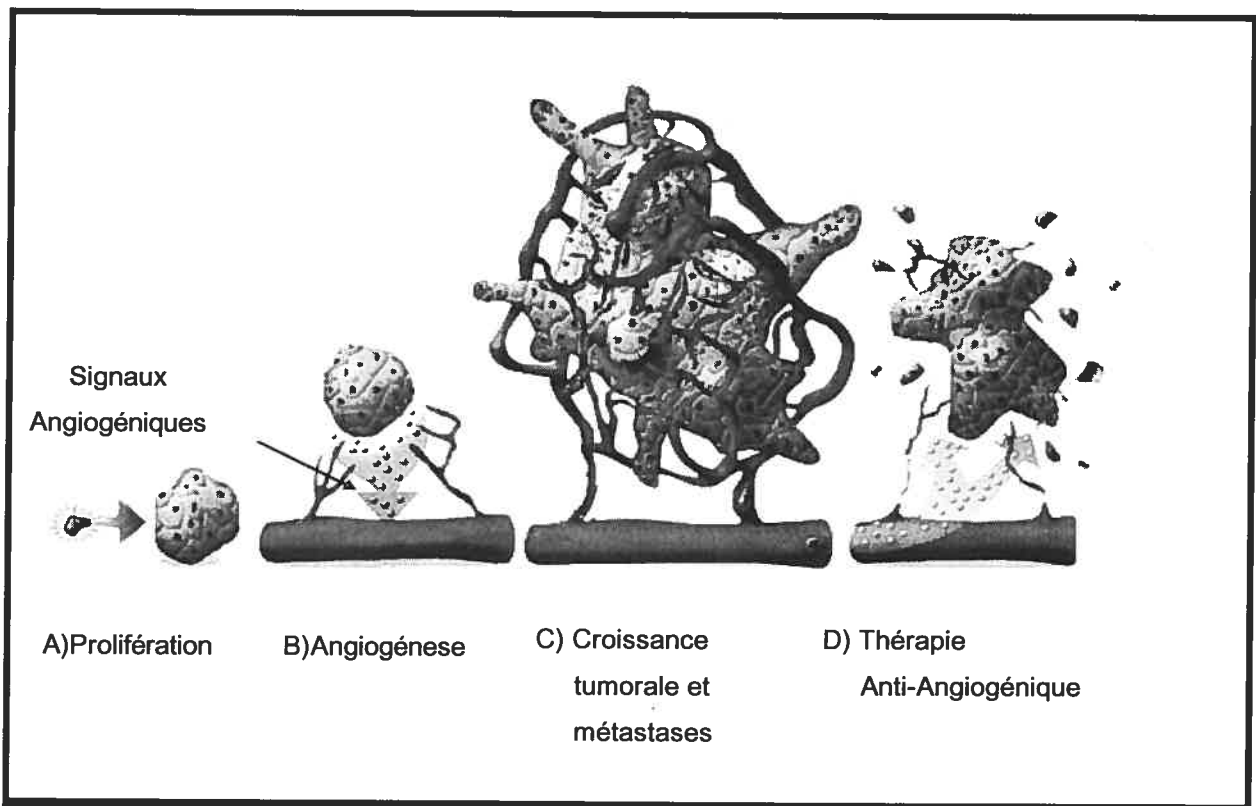


Fig 1.4. **L'angiogenèse tumorale.** L'angiogenèse joue un rôle important dans le développement de la tumeur. A) Une cellule cancéreuse prolifère pour former une masse tumorale de  $1\text{mm}^3$ ; B) La masse tumorale sécrète des signaux angiogéniques induisant la néovascularisation; C) La vascularisation de la tumeur permet sa croissance perpétuée et la formation des métastases; D) Les thérapies anti-angiogéniques antagonisent la croissance de la tumeur en éliminant ses voies d'approvisionnement sanguin.

Les étapes morphologiques du processus angiogénique sont identiques que le stimulus soit physiologique ou pathologique. Les mécanismes cellulaires et moléculaires peuvent, par contre, différer légèrement. Une fois le processus de néovascularisation accompli, le sang circule vers et à l'intérieur de la tumeur apportant suffisamment de nutriments et d'oxygène pour la croissance de celle-ci. Ainsi la masse tumorale grandit et éventuellement envahit les tissus sains environnants et distants par la métastase.

### **1.2.2.1 L'hypoxie et ses influences sur l'angiogenèse**

L'apport adéquat et constant des nutriments et de l'oxygène aux tissus est fondamental au bon fonctionnement de notre corps. Il n'est donc pas étonnant qu'une tension réduite en oxygène (hypoxie) ait un grand impact sur la physiologie du corps humain (13). Lorsque l'hypoxie se manifeste dans le sang, des chimiorécepteurs présents dans l'artère carotidienne et dans l'aorte détectent la diminution du niveau d'oxygène et arrêtent leur influence inhibitrice sur le centre vasomoteur cardiovasculaire dans le système nerveux centrale. Ainsi désinhibé, le centre vasomoteur envoie des signaux sympathiques vers le coeur et vers les muscles lisses vasculaires. La hausse du rythme cardiaque et la vasoconstriction des artères résultent en une augmentation de la pression artérielle dans le but de rétablir l'homéostasie de l'oxygène dans le corps (14). L'endothélium aussi joue un rôle important dans ce mécanisme de compensation physiologique. Étant la première couche tissulaire en contact avec le sang, l'endothélium est plus directement affecté que le système nerveux autonome par une réduction de l'apport en oxygène. En plus des signaux provenant du système nerveux, le tonus vasculaire est sous contrôle des molécules vasodilatatrices comme l'oxyde nitrique (NO) et des molécules vasoconstrictrices comme l'endothéline-1 (ET-1), qui exercent leurs influences sur les muscles lisses vasculaires. L'hypoxie à court terme diminue l'émission de NO et augmente celui de l'ET-1 par les cellules endothéliales, favorisant ainsi la vasoconstriction. A court terme, l'hypoxie stimule également l'émission de la prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) et le b-FGF qui induisent à leur tour la prolifération des cellules musculaires lisses; le dernier stimule aussi les phénotypes angiogéniques des cellules endothéliales. À plus long terme, l'hypoxie l'induit des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales, qui recrutent et adhèrent des neutrophiles en

conséquence. Ce phénomène cellulaire est à la base des inflammations qui se développent dans les sites des tissus en ischémie (15).

Une petite masse tumorale met en place un scénario d'hypoxie qui pourrait mener au cancer. L'activation de HIF-1 serait à la base de ce phénomène. HIF-1 est un facteur de transcription fortement induit et activé par une tension réduite en oxygène, mais peut aussi être activé par des facteurs de croissance, et même par des mutations géniques qui activent les oncogènes et désactivent les gènes répresseurs des tumeurs. Une fois exprimé comme protéine, son activation requiert la phosphorylation des sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ , suivi d'une dimérisation de ces deux sous-unités. Plusieurs études ont établi son rôle dans le développement des tumeurs et dans l'angiogenèse tumorale, ce qui n'est pas étonnant car HIF-1 cible quatre groupes des gènes, encodant:

- Des transporteurs transmembranaires de glucose et des enzymes du métabolisme glycolytique.
- Des facteurs de survie et prolifération.
- Des facteurs d'invasion.
- Des facteurs angiogéniques.

L'hypoxie caractéristique du foyer tumoral crée un déficit en oxygène qui inhibe le métabolisme oxydatif des cellules par les mitochondries. Pour aider les cellules endothéliales et tumorales à s'adapter à ces conditions défavorables, HIF-1 active le métabolisme glycolytique en induisant l'expression de transporteurs transmembranaires de glucose comme le GLUT1 et les enzymes du métabolisme glycolytique comme le GADPH.

Plusieurs études ont démontré que l'hypoxie augmente le profile invasif des tumeurs et la formation des tubes capillaires par des cellules endothéliales. Cela est dû en partie à l'induction par HIF-1 des protéines impliquées dans le remodelage de la MEC comme la fibronectine et la MMP-2. La kératine est une des protéines qui font partie du cytosquelette; l'induction des gènes KRT14, KRT18, et KRT19 encodant divers isoformes de la kératine par HIF-1 activent la mobilité des cellules cancéreuses (16). Il est probable que HIF-1 induise des gènes importants

pour le remodelage de la matrice extracellulaire et l'organisation du cytosquelette dans les cellules endothéliales aussi. Cela activerait leur profil migratoire et tubulogénique, et favoriserait ainsi l'angiogenèse.

De plus, HIF-1 est responsable de l'expression des facteurs de croissance tels que le VEGF, et le TGF- $\alpha$ , et aide les cellules tumorales et endothéliales à survivre et à proliférer malgré le manque d'oxygène. Cela expliquerait en partie le fait que ces cellules prolifèrent mieux en hypoxie qu'en normoxie (15). Il est important de noter que le VEGF n'est pas seulement un facteur de survie, mais aussi un facteur angiogénique. Fang et al (17) ont démontré que l'induction de HIF-1 est indispensable à l'expression de VEGF et donc au développement de l'angiogenèse tumorale et du cancer; ces facteurs de croissance, tout comme d'autres qui sont induits par le HIF-1 aussi pourraient influencer l'activité invasive des cellules tumorales ainsi que le profil tubulogénique des cellules endothéliales tels que mentionné plus haut.

HIF-1 amplifie aussi sa propre expression génique. Par exemple, le TGF- $\alpha$  qu'elle induit se lie au récepteur de l'EGF, qui par des voies de signalisation intracellulaire active non seulement la survie et la prolifération cellulaire, mais aussi l'expression de HIF-1, créant ainsi un « feedback » positif de l'induction de l'angiogenèse tumorale dans l'hypoxie (18).

En résumé, HIF-1 induit l'expression des molécules qui régulent le métabolisme, la prolifération, la mobilité, et le remodelage de la MEC dans les cellules tumorales et les cellules endothéliales. En activant ces fonctions cellulaires, la HIF-1 joue un rôle majeur dans le développement du cancer et de l'angiogenèse tumorale.

## **1.2.3 La dégradation de la matrice extra-cellulaire**

### **1.2.3.1 Les métalloprotéinases de la matrice extra-cellulaire**

Les cellules doivent être capable d'interagir avec les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) dans leur permettre de s'y greffer et de s'y proliférer. C'est via la production et l'utilisation des protéases extracellulaires qu'elles arrivent à le faire, et qu'elles peuvent participer à divers processus physiologiques ou pathologiques (12).

Parmi ces protéases, les Métalloprotéinases de la MEC (MMPs), dont l'activité dépend des ions métalliques pour dégrader et remodeler la MEC, permettent à la cellule d'interagir avec son environnement. Ces MMPs appartiennent à une superfamille de protéines metzincin, qui se distingue par un motif conservé de trois acides aminés Histidines pouvant complexer un ion de Zinc au site catalytique, en plus d'une Méthionine qui demeure dans le site catalytique tout près de l'ion de Zinc. À ce jour, 25 différentes MMPs (Tableau 1) ont été identifiées et 22 versions homologues de celles-ci ont été trouvées chez l'homme. Les MMPs peuvent être de type soluble ou de type membranaire (MT-MMP). Les MMPs solubles sont secrétées à l'extérieur de la cellule une fois qu'elles sont exprimées, tandis que les MT-MMPs restent ancrées à la membrane cellulaire soit par une partie transmembranaire hydrophobe (MMP-14, 15, 16, et 24), ou par une extrémité carboxylique hydrophobe liée à une molécule de GPI (inositol glycophosphatidique) qui attache la MMP à la membrane. Chaque MMP a une spécificité de substrat qui peut être semblable avec celle des autres, dépendant de la séquence primaire de leurs sites catalytiques.

<b>MMP</b>	<b>Nom Courant</b>
MMP-1	Collagénase-1
MMP-2	Gélatinase A
MMP-3	Stromélysine-1
MMP-7	Matrilysine
MMP-8	Collagénase-2
MMP-9	Gélatinase B
MMP-10	Stromélysine-2
MMP-11	Stromélysine-3
MMP-12	Métalloélastase macrophagique
MMP-13	Collagénase-3
MMP-14	MT1-MMP*
MMP-15	MT2-MMP*
MMP-16	MT3-MMP*
MMP-17	MT4-MMP*
MMP-18	Collagénase-4 ( <i>Xenopus</i> )
MMP-19	RASI-1
MMP-20	Enamélysine
MMP-21	XMMP ( <i>Xenopus</i> )
MMP-22	CMMP (Poulet)
MMP-23	
MMP-24	MT5-MMP*
MMP-25	MT6-MMP*
MMP-26	Endométase, Matrilysine-2
MMP-27	
MMP-28	Épilysine

Tableau 1. **Nomenclature des MMPs.** À ce jour, 25 différentes MMPs ont été identifiées, dont 22 versions homologues ont été trouvées chez l'homme. \* indique les MMPs de type membranaire. Toutes les autres sont des MMPs solubles.



Les MMPs jouent des rôles très variés et importants dans l'angiogenèse tumorale et dans les phénotypes des cellules cancéreuses et des cellules endothéliales. Dû à la diversité de substrats envers lesquels les MMPs agissent, et à l'habilité des cellules environnantes à répondre aux produits relâchés par leurs actions protéolitiques sur les protéines de la MEC, ou en clivant des précurseurs des molécules contrôlant l'angiogenèse ou des molécules ancrées à la membrane cellulaire ou même d'autres MMPs, elles peuvent augmenter ou baisser le profil migratoire et invasif des cellules ou moduler leur prolifération. Par exemple, il y a plusieurs facteurs de croissance pro-angiogéniques séquestrés dans la MEC qui seront relâchés suite à la dégradation de cette dernière par les MMPs (12). Ces facteurs pro-angiogéniques vont promouvoir les diverses étapes du processus de néovascularisation. L'adhérence cellulaire à la MEC peut aussi être régulée par les MMP. Il a été montré que les MT-MMPs peuvent dégrader la transglutaminase de type tissulaire (tTG), un co-récepteur à la membrane cellulaire qui se lie aux intégrines et qui régule l'adhésion et la diffusion des cellules sur la fibronectine (19), une des protéines structurales composante la MEC. Les MMPs peuvent aussi moduler l'apoptose des cellules. Par exemple, la MMP-7 libère le FASL, une molécule liée à la membrane cellulaire qui induit l'apoptose lorsqu'elle active le récepteur FAS à la surface cellulaire (12).

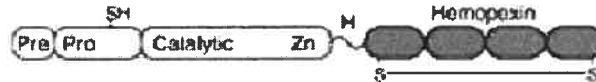
L'expression des MMPs est largement régulée par diverses cytokines et facteurs de croissance comme les interférons, les interleukines, l'EGF, le b-FGF, le VEGF, le TNF- $\alpha$ , et autres qui se lient à leurs récepteurs respectifs et initient divers cascades de signalisation intracellulaire. De plus, elle est hautement contrôlée au niveau de la transcription. Différents facteurs de transcription, peuvent induire ou bloquer la production de l'ARNm des divers MMPs. Par exemple, le facteur de croissance TGF- $\beta$ , active les facteurs de transcription c-fos et c-jun qui forment le complexe de transcription AP-1, qui à son tour induit la transcription de la MMP-13 et inhibe celle des MMPs-1 et 3. Pour la plupart des MMPs, la transcription semble être rigoureusement et spécifiquement régulée, sauf dans le cas de la MMP-2, dont la transcription semble être constitutivement active. L'expression de la MT1-MMP est dépendante de l'EGR-1 (20), un facteur de transcription qui est activé par des hormones tel l'insuline (21), des facteurs de croissance comme le SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) (22) un facteur chimiotactique des cellules progéniteurs hématopoïétiques et à des stress cellulaires comme l'hypoxie (9) et l'irradiation (23).

La plupart des MMPs solubles sont secrétées une fois l'expression protéique terminée. Cependant la sécrétion de certaines de ces MMPs est contrôlée. Par exemple, les MMP-8 et 9 sont synthétisées par des granulocytes et sauvegardées dans des granules spécifiques jusqu'à ce qu'une stimulation de ces cellules par des facteurs inflammatoires les libère par exocytose. De la même manière que pour d'autres, les MMPs sont secrétées en forme de proenzymes inactives. Il y a un groupement thiol d'une cystéine localisée près de l'extrémité C-terminale de la protéine qui se lie de façon non covalente à un cation divalent de zinc, la rupture de cette interaction ionique par clivage du pro domaine auquel il est attaché, active l'enzyme. La plupart des MMPs sont activées à l'extérieur de la cellule, sauf pour la MMP-11, la MMP-28, et les MT-MMPs, qui possèdent un domaine de reconnaissance enzymatique "furin-like" qui permet leur activation à l'intérieur de la cellule (Fig 1.5).

A) Les MMPs aux domaines minimaux (MMP-7/Matrylisine, MMP26/endométase)



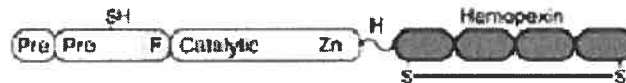
B) Les MMPs possédant seulement un domaine hémapexine (MMP-1/Collagénase-1, MMP-8/Collagénase-2, MMP-13/Collagénase-3, MMP-18/Collagénase-4, MMP-3/Stromélysine-1, MMP-10/Stromélysine-2, MMP-27, MMP-12/Métalloélastase, MMP-19/RASI-1, MMP-20/Enamélysine, MMP-22/CMMP)



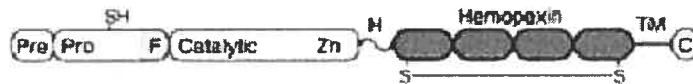
C) Les MMPs qui dégradent la gélatine (MMP-2/gélatinase-A, MMP-9/gélatinase-B)



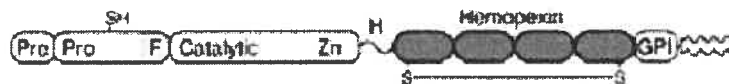
D) Les MMPs sécrétables possédant un domaine de reconnaissance enzymatique "furin-like" RXK/RR (MMP-11/Stromélysine-3, MMP-28/Épilyisine)



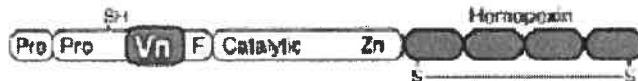
E) Les MMPs transmembranaires (MMP-14/MT1-MMP, MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP, MMP-24/MT5-MMP)



F) Les MMPs liés au GPI (MMP-17/MT4-MMP, MMP-25/MT6-MMP)



G) Les MMPs possédant un domaine « Vitronectin-like » (MMP-21/XMMP)



H) Les MMPs possédant un domaine ressemblant au récepteur IL-1 riche en Cystéine/Proline (MMP-23)

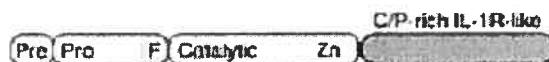


Fig 1.5. Structures générales des métalloprotéinases de la MEC.

À l'exception des MMP-7, -23 et -26, tous les MMPs ont un domaine « hemopexin/vitronectin-like » dont la structure est formée de 4 sous domaines répétitifs et un pont de disulfure liant les sous domaines 1 et 4, et qui régule la liaison des MMPs aux inhibiteurs TIMP des MMPs et de certains substrats. Au début, l'activation extracellulaire des MMPs implique des sérine protéinases, qui clivent les pro-domaines des MMPs à des sites spécifiques. Une fois activés, les MMPs peuvent aussi participer à l'activation des autres MMPs. L'activation de la proMMP-2 par exemple, implique la MT1MMP et la TIMP-2. Le rôle dominant de TIMP-2 *in vivo* est paradoxalement l'activation de la proMMP-2; son extrémité carboxylique est impliquée dans le recrutement de la MMP-2 à la membrane cellulaire, où la MT1-MMP l'active en clivant son pré-domaine, suite à cela, une partie résiduelle du pro-domaine doit être enlevée de la proMMP-2 par une molécule de MMP-2 recrutée à la membrane, pour qu'elle soit complètement active. Le processus d'activation de la MMP-2 est décrit en détail ci-dessous (Fig 1.6).

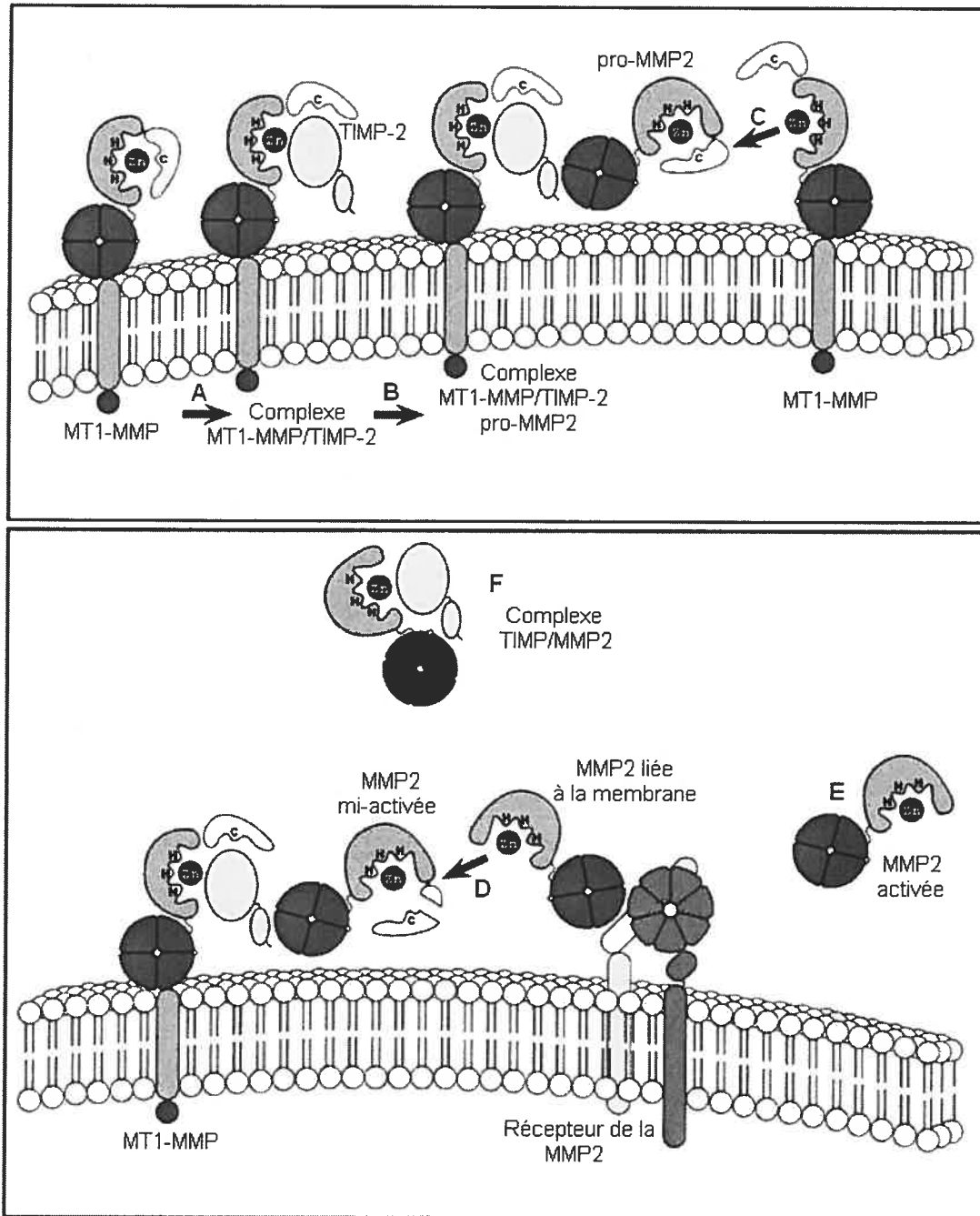


Fig 1.6 **Activation de la proMMP-2.** La MT1-MMP participe à l'activation de la proMMP-2. La TIMP-2 se lie et inhibe la MT1-MMP pour former un complexe MT1-MMP/TIMP-2 (A). Ce complexe recrute la proMMP-2 pour former un complexe MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 à la surface membranaire (B). Une autre MT1-MMP active avoisinante clive le pré-domaine de la MMP-2 et l'active partiellement (C). Le pro-domaine de la proMMP-2 mi-activée est clivée par une autre molécule de MMP-2 active recrutée à la membrane par un autre récepteur (D). La proMMP-2 est ainsi activée et relâchée dans l'espace extracellulaire (E). Des TIMPs dans l'espace extracellulaire peuvent se lier et ainsi inhiber la MMP-2 (F)

### 1.2.3.2 Les inhibiteurs des MMPs de type tissulaires

La famille des inhibiteurs des MMPs de type tissulaires (TIMP), comporte au moins 4 protéines de 20-29 KDa qui se lient et inhibent l'activité des MMPs réversiblement. Elles sont respectivement TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 et se caractérisent pour avoir une structure génique conservée. Des études effectuées sur TIMP-1 et TIMP-2 démontrent que la partie N-terminale de ces protéines interagit avec le site catalytique des MMPs pour les inhiber (24).

Les différentes TIMPs ont aussi des spécificités différentes. Ainsi, TIMP-2 et TIMP-3 inhibent MT1-MMP mais pas TIMP-1. De plus, TIMP-3 semble être plus puissant comme inhibiteur de MMP-9 que les autres TIMPs. Les TIMPs exercent leur influence de façon locale dans les tissus, tandis que le  $\alpha$ 2-macroglobuline, une protéine plasmatique abondante, inhibe les MMPs de façon plus répandue dans les fluides corporels (25). En plus de l'inhibition des MMPs, les TIMPs peuvent aussi participer dans l'activation des MMPs comme dans le cas de la TIMP-2 et son rôle à l'activation de la MMP-2 avec la MT1-MMP comme décrit plus haut.

## 1.3 La tubulogénèse

### 1.3.1 La MMP de type membranaire 1 (MT1-MMP)

La MMP de type membranaire 1, un membre parmi les 6 MT-MMP est structurellement composée des domaines pré et pro qui gardent l'enzyme dans un état latent jusqu'au moment de son activation, d'un domaine catalytique complexé avec un ion de zinc pour la dégradation des protéines de la MEC et l'activation des autres MMPs, d'un motif « Furin-like » nécessaire pour son activation intracellulaire, et d'un domaine « hemopexin/vitronectin-like » qui régule la liaison des MMPs aux inhibiteurs TIMP tel que mentionné ci dessus. L'expression génique de la MT1-MMP est régulée par le facteur de transcription EGR-1. MT1-MMP est impliquée dans l'activation de la proMMP-2, un processus qui implique aussi le recrutement de la TIMP-2 et la formation du complexe MT1-MMP / TIMP-2 / proMMP-2 (12) (Fig 1.6). Malgré cela, des études suggèrent que la MT1-MMP plutôt que la MMP-2 est indispensable à l'angiogénèse. L'inhibition spécifique de la MT1-MMP mais pas celle de la MMP-2 bloque la migration cellulaire (26, 27) et la tubulogénèse des cellules endothéliales *in vitro* (27, 28). *In vivo*, le knock-out génique de la MT1-MMP chez la souris cause des défauts sévères dans le développement de l'angiogénèse, qui sont létales 3 semaines après la naissance (29); tandis que le knock-out de la MMP-2 ne semble pas altérer la néovascularisation physiologique, mais bloque l'angiogénèse tumorale (30).

### 1.3.2 La cavéoline-1

Les cavéoles sont des petites formations de la membrane cellulaire initialement découvertes dans les cellules endothéliales, et plus tard dans plusieurs autres types cellulaires. Elles sont les médiatrices du trafic intracellulaire et on peut donc présumer qu'elles jouent des rôles importants dans plusieurs activités métaboliques. La composante principale au niveau structural et fonctionnel de la cavéole est une protéine intégrale de 22 KDa connue sous le nom de cavéoline (31).


Chez les mammifères, cette protéine existe en au moins 3 différentes isoformes: cavéoline-1, cavéoline-2, cavéoline-3. On trouve les cavéolines-1 et 2 dans les cellules endothéliales, tandis que la cavéoline-3 est présente dans les myocytes (32, 33). De toutes ces

isoformes, la cavéoline-1 est la mieux étudiée en relation à l'angiogenèse. D'abord, il a été démontré que le récepteur VEGFR-2 (34), et la MT1-MMP (35), deux molécules impliquées dans l'angiogenèse, co-localisent avec la cavéoline-1. De plus, il a été démontré aussi que l'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 bloque la formation des structures capillaires, tandis que sa surexpression augmente la formation de ces mêmes structures capillaires dans les cellules endothéliales (36, 37). Ces observations démontrent que la cavéoline-1 joue un rôle important dans l'angiogenèse.

### 1.3.3 Les intégrines

Pour le bon déroulement de l'angiogenèse, il est nécessaire que l'interaction des cellules endothéliales avec la MEC soit bien régulée. Cette interaction implique les MMPs déjà mentionnées, et des récepteurs cellulaires pouvant se lier aux protéines de la MEC: les intégrines. Ces récepteurs sont présents dans toutes les cellules adhésives des organismes multicellulaires, ils reconnaissent et réagissent avec les composants de la matrice extracellulaire. Ils peuvent former au moins 24 complexes hétérodimériques, avec 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  caractérisées jusqu'à maintenant, chez les mammifères (38). Les interactions entre les diverses intégrines et la MEC sont spécifiques, et activent diverses voies de signalisation intracellulaire nécessaires pour la survie, la prolifération et la migration des cellules (39). Dans les cellules endothéliales, les intégrines peuvent interagir indirectement avec des MMPs et des facteurs pro- et anti-angiogéniques pour le bon contrôle de l'angiogenèse. Plusieurs combinaisons des intégrines sont trouvées dans les cellules endothéliales; on peut avoir ainsi, les intégrines  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha 1\beta 6$ . En particulier, le rôle de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  a été le mieux étudié en rapport à l'angiogenèse. Cette intégrine est responsable de l'adhésion des cellules à des protéines de la matrice comme la vitronectine, la fibronectine, le facteur von Willebrand, et l'ostéopontine (40). Son expression est augmentée pendant l'angiogenèse physiologique ou tumorale, probablement par la présence des facteurs angiogéniques tels le VEGF et le b-FGF. Des études ont rapporté que cette intégrine interagit avec la MMP-2 pour cibler ses activités protéolytiques aux sites de bourgeonnement pendant l'angiogenèse (41), et qu'elle se lie et régule la signalisation du VEGFR-2 (42). De plus, des substances « off-switches », comme l'angiostatine, l'endostatine, la thrombospondine et autres





exercent leurs actions inhibitrices en se liant à l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , bloquant ainsi l'interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire.

## 1.4 Les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale comme modèle expérimentale

L'ensemble des vaisseaux sanguins est le plus grand organe du corps humain. Les cellules endothéliales, ainsi que les cellules musculaires lisses recouvrent les artères, les veines, les artérioles, les veinules, et les vaisseaux capillaires sanguins. Ce sont des cellules plates dont le noyau est plus visible que le cytoplasme, ancrées aux surfaces basales des lumières. Elles participent dans plusieurs phénomènes physiologiques dans le corps humain, comme la régulation de la pression artérielle, la coagulation du sang, les réponses inflammatoires, et l'angiogenèse. Leurs caractéristiques et fonctions dépendent largement de leur localisation et de la taille du vaisseau sanguin dont elles font partie (43).

Par exemple, les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau font partie de la barrière hémato-encéphalique, un filtre biologique qui permet la libre diffusion du glucose, de l'oxygène et de l'eau, mais pas de la plupart des drogues ou des protéines. Les cellules endothéliales des artères jouent un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle, en relâchant des molécules vasodilatatrices comme le NO ou des molécules vasoconstrictrices comme l'ET-1, qui agissent sur les muscles lisses vasculaires. Ces mêmes cellules jouent également un rôle important dans le contrôle de la coagulation sanguine, mais dans des conditions normales, elles laissent couler le sang de façon fluide dans les vaisseaux sanguins. Elles jouent un rôle important dans les réponses inflammatoires en accrochant et laissant migrer des neutrophiles par exemple lorsqu'il y a une lésion des tissus; elles participent aussi au processus de néovascularisation suite à des stimuli angiogéniques comme mentionné ci-dessus.

Étant donnée leur implication dans plusieurs processus physiologiques. L'endothelium fait l'objet de plusieurs recherches au niveau biochimique, physiologique et pharmacologique. Les types de cellules endothéliales sont morphologiquement et fonctionnellement différents, les uns des autres, donc dépendamment du sujet de recherche, il faut choisir la bonne lignée cellulaire à ce propos. Le but de cette étude était d'évaluer les effets de l'irradiation ionisante sur l'angiogenèse, le modèle de cellule endothéliale visé devait donc :

- Posséder des caractéristiques physiologiques des cellules endothéliales matures.
- Être capable d'interagir avec des cellules cancéreuses.
- Être capable de performer des fonctions cellulaires en rapport avec l'angiogenèse *in vitro*. Ceux-ci incluent la migration cellulaire et la formation des tubes capillaires sur Matrigel.
- Posséder une durée de vie et un taux de prolifération acceptable.
- Être assez abordable et accessible.

Plusieurs lignées de cellules endothéliales sont disponibles sur le marché, dont les BAEC, les RBE-4, les HMEC-1, les HMVEC et les HUVEC.

Les BAEC sont des cellules endothéliales provenant de l'aorte bovin. Ces cellules ont une durée de vie élevée dans laquelle leurs caractéristiques fonctionnelles et morphologiques ne sont pas altérées (10 passages). De plus, elles sont facilement accessibles, et plus abordables que des cellules humaines. Cependant, elles ne forment pas des structures capillaires sur le Matrigel, et donc ne sont pas utiles pour cette étude.

Les RBE-4 sont des cellules de l'endothélium composant la barrière hémato-encéphalique de rat. Elles forment des structures capillaires sur le Matrigel, sont abordables, et ont un taux de prolifération assez élevé. Des observations récentes (dans notre groupe) sur leurs caractéristiques suggèrent que les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique pourraient être fonctionnellement très différentes des autres lignées primaires de cellules endothéliales. Donc ces cellules n'ont pas été utilisées dans cette étude non plus.

Les HMVEC sont des lignées primaires de cellules endothéliales microvasculaires humaines souvent isolées des poumons et de la peau humaine. Elles forment des structures sur Matrigel, mais elles n'interagissent pas avec les cellules cancéreuses (44). De plus, leur taux de prolifération est bas et elles sont anormalement sensibles à l'irradiation (nos observations) et donc ne sont pas pratiques pour cette étude.

Les lignées primaires des cellules endothéliales (donc directement isolées des tissus d'individus sains) ont une durée de vie moyenne de 5 à 10 passages. De plus, elles perdent des caractéristiques fonctionnelles après le passage 7 (45). Et donc ne peuvent pas être utilisées pour des expériences *in vitro* à long terme. Pour cette raison, des lignées des cellules endothéliales immortalisées comme les HMEC-1 ont été créées. Les HMEC-1 sont des cellules endothéliales humaines immortalisées par transfection avec le virus carcinogénique SV40 portant l'antigène T (46). Elles ont des caractéristiques de cellules endothéliales primaires, sont capables de former des structures capillaires, et donc sont souvent utilisées comme modèle cellulaire pour des études sur l'angiogenèse. De plus, il a été démontré qu'elles interagissent avec des cellules cancéreuses (47). Cependant, l'immortalité est un aspect qui rend ces cellules, si non cancéreuses, non physiologiques non plus. Si l'irradiation causait normalement la mort des lignées primaires de cellules endothéliales, ou des altérations sur leur prolifération, son effet ne serait pas observable. Pour cette raison, même si les HMEC-1 pourraient être des bons candidats pour notre étude, elles n'ont pas été utilisées dans cette étude

Les HUVEC sont une lignée primaire de cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine. La corde ombilicale humaine étant très abondante pour la récolte des cellules endothéliales, les HUVEC sont assez abordables et très accessibles; cela explique en partie le fait qu'elles soient utilisées couramment dans les recherches biomédicales concernant l'endothélium. Comme mentionné ci haut, elles ont une durée de vie de jusqu'à 10 passages et perdent des caractéristiques fonctionnelles après le passage 7 (45). Ces cellules ont un taux de prolifération moyen. Des études ont établi même qu'elles interagissent avec des cellules cancéreuses du colon (48), des cellules cancéreuses de la tête et du cou (49), et des mélanomes (50, 51). De plus elles sont des cellules primaires possédant des caractéristiques physiologiques des cellules endothéliales matures, et forment des structures capillaires sur le Matrigel. Tous ces qualités font des HUVEC un bon modèle cellulaire pour notre étude.

## 1.5 Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)

Les cellules souches ont fait un des sujets de recherches biomédicales les plus importants du XX<sup>ème</sup> siècle. Le corps humain perd des tissus au cours de sa vie, soit par maladie, accident, âge ou autres causes naturelles; la chance de trouver des organes pour les remplacer étant maigre, les cellules souches ont prouvé être une alternative médicale efficace pour la restauration des tissus, pouvant produire des tissus et divers organes corporels (NIH; Stem Cells : A Primer; <http://stemcells.nih.gov/infoCenter/stemCellBasics.asp> ). Les cellules souches sont utilisées dans le cadre de thérapies cellulaires visant à corriger des pathologies comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, le diabète, l'arthrite rhumatoïde, les maladies du cœur, et même pour réparer les dommages de la moelle épinière.

Les cellules souches sont non différenciées, et ont une grande capacité de division, donc de régénération prolongée, et de produire plusieurs autres lignées de cellules différentes. Elles ont comme fonction de remplacer des cellules tissulaires endommagées ou mortes, par différenciation à des lignées cellulaires spécifiques. Par exemple, les globules rouges, les globules blancs, et les plaquettes du sang, ont une durée de vie courte, alors il y a continuellement un renouvellement sans fin de ces cellules par la mitose (processus de reproduction par division cellulaire) et la différenciation de ces cellules souches hématopoïétiques en des globules et des plaquettes ((NIH; Stem Cells : A Primer; <http://stemcells.nih.gov/infoCenter/stemCellBasics.asp> ).

Les cellules souches ne sont pas différenciées, mais elles peuvent être destinées à des programmes d'évolution spécifiques. Dans ce contexte, on peut avoir des cellules souches :

- Unipotentes: qui peuvent se différencier en une seule lignée cellulaire.
- Multipotentes : qui peuvent se différencier en quelques lignées cellulaires.
- Pluripotentes : qui peuvent se différencier en plusieurs lignées cellulaires.

- Totipotentes : qui peuvent se différencier en toutes les lignées cellulaires de tous les tissus de l'organisme et même reproduire l'embryon de l'organisme au complet.

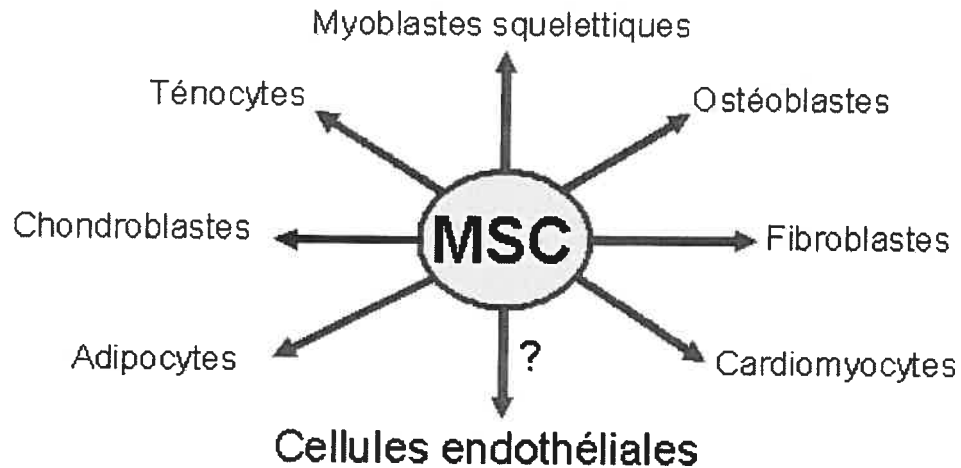


Fig 1.7. **Différenciation des MSC en divers lignées mésenchymateuses.** Les Cellules Stromales Moelleuses (MSC) sont capables de se différencier en des lignées cellulaires mésenchymateuses, c'est pourquoi elles sont aussi connues comme des Cellules Souches Mésenchymateuses.

Cinq types principaux de cellules souches ont été caractérisés:

- Les cellules souches embryonnaires, proviennent du blastocœle de l'embryon et ont le potentiel de se différencier en toutes les lignées cellulaires du corps. C'est le type de cellules souches le moins prédestinées.
- Les cellules souches épithéliales sont dérivées de la couche mésodermique de l'embryon. Elles donnent naissance à l'épithélium intestinal et épidermique, et l'endothélium qui couvre les vaisseaux sanguins entre autres.
- Les cellules souches neuronales sont localisées dans le cerveau, et sont les précurseurs des neurones, des cellules gliales, des astrocytes, et des oligodendrocytes.

- Les cellules souches hématopoïétiques résident dans la moelle osseuse, et comme mentionné ci-dessus, produisent les globules rouges, les différents globules blancs (ie: granulocytes, monocytes, et lymphocytes), et les plaquettes du sang.
- Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) résident aussi dans la moelle osseuse, elles sont capables de se différencier en des myoblastes squelettiques, des adipocytes, des ténocytes, des chondroblastes, des ostéoblastes, des fibroblastes, et des cardiomyocytes (Fig 1.7).

Les MSCs sont connues sous le nom de cellules formant des colonies fibroblastiques, et aussi comme cellules stromales moelleuses, due à leur localisation dans le stroma moelleux. Contrairement aux cellules souches hématopoïétiques avec lesquelles elles sont co-localisées dans la moelle osseuse, ces cellules ont tendance à adhérer aux surfaces des plastiques des contenant de culture. Les MSC sont des populations morphologiquement, phénotypiquement, et fonctionnellement hétérogènes. Récemment, une étude a rapporté qu'elles auraient aussi le potentiel de se différencier en des cellules endothéliales mésodermiques (52) et des cellules endothéliales CD31 positives (53). Cela est étonnant car les MSC n'expriment pas des marqueurs hématopoïétiques ou endothéliales comme CD11, CD14, CD31, CD34, ou CD45 lorsqu'elles ne sont pas différenciées (54). De plus, plusieurs autres études suggèrent la possibilité d'implication des MSC dans l'angiogenèse tumorale. Notamment, une étude *in vivo* démontre que les cellules progénitrices multipotentes d'adulte (MAPCs), des analogues des MSC, sont capables de se différencier en des cellules endothéliales capables de contribuer à l'angiogenèse tumorale (55). De plus, d'autres études rapportent qu'elles interagissent sélectivement avec les cellules épithéliales tumorales (56), et que les MSC sont impliquées dans la croissance et la survie des myelomes plasmatiques. Rien n'est connu par contre sur le profil migratoire ou prolifératif, ou l'habilité tubulogénique des MSC.

## 1.6 L'apoptose

Le mot apoptose a été mentionné pour la première fois comme terminologie scientifique dans un article par Kerr, Wyllie et Currie en 1972 pour décrire un processus de mort cellulaire physiologique programmée (57). On dit qu'elle est programmée car il y a des signaux génétiques dans chaque cas qui initient une cascade d'événements qui éteignent sa vie. Elle est impliquée dans plusieurs processus physiologiques normaux comme l'élimination de la membrane interne de l'utérus lors de la menstruation chez la femme, ou la mort quotidienne des vieux neutrophiles dans la circulation sanguine des mammifères, un processus constant pour assurer toujours la présence des neutrophiles jeunes et fonctionnels pour le bon fonctionnement et l'efficacité du système immunitaire (58).

La nécrose, ou mort cellulaire non programmée, est causée par des dommages sévères à une cellule, et qui se déroule de façon non ordonnée pour éventuellement désintégrer complètement les organelles de la cellule. Contrairement à la nécrose, l'apoptose se déroule de façon ordonnée. Elle implique la condensation et la fragmentation de la chromatine, la dilatation du réticulum endoplasmique rugueux, et la division de la cellule en des capsules contenant les divers organelles comme la mitochondrie intacte morphologiquement, et exprimant des signaux phagocytaires induisant ainsi l'endocytose par les macrophages. Ceci a des implications physiologiques importantes car c'est la raison pour laquelle l'apoptose ne laisse aucune trace de la cellule originale et n'induit donc pas de réponses inflammatoires. La nécrose par contre libère des débris de cellule originale, causant des inflammations (Fig 1.8).

L'apoptose peut être induite dans les cellules par plusieurs stimuli comme des toxines, des hormones, des facteurs de croissance, et l'irradiation entre autres; les cellules ne répondent pas toutes aux mêmes stimuli apoptotiques. L'apoptose serait induit par des stimuli causant des dommages dans l'ADN des cellules. Ceci activerait le facteur de transcription p53, qui est cruciale à la promotion de l'apoptose (59).



### 1.6.1 La caspase-3

Des enzymes appelées caspases jouent un rôle capital dans l'apoptose. Quatorze membres de cette famille de protéases à cystéine ont été identifiés jusqu'à maintenant, et on peut les diviser en deux classes: les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Elles sont produites sous forme de zymogènes, et leur activation implique un recrutement des complexes formés dans la partie intracellulaire par l'intermédiaire des protéines adaptatrices cytosoliques comme APAF-1 et par l'oligomérisation des récepteurs membranaires comme les récepteurs du TNF, et les récepteurs FAS. Ce recrutement mène à une dimérisation des caspases et à une activation subséquente, suivie par un autoclivage pour donner la forme mature des caspases. Ces dernières peuvent ensuite cliver d'autres caspases pour les activer, et ainsi une cascade d'activation est initiée et amplifiée.

Le rôle des caspases est surtout exécutif, c'est-à-dire qu'elles vont éteindre les voies protectrices et activer des molécules qui vont participer à la mort cellulaire. Les caspases ont une influence très vaste sur les protéines cytosoliques et nucléaires. Les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et du métabolisme sont des substrats.

La caspase-3 est une caspase effectrice, dont l'activation signale un point de non-retour dans l'apoptose, c'est la raison pour laquelle son activité est utilisée pour déterminer le degré d'apoptose. Des études ont décrit que la caspase-3 était nécessaire pour la condensation de la chromatine et pour la dégradation internucléosomale de l'ADN, une étape typique de l'apoptose et qu'elle amplifie les activités des caspase-8 et 9, nécessaires pour la rupture de la cellule (56).

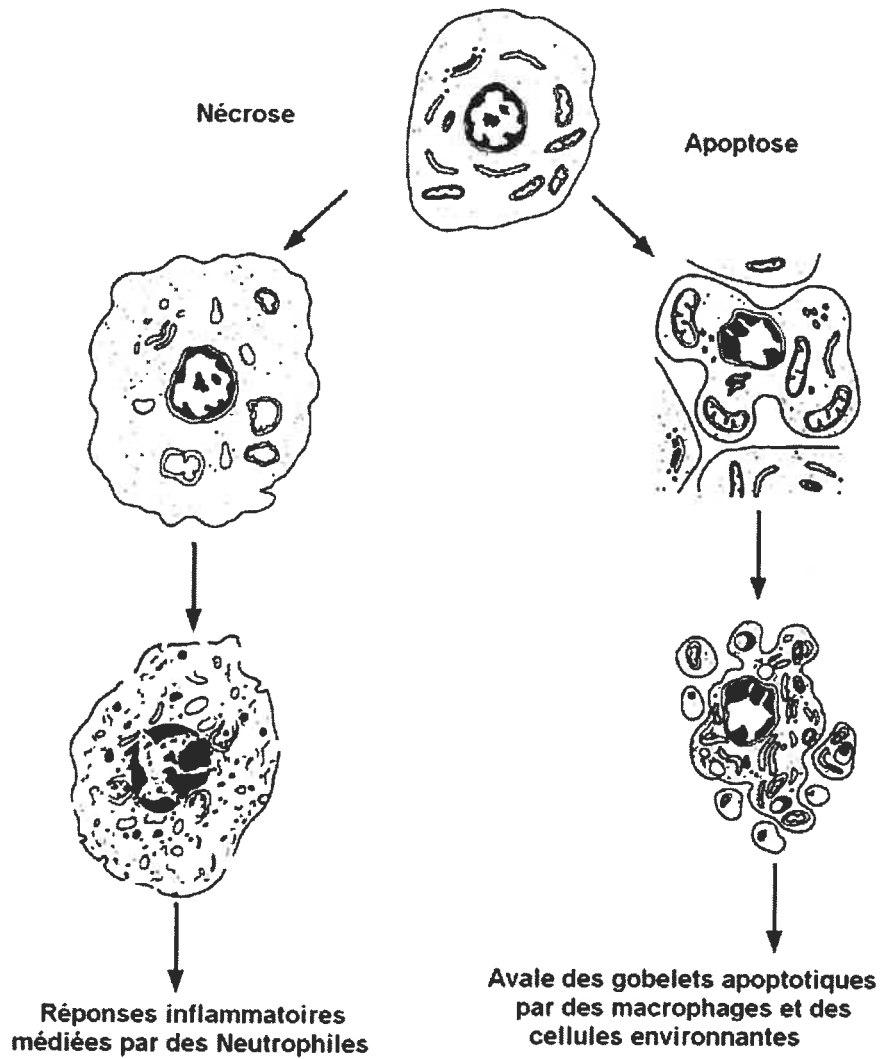


Fig 1.8. **Apoptose vs Nécrose.** L'apoptose se déroule de façon ordonnée, et ne laisse pas de débris de la cellule originelle et donc n'induit pas des réponses inflammatoires contrairement à la nécrose. Les gobelets apoptotiques de la cellule originale sont avalés par des macrophages et des cellules environnantes.

## 1.7 Les approches cliniques contre le cancer

### 1.7.1 La radiothérapie

La radiothérapie est le mode thérapeutique de choix pour plusieurs types de cancers. Le principe est que le traitement à l'irradiation dirigé contre les tumeurs endommagerait gravement le matériel génétique des cellules cancéreuses au point que la réparation de l'ADN devienne impossible, et que la mort cellulaire en résulte (60). Dans certains cas, ce traitement est souvent une meilleure alternative que la chimiothérapie. Par exemple, dans le cas des glioblastomes, les cellules saines sont beaucoup plus sensibles aux agents utilisés pour la chimiothérapie que les cellules cancéreuses. La radiothérapie devient donc une meilleure alternative car elle permet de cibler les tumeurs plus précisément, même si ces dernières sont plus radiorésistantes. La radiothérapie peut prolonger l'espérance de vie de 6 à 8 mois des patients atteints de cancer (61). Cependant, cette technique entraîne des effets secondaires importants malgré l'efficacité. La détérioration de l'ADN des cellules saines environnantes causerait:

- Des morts cellulaires qui seraient à la base des hémorragies
- Le changement des cellules saines en cellules cancéreuses qui, en partie, seraient la cause des tumeurs secondaires.

L'apparition de tumeurs secondaires malgré la possible éradication d'une première tumeur peut aussi être expliquée d'une autre façon. Des études effectuées sur des lignés de cellules tumorales primaires radio et chimio résistantes comme les glioblastomes (62, 63), les cellules cancéreuses pancréatiques (64) et les cellules cancéreuses de poumons de type Lewis Lung Carcinoma (LLC) (65), ont démontré que même si l'irradiation atténue partiellement la prolifération cellulaire de ces cellules, elle active aussi le profil invasif de ces cellules même à de faibles doses. Ces observations ont été corrélées à des expressions plus élevées des intégrines  $\alpha\beta3$  (62), de la MMP-2, et de la MT1-MMP. Sur d'autres tumeurs malignes comme les médulloblastomes par contre, l'irradiation pourrait s'avérer utile, car elle réduit significativement la survie cellulaire, et le profil invasif des cellules cancéreuses de médulloblastome(63).

La plupart des efforts ont été mis sur l'effet de l'irradiation sur des cellules cancéreuses. Cette technique a par contre été très peu étudiée sur les cellules endothéliales. Un changement de direction vers l'angiogenèse pourrait s'avérer utile pour prévenir d'autres dangers associés à la radiothérapie et même développer des thérapies plus efficaces contre les cancers les plus agressifs. Il a été démontré que l'irradiation à 15 Gy (Grey, une unité pour mesurer la puissance de l'irradiation) tue les cellules endothéliales normales. De plus, l'irradiation diminue le volume des tumeurs implantées chez des souris normales, mais pas dans des souris dont les cellules endothéliales sont immortalisées par knock-out de la Sphingomyélinase et Bax (deux protéines nécessaire pour l'initiation de l'apoptose). De plus, même sans irradiation, les tumeurs implantées grandissent plus vite chez les souris exprimant les cellules endothéliales n'exprimant ni la Sphingomyélinase ni Bax. Cela démontre que la survie des tumeurs dépend surtout de la présence des cellules endothéliales, même après traitement à l'irradiation (66).

### **1.7.2 Les traitements anti-angiogéniques**

Le traitement des cancers à l'aide des agents anti-angiogéniques est une idée récente qui semble attirer de plus en plus d'intérêt. Ce type de thérapie vise spécifiquement les cellules endothéliales et donc l'angiogenèse tumorale plutôt que les cellules cancéreuses. L'avantage est qu'elle empêcherait significativement le développement de la résistance aux drogues par les tumeurs (67), et qu'elle pourrait induire un effet anti-tumoral tout en gardant les effets cytotoxiques à de faibles niveaux (68, 69). Les drogues anti-angiogéniques ciblent les protéines impliquées soit dans la prolifération, soit la migration, soit la tubulogenèse, ou d'autres étapes nécessaires au développement de l'angiogenèse. Elles peuvent être des molécules synthétiques ou des composés d'origine naturelle.

Parmi les molécules synthétiques, il y a les antibiotiques et certains analogues de peptides qui réguleraient les activités des MMPs. La tétracycline, et ses analogues semi synthétiques la doxycycline et la minocycline, inhibent les MMPs 1, 2 et 12 (69) et ont été utilisées pour traiter l'arthrite rhumatoïde (70), qui est liée à une angiogenèse excessive. Parmi les analogues de peptides, on trouve les phosphonamidates (71) et les hydroxamates (72) qui sont des analogues du collagène, une protéine de la matrice extracellulaire. De ces analogues de peptides, les

hydroxamates ont été rapportés comme les plus puissants dans l'inhibition des MMPs *in vitro* (73). Des drogues comme le Batimastat, l'Ilomastat, et le Marimastat sont des exemples des hydroxamates. Ces molécules qui ont une structure ressemblant au collagène, séquestrent l'ion divalent de Zinc nécessaire pour l'activité des MMPs.

Divers composés naturels ont été aussi étudiés pour leurs propriétés anti-angiogéniques. Deux exemples en particulier sont d'un grand intérêt dû à leurs effets puissants : le Néovastat et les catéchines du thé vert.

Le Néovastat (Æ-941) est un produit naturel extrait du cartilage de requin. C'est un agent anti-angiogénique ayant plusieurs mécanismes d'action qui est actuellement en essai clinique phase 3 pour le cancer du rein, et un type de cancer du poumon (74). Cet extrait a été démontré comme étant capable de:

- Bloquer les MMPs 2, 9 et 12 (75-77).
- Inhiber sélectivement la liaison de VEGF au récepteur VEGFR-2 (78-81).
- Activer spécifiquement dans les cellules endothéliales les caspases (82).
- Stimuler le tPA (tissue type plasminogen activator), une protéase qui produit l'angiostatine en clivant le plasminogène (83).

Les catéchines du thé vert ont aussi attiré beaucoup d'intérêt très récemment. Une des preuves possibles du potentiel anti-cancéreux du thé vert le plus significatif serait la grande différence entre l'incidence de cancer des orientaux, qui en boivent régulièrement et des occidentaux, qui en boivent moins (84). En effet, des études ont démontré des effets protecteurs du thé vert contre le cancer de l'estomac (85), du sein (86), de la vessie (87) et de la peau (88).

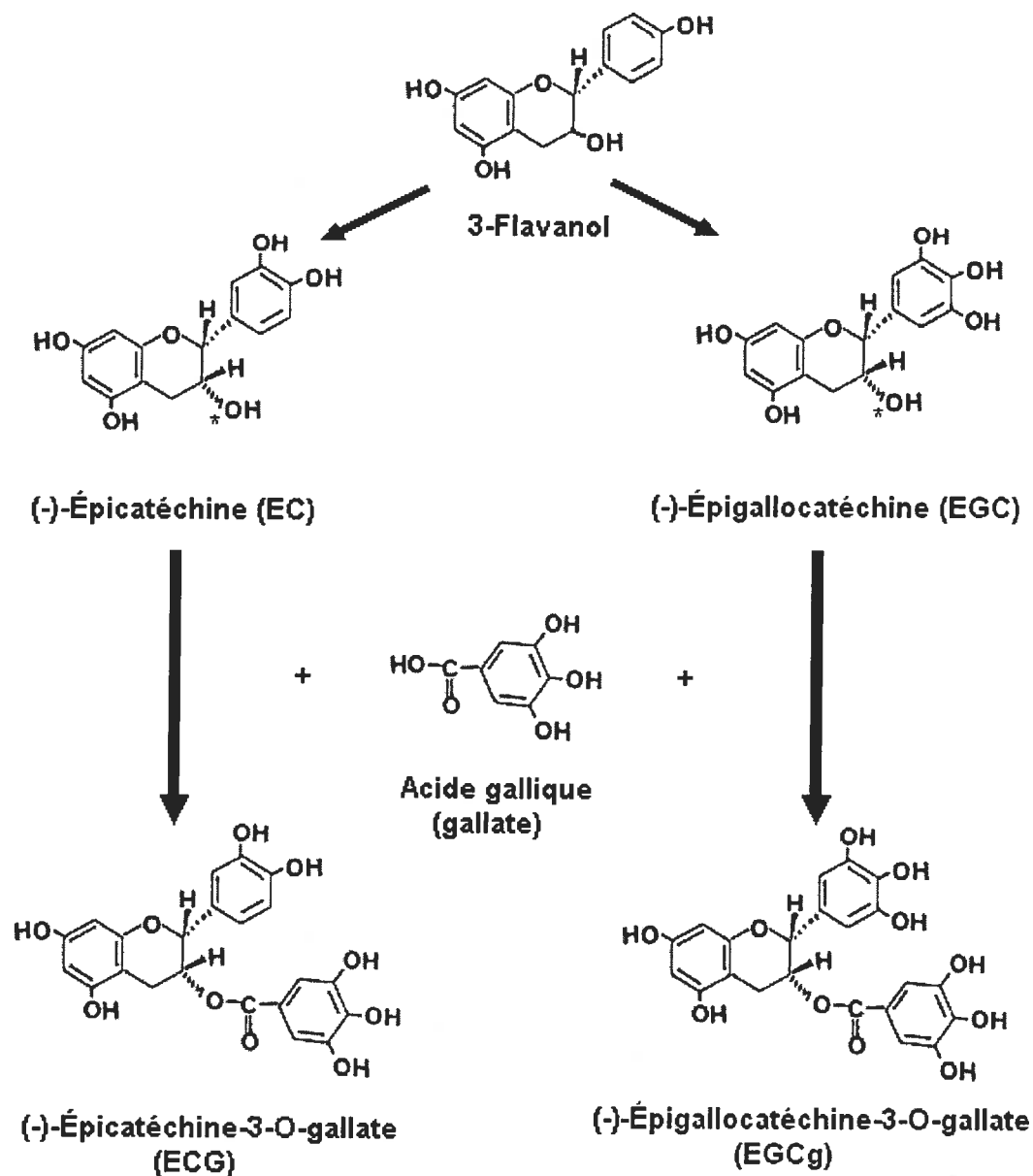


Fig 1.9. **Structures chimiques des catéchines du thé vert.** Les structures des différentes catéchines trouvées dans le thé vert, sont basées sur une structure générale 3-flavanol et d'une molécule de gallate liée à l'oxygène du C3 de la molécules (\*).

Les catéchines sont synthétisées dans les feuilles de thé vert à partir de la malonate, la shikimate, et de leurs métabolites. On peut distinguer plusieurs types de catéchines comme: le (-)-épigallocathéchine (EGC), et le (-)-épicathéchine (EC). Les structures de chacune de ces molécules sont basées sur un squelette de 3-flavanol, une molécule de 15 atomes de carbone,

caractérisé par deux parties phénoliques et connectés par 3 sous-unités de carbone. Ces catéchines peuvent aussi avoir un groupe de gallate attaché à l'oxygène de la sous-unité du 3<sup>me</sup> carbone, et on obtiendrait le (-)-épigallocatechine-3-O-gallate (EGCg), et le (-)-épicatéchine-3-O-gallate (ECG) respectivement. Ces molécules exercent leurs propriétés anti-cancéreuses de plusieurs façons (89) (Fig 1.9).

Les espèces réactives d'oxygène (ROS), des molécules à radicaux libres produites par les diverses activités métaboliques du corps, ont un potentiel carcinogénique. Aussi, les divers stimuli extracellulaires peuvent induire des voies de signalisations intracellulaires qui causeraient le cancer dans des cellules normales. Des facteurs de croissance peuvent se lier à des récepteurs tyrosine kinases (RTKs) et activer des voies de signalisation impliquant les MAP Kinases (MAPKs), et le complexe de transcription AP-1, deux des protéines qui sont impliquées dans plusieurs fonctions du cycle cellulaire, et qui sont connues pour leur capacité d'induire la néoplasie, la métastase et l'angiogénèse (90).

Les catéchines sont des anti-oxydants très puissants, et donc neutralisent les ROS efficacement (86), de plus ils peuvent agir sur les voies de signalisation intracellulaires pour ralentir la carcinogénèse, soit en inhibant l'activité des RTK ou en ciblant des effecteurs moléculaires en aval. En particulier, l'EGCg a été démontré comme étant capable d'inhiber l'activation du VEGFR-2 (91), et elle est aussi connue pour son interférence avec les voies impliquant le complexe AP-1 (92, 93, 94).

Les MMPs sont aussi susceptibles d'être inhibées par les catéchines. En particulier, des études ont montré que les MMPs 2, 9 et 12 sont inhibées par les catéchines du thé vert (95). La MT1-MMP, qui attire de plus en plus l'attention sur son importance dans l'invasion cellulaire et la morphogénèse, est également susceptible d'être inhibée par les catéchines du thé vert. En particulier, l'EGCg bloque l'expression et l'activité catalytique de la MT1-MMP (96, 35), et donc la migration dans les cellules U87 et dans les cellules COS-7 exprimant la MT1-MMP (26).

### 1.7.3 Les traitements en synergie

La radiothérapie, la chimiothérapie et les traitements anti-angiogéniques ont chacun un taux d'efficacité limité qui dépend de plusieurs facteurs, incluant les doses appliquées, le mode de traitement, la nature de la pathologie en question, les particularités des patients, et autres. Il est possible que les traitements coopératifs entre ces différentes approches thérapeutiques puissent avoir des effets additifs et même synergiques, ce qui a mené plusieurs groupes à faire des études de ce genre pour le cancer. Le temozolomide (TMZ) est un agent d'alkylation qui a été récemment approuvé pour le traitement des gliomes malins récurrents; il a été démontré que le traitement au TMZ des Glioblastomes U87, et LN-229 inhibe leurs profils invasifs de base et activés par l'irradiation ainsi que l'expression des MMPs et des intégrines augmentées par l'irradiation (63). Le CGS27023A, un inhibiteur des MMPs supprime l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques Panc-1 de base, et activé par l'irradiation (64). Le taxol, connu aussi sous le nom de paclitaxel est un agent chimiothérapeutique utilisé pour le traitement du cancer d'ovaire, des seins, et des poumons, dont les propriétés radiosensibilisatrices commencent à être étudiées (97). D'autres études ont aussi été faites avec des inhibiteurs naturels de l'angiogénèse comme l'angiostatine. Clairement, cette molécule agit spécifiquement sur les cellules endothéliales, car des traitements à l'angiostatine agissent sur la survie des lignées de cellules endothéliales comme les HAEC, les HUVEC, et les HMEC-1, mais pas celle des lignées des cellules tumorales comme les gliomes C6 et D54, le carcinomes des poumons LLC, les carcinomes de larynx SQ20B et de la prostate PC-3 *in vitro*. D'autant plus que, l'angiostatine agit en synergie et de façon additive avec l'irradiation seulement sur la survie des cellules endothéliales, mais pas sur les cellules cancéreuses *in vitro*. (98, 99). Le fait que le traitement combiné d'irradiation avec l'angiostatine fait régresser le volume des tumeurs de gliomes implantés (96) sur les souris plus significativement que chacun des traitements seuls, indique que ce genre de co-traitements pourrait être plus efficace que les traitements conventionnels pour le cancer.



## Chapitre 2

### **OBJECTIFS**

L'objectif de cette étude est d'examiner l'influence de l'hypoxie sur le profil migratoire et tubulogénique des MSC, et de définir les partenaires moléculaires régulant la contribution des MSC à l'angiogenèse. Ensuite, nous voulons étudier les effets de l'irradiation sur les cellules endothéliales *in vitro*, tant au niveau cellulaire que moléculaire. On envisage aussi d'évaluer l'efficacité des co-traitements aux agents anti-angiogéniques et à l'irradiation ciblant l'angiogenèse tumorale.

## Chapitre 3

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

*3.1 Anticorps et produits chimiques* : Les matériels suivants sont acquis des compagnies mentionnées ci-dessous : Les anticorps polyclonaux de lapin anti-TIMP2 (AB801), anti-MT1-MMP [hinge] (AB815) et anti-MT1-MMP [domaine catalytique] (AB8102), l'anticorps monoclonal de souris anti-MMP2, et le kit d'immunobuvardage (Western Blot) optimisé pour la chimioluminescence proviennent de Chemicon International (Temecula, Californie). L'anticorps polyclonal de lapin anti-VEGF (SC507) provient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Californie). L'anticorps monoclonal de souris anti-Cav 1 (Cat#37120) a été acheté de BD Pharmingen (Mississauga, Ontario). L'anticorps monoclonal de souris anti-tTG est de Medicorp (Montréal, Québec). Les anticorps d'âne conjugués à la peroxydase de radis, anti-souris et anti-lapin IgG ont été fournis par Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, Pennsylvanie). Les membranes polyvinyliques sont de Boehringer Mannheim. Le kit de dosage des protéines BCA est de Pierce. Tous les produits pour l'électrophorèse et la zymographie sont de Bio-Rad. Le réactif de TRIZOL, la trypsine, l'héparine, la pénicilline et la streptomycine sont de GIBCO/BRL. Le Sérum Fœtal Bovin (FBS) provient de Hyclone laboratories. L'agarose, la gélatine, le dodecyle sulfate de sodium, le sphingosine-1-phosphate (S-1-P), le Triton X-100, le (-)-Epigallocatechine (EGC), le (-)-Epigallocatechine-3-gallate (EGCg), le supplément de croissance pour cellules endothéliales (ECGS), et la fibronectine (FN) sont de Sigma (St-Louis, MO). L'ilomastat (GM6001) est de AM Scientific. Le matrigel Provient de Becton Dickinson Labware (Bedford, MA). Le Milieu de culture Minimal Essentiel (MEM) et le Milieu Aigle de culture modifié de Dubelco à Glucose Élevé (DMEM-HG) sont de Gibco (InVitrogen corp, NY) Le Milieu Essentiel de culture pour les cellules Endothéliales (EBM-2) est de Clonetics. Le facteur de croissance fibroblastique basique (b-FGF) et le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) recombinant sont de R&D Systems (Minneapolis, MN). Les kits d'amplification des gènes MasterAmp et InVitrogen sont de Epicentre (Madison, Wisconsin).

*3.2 Culture cellulaire* : Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) proviennent des fémurs et tibias des souris femelles pesant chacune entre 18 et 22g. Ces cellules ont été cultivées dans du DMEM-HG supplémenté de 10% FBS inactivé, et 100 U/mL de pénicilline et 100mg/mL streptomycine dans une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub>, à 37°C. Les MSC ont été propagés jusqu'au

passage 11 et ont été utilisés pour des expériences aux passages entre 3 et 11. Les cellules de glioblastome U87 sont d'origine humaine et ont été maintenues dans du MEM contenant 10% FBS, 2mM glutamine, 100 U/mL pénicilline, et 100mg/mL streptomycine dans une atmosphère humidifiée avec 5%CO<sub>2</sub>, à 37°C. Les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) ont été maintenues dans du EBM-2 additionnée de 10% FBS inactivé, 40mg/mL ECGS, 90mg/mL héparine, 100 U/mL pénicilline, et 100mg/mL streptomycine dans une atmosphère humidifiée avec 5%CO<sub>2</sub>, à 37°C. Les HUVECs ont été propagées jusqu'au passage 7, et ont été utilisées à des passages entre 3 et 6.

*3.3 Scénario d'hypoxie* : Les cellules U87 et les MSCs à 80% de confluence ont été maintenues dans du MEM et du DMEM sans sérum respectivement et soumis à une condition de normoxie dans un atmosphère de 95% air et 5% CO<sub>2</sub>, et une condition d'hypoxie dans une atmosphère de 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> et 1% O<sub>2</sub> pendant 24 et 48h. Des échantillons de milieu conditionné ont été prélevés aux temps 2, 4, 8, 24, 32 et 48h pour des analyses. Les cellules ont été récoltées après 24h et 48h pour des analyses.

*3.4 Traitement des HUVEC aux agents anti-angiogéniques et à l'irradiation* : Les cellules HUVEC à 70% de confluence ont été traitées avec ou sans 5µM EGC, 5µM EGCg, 0.2X Néovastat, 5µg/mL Thalidomide, et 20µM Ilomastat dans du EBM-2 sans sérum pendant 7-8 h ensuite elles ont été irradiées aux rayons Gamma avec un accélérateur de photons linéaire Elekta SL75 de 6MV, à des doses de 1, 3, 10, et 30 ± 7% Gy. Les cellules ont été par la suite maintenues dans du EBM-2 avec 0.5% de FBS inactivé, et incubées jusqu'au lendemain à 37°C.

*3.5 Migration cellulaire* : Les MSC et les HUVECs ont été décollées par trypsinisation et ultimement resuspendues dans du DMEM et du EBM-2 sans sérum respectivement à une concentrations de 10<sup>6</sup> cellules / mL. 10<sup>5</sup> cellules ont étéensemencées sur la surface supérieure des filtres chimiotactiques contenant des pores de 8µm de diamètre, laminés de gélatine / PBS 0.15% dans des chambres de Boyden de Costar (Amherst, MA). 600µL de DMEM et de EBM-2 avec ou sans substances chimioattractant ou inhibitrices à tester, et ajoutées au dessous des chambres de Boyden. Les MSC ont migré pendant 4h à une condition de normoxie dans un atmosphère de 95% air et 5% CO<sub>2</sub>, ou une condition d'hypoxie dans une atmosphère de 94% N<sub>2</sub>,

5% CO<sub>2</sub> et 1% O<sub>2</sub> à 37°C. Les HUVECs ont migré pendant 4h à une condition de normoxie dans une atmosphère de 95% air et 5% CO<sub>2</sub>, à 37°C. Ces cellules ont été par la suite fixées avec de la formaldéhyde dilué à 3.7% dans PBS 1X, colorées avec du cristal violet dilué à 0.1% dans du Méthanol 20% / H<sub>2</sub>O. Les cellules restantes dans la partie supérieure des membranes ont été enlevées avec des cure-oreilles et comptées par microscope. Un compte moyen de cellules / champ a été calculé à partir de quatre comptes indépendants pour chacun des filtres. Les données sont représentatives d'une moyenne de quatre comptes chaque pour trois expériences indépendantes pour chaque chambre de Boyden.

*3.6 Essai de tubulogenèse sur matrigel* : Le matrigel, une substance conçue pour reproduire les conditions de la membrane de base contenant des protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, et protéoglycans), des facteurs de croissance et des enzymes protéolytiques, a été décongelé sur glace pour prévenir une solidification prématurée; des aliquots de 50µL ont été mis dans des puits individuels des plaques à 96 puits, et laissés solidifier pendant 2h. Les MSC et les HUVECs ont été décollées et resuspendues dans leur milieu respectif sans sérum comme décrit ci-dessus à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules / mL pour les MSC et 2 x 10<sup>5</sup> cellules / mL pour les HUVECs. 10<sup>5</sup> MSC ont été ajoutées par puits contenant du matrigel solidifié et la tubulogenèse a procédé pendant 18h à une condition de normoxie dans une atmosphère de 95% air et 5% CO<sub>2</sub>, ou une condition d'hypoxie dans une atmosphère de 94%N<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> et 1% O<sub>2</sub> à 37°C. 2 x 10<sup>4</sup> HUVECs ont été ajoutées par puits contenant du matrigel solidifié et la tubulogenèse a procédé pendant 4-5h à une condition de normoxie dans une atmosphère de 95% air et 5% CO<sub>2</sub> à 37°C. Les structures tubulaires formées par les cellules dans chaque puits ont été quantifiées par photographie microscopique de la région au complet, suivi d'une analyse digitale par le logiciel NORTON ECLIPSE. Les données sont représentatives d'une moyenne de trois expériences indépendantes faites en duplicata.

*3.7 Essai d'adhérence* : Le fond des puits dans des plaques à 96 puits a été laminé de fibronectine dilué à diverses concentrations dans du PBS 1X pendant 18h à 4°C, rincé au PBS 1X, bloqué avec 1% BSA dans du PBS 1X pendant 1h à 37°C, relavé au PBS 1X, et conditionné au EBM-2. Les HUVECs traitées et irradiées la veille ont été décollées comme décrit ci-haut et resuspendues ultimement à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules / mL dans du EBM-2 sans sérum, 5

$\times 10^4$  cellules ont été ajoutées dans des puits et l'adhérence a procédé pendant 3h à une atmosphère de 95% air et 5% CO<sub>2</sub> à 37°C. Les cellules décollées faiblement ou non décollées à la fin ont été rincées au milieu froid, et les cellules adhérentes ont été fixées et colorées comme décrit ci-haut. La quantification et l'analyse des résultats ont été faites par colorimétrie dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595nm et avec le logiciel SoftMax. Les données sont représentatives d'une moyenne de trois expériences indépendantes faites en triplicata.

*3.8 Test de prolifération* : Des HUVEC prétraitées et irradiées dans des plaques à 96 puits ont été incubées pendant 4 jours avec du EBM-2 supplémenté de 10% FBS inactivé, 40mg/mL ECGS, 90mg/mL héparine, 100 U/mL pénicilline, et 100mg/mL streptomycine dans une condition de normoxie dans une atmosphère de 95% air et 5% CO<sub>2</sub> à 37°C. Ensuite les vieux milieux de ces cellules ont été aspirés et la prolifération cellulaire a été mesurée par colorimétrie avec des substrat luminescents pour mitochondrie WST-1 dilué 1:10 dans du MEM sans sérum, en cinétique, à une longueur d'onde de 450nm dans un spectrophotomètre à 37°C, et avec le logiciel Softmax. Les données sont représentatives d'une moyenne de trois expériences indépendantes faites en triplicata.

*3.9 Zymographie*: Les milieux conditionnés par les MSCs, récoltés comme mentionné ci dessus ont été utilisés pour quantifier l'activité gélatinolytique des MMPs. Des aliquots de 30µL ont été soumis à l'électrophorèse par gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) à 9% (p / V) contenant de la gélatine à 0.1 mg/mL. Les gels ont été lavés 30 minutes, 2 fois dans du 2.5% Triton X-100 dans de l'eau nano-pure pour enlever le SDS, rincés 5 fois dans de l'eau nano-pure, et trempés dans un tampon contenant 20mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, et 50mM Tris-HCl (pH7.4) pendant 18 heures à 37°C. Ces gels ont été par la suite colorés au Coomassie Brilliant Bleu R-250, décolorés dans une solution de 10% acide acétique et 30% méthanol dans de l'eau nano-pure. L'activité gélatinolytique de chaque MMP dans les échantillons est représentée par des bandes non colorées sur un fond bleu.

*3.10 Dosage de protéines* : Les courbes standards ont été préparées par dilution de BSA à des dilutions entre 0 et 1:50 dans de l'eau nano-pure. Les lysats des MSC et HUVEC ont été dilués 1:500 dans de l'eau nano-pure. Tous les échantillons ont été colorés au réactif BCA pendant 45

minutes à 60°C. Les concentrations de protéines ont été déterminées par colorimétrie (562nm) à l'aide du logiciel Softmax.

*3.11 Essai d'activité caspase-3* : Les HUVECs traitées et irradiées ont été récoltées et lysées avec du tampon Apo-Alert (Clontech, CA) et les surnageants isolés par centrifugation à 16000g pendant 20min. L'activité caspase-3 a été déterminée avec 50µM du Ac-DEVD-AFC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin), un substrat fluorogénique spécifique de la Caspase-3, dilué dans du tampon de réaction contenant 50mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 100mM NaCl, 10% Sucrose, 0.1% 3-(3-cholamidopropyl-dimethylammonio)-1-propanesulfonate, 5mM DTT, et 1mM EDTA. Le largage d'AFC a été quantifié par fluorimétrie en cinétique pendant 30min à 37°C, à une longueur d'onde d'excitation de 400nm et d'émission de 505nm.

*3.12 Immunobuvardage de type Western blot* : Les particules présentes dans les milieux conditionnés par les MSC ont été précipitées par Acide Tri-Chloroacétique (TCA), utilisées à une fraction de 1:5 du volume totale. Les culots qui en résultent ont été suspendus dans un tampon de lyse contenant 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 150mM NaCl, et Tris-HCl (pH 7.4). Les lysats des MSC et HUVEC ont été préparés par suspension des cellules dans un tampon comme mentionné ci-dessus. Des échantillons de milieux conditionnés, précipités et suspendus et de lysats des cellules ont été égalisés à 30µg protéine, et soumis au SDS-PAGE, et transférés sur une membrane PVDF. Les détections des protéines ont été effectuées en incubant les membranes qui les contiennent avec leurs anticorps primaires respectifs pendant 1h à 37°C ou 18h à 4°C, suivi des lavages au tampon TBS-T, une incubation aux anticorps secondaires conjugués à la peroxydase respectifs pendant 1h, des lavages supplémentaires au tampon TBS-T et une exposition des membranes à des substrats chimioluminescents pour les peroxydases. Les spécifications des anticorps ont été effectués dans la partie des anticorps et produits chimiques de cette section.

*3.13 Isolation de l'ARN et amplification de l'ADNc par la méthode Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* : Les ARN des MSC et HUVEC ont été extraits des cellules avec du réactif de Trizol. 1 µg de l'ARN total de chaque échantillon de cellules a été



utilisé pour la production d'une première tire d'ADN complémentaire (cDNA) suivi d'une amplification du gène en question. Pour les ARN extraits des MSC, les amorces de HIF-1 $\alpha$ , MMP-2 et MT1-MMP spécifiques pour la souris, et le kit d'amplification des gènes MasterAmp ont été utilisés pour la détection de ces molécules. Pour les ARN extraits des HUVEC, les amorces pour la MT1-MMP, la tTG, et les intégrines  $\alpha$ V,  $\beta$ 1, et  $\beta$ 3 spécifiques pour les gènes humains, et le kit d'amplification des gènes InVitrogen ont été utilisés.

*3.14 Détection des protéines par FACS :* Les HUVECs ont été lavées deux fois au PBS et resuspendues dans du PBS contenant 2% FBS. Par la suite, les cellules ont été incubées séparément en présence des anticorps Anti-CD29 (intégrine  $\beta$ 1), Anti-CD51 (intégrine  $\alpha$ V), et Anti-CD61 (intégrine  $\beta$ 3) pendant 60 min, aux anticorps anti-souris conjugués à la peroxydase pendant 30min, lavés au PBS deux fois et analysés au FACScalibur (Beckton Dickinson Cytometry System, Mansfield, MA).

*3.15 Traitement statistique des données :* Les données sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes. Le Student's unpaired t-test a été utilisé pour calculer la signifiante des différences entre les données des échantillons traités par rapport au contrôle pour la migration cellulaire, l'essai de tubulogénèse sur matrigel, et le test d'adhérence. Les valeurs inférieures à 0.05 sont considérées comme étant significatives.

## Chapitre 4

### **RÉSULTATS (Articles)**

Hypoxia promotes murine bone marrow-derived stromal cell migration and tube formation

Publié dans le journal STEM CELLS volume 21, numéro 3

Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate

Accepté pour publication dans le journal  
CANCER BIOLOGY AND THERAPY

## **Hypoxia promotes murine bone marrow-derived stromal cell migration and tube formation**

Borhane Annabi<sup>1</sup>, Ying-Ta Lee<sup>1</sup>, Sandra Turcotte<sup>1</sup>, Emmanuelle Naud<sup>1</sup>, Richard R. Desrosiers<sup>1</sup>, Nicoletta Eliopoulos<sup>2</sup>, Jacques Galipeau<sup>2</sup> and Richard Béliveau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine and Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada, and*


<sup>2</sup>*Department of Medicine, Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Quebec, Canada*

*Correspondence* : Richard Béliveau, Ph.D., Laboratoire de Médecine Moléculaire, Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 3175 Chemin Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5. Telephone: (514) 345-2366 ; FAX: (514) 987-0246; e-mail: oncomol@nobel.si.uqam.ca

*Acknowledgments* : This work was supported by grants from the Fondation Charles-Bruneau. B.A. holds a CIHR-Canada Research Chair in Molecular Oncology.

*Key words* : Angiogenesis / hypoxia / murine marrow stromal cells / cell migration / matrix metalloproteinase

*The abbreviations used are* : ECM, extracellular matrix; Egr-1, early growth response-1; b-FGF, basic fibroblast growth factor; HIF-1, hypoxia-induced factor-1; MMP, matrix metalloproteinase; MSC, bone marrow-derived stromal cells; MT-MMP, membrane-type matrix



metalloproteinase, RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SIP, sphingosine-1-phosphate; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; VEGF, vascular endothelial growth factor

## ABSTRACT

Recent evidence indicate that bone marrow-derived stromal cells (MSC) are able to acquire a histology coherent with endothelial cells that may enable them to contribute to tumour angiogenesis through yet undefined mechanisms. In this work, we investigated the angiogenic properties of murine MSC involved in extracellular matrix degradation and in neo-vascularization that could take place in a hypoxic environment such as that encountered in tumour masses. MSC were cultured in normoxia (95% air and 5% CO<sub>2</sub>) or in hypoxia (1% oxygen, 5% CO<sub>2</sub>, and 94% nitrogen). We found that hypoxic culture conditions rapidly induced MSC migration and three-dimensional capillary-like structure formation on Matrigel. *In vitro*, MSC migration was induced by growth factors- and cytokines-enriched conditioned media isolated from U-87 glioma cells as well as from MSC cultured in hypoxic conditions suggesting both paracrine and autocrine regulatory mechanisms. Although increased VEGF levels were secreted by MSC in hypoxic conditions, this growth factor could not alone explain their increased migration. Interestingly, matrix metalloproteinase (MMP)-2 mRNA expression and protein secretion were down-regulated, while those of membrane-type (MT)1-MMP were strongly induced by hypoxia. Functional inhibition of MT1-MMP by a blocking antibody strongly suppressed MSC ability to migrate and generate capillary-like structures. Collectively, these data suggest that MSC may have the capacity to participate into tumour angiogenesis through regulation of their angiogenic properties under an atmosphere of reduced oxygen that closely approximates the tumour microenvironment.

## INTRODUCTION

Bone marrow-derived stromal cells (MSC) are a population of pluripotent adherent cells residing within the bone marrow microenvironment and frequently referred to as mesenchymal stem cells due to their ability to differentiate into many mesenchymal phenotypes [1]. In contrast to their hematopoietic counterparts, MSC demonstrate strikingly enhanced ability to adhere to tissue-culture surfaces and to differentiate in culture into cells of the osteogenic, chondrogenic, tendonogenic, adipogenic, and myogenic lineages [2]. In their undifferentiated state, MSC do not express hematopoietic or endothelial cell surface markers such as CD11, CD14, CD31, CD34 and CD45 [3]. Intriguingly, recent work has, however, shown that altering culture conditions could render these CD34-negative cells capable of differentiating into endothelial cells, and this further highlights the potential role of MSC in neo-vascularization [3, 4]. All these attributes thus make the MSC an interesting cell phenotype to investigate in light of their recently reported potential to differentiate into mesoderm-derived endothelial cells [5], and of their ability to transdifferentiate *in vivo* into CD31<sup>+</sup> endothelial cells [6, 7].

The possible involvement of human MSC in neo-vascularization was recently proposed by their capacity to contribute to tumour angiogenesis *in vivo* [8]. In addition, bone marrow-derived MSC also exhibited selective interaction towards epithelial tumour cells [9], and implication in growth and survival of myeloma plasma cells was also recently reported and attributed to MSC [10]. Consequently, a potential role of MSC in response to tumour angiogenic factors may thus impact on tumour cell growth. Whether MSC angiogenic properties enable these cells to participate in extracellular matrix (ECM) proteolysis in order to migrate, proliferate, and form capillary-like structures either within or at distal sites of the bone marrow

environment remains however to be evaluated. In the present study, we investigated critical molecular mechanisms regulating the phenotypical and functional properties of MSC that further define their role in neo-vascularization and in microvascular network remodeling.

The molecular regulation of ECM proteolysis that occurs during angiogenesis and of MSC migration/invasion properties is largely accomplished through the action of the soluble and membrane-bound matrix metalloproteinases (MMPs) [11, 12]. More recently, the contribution of soluble MMPs supplied by bone marrow-derived cells was documented in response to several growth factors, cytokines, and chemokines [13, 14], and their contribution to skin carcinogenesis recognized [15]. In light of these published data, one can thus predict a critical role for MMPs in support to MSC cell-cell and cell-matrix interactions that would be required for tumour neo-vascularization. Although much emphasis was given to the role of soluble secreted MMPs, the precise role and regulation of the membrane-type MMPs at the cell surface of MSC in neo-vascularization have however been largely underscored. Of particular interest, targeted disruption of the membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) gene in mice resulted in disorders in connective tissue growth [16], illustrating MT1-MMP's pivotal role in stromal remodeling and during cellular growth and differentiation processes involved in development.

Hypoxia alters fundamental and physiologically important intracellular pathways, and has long been recognized as a stimulus for tumour angiogenesis [17]. Recent evidence demonstrated that long term cultures of MSC under an atmosphere of reduced oxygen, that closely approximates documented *in vivo* oxygen tension, enabled these cells to optimally proliferate and differentiate [18]. More recently, a three-dimensional *in vivo* model was used where MSC

were resuspended in Matrigel and the plugs implanted subcutaneously in isogenic mice recipients. At 2 weeks post-implantation, Matrigel plugs were removed and MSC demonstrated to possess functional vascular plasticity and to transdifferentiate into CD31 endothelial cells possibly due to the reduced oxygen tension of Matrigel implants [7]. In this paper, we investigated the effects of a low oxygen tension on the ability of MSC to exhibit angiogenic-like properties and characterized some molecular players involved in these processes. Our data indicate that (i) MSC migration and capillary-like structure formation are rapidly induced by growth factors-mediated regulation in hypoxic culture conditions, that (ii) increased MSC migratory potential can however not be solely attributed to VEGF, and that (iii) MT1-MMP plays a key role, independent of proMMP-2 activation, in MSC three-dimensional capillary-like structure formation. These observations provide molecular and cellular rationales to MSC potential involvement at sites of active microvascular network remodeling possibly in response to tumour angiogenic factors.



## MATERIALS AND METHODS

*Antibodies and Chemicals* : The following materials were purchased from the indicated sources : Anti-TIMP-2 polyclonal antibody (AB801), anti-MMP-2 monoclonal antibody (MAB3308), anti-MT1-MMP catalytic domain monoclonal antibody (AB8102), anti-MT1-MMP raised against the hinge domain (AB815), and the enhanced chemiluminescence (ECL)-Western blot kit were from Chemicon (Temecula, CA). Anti-VEGF polyclonal antibody (SC-507) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories; polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were from Boehringer Mannheim; all products for electrophoresis and zymography were bought from Bio-Rad; TriZOL reagent, trypsin, penicillin and streptomycin were from GIBCO BRL; fetal bovine serum (FBS) was from HyClone Laboratories; agarose, gelatin, sodium dodecyl sulfate (SDS), sphingosine-1-phosphate (S1P), and Triton X-100 were from Sigma (St-Louis, MO). Matrigel was from Becton Dickinson Labware (Bedford, MA), b-FGF and human recombinant VEGF were from R&D Systems (Minneapolis, MN).

*Cell culture and experimental hypoxic conditions* : The human U-87 glioblastoma cell line was purchased from American Tissue Culture Collection and maintained in modified Eagle's medium (MEM) containing 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and were cultured under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Bone marrow-derived stromal cells (MSC) were isolated from mouse bone marrow and cultured as follows. Whole bone marrow was harvested from the femurs and tibias of 18-22g female C57Bl/6 mice (Charles River, Laprairie Co., QC) sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation. Cells were plated in high

glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 50 units/ml Penicillin/Streptomycin. After 5-7 days of incubation in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, the nonadherent hematopoietic cells were discarded. The adherent MSC were further maintained in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in the absence of any exogenous growth factor or anchoring materials such as fibronectin or collagen. MSC were kept subconfluent and expanded in number over 14 passages by a 1:2 split on a weekly basis. Our culture expanded murine MSC were CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, and CD45<sup>-</sup> *in vitro* as assessed by immunohistochemistry (data not shown), consistent with other reports [19, 20, 21]. Culture-expanded MSC were trypsinized and subsequently stained with the following monoclonal antibodies (Abs): phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD44 (clone IM7), anti-CD45 (clone 30-F11), anti-Flk1 (clone Avas12a1). Biotinylated anti-CD31 (clone 390), anti-CD34 (clone RAM34), all from BD Biosciences (San Diego, CA). Biotinylated anti-Flt4 (clone AFL4), anti-Tie2 (clone Tek 4) from EBioscience (San Diego, CA). Biotinylated Abs were revealed by CyChrome streptavidin (BD Biosciences). PE-labeled or biotinylated rat isotypic control immunoglobulins were from BD Biosciences. Events were acquired on a Coulter EPICS flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA) and analyzed by means of Win MDI 2.7 software. *In vitro* culture-expanded adherent MSC were uniformly fibroblast-like in appearance. 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). Progeny derived from this population were utilized for all subsequent analysis. Hypoxic conditions were attained by incubation of confluent cells in an anaerobic box. The oxygen was maintained at 1% by a compact gas oxygen controller Proox model 110 (Reming

Bioinstruments Co., Redfield, NY) with a residual gas mixture composed of 94% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>.

*Cell migration/invasion assay* : Cells were dislodged after brief trypsinization and dispersed into homogeneous single cell suspensions that were washed extensively and resuspended in DMEM to a concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml. To assess migration from established monolayers, cells (10<sup>5</sup>) were dispersed onto 0.15% gelatin/PBS-coated chemotaxis filters (Costar; 8- $\mu$ m pore size) within Boyden chamber inserts and allowed to adhere for 1 h at 37°C, after which they were challenged by the addition of 600  $\mu$ l of a chemoattractant solution composed of conditioned media isolated from the indicated serum-deprived cell lines to the lower compartments. Migration was allowed to proceed for 4 h at 37°C in either 5% CO<sub>2</sub>/95% air (normoxia), or 1% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/94% N<sub>2</sub> (hypoxia). Cells remaining attached to the upper surface of the filters were carefully removed with a cotton swab. Cells that had migrated to the lower surface of the filters were fixed with 3.7% formaldehyde, stained with 0.1% crystal violet/20% MeOH, and counted by microscopic examination. The average number of migrating cells per field was assessed by counting at least four random fields per filter. Data points indicate the mean obtained from three separate chambers within one representative experiment.

*Capillary-like structure formation assay* : Induction of tubulogenesis was performed using Matrigel [22]. Matrigel was thawed on ice to prevent premature polymerization; aliquots of 50  $\mu$ l were plated into individual wells of 96-well tissue culture plates (Costar, Amherst, MA) and allowed to polymerize at 37°C for at least 60 min. Cells were removed from confluent cultures by treatment with Trypsin 0.05%-EDTA 0.53mM. The cells were washed in serum-

containing medium, then resuspended to  $10^6$  cells/ml. Into each culture well was added 100  $\mu$ l cell suspension with or without additional test substances. Each dose of control or test compound 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 digitalized and measured using the ECLIPSE-software. For each test, five randomly chosen areas were measured and averaged.

*Total RNA Isolation and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

*analysis* : Total RNA was extracted from cultured MSC using the TriZOL reagent. One microgram of total RNA was used for first strand cDNA synthesis followed by specific gene product amplification with the MasterAmp One Tube RT-PCR Kit (Epicentre, WI, USA). Primers for HIF-1 $\alpha$ , MMP-2, and MT1-MMP were all derived from mouse sequences, and PCR conditions have been optimized so that the gene products were found to be at the exponential phase of the amplification.  $\beta$ -Actin was used as an internal control and was found to be constant between all tested conditions. PCR products were resolved on 2% agarose gels containing 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide.

*Gelatin Zymography* : Gelatinolytic activity in culture media from monolayer cultures was detected by gelatin zymography as described previously [23]. Briefly, an aliquot (30  $\mu$ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE using a 9% (w/v) acrylamide gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated 30 min at room temperature twice in 2.5% Triton X-100 to remove SDS and rinsed 5 times in ddH<sub>2</sub>O. The gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then

stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250, and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H<sub>2</sub>O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

*Western Blot Analysis* : The preparation of whole cell lysates was performed by resuspending the cells in a buffer containing 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 150 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl pH 7.4. Cell lysates (30 µg/well) or aliquots of culture media were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to PVDF membranes. Immunoblotting procedures were performed as previously described in detail [23]. PVDF membranes were incubated with primary antibody, washed, and incubated with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. Bound IgG were detected using a chemiluminescent substrate. Immunoreactive bands were quantified by densitometric measurement using a Personal Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

*Statistical data analysis* : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test and was used to compare migration and extent of capillary-like structure formation to untreated control basal migration or spontaneous MSC tube-formation. Probability values of less than 0.05 were considered significant, and an asterisk (\*) identifies such significance in each figure.

## RESULTS

*Reduced oxygen tension rapidly induces MSC migration and capillary-like structure formation.* We first tested for the effect of hypoxia on MSC capacity to manifest angiogenic features. MSC were cultured under either normoxic (5% CO<sub>2</sub>/95% air) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/94% N<sub>2</sub>) conditions for 4 hours. *In vitro* migration of MSC was assessed using gelatin-coated filters and found to be induced by more than 4-fold (normoxia : 132 ± 9 cells/field; hypoxia : 571 ± 20 cells/field) when cell migration proceeded under reduced oxygen tension conditions (Fig.1, upper panels). When cells were plated onto a 3D-Matrigel basement membrane model that closely mimics the structure, composition, physical properties, and functional characteristics of the basement membrane *in vivo* [24], and incubated under hypoxic conditions, three-dimensional capillary-like structure formation was also found to be rapidly induced (Fig.1, lower panels).

*Hypoxia down-regulates proMMP-2 expression and secretion from MSC.* ECM proteolysis is an essential step in the angiogenic process that requires MMPs activation. Confluent MSC were thus serum-deprived and cultured in normal and hypoxic conditions to monitor the effect on soluble MMP secretion. Gelatin zymography was performed and the hydrolytic activity of MMP-2 assessed (Fig.2). Intriguingly, hypoxic culture conditions resulted in a marked time-dependent decrease in the secreted latent proMMP-2 gelatinolytic activity (Fig.2a). Using Western blotting and immunodetection with a specific anti-MMP-2 antibody, this diminished activity was further correlated with a ~40% decrease in extracellular proMMP-2 protein levels compared to normoxia (Fig.2b). Since MSC proliferation rate was not affected by

these short term incubation conditions (not shown), one can thus hypothesize that hypoxia either decreased MMP-2 gene expression, protein synthesis rate, or affected vesicular trafficking components responsible for proMMP-2 secretion.

*Hypoxia promotes the expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and of angiogenesis related markers in MSC.* In order to assess hypoxia-induced modulations of gene expression levels, total RNA was isolated from MSC cultured under normal and hypoxic conditions and RT-PCR used to amplify cDNA from both MMP-2 and that of its known cell surface activator membrane-type 1 (MT1-) MMP. Results in Fig.3 show that under normoxia MMP-2 gene expression was stable after 24 hours of serum-deprivation (MSC were cultured in high glucose-DMEM without addition of 10% FBS) but started to decline at 48 hours. In accordance with the zymography and Western blot data in Fig.2, hypoxia also down-regulated MMP-2 gene expression while that of  $\beta$ -actin remained unaffected. Interestingly, these MMP-2 modulations were also recently reported in hypoxic differentiated endothelial cells [25] further strengthening the potential common endothelial-like phenotype that may characterize MSC.

In contrast to MMP-2, MT1-MMP gene expression was strikingly increased when MSC were exposed to hypoxic conditions, and maximal induction was already observed after as soon as 24 hours of incubation (Fig.3). Longer (48 hrs) serum-deprivation of MSC resulted in increased MT1-MMP gene expression that was at that point comparable whether cells were cultured in normal or hypoxic culture conditions. Hypoxia-induced MT1-MMP gene expression was also further correlated with increased levels of MT1-MMP protein levels as assessed by Western blotting in cell lysates (Fig.4a). This is demonstrated by an increase in the respective 63

kDa pro- (corresponding to the recombinant MT1-MMP protein isolated from transfected COS-7 cells [26]), and 60 kDa active-forms of MT1-MMP. Interestingly, the intracellular protein expression of early growth response-1 (Egr-1), a transcription factor known to tightly regulate MT1-MMP gene expression, was also found to be increased in response to hypoxia (Fig.4a).

Many other genes involved in cellular differentiation can also be directly or indirectly regulated by hypoxia in MSC. While hypoxic conditions decreased the secretion of proMMP-2 into the extracellular media (Fig.2 and Fig.4b), that of its inhibitor TIMP-2 was found to be unaffected (Fig.4b). This, indeed, contrasted with that of vascular endothelial growth factor (VEGF) that was highly expressed and secreted by MSC cultured under hypoxic conditions up to 48 hrs (Fig.4b). VEGF protein up-regulation was correlated with a sustained gene expression of hypoxia-induced factor-1 (HIF-1 $\alpha$ ) for up to 48 hrs (not shown).

*Growth factors-dependent autocrine regulation of MSC migration.* Besides VEGF secretion, other growth factors could be secreted by MSC under hypoxia. To investigate the effect of hypoxia-secreted growth factors on cell migration, conditioned media was isolated from serum-starved MSC cultured under either normal or hypoxic conditions. These respective media would very likely contain a mixture of growth factors that may up- or down-regulate the basal migratory potential of MSC. When MSC were allowed to migrate in modified Boyden chambers under normoxia for 4 hrs, their migration was strongly induced by serum (Fig.5). When cell migration was assessed in the presence of conditioned media isolated from serum-deprived MSC added to the lower compartment of the Boyden chambers, migratory activity gradually enhanced from 24 hrs to 48 hrs. Interestingly, conditioned media isolated from serum-deprived MSC



cultured in hypoxic conditions induced cell migration to levels comparable to those obtained with serum. An approximately 4-fold increase was seen at 24 hrs, but similar levels were obtained when conditioned media was isolated at 48 hrs hypoxia compared to normoxia (Fig.5). Equivalent induction of MSC migration was also observed when conditioned media was isolated from serum-deprived U-87 glioma cells, a highly vascularized tumour derived cell line, cultured in normal and hypoxic conditions (not shown). Together, these results suggest that both autocrine and paracrine regulation of MSC migration may take place.

Serum contains several polypeptide growth factors that regulate cell motility [27]. We thus decided to assess the effect of the two major angiogenic growth factors VEGF and basic fibroblast growth factor (b-FGF), or a combination of both growth factors on MSC migration. While these two growth factors are known to induce differentiated endothelial cell migration [28], we observed that maximal VEGF concentrations (50 ng/ml) only induced a marginal increase in MSC migration in agreement with previous reports where expression of the VEGF receptor Flk1 was very low [8]. In contrast, b-FGF (10 ng/ml) alone (Fig.6a) or in combination with VEGF (not shown) markedly induced MSC migration. Interestingly, VEGF- or b-FGF-induced MSC migration were however much lower than that induced by serum itself or by sphingosine-1-phosphate (S-1-P) (Fig.6b), a bioactive lysophospholipid that is released from platelets, macrophages and epithelial cells, and that triggers invasion of primitive hematopoietic cells [29], suggesting that other alternative growth factors or cytokines are needed. Furthermore, MSC migration was also assessed in normoxic and hypoxic conditions in the presence of a blocking antibody directed against the MT1-MMP catalytic domain. As shown in Fig.6c, MT1-MMP-dependent MSC migration is shown to be effectively antagonized by the blocking MT1-

MMP antibody whether migration proceeds in normal or low oxygen tension environment. This suggests that MT1-MMP can contribute to MSC migration.

*MSC capillary-like structure formation is mediated by functional MT1-MMP.* We herein report that MSC spontaneously generate three-dimensional capillary-like structures, and that this capability is stimulated by hypoxia (Fig.1). While MMP-2 and MT1-MMP expression is regulated in MSC by hypoxia, we decided to examine the extent of implication of these MMPs in the formation of such structures under basal and hypoxic conditions. MSC were plated onto Matrigel and overlaying culture media replaced by fresh serum-free media containing respectively anti-mouse IgG (control), anti-MT1-MMP monoclonal antibody directed against the catalytic domain, anti-MT1-MMP polyclonal antibody raised against the non-catalytic hinge domain, 10  $\mu$ M Marimastat, a non specific MMP inhibitor reported to tightly bind the recombinant catalytic domain of MT1-MMP [30, 31], or 25  $\mu$ M EGCg a green tea catechin known to specifically affect MT1-MMP-driven cell migration and gene expression [32]. The results shown in Fig.7a clearly demonstrate that MSC's ability to form capillary-like structures was antagonized or strongly diminished when MT1-MMP catalytic domain was inhibited either through the action of an antibody directed towards its functional extracellular catalytic domain, or through the action of agents known to inhibit MMP hydrolytic activity such as Marimastat or EGCg. Quantification of the MSC capillary-like structure networking revealed a 75% decrease when MT1-MMP activity was inhibited or complexed by the antibody, and a 40% inhibition by Marimastat, while it was almost completely inhibited by EGCg (Fig.7b). The rapid formation of MSC capillary-like structures under hypoxic conditions (Fig.1) was similarly antagonized with the anti-MT1-MMP catalytic antibody (not shown). In addition, we provide evidence that the

catalytic function of MT1-MMP involved in the processing of latent proMMP-2 into its active form is also affected by the anti-MT1-MMP catalytic antibody in a cell-based system. Recombinant MT1-MMP was overexpressed in COS-7 cells as previously reported [32] and shown to convert an exogenous source of latent proMMP-2 into active MMP-2 (Fig.7c). This reaction was specifically antagonized by Marimastat, EGCg, and anti-MT1-MMP catalytic antibody, but not by EGC or anti-MT1-MMP antibody directed against the hinge region. These observations further validate the involvement of MT1-MMP catalytic activity in both proMMP-2 activation and capillary-like structure formation by MSC. Inhibition of MSC-secreted soluble MMP-2 was not assessed for two main reasons as *i)* no specific anti-MMP-2 antibody raised against its catalytic domain was commercially available, and *ii)* because of the high levels of Matrigel-derived endogenous MMP-2 that would have saturated the antibody and thus interfered with secreted MMP-2 attributable to MSC [24]. Collectively, our observations thus indicate that the up-regulation of MT1-MMP observed under hypoxia may be essential to elicit the formation of capillary-like structures and consequently to angiogenic properties of MSC.

## DISCUSSION

The recently reported phenotypical plasticity of bone marrow-derived stromal cells (MSC) into endothelial-like cells provides a rationale towards their potential role in neo-vascularization and in microvascular network remodelling [4, 5]. Moreover, We have recently shown that our *in vitro* cultured MSC retained their progenitor cell potential *in vivo*. Specifically, when CD31<sup>-</sup> MSC were mixed either with Matrigel then implanted subcutaneously (s.c.), or co-injected s.c. with U-87 glioblastoma cells in nude mice, they demonstrated in both experimental approaches the plasticity to differentiate into CD31<sup>+</sup> endothelial cells [6, 7, 33]. Interestingly, these processes were recently shown to be modulated in response to tumour angiogenic factors [8]. Molecular and cellular understanding of MSC behaviour thus need to be promptly resolved before these cells can be used for safe and effective clinical application. In the present study, we focused on molecular events that regulate MSC migration and tube formation under hypoxia which are essential events involved in angiogenesis. In this matter, we suggest that MSC are able to participate in the production of vessels through their ability to migrate and to generate capillary-like structures, and that these angiogenic properties are modulated through growth factors-mediated paracrine regulation.

Under hypoxic conditions, the major transcription factor affecting gene regulation is HIF-1 [34]. This transcription factor in turn up-regulates expression of several genes involved in angiogenesis such as growth factors b-FGF, VEGF, and that of VEGF receptors Flk-1 and Flt-1, as well as components of plasminogen system including the urokinase receptor, and the inhibition of plasminogen activator 1 [34, 35]. Furthermore, other transcription factors activated

by hypoxia interestingly include Egr-1, which regulates MT1-MMP transcription [36, 37]. In the present study, we blocked the MSC ability to generate tube formation using an antibody directed against the extracellular MT1-MMP catalytic domain. This suggests that MT1-MMP is a crucial protease for MSC in the process of tube formation. Indeed, this is supported by previous reports where the blocking of MMPs activity in both *in vitro* and *in vivo* models resulted in inhibition of angiogenesis [38]. In particular, the membrane-type MMPs (MT-1, -2, -3, -4, -5, -6 MMPs) are tethered to the plasma membrane [26], and such localization is known to enable pericellular proteolysis associated with cell migration, proliferation, and capillary tube formation required for neovascularization [39]. Interestingly, we and others have observed that MT1-MMP overexpression triggered cell migration [40], and was activated in endothelial cells where increased cell motility, matrix remodeling, and formation of capillary tubes was also reported [41]. Furthermore, MT1-MMP was recently shown to cleave CD44, one of the cell adhesion molecules expressed at the cell surface of MSC, and to promote cell migration [42]. Of interest is the fact that the multifactorial agents used in the present study, such as Marimastat or EGCg, have also been shown to respectively modulate other molecular targets that potentially participate in tubulogenesis. Indeed, hydroxamate-based zinc MMP inhibitors such as Batimastat or Marimastat blocked the activity of members of the “a disintegrin and MMP-like” (ADAM) family [43], while EGCg, not only directly inhibited MT1-MMP activity [44] and MT1-MMP-dependent proMMP-2 activation [32], but also specifically inhibited tubulogenesis in differentiated endothelial cells [45]. We thus propose that MT1-MMP regulation may be a key modulator in the proteolytic and cell migratory angiogenic responses of MSC that are modulated by hypoxic conditions. More specifically, we also provide evidence for MSC ability to generate MT1-MMP-dependent capillary-like structures that may ultimately enable them to contribute to

neo-vascularization. Future studies aimed at demonstrating the roles of other partners in ECM degradation (such as the TIMPs) will certainly give further insight into the mechanisms of MSC capillary-like structure formation on Matrigel. The use of differentiated endothelial cells isolated from MT1-MMP and/or MMP-2-null mice may eventually be correlated and compared to the molecular events involved in tubulogenesis and that we identified in MSC.

While recent emerging views provide evidence that MT1-MMP and VEGF can be functionally linked in angiogenesis [46, 47], compelling data also provide evidence that low hypoxic O<sub>2</sub> levels have the potential to optimize progenitor cell expansion and survival in culture [48] possibly through hypoxia-dependent increase in VEGF expression [49, 50]. Interestingly, our results indicate that hypoxia-induced up-regulation of MT1-MMP in MSC correlates with a stimulation of VEGF production. This may translate *in vivo* by an increase in surrounding endogenous endothelial cell response and eventually in their subsequent recruitment and involvement in tumour vascularization and growth. In support for a role of VEGF in MSC differentiation and involvement in neovascularization is also the fact that human marrow-derived multipotent adult progenitor cells (MAPC), depleted of hematopoietic cells, expressed vWF and markers of mature endothelium (CD31, CD34, CD36, and CD62-P) upon the presence of VEGF in long term cultures [5, 8]. Remarkably, injection of undifferentiated MAPC resulted in human endothelial cells vascularizing a spontaneous murine tumour, indicating that undifferentiated MAPC can respond to local differentiation-inducing cues *in vivo* [8]. Experimentally, it was also shown by the use of neutralizing antibodies that b-FGF, released from intracellular stores of hypoxic endothelial cells was a crucial mediator of this effect [51].

Taken together, our results indicate that hypoxia strongly affects the regulatory pathways of MSC leading to the activation of several molecular and cellular events which result in the formation of conditions favorable to proliferative and ECM remodeling activities. Moreover, these findings support the hypothesis that hypoxia-driven angiogenesis may be a critical condition for ECM formation and remodeling by MSC that would be potentially necessary for successful applications using engineered MSC to deliver therapeutic agents into sites of active or pathological angiogenesis. MSC may thus play an important regulatory role in hypoxic microenvironments such as those found within tumour masses. Future studies involving immunohistochemical analysis of the regulation of MSC surface markers expressed during their differentiation process may offer greater insight into the specific mechanisms mediating and regulating MSC angiogenic properties.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1 : Hypoxic culture conditions rapidly stimulate both MSC migration and their ability to generate capillary-like structures.** MSC were assayed for basal migration in normoxic (5% CO<sub>2</sub>/95% air) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/94% N<sub>2</sub>) conditions as described in the Methods section. In parallel, MSC were also seeded on Matrigel and capillary-like structure formation monitored in normal and hypoxic conditions within a 4 hrs period.

**Fig.2 : Hypoxic culture conditions down-regulate extracellular MMP-2 gelatinolytic activity through diminished protein secretion.** MSC were serum-starved and cultured in normal or hypoxic conditions (see legend of Fig.1) for up to 48 hrs. Aliquots (30 µl) of the conditioned media were assayed for MMP-2 activity by gelatin-zymography (A), or assessed for MMP-2 protein content by Western-blotting (B). A representative densitometric analysis of proMMP-2 protein levels derived from the Western-blots data is shown for normal (open circle) or hypoxic (closed circle) culture conditions.

**Fig.3 : Hypoxia up-regulates MT1-MMP gene expression, but not that of MMP-2.** MSC were cultured in serum-deprived media (high glucose-DMEM without addition of 10% fetal bovine serum) under normal (N) or hypoxic (H) conditions (see legend of Fig.1) for up to 48 hrs. Total RNA was isolated and gene expression levels of MMP-2, MT1-MMP, and actin assessed by RT-PCR using murine primer sequences as described in the Methods section.



**Fig.4 : Hypoxia induced VEGF secretion that correlates with MT1-MMP protein expression.** MSC were serum-starved as described in the legend of Fig.3 for 24 or 48 hrs in normoxic or hypoxic (see legend of Fig.1) culture conditions. Cell lysates (A) were monitored for MT1-MMP (using AB815 antibody; rMT1-MMP protein was isolated from transfected COS-7 cells [40]) and Egr-1 protein expression by Western blotting as described in the Methods section. Conditioned media (B) were assessed for secreted MMP-2 activity by gelatin zymography as well as for MMP-2, and VEGF and TIMP-2 protein levels by immunoblotting.

**Fig.5 : Soluble growth factors are secreted in hypoxic conditions and regulate MSC migration.** Conditioned media was isolated from serum-starved MSC cultured in normal or hypoxic conditions (see legend of Fig.1). MSC were trypsinized and seeded ( $10^5$  cells) on gelatin-coated filters of modified Boyden chambers. Migration was allowed to proceed for 4 hrs under normal conditions in the presence of either serum-free media (-), serum-containing media (+), conditioned media isolated at 24 or 48 hrs from serum-starved MSC that were cultured in normal or hypoxic conditions. Four different fields were counted. \* indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) compared with the control (serum-free conditioned media) using the student's *t*-test.

**Fig.6 : Modulation of MSC migration by growth factors.** Marrow stromal cells (MSC) were trypsinized, seeded ( $10^5$  cells) on gelatin-coated filters and allowed to migrate in normoxia for 4 hrs at 37°C. The lower compartment of the Boyden chamber either contained serum-free media, serum-containing media, or the indicated growth factors (50 ng/ml VEGF, 10 ng/ml b-FGF, 1  $\mu$ M S-1-P) resuspended in serum-free media. A representative staining of the filters is shown in A), and a mean of three independent

experiments is plotted in B). MSC migration on gelatin-coated filters was also assessed in the presence of 1  $\mu\text{g}$  anti-mouse IgG (-) or equivalent amount of an antibody directed against MT1-MMP catalytic domain (+), and was left to proceed in normoxic or hypoxic conditions (C) as described in the Methods section. \* indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) compared with the control (serum-free conditioned media) in normoxic conditions using the student's *t*-test. \*\* indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) compared with the control (serum-free conditioned media) in hypoxic conditions using the student's *t*-test.

**Fig.7 : MSC capillary-like structure formation is mediated by functional MT1-MMP.** Marrow stromal cells (MSC) were trypsinized, seeded ( $10^5$  cells) on Matrigel-coated filters and allowed to adhere for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . Overlaying culture media was then removed and replaced by fresh serum-free media containing 4.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of respectively anti-mouse IgG (control), anti-MT1-MMP monoclonal antibody raised against the catalytic domain, anti-MT1-MMP polyclonal antibody raised against the hinge domain, 10  $\mu\text{M}$  Marimastat, or 25  $\mu\text{M}$  EGCg. Cells were further incubated for 18 h in normal conditions. Capillary-like structures formation (A) was monitored as described in the Methods section, and quantified by measuring the total relative length of the capillary network (B). COS-7 cells were transfected with a cDNA encoding for MT1-MMP [42] and activation of an exogenous source of proMMP-2 was monitored in the presence or not of the indicated agents (C). (-) Mock and (+) MT1-MMP transfected COS-7 cells. \* indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) compared with the control (no test substance added) using the student's *t*-test.

## REFERENCES

- 1 Prockop, DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-74.
- 2 Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 2002; 20:205-214.
- 3 Huss R, Lange C, Weissinger EM et al. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells*. 2000; 18:252-260.
- 4 Tomanek RJ, Schatteman GC. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 2000; 261:126-135.
- 5 Reyes M, Lund T, Lenvik T et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98:2615-2625.
- 6 Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Beauséjour CM et al. Human cytidine deaminase as an ex vivo drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells. *Gene Therapy* 2002; 9:452-462.
- 7 Al-Khaldi A, Eliopoulos N, Martineau D et al. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neo-angiogenic response in vivo. *Gene Therapy* 2002 (in press).
- 8 Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109:337-346.
- 9 Hombauer H, Minguell JJ. Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Cancer* 2000; 82:1290-1296.
- 10 Wallace SR, Oken MM, Lunetta KL et al. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients. *Cancer* 2001; 91:1219-1230.
- 11 Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current Opinions in Cell Biology* 1995; 7:728-735.
- 12 Forget MA, Desrosiers RR, Béliveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77:465-480.
- 13 Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Nabholz JM et al. Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane. *Blood* 1999; 93:3379-3390.

- 14 Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowski A et al. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp Hematol* 2000; 28:1274-1285.
- 15 Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D et al. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; 103:481-490.
- 16 Holmbeck K, Bianco P, Caterina J et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999; 99:81-92.
- 17 Malonne H, Langer I, Kiss R. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17:1-14.
- 18 Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* 2001; 187:345-355.
- 19 Woodbury D, Schwartz EJ, Prockop DJ et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364-370.
- 20 Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ et al. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; 19:219-225.
- 21 Zhao LR, Duan WM, Reyes M et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into ischemic brain of rats. *Experimental Neurology* 2002; 174:11-20.
- 22 Venetsanakos E, Mirza A, Fanton C, et al. Induction of tubulogenesis in telomerase-immortalized human microvascular endothelial cells by glioblastoma cells. *Experimental Cell Research* 2002; 273:21-33.
- 23 Beaulieu E, Kachra Z, Mousseau N et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human pituitary tumors. *Neurosurgery* 1999; 45:1432-1441.
- 24 Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP et al. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Experimental Cell Research* 1992; 202:1-8.
- 25 Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S et al. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res* 2002; 90:784-791.
- 26 Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 1999; 107:137-143.

- 27 Manske M, Bade EG. Growth factor-induced cell migration: biology and methods of analysis. *Int Rev Cytol* 1994; 155:49-96.
- 28 Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis : Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sciences* 2001; 22:201-207.
- 29 Yanai N, Matsui N, Furusawa T et al. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid trigger invasion of primitive hematopoietic cells into stromal cell layers. *Blood* 2000; 96:139-144.
- 30 Toth M, Bernardo MM, Gervasi DC et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem* 2000; 275:41415-41423.
- 31 Bernardo MM, Brown S, Li ZH et al. Design, synthesis, and characterization of potent, slow-binding inhibitors that are selective for gelatinases. *J Biol Chem* 2002; 277:11201-11207.
- 32 Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1542:209-220.
- 33 Annabi B, Naud E, Lee YT et al. Paracrine regulation of bone marrow stromal cells migration and tube formation : Implications in tumor angiogenesis. *J Cell Science* 2002; (submitted)
- 34 Ramirez-Bergeron DL, Simon MC. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells* 2001; 19:279-286.
- 35 Koong AC, Denko NC, Hudson KM et al. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 2000; 60:883-887.
- 36 Yan SF, Lu J, Zou YS et al. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem* 1999; 274:15030-15040.
- 37 Haas TL, Stitelman D, Davis SJ et al. Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem* 1999; 274:22679-22685.
- 38 Langer R, Conn H, Vacanti J et al. Control of tumor growth in animals by infusion of an angiogenesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77:4331-4335.

- 39 Ingber DE, Madri JA, Folkman, JA. Possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology* 1986; 119:1768-1775.
- 40 Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N et al. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochemical J* 2001; 353:547-553.
- 41 Galvez BG, Matias-Roman S, Albar JP et al. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem* 2001; 276:37491-37500.
- 42 Kajita M, Itoh Y, Chiba T et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001; 153:893-904.
- 43 Hooper NM, Trew AJ, Parkin ET et al. The role of proteolysis in Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol* 2000; 477:379-390.
- 44 Dell'Aica I, Dona M, Sartor L, et al. (-)Epigallocatechin-3-Gallate directly inhibits MT1-MMP activity, leading to accumulation of nonactivated MMP-2 at the cell surface. *Lab Invest* 2002; 82:1685-1693.
- 45 Lamy S, Gingras D, Béliveau R. Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res* 2002; 62:381-385.
- 46 Deryugina EI, Soroceanu L, Strongin AY. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62:580-588.
- 47 Sounni NE, Devy L, Hajitou A et al. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J* 2002; 16:555-564.
- 48 Cipolleschi MG, Rovida E, Ivanovic Z et al. The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia* 2000; 14:735-739.
- 49 Ikeda E, Achen MG, Breier G et al. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995; 270:19761-19766.
- 50 Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett* 1995; 370:203-208.

- 51 Kourembanas S, Hannan RL, Faller DV. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1990; 86:670-674.

**Fig.1**

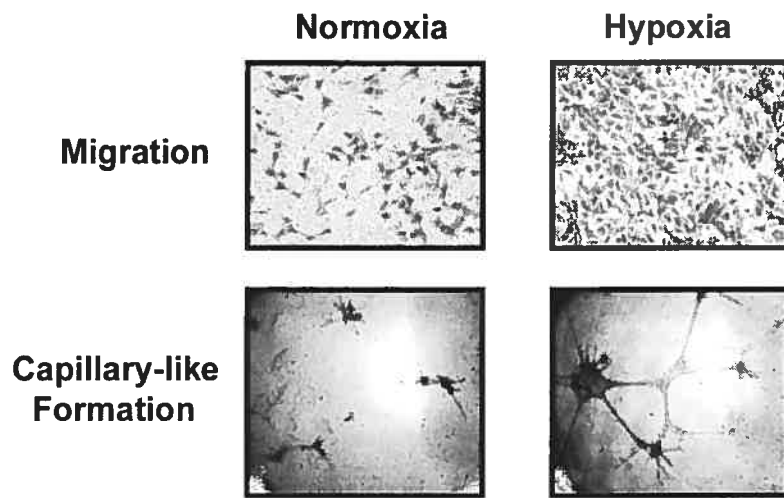
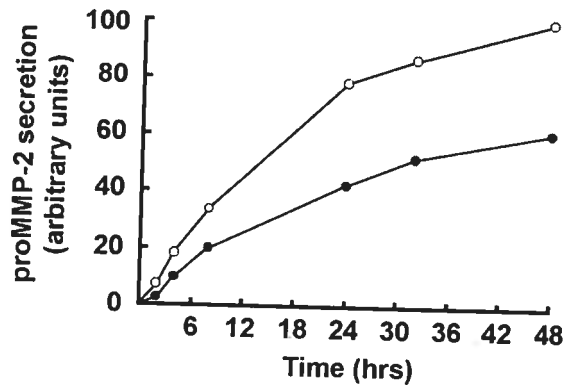
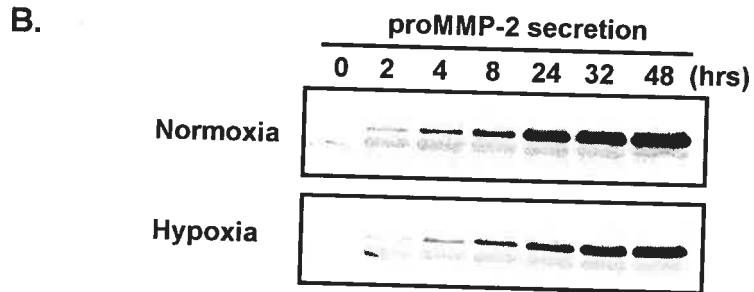
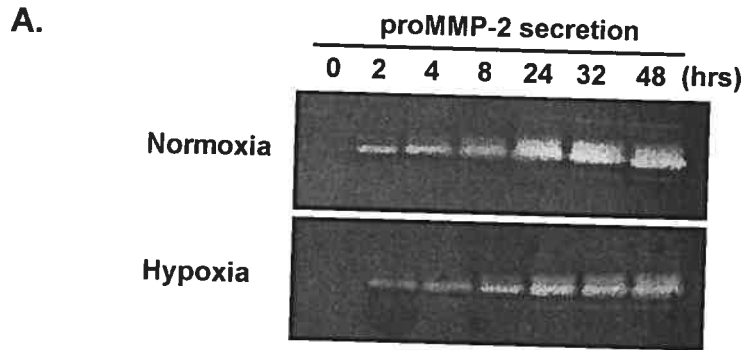
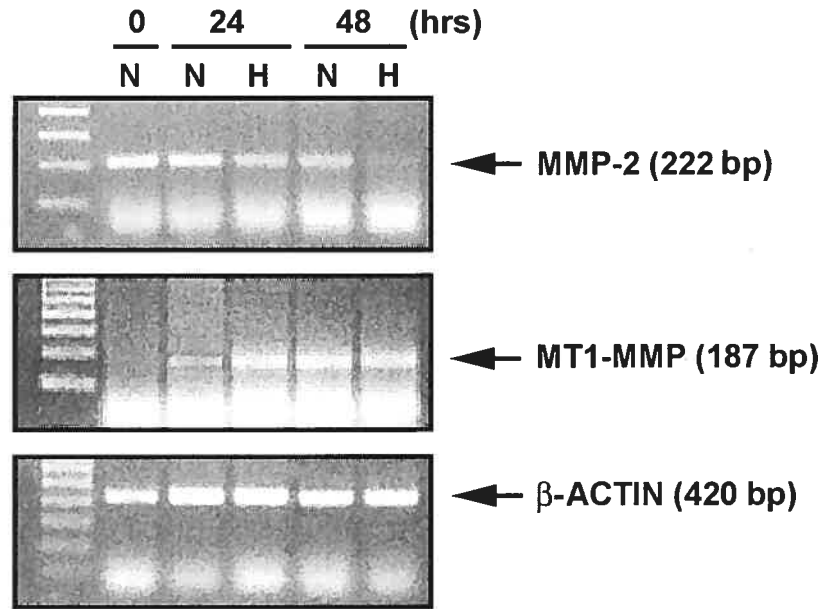




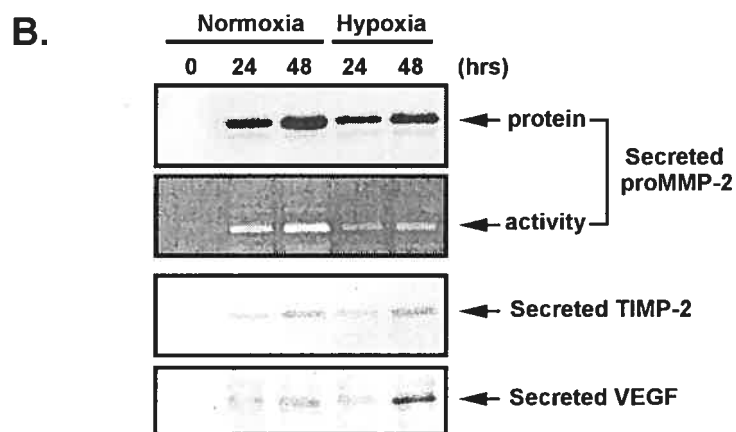
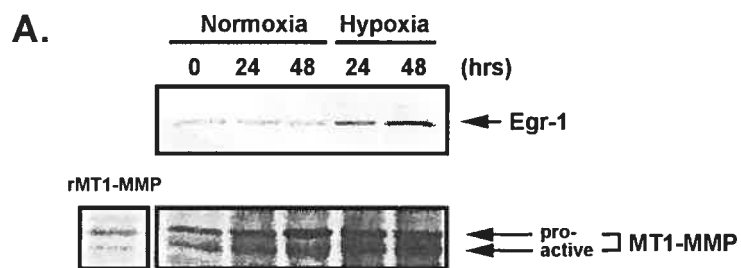
Fig.2



**Fig.3**



**Fig.4**



**Fig.5**

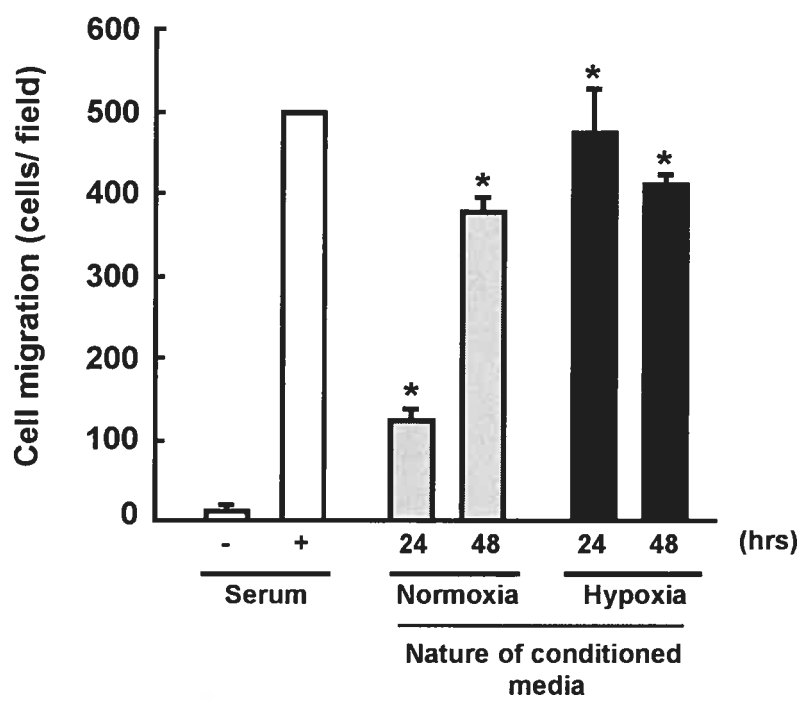
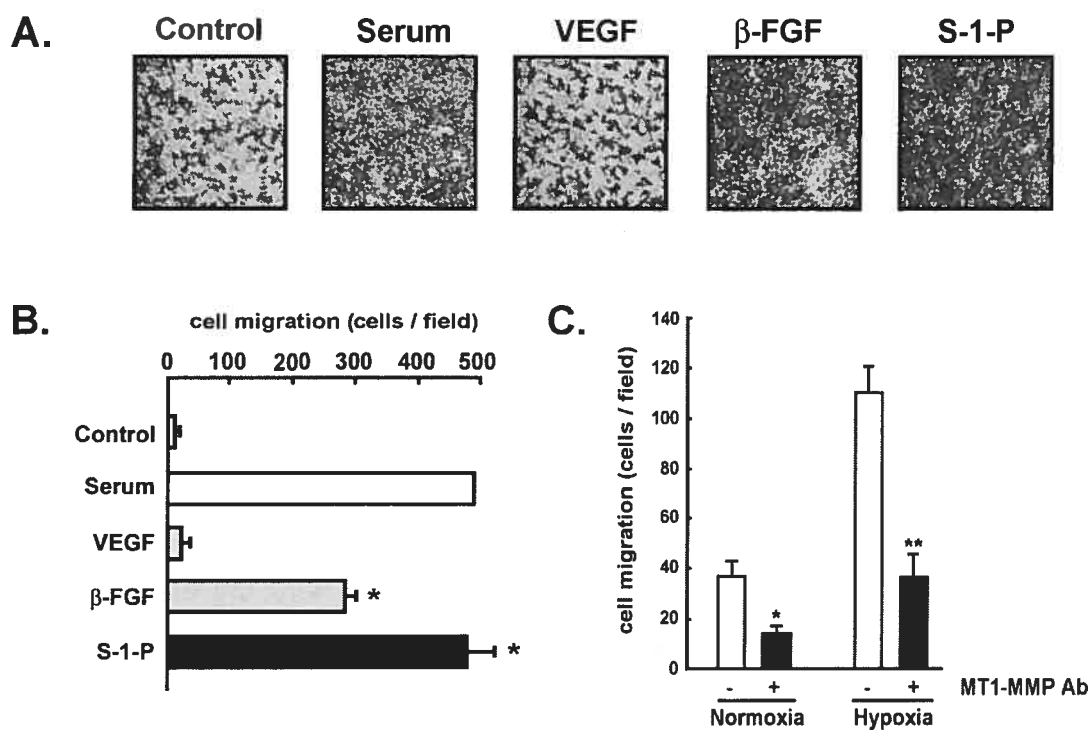
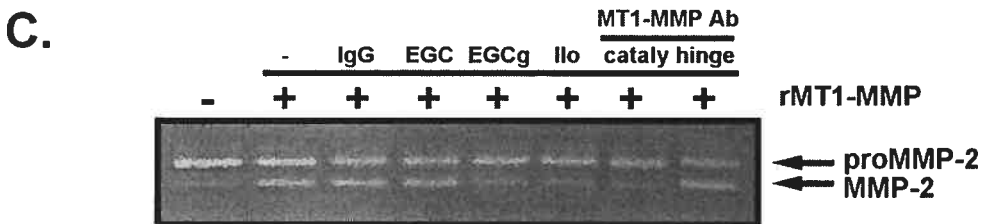
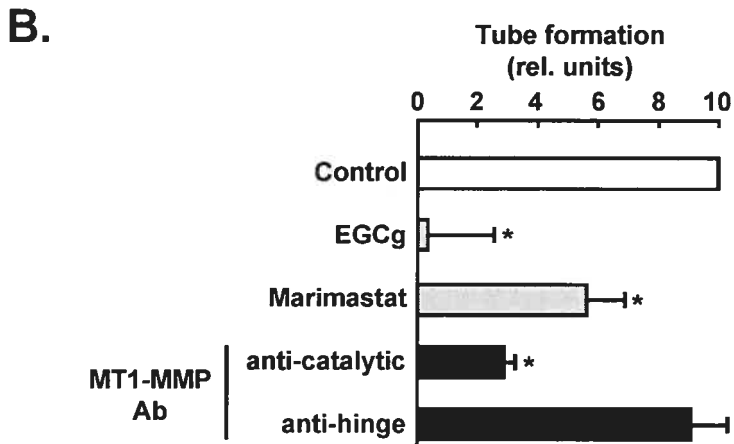
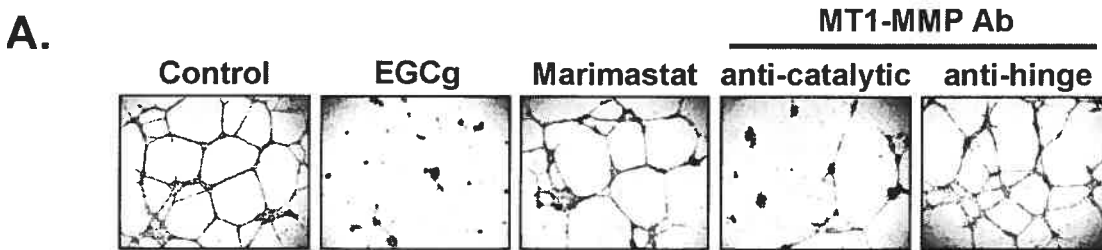


Fig.6



**Fig.7**



**Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate**

Ying-Ta Lee<sup>1¶</sup>, Borhane Annabi<sup>1¶</sup>, Charles Martel<sup>2</sup>, Anthony Pilorget<sup>1</sup>, Jean-Paul Bahary<sup>2</sup> and Richard Béliveau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine and Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada, and*

<sup>2</sup>*Department of Radiology, Hôpital Notre-Dame-CHUM, Montreal, Quebec, Canada*

*Correspondence* : Richard Béliveau, Ph.D., Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 1P3. Telephone: (514) 345-2366 ; FAX: (514) 987-0246; e-mail: oncomol@nobel.si.uqam.ca

<sup>¶</sup>These authors contributed equally to this work

*Acknowledgments* : B.A. holds a CIHR-Canada Research Chair in Molecular Oncology. This work was supported by grants from the Société de Recherche sur le Cancer and the Fondation Charles-Bruneau.

*The abbreviations used are* : ECM, extracellular matrix; EGC, epigallocatechin; EGCg, epigallocatechin-(3)-gallate; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IR, ionizing radiation; MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase; tTG, tissue transglutaminase.

## ABSTRACT

Radiation therapy is a widely-used option for the treatment of a variety of solid tumors. Although effective, ionizing radiation (IR) may give rise to various side effects, including secondary tumors. In agreement with this, recent reports have demonstrated increased invasive potential in different tumor-derived cell lines following radiation treatment. Many of the molecular effects of IR specifically on the endothelial cells involved in tumor neo-vascularization remain unknown. In this study, we found that low sublethal single doses of IR applied to human umbilical vein endothelial cells stimulated cell migration and *in vitro* tubulogenesis. This correlated with an increase in membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) protein expression, a crucial enzyme that promotes endothelial cell migration and tube formation, and of caveolin-1, a protein that regulates tube formation. Cell adhesion was also promoted by IR, reflected in increased gene expression levels of cell surface beta(3) integrin. Pretreatment of the cells with epigallocatechin-3-gallate (EGCg), a green tea catechin that possesses anti-angiogenic properties, prevented most of the IR-induced cellular and molecular events. These observations suggest that current protocols involving radiation therapy for the treatment of cancer can paradoxically promote angiogenesis, but can be improved by combination with anti-angiogenic molecules such as EGCg to target those tumor-derived endothelial cells that escaped IR-induced apoptosis.

**Key words :** Irradiation / angiogenesis / green tea / integrin / endothelial cells / tubulogenesis / MT1-MMP / caveolin

**Main points :** *i)* Low sublethal ionizing radiation (IR) induces migration and tubulogenesis in endothelial cells  
*ii)* MT1-MMP and caveolin-1, both involved in tubulogenesis, protein expression is induced by low dose IR  
*iii)* Green tea catechin EGCg antagonizes the IR-induced molecular and cellular effects in endothelial cells



- iv)* Integrin beta(3) expression is specifically induced by IR and antagonized by EGCg
- v)* The anti-tumoral properties of EGCg may help design new therapeutic approaches combining low dose radiotherapy with naturally occurring anti-angiogenic agents


## INTRODUCTION

Radiotherapy is a commonly used treatment for certain solid tumors. Despite its efficacy, it may give rise to secondary tumors that are more invasive and resistant to radiation than the primary tumors which generated them. The molecular basis for this problem may, in part, be explained by recent studies reporting increased invasiveness of glioma (1, 2) and pancreatic cancer cells (3) following irradiation. In these studies, the gene expression and proteolytic activity of soluble and membrane-bound matrix metalloproteinases (MMP) were found enhanced by irradiation. In addition, other studies showed that UV-irradiation (4) and ionizing radiation (IR) (5) increased the gene expression of Egr-1, a nuclear transcription factor that regulates several biological functions including cell proliferation and programmed cell death (6, 7), and which is known also to regulate MT1-MMP gene expression (8, 9). It is well known that proteolytic remodeling of the extracellular matrix (ECM) by MMP is necessary for cells to mobilize within it. Thus, it has been suggested that irradiation may activate the invasive and ECM-adhesive properties of cancer cells through MMP and cell surface integrin expression (10, 11). Whether these events are modulated in endothelial cells of the tumor-derived vasculature is unknown.

Angiogenesis, the process of neovascularization, is required for a tumor mass to expand and become malignant (12). In this process, blood vessels form a capillary network in the tumor mass, supply it with nutrients and oxygen, and eventually serve as a means for the tumor to invade more distant parts of the body. Since tumor growth and metastasis greatly depend on angiogenesis, it would be reasonable to use radiotherapy to target blood vessels. Until recently, endothelial cell apoptosis in response to radiotherapy was suggested to regulate angiogenesis-

dependent tumour growth (13, 14). However, very little is known about the molecular and cellular events involved in those endothelial cells that escape IR-induced apoptosis. Low energy laser irradiation has recently been shown to promote angiogenesis in an infarcted rat heart and in a chick embryo CAM model (15), and may well be attributable to up-regulation, in endothelial cells, of the nitric oxide pathway (16). Low doses of gamma radiation given to tumor-bearing mice were also found to induce fibroblast growth and angiogenesis prior to tumor recurrence (17). All this evidence indicates that irradiation stimulates neovascularization. Since endothelial cells are directly involved in angiogenesis, these would certainly play a central role in IR-enhanced tumor neovascularization. Moreover, the recent discovery that several naturally occurring polyphenols, including epigallocatechin-3-gallate (EGCg) in green tea, inhibited tumor angiogenesis has shed light on the health beneficial mechanisms of these natural products (18, 19). Whether these natural polyphenols can be used in combination with radiotherapy is unknown.

In this study, we assessed the effects of IR on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) migration and tubulogenesis. The latter angiogenic function being a prerequisite for neovascularization to occur. We found that MT1-MMP and caveolin-1 protein expression were induced by IR and that this upregulation correlated with increased endothelial capillary tube formation and migration. Moreover, beta(3) integrin gene and protein expression was also upregulated by IR while that of cell surface tissue transglutaminase (tTG) was decreased. Pretreatment of the endothelial cells with low concentrations of the antiangiogenic agent green tea catechin, EGCg, specifically antagonized the IR-induced effects. These observations should prompt the development of combined synergistic radiotherapy and anti-angiogenic approaches to



clinical treatment in order to target those tumor-derived endothelial cells that escaped IR-induced apoptosis.

## MATERIALS AND METHODS

*Antibodies and Chemicals* : The following materials were purchased from the indicated sources : Rabbit anti-MT1-MMP polyclonal antibody (AB815) and the enhanced chemiluminescence (ECL)-Western blot kit were from Chemicon International (Temecula, CA). Mouse anti-caveolin-1 monoclonal antibody (Cat#37120) was from BD Pharmingen (Mississauga, ON), mouse anti-tissue transglutaminase (tTG) monoclonal antibody 1 (clone CUB 7402) was from Mediacorp (Montreal, QC). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA); the BCA protein assay kit was from Pierce; polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were from Boehringer Mannheim; all products for electrophoresis were bought from Bio-Rad; TRIzol reagent, heparin, trypsin, penicillin and streptomycin were from GIBCO BRL; fetal bovine serum (FBS) was from HyClone Laboratories (Logan, UT); agarose, (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCg), endothelial cell growth supplement (ECGS), fibronectin, and sodium dodecyl sulfate (SDS) were from Sigma (St-Louis, MO). Ilomastat (GM-6001) was from AM Scientific, Matrigel was from Becton Dickinson Labware (Bedford, MA).

*Cell culture and irradiation treatment* : HUVEC (ATCC) were used between the fourth and eighth passages and were maintained in Endothelial Basal Medium (EBM, Clonetics) containing 10% FBS, 40 µg/ml ECGS, 90 µg/ml heparin, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and were cultured under 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Irradiation proceeded at room temperature as follows : Cells seeded in sterile F75 culture flasks, or in 96-well plates were treated with serum-free EBM supplemented or not with either 5 µM EGCg or

EGC for 7-8 hours and were subjected to single doses of radiation. Cells were overlaid with sufficient medium in order to provide efficient build up doses, and were irradiated with a 6MV photon beam from an Elekta SL75 linear accelerator. The delivered radiation doses were measured using thermoluminescence dosimetry (TLD) system with an accuracy of 7%. Cells were then overlaid with fresh EBM containing 0.5% FBS, and cultured overnight. Control (non-irradiated) cells were handled similarly to those cells that were subjected to IR.

*Endothelial cell migration and proliferation assays:* Cells were dislodged after brief trypsinization, washed extensively and resuspended in serum-free EBM-2 18 hrs post-irradiation. To assess migration, cells ( $10^5$ ) were dispersed onto 0.15% gelatin/PBS-coated chemotaxis filters (Costar; 8- $\mu$ m pore size) within Boyden chamber inserts and allowed to adhere and migrate for 4 hours. Cells that had migrated to the lower surface of the filters were fixed with 3.7% formaldehyde, stained with 0.1% crystal violet/20% MeOH and counted by microscopic examination. The average number of migrating cells per field was assessed by counting at least four random fields per filter. Data points indicate the mean obtained from three separate chambers within one representative experiment. HUVEC proliferation was assessed as follows using a cell metabolic reagent assay (WST-1; Roche Molecular Biochemicals) for the microtiter tetrazolium assay : Cells ( $10^4$  cells/well) were seeded in 96-well plates and proliferation assessed at days 1 and 2 of culture. Cells were then subjected to increasing single dose irradiation as described above. HUVEC proliferation was then monitored for the next 2 following days. The number of living cells was determined by measuring the ratio between absorbances at 450 and 610 nm.

*Endothelial cell morphogenesis assay:* Induction of tubulogenesis was measured using Matrigel aliquots of 50  $\mu$ L, plated into individual wells of 96-well tissue culture plates (Costar, Amherst, MA) and allowed to polymerize at 37°C for at least 1 hour. Cells that were pre-treated with EGC or EGCg and submitted to IR were harvested by treatment with 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA. The cells were then washed in serum-containing medium to remove any trace of EGC or EGCg, and then resuspended at  $2 \times 10^5$  cells/ml in serum-free EBM-2. 100  $\mu$ l cell suspension was added into each culture well and cells were allowed to form capillary tubes at 37°C under 95% air, 5% CO<sub>2</sub> for 4-5 hours. All experiments were performed at least three times. For quantification of tube formation, the total length of the tubes formed in a unit area was digitized and measured using the ECLIPSE-software. For each test, five randomly chosen areas were measured and averaged.

*Endothelial cell adhesion assay :* Adhesion assays were performed as previously described (20). Briefly, adhesion wells were coated with 10  $\mu$ g/ml fibronectin for 2h at 37°C, and then blocked by adding a solution of PBS/BSA 0.5%. Cells were harvested as a single cell suspension by treatment with 0.53 mM EDTA in PBS pH 7.2, added to the precoated wells and allowed to adhere to the substrata for 2h at 37°C. After washing, adherent cells were stained with a solution of 0.1% crystal violet/20% (v/v) MeOH and lysed with 1% SDS. Spectrophotometric absorbance was then measured at 600 nm.

*Fluorimetric caspase-3 activity assay :* HUVEC were grown to about 60% confluence in 6-well dishes and treated with TNF- $\alpha$ , EGCg, or with IR doses. Cells were then collected and washed in ice-cold PBS pH 7.0. Cells were subsequently lysed in Apo-Alert lysis buffer (Clontech, Palo Alto, CA) for 1 hr at 4°C and the lysates were clarified by centrifugation at

16,000 g for 20 min. Caspase-3 activity was determined by incubation with 50  $\mu$ M caspase-3-specific fluorogenic peptide substrate acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin (Ac-DEVD-AFC) in assay buffer [50 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 5 mM DTT and 1 mM EDTA] in 96-well plates. The release of AFC was monitored for at least 30 min at 37°C on a fluorescence plate reader (Molecular Dynamics) ( $\lambda_{ex}$ =400nm,  $\lambda_{em}$ =505nm).

*Total RNA Isolation and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis* : Total RNA was extracted from treated cells using the TRIzol reagent. One microgram of total RNA was used for first strand cDNA synthesis followed by specific gene product amplification with the InVitrogen One Tube RT-PCR kit (Burlington, ON). Primers for MT1-MMP, tTG, Cav-1, alpha(v) integrin, beta(1) integrin, and beta(3) integrin were all derived from human sequences, and PCR conditions have been optimized so that the gene products were measured during the exponential phase of the amplification. PCR products were resolved on 2% agarose gels containing 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide.

*Western Blot Analysis* : Twenty four hours following cell ionization, whole cell lysates were prepared by resuspending the cells in a buffer containing 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 150 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl pH 7.4. Cell lysates (30  $\mu$ g protein / well) were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to PVDF membranes. Immunoblotting procedures were performed as previously described (21). PVDF membranes were incubated with primary antibody, washed, and incubated with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. Bound IgG were detected using a chemiluminescent



substrate. Immunoreactive bands were quantified by densitometric measurement using a Personal Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

*FACS Analysis* : Cells ( $1 \times 10^6$  cells/sample) were washed twice with PBS and resuspended in PBS containing 2% FBS. Cells were then incubated with either monoclonal anti-CD51 (integrin  $\alpha(v)$ ), anti-CD61 (integrin  $\beta(3)$ ), or anti-CD29 (integrin  $\beta(1)$ ) (BD Pharmingen) for 60 min, followed by incubation with PE-conjugated anti-mouse IgG for 30 min. After washing twice with PBS, the cells were analyzed on the FACScalibur (Becton Dickinson Cytometry System, Mansfield, MA).

*Statistical data analysis*: Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test and was used to compare migration and extent of capillary-like structure formation to untreated control basal migration or HUVEC tube formation. Probability values of less than 0.05 were considered significant, and an asterisk (\*) identifies such significance in each figure.

## RESULTS

*Sublethal low single dose ionizing radiation partially inhibits endothelial cell proliferation.* We first tested the sensitivity of exponentially growing HUVEC cell cultures to increasing doses of ionizing radiation (IR). HUVEC cells were seeded, cultured for 2 days, and subconfluent cells were subjected to single doses of IR. Cell proliferation was measured each of the next 2 days. We observed a dose-dependent decrease in the proliferative rate of HUVEC that were irradiated with maximal inhibition at 30 Gy (Fig.1a), undoubtedly due to IR-induced G2 arrest in accordance with previous reports (22). When the proliferative rate (at day 4) of the cells was plotted against the intensity of IR, a dose-dependent effect was again observed with a half-maximal effect at approximately 10 Gy (Fig.1b). To assess whether IR induced HUVEC apoptosis, which could also explain the cell growth arrest, the pro-apoptotic caspase-3 activity was assayed. We found that under the IR conditions used, significant induction of caspase-3 activity was only observed at 30 Gy but not at lower IR doses (Fig.1c). Neither did low concentrations (5  $\mu$ M) of EGCg induce caspase-3 activity, even in combination with up to 10 Gy IR (not shown). In contrast to this, a high (25  $\mu$ M) EGCg concentration and TNF- $\alpha$  induced a marked increase in caspase-3 activity, as previously reported, in HUVEC (23, 24). Only those living cells that escaped IR-induced apoptosis were further investigated in the rest of our study.

*Ionizing radiation triggers in vitro tubulogenesis and endothelial cell migration.* We then assessed IR effects on the angiogenic properties of HUVEC. Cells were irradiated with single doses and left in culture for 18 hours post-irradiation. We then measured the basal HUVEC migration capacity using modified Boyden chambers with gelatin-coated filters. Increasing doses of irradiation were found to trigger HUVEC cell migration in a dose-dependent

manner with a maximal 2.5-fold increase at 10 Gy (Fig.2a). Moreover, when these same cells were plated onto Matrigel, capillary-like structure formation was also induced following single dose irradiation (Fig.2b and 2c) with a similar plateau reached, as was seen for HUVEC migration, at 10 Gy. These data suggest that IR triggers the expression of angiogenic protein markers involved in those endothelial cells that escaped IR-induced apoptosis as reflected by an increase in both cell migration and tubulogenesis.


*Angiogenic markers involved in tubulogenesis are modulated by ionizing radiation in HUVEC.* Membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) has recently emerged as one of the best-documented angiogenic molecular markers involved in both endothelial cell migration and tubulogenesis (25, 26). We thus decided to monitor MT1-MMP protein expression levels using Western-blot analysis following HUVEC irradiation. MT1-MMP protein expression increased significantly following irradiation, and this was correlated with increasing doses of IR (Fig.3a). Concomitantly, the protein expression of Egr-1, a transcription factor that regulates MT1-MMP gene expression, was also induced (not shown). We also assessed the caveolin-1 protein levels associated with these cells, as it was recently reported that caveolin-1 enhanced endothelial capillary tubule formation (27). We observed that, while MT1-MMP protein expression was increased by 2.4-fold at 10 Gy (Fig.3b), caveolin-1 protein levels was also significantly upregulated by increasing doses of IR (Fig.3a and b). Finally, the expression of tissue transglutaminase (tTG) was also monitored as its cell surface expression at the leading edge of motile cancer cells is known to regulate cell adhesion and locomotion (28). Interestingly, IR of HUVEC led to a significant (42%) decrease in tTG expression in a dose-dependent manner (Fig.3a and b). Total ERK and  $\beta$ -actin protein levels were not affected by irradiation

demonstrating that this treatment did not affect the content of intracellular signaling transduction or structural proteins.

*Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate antagonizes IR-induced tubulogenesis in HUVEC.* Recent evidence suggests that the antiangiogenic properties of specific naturally occurring polyphenols present in green tea may help reduce the incidence of tumor growth (18, 29). We thus treated HUVEC cells with sublethal doses of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCg), which we have shown to be the most potent green tea catechin in affecting both cancerous and endothelial cell angiogenic functions (19, 30), and tubulogenesis was assayed. We observed that the IR-induced HUVEC capillary-like structure formation was antagonized by prior treatment with EGCg but not with EGC (Fig.4). Interestingly, the action of other antiangiogenic agents such as thalidomide or fumagillin could not counteract the IR-induced tubulogenesis in HUVEC. Thalidomide's effects were mostly demonstrated in growth-factor induced angiogenesis (31, 32), while its effect on the basal angiogenic properties of endothelial cells remains uncertain. Fumagillin's lack of effect was also not surprising in light of its re-evaluation of selectivity towards endothelial cells (33) and mechanism of action mostly blocking methionine aminopeptidase-2 cell-cycle functions (34). Neovastat and Ilomastat, both known to inhibit MMP-mediated processes involved in tubulogenesis (35, 36), inhibited both the basal as well as the IR-induced capillary-like structure formation in HUVEC (Fig.4). In light of these results, we further investigated the synergistic effects of low concentrations of EGCg combined with low IR, as this was the only treatment that did not affect the basal formation of capillaries but which sensitized HUVEC to subsequent IR.

*Gene expression of specific cell surface integrins is upregulated by IR in HUVEC.* In order to investigate further the cell adhesive properties involved in HUVEC migration and tubulogenesis, we decided to monitor the gene expression of tTG, a potent integrin-binding adhesion coreceptor involved in the binding of cells to fibronectin, of caveolin-1, and of several other integrins. We observed that, while tTG, beta(1) integrin and alpha(v) integrin gene expression remained unaffected by IR, caveolin-1 and beta(3) integrin gene expression were found to be upregulated by IR (Fig.5). Pre-treatment of HUVEC with EGCg downregulated the basal levels of tTG and beta(3) integrin gene expression, but not those of caveolin-1 and alpha(v) integrin (Fig.5). MT1-MMP gene expression was also significantly induced by IR in agreement with the protein expression levels, and that induction was unaffected by pretreatment with low EGCg concentrations (Fig.5).

*Ionizing radiation triggers increased adhesion of HUVEC on fibronectin.* Recent evidence showed that matrix-dependent proteolysis of surface tTG regulated cell adhesion and locomotion of cancer cells (28). Since IR triggered an increase in MT1-MMP expression with a concomitant decrease in that of tTG (Fig.3), we decided to monitor the adhesive ability of HUVEC following IR. Interestingly, HUVEC adhesion to fibronectin was significantly increased when cells were irradiated at 10 Gy (Fig.6a). This IR-induced cell adhesion to fibronectin was, however, antagonized when HUVEC were pretreated with EGCg. HUVEC adhesion to collagen and laminin was not increased by IR (not shown). These results prompted us to further define the cell-surface integrins that are expressed in HUVEC and which up-regulated cell adhesion to fibronectin following IR. This was performed by flow cytometry analysis of cell surface beta(1), beta(3), and alpha(v) integrin expression in irradiated HUVEC.



Integrin beta(3) expression was found increased by IR, confirming the increase observed in gene expression (Fig.6b).

## DISCUSSION

Interference with tumor blood vessels through anti-angiogenesis or vascular targeting can indirectly suppress tumour growth. As tumour cells are dependent on proliferating endothelial cells for survival, it is thus tempting to target newly forming blood vessels as part of anti-angiogenic therapeutic approaches. Accordingly, single doses of radiation have recently been shown to preferentially damage the endothelial cells (13,14), which could have profound implications for cancer therapy. Targeting the vasculature of solid tumours using anti-angiogenic agents, in parallel with IR, seems to be a promising and selective novel treatment (37). For instance, combining IR with angiostatin, a proteolytic fragment of plasminogen, improved tumor eradication (39-41). Most of the recent data, however, document the use of synthetic agents in combination with radiotherapy. Interestingly, an alkylating agent such as temozolomide was shown to prevent irradiation-induced glioma cell invasion (2). More recently, the orally available VEGF receptor inhibitor PTK787 (22), combined with IR was shown to decrease endothelial cell proliferation and numbers of microvessels in tumour xenografts. Accordingly, other antiangiogenic agents such as SU5416 (an inhibitor of VEGF receptor) and SU6668 (an inhibitor for VEGF, FGF, and PDGF receptors) were also recently shown to increase the antitumour effects of fractionated IR (41). All these mechanistic evidence is of interest for the present study as we have recently reported that the green tea catechin EGCg similarly inhibited the VEGF receptor kinase activity in endothelial cells (19). It is thus tempting to hypothesize that such inhibitory mechanism be specifically responsible for the action of EGCg and other VEGFR inhibitors in synergy with IR. Some other promising synthetic agent, which potential receptor tyrosine kinase inhibitory actions is suggested includes thalidomide (42). Gemcitabine, paclitaxel, docetaxel, irinotecan and vinorelbine (43), as well as rofexobid (Vioxx), a specific

COX-2 inhibitor that was found to inhibit endothelial cell function in combination with IR (44), have shown improved toxicity profiles and appear to be effective both as single agents and in combination with other treatments to target angiogenesis-dependent malignancies. However, the radiosensitizing ability of these agents has so far shown limited efficacy in the standard treatments for patients with a number of types of cancer.

The clinical potential of natural, dietary compounds to decrease the incidence of several cancers as well as the multiple anti-cancer activities associated with one of these dietary sources, green tea, through anti-angiogenic properties were recently reviewed (29, 45). These inhibitory activities affected soluble MMP secretion (30), MT1-MMP-mediated cell migration (46), and antagonized three-dimensional endothelial cell-tube formation through inhibition of VEGF receptor activity (19). In the present study, we further demonstrated that IR upregulates specialized angiogenic markers, namely MT1-MMP and caveolin-1, both known to regulate endothelial cell migration and tubulogenesis. The IR-induced increase in caveolin-1 directly correlates with the increase in capillary-like structure formation in HUVEC and is in agreement with caveolin-1 involvement in tubulogenesis (27). Interestingly, while caveolin-1 is found exclusively within cholesterol-enriched plasma membrane domains, the MT1-MMP protein was also recently shown to be located partially at these specialized cell surface plasma membrane regions (46). Moreover, these two proteins were found to regulate endothelial and cancer cell angiogenic functions involved in cell migration and ECM adhesion (46, 47). Of particular interest are the findings that endothelial  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin is also targeted to the same caveolar microdomains in endothelial cells (47), plays an important role in IR-induced adhesion to both collagen and fibronectin (11), and interacts with MT1-MMP (48). Collectively, these observations are suggestive of crucial protein interactions involving MT1-MMP/caveolin-



1/alpha(v)beta(3) within a limited caveolar microenvironment at the cell surface and by which angiogenic functions could be specifically downregulated by combined anti-angiogenic/radiotherapeutic treatments (Fig.7).

Several lines of evidence indicate that integrins are a key factor in the interactions of cells with ECM components (49). Studies have now clearly established that IR activates cell surface expression of vascular adhesion molecules (50) and that integrin beta(3) is activated and accumulates in the lumen of irradiated tumour blood vessels (10). Accordingly, such crucial observation has led to the generation of beta(3)-binding proteins that were shown to bind to tumours following exposure to IR. This strategy may eventually allow one to target drug delivery to IR-induced neoantigens in tumor neovasculature (51, 52). In light of the observed IR-induced HUVEC adhesion property that we report herein on fibronectin and of its reversal by EGCg, one may thus assume that EGCg specifically modulates the cell's interaction with fibronectin through specific cell surface integrins, as previously suggested (53, 54). Moreover, modulation of signal transduction pathways by tea polyphenols has also helped elucidate many molecular mechanisms of cancer chemoprevention by green tea (29). Of particular interest is the suppression by tea polyphenols of various tumour biomarkers and related transducing proteins including growth factor receptor tyrosine kinases, cytokine receptor kinases, PI3K, and the serine/threonine Akt (protein kinase B) (55). Interestingly, since the PI3K/Akt signal transduction pathway was recently shown to be activated in HUVEC by IR (56), it is thus tempting to suggest that this same pathway may well be inhibited by the actions of low EGCg concentrations, and may profoundly modulate adhesion receptor signaling. In addition, the action of EGCg may also occur through protection against oxidative cellular stress and genotoxic damage consequent to the production of large amounts of reactive oxygen species at the time of irradiation (57-59).

Our results further provide evidence of a complex interplay potentially involving other key players at the cell surface of endothelial cells, such as tTG, which are known to be regulated by IR-induced MT1-MMP expression and possibly through proteolysis by MT1-MMP (28). Alternatively, one appealing hypothesis involves the early participation of thrombin, a critical serine protease in the coagulation cascade and a potent promoter of angiogenesis. Indeed, its reported cellular effects in HUVEC include upregulation of tTG expression and secretion (60), upregulation of beta(3) integrin (61) and activation of proMMP-2 (62, 63). Thus, the many actions of thrombin on endothelial cells may explain the well-known association between IR-induced thrombosis, tumour neovascularization and beta(3) integrins. The latter have been implicated in a wide variety of physiological functions, including platelet aggregation and thrombosis, placentation, angiogenesis, bone remodeling, and tumor progression. Finally, recent evidence concluded that therapeutic doses of ionic energy caused a transient increase in thrombin generation during radiotherapy (64).

As combined antiangiogenic/radiotherapy treatments are already underway as Clinical Phase I trials in adult patients, we propose that the cooperative anti-tumoral effects of naturally occurring green tea polyphenols possessing anti-angiogenic properties combined with irradiation treatments will help optimize the present clinical treatments. The synergistic effects obtained when radiotherapy is combined with low-dose metronomic anti-angiogenic therapy should thus provide the underpinnings for the development of new therapeutic strategies using a nutraceutical approach.

## REFERENCES

1. Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, Dichgans J, Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res* 2001; 61:2744-2750.
2. Wick W, Wick A, Schulz JB, Dichgans J, Rodemann HP, Weller M. Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Res* 2002; 62:1915-1919.
3. Qian LW, Mizumoto K, Urashima T, Nagai E, Maehara N, Sato N, et al. Radiation-induced increase in invasive potential of human pancreatic cancer cells and its blockade by a matrix metalloproteinase inhibitor, CGS27023. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1223-1227.
4. Huang RP, Fan Y, Boynton AL. UV irradiation upregulates Egr-1 expression at transcription level. *J Cell Biochem* 1999; 73:227-236.
5. Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, Qureshi SA, Weichselbaum R, Kufe DW. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:2419-2422.
6. Weichselbaum RR, Hallahan D, Fuks Z, Kufe D. Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation-stress response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30:229-234.
7. Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 2002; 193:287-292.
8. Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA. Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem* 1999; 274:22679-22685.
9. Yamaguchi S, Yamaguchi M, Yatsuyanagi E, Yun SS, Nakajima N, Madri JA et al. Cyclic strain stimulates early growth response gene product 1-mediated expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *Lab Invest* 2002; 82:949-956.
10. Hallahan DE, Qu S, Geng L, Cmelak A, Chakravarthy A, Martin W et al. Radiation-mediated control of drug delivery. *Am J Clin Oncol* 2001; 24:473-480.
11. Meineke V, Gilbertz KP, Schilperoort K, Cordes N, Sendler A, Moede T et al. Ionizing radiation modulates cell surface integrin expression and adhesion of COLO-320 cells to collagen and fibronectin in vitro. *Strahlenther Onkol*. 2002; 178:709-714.
12. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002; 29:15-18.

13. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001; 293:293-297.
14. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003; 300:1155-1159.
15. Mirsky N, Krispel Y, Shoshany Y, Maltz L, Oron U. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4:785-790.
16. Sonveaux P, Brouet A, Havaux X, Gregoire V, Dessy C, Balligand JL et al. Irradiation-induced angiogenesis through the up-regulation of the nitric oxide pathway: implications for tumor radiotherapy. *Cancer Res* 2003; 63:1012-1019.
17. Hast J, Schiffer IB, Neugebauer B, Teichman E, Schreiber W, Brieger J et al. Angiogenesis and fibroblast proliferation precede formation of recurrent tumors after radiation therapy in nude mice. *Anticancer Res* 2002; 22:677-688.
18. Cao Y, Cao R, Brakenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J Nutr Biochem* 2002; 13:380-390.
19. Lamy S, Gingras D, Béliveau R. Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res* 2002; 62:381-385.
20. Rigot V, Lehmann M, Andre F, Daemi N, Marvaldi J, Luis J. Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells. *J Cell Sci* 1998; 111:3119-3127.
21. Beaulieu E, Kachra Z, Mousseau N, Delbecchi L, Hardy J, Béliveau R. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human pituitary tumors. *Neurosurgery* 1999; 45:1432-1440.
22. Hess C, Vuong V, Hegyi I, Riesterer O, Wood J, Fabbro D et al. Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth. *Br J Cancer* 2001; 85:2010-2016.
23. Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide* 1997; 1:282-293.
24. Li X, Liu L, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Sebt SM et al. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277:15309-15316.
25. Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 2000; 149:1309-1323.

26. Lafleur MA, Handsley MM, Knauper V, Murphy G, Edwards DR. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci* 2002; 115:3427-3438.
27. Liu J, Wang XB, Park DS, Lisanti MP. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem* 2002; 277:10661-10668.
28. Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem*. 2001; 276:18415-18422.
29. Demeule M, Michaud-Levesque J, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J et al. Green Tea Catechins as Novel Antitumor and Antiangiogenic Compounds. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2002; 2:441-463.
30. Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1542:209-220.
31. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:4082-4085.
32. Gordon JN, Goggin PM. Thalidomide and its derivatives: emerging from the wilderness. *Postgrad Med J*. 2003; 79:127-132.
33. Rodriguez-Nieto S, Medina MA, Quesada AR. A re-evaluation of fumagillin selectivity towards endothelial cells. *Anticancer Res* 2001; 21:3457-3460.
34. Bradshaw RA, Yi E. Methionine aminopeptidases and angiogenesis. *Essays Biochem* 2002; 38:65-78.
35. Béliveau R, Gingras D, Kruger EA, Lamy S, Sirois P, Simard B et al. The antiangiogenic agent neovastat (AE-941) inhibits vascular endothelial growth factor-mediated biological effects. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1242-1250.
36. Galardy RE, Grobelny D, Foellmer HG, Fernandez LA. Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res* 1994; 54:4715-4718.
37. Landuyt W, Ahmed B, Nuyts S, Theys J, Op de Beeck M, Rijnders A et al. In vivo antitumor effect of vascular targeting combined with either ionizing radiation or anti-angiogenesis treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49:443-450.
38. Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba MJ, Stellato KA et al. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature* 1998; 394:287-291.

39. Griscelli F, Li H, Cheong C, Opolon P, Bennaceur-Griscelli A, Vassal G et al. Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:6698-6703.
40. Gorski DH, Mauceri HJ, Salloum RM, Halpern A, Seetharam S, Weichselbaum RR. Prolonged treatment with angiostatin reduces metastatic burden during radiation therapy. *Cancer Res* 2003; 63:308-311.
41. Ning S, Laird D, Cherrington JM, Knox SJ. The antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation. *Radiat Res* 2002; 157:45-51.
42. Kinuya S, Kawashima A, Yokoyama K, Koshida K, Konishi S, Watanabe N et al. Cooperative effect of radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy with thalidomide in human cancer xenografts. *J Nucl Med* 2002; 43:1084-1089.
43. Curran WJ. New chemotherapeutic agents: update of major chemoradiation trials in solid tumors. *Oncology* 2002; 63:29-38.
44. Dicker AP, Williams TL, Grant DS. Targeting angiogenic processes by combination rofecoxib and ionizing radiation. *Am J Clin Oncol* 2001; 24:438-442.
45. Greenwald P, Clifford CK, Milner JA. Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer* 2001; 37:948-965.
46. Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J* 2001; 353:547-553.
47. Puyraimond A, Fridman R, Lemesle M, Arbeille B, Menashi S. MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells. *Exp Cell Res* 2001; 262:28-36.
48. Galvez BG, Matias-Roman S, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG. ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *J Cell Biol* 2002; 159:509-521.
49. Giancotti FG, Mainiero F. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198:47-64.
50. Heckmann M, Douwes K, Peter R, Degitz K. Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation. *Exp Cell Res* 1998; 238:148-154.
51. Hallahan D, Geng L, Qu S, Scarfone C, Giorgio T, Donnelly E et al. Integrin-mediated targeting of drug delivery to irradiated tumor blood vessels. *Cancer Cell* 2003; 3:63-74.

52. Kiani MF, Yuan H, Chen X, Smith L, Gaber MW, Goetz DJ. Targeting microparticles to select tissue via radiation-induced upregulation of endothelial cell adhesion molecules. *Pharm Res* 2002; 19:1317-1322.
53. Ogata K, Mukae N, Suzuki Y, Satoh K, Narumi K, Nukiwa T et al. Effects of catechins on the mouse tumor cell adhesion to fibronectin. *Planta Med* 1995; 61:472-474.
54. Sazuka M, Isemura M, Isemura S. Interaction between the carboxyl-terminal heparin-binding domain of fibronectin and (-)-epigallocatechin gallate. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62:1031-1032.
55. Lin JK. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through modulating signal transduction pathways. *Arch Pharm Res* 2002; 25:561-571.
56. Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res* 2002; 62:4671-4677.
57. Tobi SE, Gilbert M, Paul N, McMillan TJ. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation. *Int J Cancer* 2002; 102:439-444.
58. Parshad R, Sanford KK, Price FM, Steele VE, Tarone RE, Kelloff GJ et al. Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells. *Anticancer Res* 1998; 18:3263-3266.
59. Feinendegen LE. Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21:85-90.
60. Auld GC, Ritchie H, Robbie LA, Booth NA. Thrombin upregulates tissue transglutaminase in endothelial cells: a potential role for tissue transglutaminase in stability of atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1689-1694.
61. Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: involvement of  $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C1501-1510.
62. Lafleur MA, Hollenberg MD, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G, Edwards DR. Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. *Biochem J* 2001; 357:107-115.
63. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33:960-970.

64. Uszynski M, Miodonska J, Zekanowska E. Transient increase in thrombin generation during radiotherapy of uterine carcinoma: A preliminary study using thrombin-antithrombin III complex measurements. *Gynecol Obstet Invest* 1998; 46:130-132.



## FIGURE LEGENDS

**Fig.1 : Sublethal low single dose ionizing radiation partially inhibits endothelial cell proliferation.** (A) HUVEC were seeded and cultured for two days, then subjected to increasing single dose ionizing radiation as described in the Methods section. Cell proliferation was monitored for two days following irradiation. (B) HUVEC proliferation is expressed as the percent of maximal inhibitory effect observed at day 4 of proliferation. (C) HUVEC were treated with 5  $\mu$ M or 25  $\mu$ M EGCg, 25 ng/ml TNF- $\alpha$  plus 1  $\mu$ g/ml cycloheximide for 24 hrs, or subjected to IR as described in the Methods section. Caspase-3 activity was measured in HUVEC 24 hrs post-irradiation by using Ac-DEVD-AFC as a substrate. Proliferation and caspase-3 results are the means  $\pm$  S.D. of triplicate wells in a single experiment and are representative of three separate experiments. \* indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) compared with the control non-irradiated HUVEC using Student's *t*-test.

**Fig.2 : IR triggers *in vitro* tubulogenesis and endothelial cell migration.** (A) HUVEC were subjected to increasing doses of IR, and then left to recuperate at 37°C overnight. Cells were harvested and migration assessed on gelatin-coated filters using modified Boyden chambers. (B) The same ionized HUVEC were also used to monitor the extent of three-dimensional capillary-like structure formation on Matrigel, and tubulogenesis was quantified as described in the Methods section (C). \* indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) compared with the control non-irradiated HUVEC using Student's *t*-test.

**Fig.3 : Cell surface angiogenic markers are modulated by IR in HUVEC.** (A) Cells were cultured and subjected to IR. Cell lysates (30 µg protein / well) from each condition were loaded on SDS-gels, and then transferred to PVDF membranes. Immunodetection of the specific angiogenic markers was carried out as described in the Methods section. (B) Quantification of control (0 Gy, with bars) and irradiated (10 Gy, black bars) HUVEC lysates was performed by densitometry. The results are the means ± S.D from three independent experiments. \* indicates statistically significant differences ( $P<0.05$ ) compared with the control non-irradiated HUVEC using Student's *t*-test.

**Fig.4 : Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate antagonizes IR-induced tubulogenesis in HUVEC.** Cells were treated with several potent antiangiogenic agents as described in the legend to Fig.2, and tubulogenesis assessed on Matrigel. Cells were treated for 7 hrs prior to irradiation with sub-lethal doses of 5 µM EGC or EGCg, 0.1X neovastat (Neov), 1 µg/ml thalidomide (Thali), 0.2 µg/ml fumagillin (Fuma), or 20 µM ilomastat (Ilo). Capillary-like structure formation results are the means ± S.D. of triplicate wells in a single experiment and are representative of two separate experiments. \* indicates statistically significant differences ( $P<0.05$ ) compared with the control non-irradiated HUVEC using Student's *t*-test.

**Fig.5 : Gene expression of specific cell surface integrins is upregulated by IR in HUVEC.** Cells were pretreated (or not) with 5 µM EGCg and then subjected to 10 Gy IR. Total RNA was isolated and gene expression levels of tTG, MT1-MMP, Cav-1, alpha(v) integrin, beta(1) integrin, and beta(3) integrin were assessed by RT-PCR using human primer sequences as described in the Methods section.

**Fig.6 : Ionizing radiation specifically upregulates endothelial cell surface expression of beta(3) integrin and adhesion on fibronectin.** (A) Cells were pretreated (triangles) or not (circles) with 5  $\mu$ M EGCg and then subjected to 10 Gy IR (closed circles, closed triangles). Cell adhesion was monitored on increasing concentrations of fibronectin. The figure represents one of two independent experiments. For the sake of clarity, error bars are only represented for the irradiated cells. (B) Subconfluent HUVEC were subjected to 10 Gy IR and harvested in parallel with non-irradiated control cells after 18 hrs to measure the cell surface expression of alpha(v) integrin, beta(1) integrin, and beta(3) integrin. Flow cytometry was performed after immunostaining with monoclonal antibodies against adhesion molecules (shaded plots) as well as IgG1 isotype control MoAb (open plot). X-axis, fluorescence in arbitrary units; Y-axis, cell number. The figure represents one of two independent experiments.

**Fig.7 : Schematic representation of the proposed IR-induced molecular and cellular events that are antagonized by EGCg in endothelial cells.** (A) Low sublethal dose of ionizing radiation (IR) that does not trigger apoptosis in endothelial cells induces the gene expression of several angiogenic cell surface markers. (B) While induction of caveolin-1 and MT1-MMP at the cell surface triggers cell migration and tubulogenesis, that of integrin  $\beta$ 3 enhances cell adhesion (C). Pretreatment of the endothelial cells with low concentrations of the green tea catechin EGCg sensitizes those cells that escaped IR-induced apoptosis by down-regulating the gene expression of the above mentioned cell surface markers (D) and subsequently antagonizes IR-induced cell adhesion and tubulogenesis. Also depicted, is the potential regulation of tTG at the cell surface by

MT1-MMP. The latter can cleave tTG which can then limit its cell surface availability and function in endothelial cell migration and cell adhesion. This model reflects the specific and dynamic effects that the anti-angiogenic properties of EGCg can provide in synergy with low dose radiotherapy in order to target those endothelial cells that escaped IR-induced apoptosis.

Fig.1

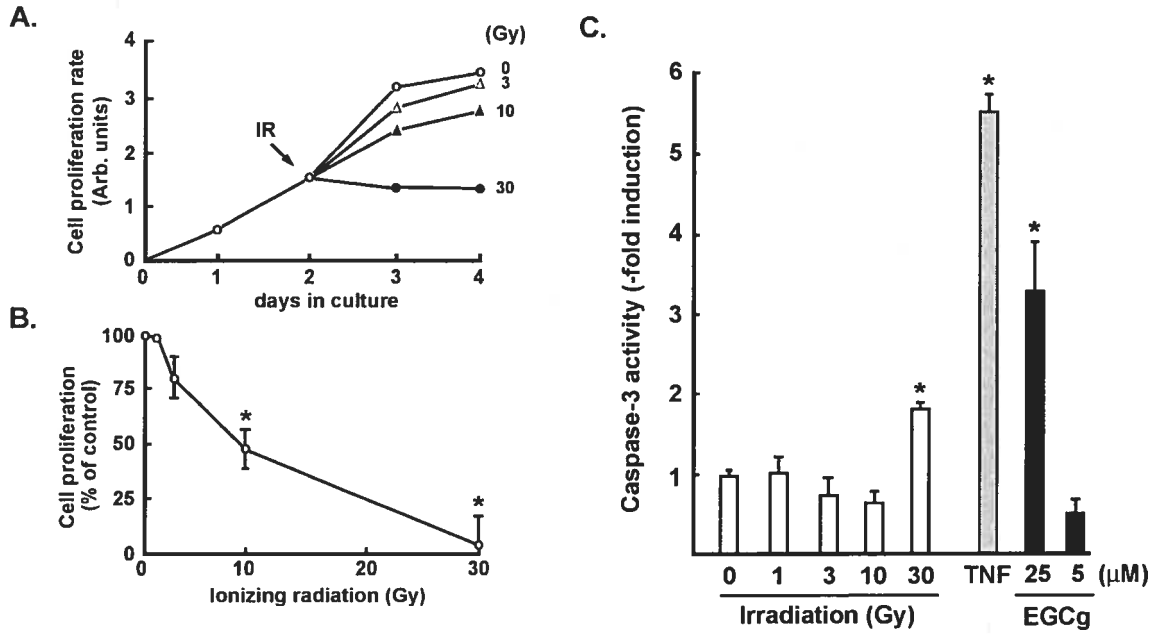


Fig.2

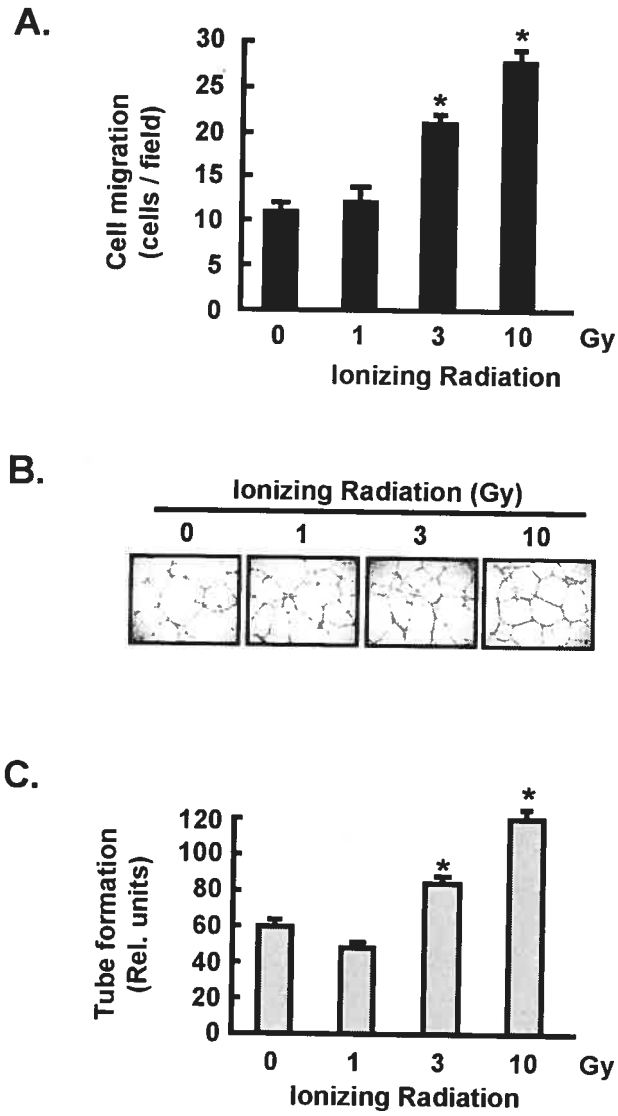
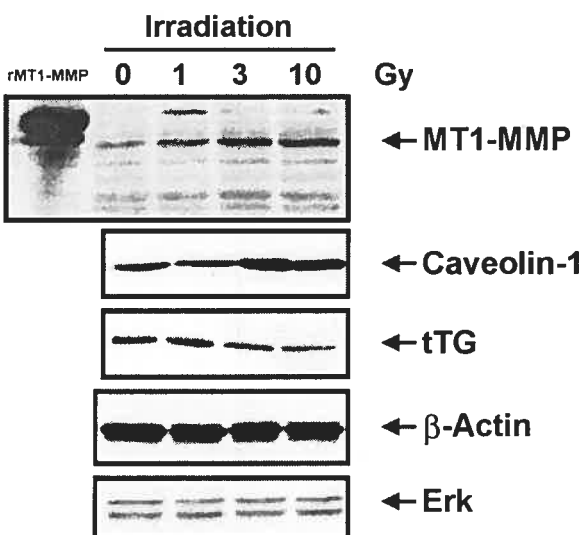


Fig.3

A.



B.

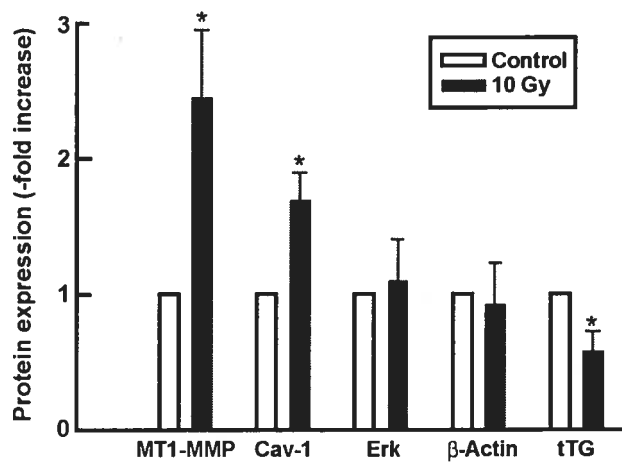
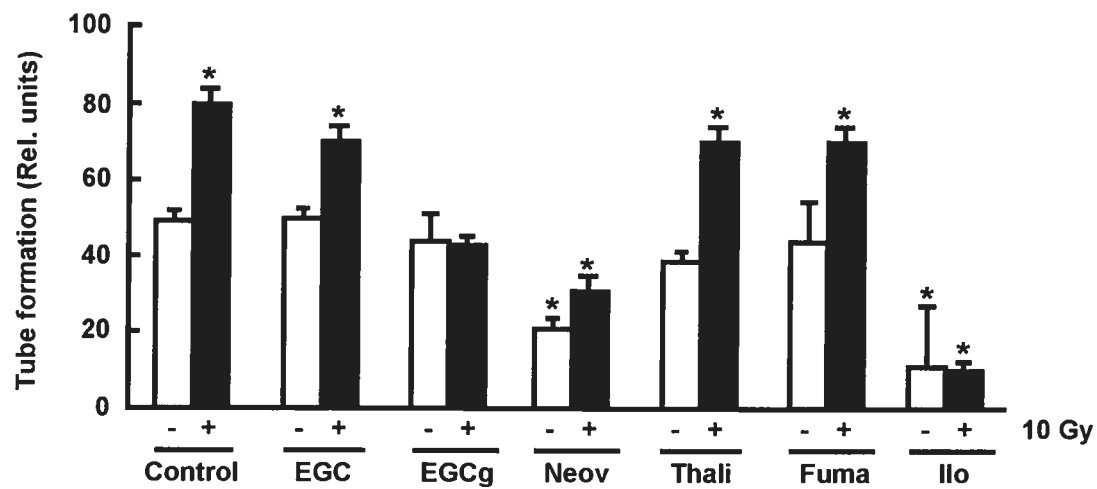


Fig.4





**Fig.5**

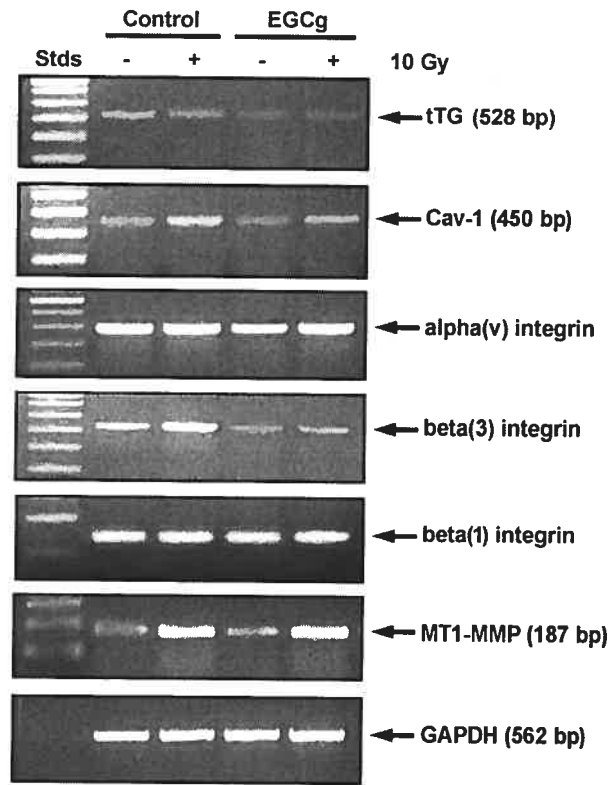
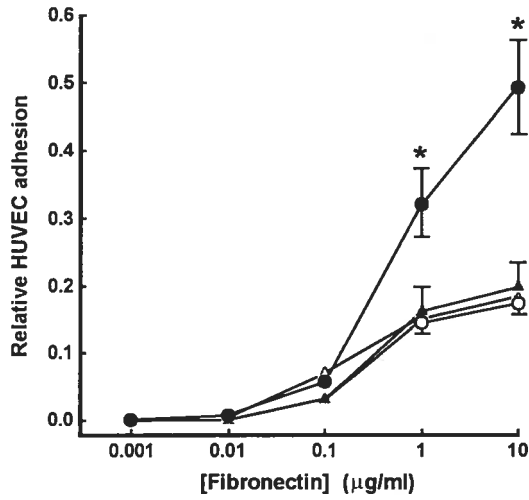


Fig.6

A.



B.

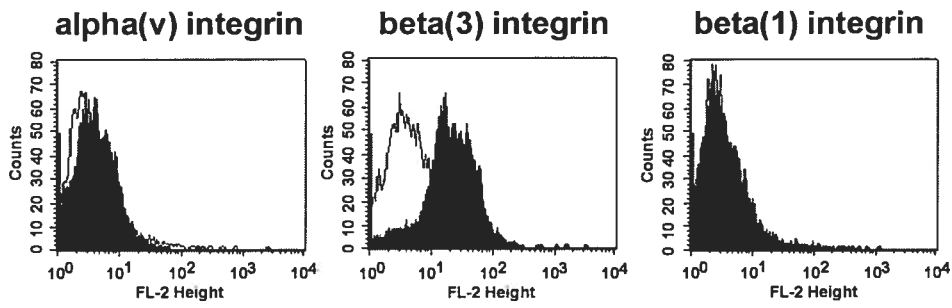
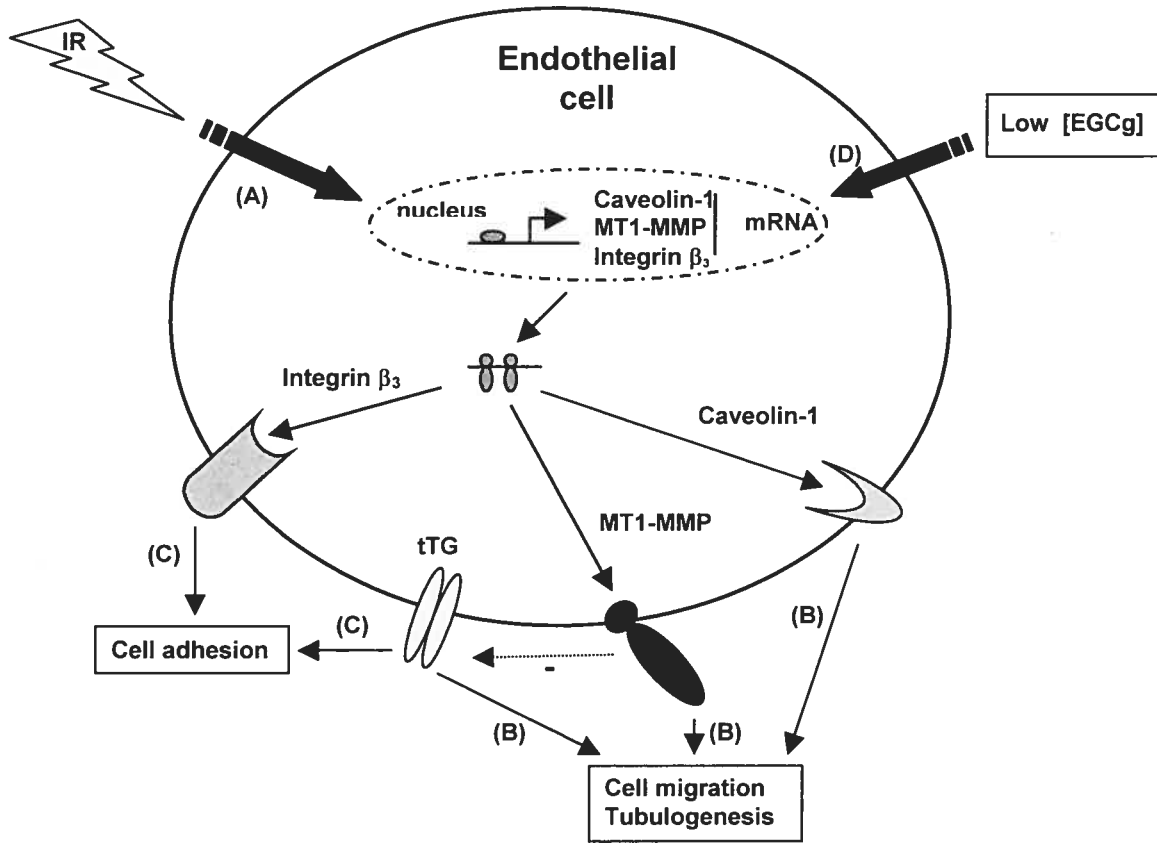


Fig.7



## Chapitre 5

# **DISCUSSION**

## 5.1 La régulation des propriétés angiogéniques des MSC par l'hypoxie

Des études récentes ont montré que les cellules souches mésenchymateuses (MSC) provenant de la moelle osseuse peuvent manifester des phénotypes cellulaires et moléculaires les apparentant aux cellules endothéliales (52-55). De plus, ces cellules répondent à des facteurs de croissance libérés par des cellules tumorales et des cellules endothéliales (100). Ces observations renforcent la possibilité qu'elles puissent contribuer à l'angiogenèse tumorale. À la lumière de cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier l'effet de l'hypoxie sur les propriétés angiogéniques des MSC, car l'hypoxie reflète la tension réduite en oxygène observée près des masses tumorales, et elle est connue pour son habilité à induire l'angiogenèse tumorale (101).

Nous avons observé que l'hypoxie augmente la migration des MSC ainsi que leur habilité tubulogénique, deux fonctions cellulaires requises dans l'angiogenèse. La dégradation de la membrane basale, et le remodelage de la MEC, médié par l'activité protéolytique des MMPs, sont nécessaires avant que les cellules ne puissent se déplacer à travers la MEC. D'abord, nous avons constaté que l'hypoxie diminue l'activité gélatinolytique de la MMP-2; cela a été corrélé avec une diminution de son expression génique; cependant, l'expression génique et protéique de la MT1-MMP est plus augmentée en hypoxie, ce qui corrèle avec des niveaux plus hauts de l'EGR-1 en hypoxie. Au vu de ces observations, nous avons décidé d'examiner la valeur fonctionnelle de ces résultats.

Le blocage spécifique de la fonctionnalité de la MT1-MMP par l'EGCg ou par un anticorps ciblé à son site catalytique, inhibe de façon plus spectaculaire l'angiogenèse que l'action des inhibiteurs non-spécifiques des MMPs comme le Marimastat. Cela démontre que la MT1-MMP plutôt que la MMP-2 est indispensable à l'angiogenèse. En fait, le rôle de la MT1-MMP dans le phénotype angiogénique des cellules endothéliales a été bien établi par plusieurs groupes (26-28). D'après nos observations, la MT1-MMP et non pas la MMP-2 semblerait être le modulateur principal des propriétés angiogéniques dans les conditions d'hypoxie; cela semble paradoxal en partie vu que l'activité de la MMP-2 a été corrélée directement avec l'angiogenèse

tumorale (38). Il se pourrait aussi que la MT1-MMP une fois dans le foyer tumoral active la proMMP-2 libérée par les cellules cancéreuses et endothéliales plutôt que la sienne, et de cette façon elle contribuerait à l'angiogenèse tumorale. Cette hypothèse reste toutefois à être vérifiée.

L'hypoxie serait donc capable d'activer directement la migration et la tubulogenèse des MSC. Nous nous sommes demandé par contre si elle pouvait aussi activer indirectement ces fonctions angiogéniques en induisant la production des facteurs de croissance dans ces cellules. Nous avons observé que des milieux conditionnés par des MSC soumises à l'hypoxie augmentent le profil migratoire des MSC non traités. Le même phénomène a été constaté lorsque des milieux conditionnés de U87 ont été utilisés. Cela suggère que l'hypoxie induit la production des facteurs de croissance par les cellules qu'elle affecte, et que ces facteurs modulent les propriétés migratoires de façon autocrine et paracrine des cellules environnantes y compris les MSC. Le VEGF est le facteur de croissance angiogénique le mieux connu pour sa contribution à l'angiogenèse tumorale. Nous avons détecté un haut niveau de VEGF sécrété dans le milieu conditionné par les MSC en hypoxie. Cela corrèle avec des niveaux plus hauts du transcrit de HIF-1 $\alpha$ , un facteur de transcription activé exclusivement par des bas niveaux d'oxygène, qui active l'expression du VEGF. Il a été démontré que l'EGR-1 active l'expression du b-FGF (103). Vu que les niveaux d'EGR-1 sont plus hauts en hypoxie dans les MSC, il est fort probable que le b-FGF soit produit en grande quantité aussi. Il serait intéressant de vérifier cela, et de voir si d'autres facteurs de croissance seraient aussi induits par l'hypoxie.

La HIF est probablement le facteur de transcription le plus important pour son rôle dans le développement du cancer et de l'angiogenèse tumorale, il n'est pas le seul à être activé par l'hypoxie (103). Il est maintenant connu que l'EGR-1, un autre facteur de transcription qui induit des réponses cyto-protéctrices contre le stress cellulaire, est aussi activé par une tension réduite en oxygène, et agit indépendamment de la HIF-1 dans la promotion de l'angiogenèse tumorale (104). Par exemple la MT1-MMP est une metalloprotéinase dont l'expression génique est régulée par l'EGR-1 et non par HIF-1, sans lequel les cellules endothéliales ne pourraient pas former de tubes capillaires. D'autres facteurs de transcription pourraient aussi être activés indépendamment de la HIF-1, mais ils pourraient agir séparément ou en conjonction avec HIF-1. En effet, la HIF-1 est induit de façon non-spécifique dans tous les types de cellules par

l'hypoxie. Cependant la nature des gènes activés par celui-ci dépend de la lignée cellulaire sur laquelle il agit, il est très possible alors que cela dépende de l'interaction de la HIF-1 avec d'autres facteurs de transcription (18).

Le VEGF exprimé en grande quantité en hypoxie dans les MSC laisse supposer qu'il puisse jouer un rôle primordial dans les propriétés angiogéniques de ces cellules. Cependant, nous avons constaté que le VEGF n'induit qu'une activation marginale de la migration des MSC par rapport à d'autres facteurs de croissance tels que le b-FGF ou la S-1-P. Ces observations corrélerent avec des études qui montrent que le VEGFR-2 est faiblement exprimé (55), et notre étude démontrant que le récepteur de la S-1-P, EDG-1 est fortement exprimé (105, voir annexe) dans les MSC dans leur état basale. D'après ces observations, il est aussi possible que les MSC expriment fortement les récepteurs du b-FGF dans leur état basal; en particulier, il serait intéressant de vérifier si le FGFR-1 est hautement exprimé dans les MSC, car de tous les récepteurs FGFR, connus jusqu'à présent, seul le rôle du FGFR-1 dans la néovascularisation a été établi (106). Le fait que le VEGF n'induit pas une migration significative des MSC pourtant n'indique pas qu'elles ne puissent pas participer à l'angiogenèse tumorale. En effet, il a été rapporté que les fibroblastes sont nécessaires pour l'induction des propriétés angiogéniques des cellules endothéliales (107). Il est possible que les MSC se différencient en des fibroblastes une fois dans le foyer tumoral et qu'elles expriment le VEGF pour aider au recrutement des cellules endothéliales. Une autre possibilité, est que le VEGF joue un rôle dans la différenciation des MSC en des cellules endothéliales. En partant de cette hypothèse, des études ont démontré que le traitement prolongé au VEGF des cellules progénitrices multipotentes adultes (MAPCs) induit l'expression des marqueurs des cellules endothéliales et du VEGFR-2 (55). Étant donné la courte durée de 4 heures d'exposition des MSC au VEGF, il n'est pas étonnant que ce facteur de croissance n'ait pas eu d'effets significatifs sur leur profil migratoire. Si le même traitement prolongé causait les mêmes effets dans les MSC, le VEGF pourrait aussi induire une migration et une formation des structures capillaires par les MSC.

La participation des muscles lisses est nécessaire à la maturation des vaisseaux capillaires. Vu que les MSC peuvent se différencier en des cellules musculaires lisses (108), il est possible qu'elles contribuent à la stabilisation des réseaux capillaires tumoraux. La tension

réduite en oxygène retrouvée dans les masses tumorales induirait les MSC à migrer vers la tumeur et à interagir avec les cellules tumorales et les cellules endothéliales. Ensuite une partie des MSC près des cellules endothéliales pourrait se différencier en des cellules musculaires lisses. Plus tard, l'hypoxie induirait les cellules endothéliales à sécréter le b-FGF qui induirait la prolifération des cellules musculaires lisses (109) de façon à stabiliser le réseau capillaire sanguin dans la masse tumorale.

En conclusion, une tension réduite en oxygène tel que mesuré à l'intérieur des masses tumorales peut agir seule, ou en synergie avec des facteurs de croissance produits par les cellules tumorales pour induire les propriétés angiogéniques des MSC. Elle pourrait aussi induire la production des facteurs de croissance dans les MSC, qui agiraient sur elles mêmes et sur les tumeurs. De cette façon il y aurait un effet direct de l'hypoxie, et une régulation autocrine et paracrine des propriétés angiogéniques des MSC et des propriétés invasives des tumeurs. Les MSC seraient ainsi recrutées dans le foyer de la tumeur, et pourraient contribuer à l'angiogenèse tumorale par leur différenciation en cellules endothéliales. En accord avec cette hypothèse, des études démontrent que les MSC CD31<sup>-</sup> implantées dans des billes de matrigels (une substance reflétant les conditions de la MEC) injectées en présence ou en absence des glioblastomes U87 sont capable de se différencier en des cellules endothéliales exprimant l'antigène CD31 (53, 100). Alternativement, elles pourraient se différencier en des fibroblastes qui aideraient au recrutement des cellules endothéliales par l'intermédiaire du VEGF (107), ou aider à stabiliser les réseaux capillaires déjà présents dans la tumeur en produisant des cellules musculaires lisses autour des cellules endothéliales.

Une des limitations de notre étude se situe dans l'interprétation des résultats observés, dû au fait que les MSC soient une lignée de cellules "hétérogènes". Elles manquent de critères de reconnaissance spécifiques et leur difficile accès tissulaire les rendent difficiles à purifier à homogénéité (105). On trouve dans cette hétérogénéité diverses sous-populations de précurseurs cellulaires d'où proviennent des fibroblastes, des ostéoblastes, des myoblastes, des cellules endothéliales mésodermiques et d'autres comme mentionnés auparavant; ce qui veut dire que nos résultats ne sont attribuables qu'à une sous-population de cellules ne représentant qu'une fraction de MSC. Cependant, d'après nos observations il est probable qu'il y ait au moins une sous-



population dans les MSC dont les propriétés pro-angiogéniques sont activées par l'hypoxie, qui pourraient se différencier en des cellules endothéliales et contribuer à l'angiogenèse tumorale. De plus il y aurait aussi des sous-populations qui peuvent se différencier en des fibroblastes et en cellules musculaires lisses et y contribuer aussi comme mentionné ci-dessus.

## 5.2 La modulation des propriétés angiogéniques des cellules endothéliales par l'irradiation.

La radiothérapie est souvent utilisée comme option thérapeutique dans le traitement de divers cancers. Cependant, elle peut parfois être peu efficace due à la haute radiorésistance intrinsèque de certaines cellules cancéreuses. De plus, des tumeurs secondaires peuvent surgir suite à la rémission d'une première tumeur traitée à la radiothérapie. Des études ont été effectuées sur plusieurs lignées des cellules cancéreuses radiorésistantes qui montrent que des doses sublétales de rayons ionisants augmentent leurs propriétés invasives (62-65). Vu que les tumeurs dépendent grandement de l'angiogenèse pour se développer et envahir d'autres tissus, il est probable que ce processus biologique y soit impliqué aussi. En fait, Hast *et al* (110) ont rapporté que l'irradiation provoque la prolifération des fibroblastes et l'angiogenèse avant l'apparition des tumeurs secondaires dans des souris. Cela suggère que les cellules endothéliales y contribueraient aussi. Toutefois, l'effet de l'irradiation sur les cellules endothéliales est peu connu. Nous avons donc décidé d'étudier les effets des rayons X sur le profil angiogénique des cellules endothéliales.

D'abord nous avons testé l'effet de l'irradiation sur la prolifération et l'activité pro-apoptotique de la caspase-3 pour décider à quelles doses nous devions traiter ces cellules. Nos travaux et d'autres études (66) démontrent une atténuation de la prolifération et une induction significative de l'apoptose à des doses d'irradiation supérieures à 10 Gy. Nous avons donc utilisé des doses croissantes d'irradiation jusqu'à 10 Gy pour nos études.

Nous avons observé que des doses croissantes d'irradiation induisent la hausse de la migration cellulaire ainsi que la formation des structures capillaires des cellules endothéliales. Nous avons également observé des niveaux plus hauts de MT1-MMP, ce qui corrèle avec l'induction de son facteur de transcription, l'EGR-1 par l'irradiation (23). L'expression de la cavéoline-1 est aussi induite par l'irradiation. Vu que les activités de la MT1-MMP (26-28) et de la cavéoline-1 (36, 37) corrèlent directement avec la tubulogenèse des cellules endothéliales. L'induction de la tubulogenèse par l'irradiation implique potentiellement ces deux molécules.

Sonveaux *et al* (111) ont aussi rapporté que l'irradiation augmente le profil angiogénique des cellules endothéliales, mais par l'intermédiaire d'une voie impliquant l'oxyde nitrique (NO). Il pourrait y avoir un lien fonctionnel entre la voie de NO et la MT1-MMP. Des études rapportent la modulation de l'expression de la MMP-1 (112), la MMP-2 et la MMP-9 (113) par la NO. L'expression de la MT1-MMP pourrait être potentiellement régulée par la NO aussi, cette hypothèse doit toutefois être vérifiée.

La radiothérapie peut causer l'apparition des tumeurs secondaires. Cependant, son efficacité ne peut pas être négligée; il a été démontré qu'elle prolonge la survie moyenne des patients souffrant des glioblastomes de 6 à 8 mois (64). Si on l'utilisait pour cibler la vasculature tumorale plutôt que les cellules tumorales, il serait possible d'augmenter son rendement, et de minimiser ses effets secondaires (114). Cela pourrait être accompli en combinant l'irradiation à des traitements faisant appel à divers agents anti-angiogéniques. Nous avons testé la capacité de plusieurs types d'agents anti-angiogéniques incluant des catéchines du thé vert comme l'EGC et l'EGCg, des produits naturels en essai clinique comme le Néovastat, et des inhibiteurs chimiothérapeutiques comme la thalidomide, la fumagiline et l'ilomastat, pour bloquer la tubulogénèse activée par l'irradiation. Seulement l'EGCg a agi sur la tubulogénèse activée sans perturber celle de base. Il est intéressant de noter que l'EGC qui n'a eu aucun effet sur la tubulogénèse, a une structure chimique semblable à l'EGCg, sauf par l'absence d'un groupe gallate (fig1.9). Cela suggère que le gallate joue un rôle indéniable dans l'activité inhibitrice de l'EGCg. Éventuellement, il serait intéressant de mener d'autres études vérifiant si le gallate seul ou l'intégrité totale de la structure de l'EGCg est nécessaire aux activités anti-angiogéniques de cette molécule.

Nous avons aussi observé que l'EGCg antagonise même l'expression de la cavéoline-1 activé par l'irradiation, ce qui explique ses effets sur la tubulogénèse dans les cellules endothéliales. Cependant, les niveaux d'ARN de la MT1-MMP ne sont pas affectés à cette concentration (96). Les résultats obtenus avec l'irradiation et avec l'EGCg sur la tubulogénèse des cellules endothéliales corrélerent avec un phénomène similaire que l'on observe dans l'adhérence des cellules endothéliales comme nous avons observé. L'irradiation augmente l'adhésion des cellules endothéliales à la fibronectine, cet effet est remis à des niveaux de base

par l'irradiation. La fibronectine est une des protéines structurales majeures de la MEC. Les cellules interagissent avec cette protéine et avec d'autres protéines structurales par l'intermédiaire des récepteurs connus comme les intégrines. Nous avons démontré que l'expression de l'intégrine  $\beta_3$ , est modulée par l'irradiation et antagonisée par l'EGCg tandis que celle de l'intégrine  $\alpha_v$  reste in affectée. Cette observation corrèle avec des études démontrant que l'irradiation active l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (115) et que les niveaux d'intégrine  $\beta_3$  sont plus hauts dans les parois des lumières des cellules endothéliales des vaisseaux capillaires tumorales suite à l'irradiation. Dans les cellules endothéliales, onze types de combinaisons d'intégrines  $\alpha$  et  $\beta$  sont présents dont l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  qui a été le mieux caractérisé pour son rôle dans l'angiogenèse (38). Il est possible que l'irradiation induise ainsi la formation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et donc l'adhérence à la fibronectine; dans ce cas le facteur limitant serait l'intégrine  $\beta_3$ . Nous avons remarqué aussi une diminution de l'expression de la transglutaminase tissulaire (tTG) par l'EGCg. Paradoxalement, l'irradiation ne module pas sa transcription. De plus, les niveaux de tTG à la surface cellulaire diminuent avec des doses croissantes d'irradiation. Belkin *et al* (19) ont démontré que la MT1-MMP clive et inhibe la tTG à la surface cellulaire. Cela expliquerait l'augmentation du niveau de la MT1-MMP, et la réduction des niveaux de la tTG par l'irradiation, à la surface cellulaire. La tTG en collaboration avec l'intégrine  $\beta_3$  module l'adhésion cellulaire à la fibronectine aussi (116). Mais si cela était le cas, l'irradiation devrait réduire l'adhésion. Cela suggère que dans les cellules endothéliales l'intégrine  $\beta_3$  pourrait potentiellement moduler cette fonction cellulaire par elle-même, et que la tTG ne joue qu'un rôle secondaire. De plus, Belkin *et al* (19) ont suggéré que la fibronectine potentiellement protège la tTG de la dégradation par la MT1-MMP. À la lumière des résultats obtenus et des rapports provenant de la littérature, l'intégrine  $\beta_3$  serait ultimement la molécule d'intérêt dans la médiation de l'adhérence cellulaire à la fibronectine et serait potentiellement une des cibles moléculaires majeures dans l'établissement des thérapies anticancéreuses.

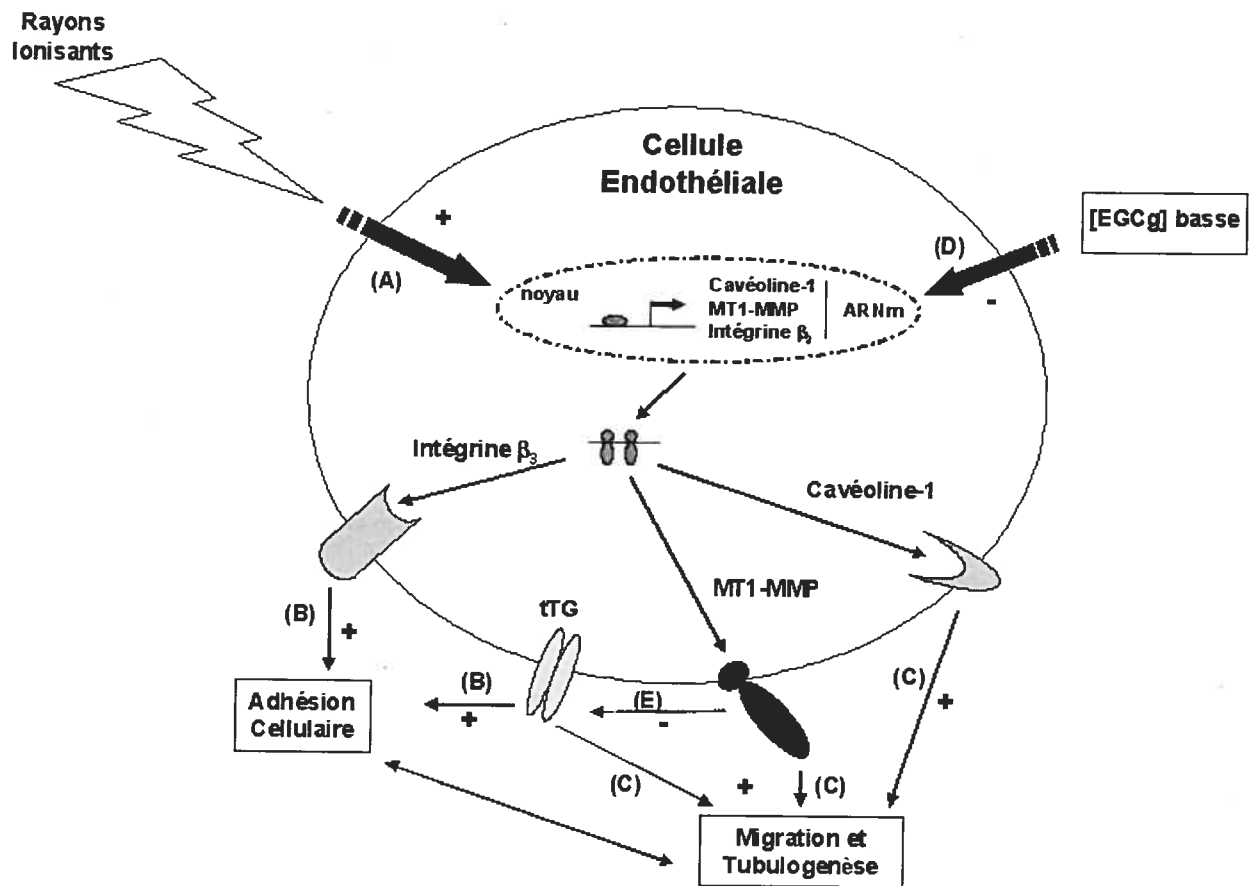


Fig 5.1. Effets cellulaires et moléculaires de l'irradiation et de l'EGCg sur les cellules endothéliales.

Les effets de l'irradiation et de l'EGCg sur le phénotype angiogénique des cellules endothéliales pourraient donc être expliqués de la façon suivante (Fig 5.1). L'irradiation activerait des facteurs de transcription dans le noyau de la cellule endothéliale qui à leur tour induiraient l'expression génique des modulateurs angiogéniques comme la MT1-MMP, la cavéoline-1, et l'intégrine  $\beta_3$  (A). Une fois mises à la surface cellulaire, ces molécules augmenteraient l'adhésion (B) et ainsi la migration et la tubulogénèse par les cellules endothéliales (C). L'EGCg à une basse concentration antagoniserait les effets de l'irradiation sur l'expression des modulateurs angiogéniques (D), alors elle bloquerait l'adhésion cellulaire et donc la migration et la tubulogénèse par les cellules endothéliales. La hausse de la MT1-MMP par l'irradiation causerait le clivage et l'inactivation de la tTG à la surface cellulaire (E) et devrait en théorie interférer avec l'adhésion cellulaire à la MEC. Par contre, il est possible

qu'elle soit protégée du clivage par la fibronectine, ou qu'elle ne joue qu'un rôle secondaire dans cette fonction cellulaire par rapport à l'intégrine  $\beta 3$ .

## Chapitre 6

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

D'après l'ensemble de nos résultats et des études dans la littérature, nous pouvons conclure que les MSC possèdent des caractéristiques angiogéniques qui peuvent être régulées par l'hypoxie directement, ou indirectement par l'action des facteurs de croissance. Ces facteurs de croissance seraient multiples et influenceraient de façon autocrine et paracrine les propriétés angiogéniques et vasculogéniques des MSC. De plus, nous avons identifié plusieurs facteurs de croissance tels le b-FGF et la S-1-P, pouvant réguler ces propriétés.

Des évidences récentes attribuent à la HIF-1, la résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie (117, 118). La résistance des cancers à la chimiothérapie est basée sur des niveaux élevés de la protéine MDR-1 dans les cellules tumorales. Il faut noter que l'expression de MDR-1 est sous contrôle de la HIF-1. Compte tenu du rôle global de la HIF-1 dans l'angiogenèse tumorale et dans les fonctions des cellules cancéreuses, des traitements ciblant celle-ci permettraient de bloquer simultanément plusieurs mécanismes responsables pour la formation et même la progression tumorale. Il a été démontré que l'inhibition HIF-1 par knock-out bloque l'angiogenèse tumorale et donc le développement des tumeurs; l'expression de MDR-1 devrait aussi être atténuée en conséquence. Il serait donc intéressant d'explorer la possibilité de combiner des traitements anti-angiogéniques, anti-tumoraux et anti-HIF-1 pour augmenter l'efficacité des thérapies anti-cancer. En bref, HIF-1 est une cible thérapeutique potentiel majeure à considérer.

Enfin, l'activité de la MT1-MMP est indispensable pour le remodelage de la MEC et donc dans la manifestation de la migration et de la tubulogenèse des MSC en réponse à une condition d'hypoxie semblable à celle reflétant l'intérieur des masses tumorales.

Les MSC pourraient être recrutées dans la tumeur, et contribuer à sa vascularisation probablement par différenciation en des cellules endothéliales. D'ailleurs, on a constaté dans une autre étude que les MSC augmentent la vascularisation de la tumeur et qu'elles expriment CD31, un marqueur présent dans les cellules endothéliales, lorsque co-injectées avec des glioblastomes U87 de façon sous-cutanée dans des souris. De plus, elles répondent aux stimuli des milieux conditionnés isolés de diverses lignées de cellules endothéliales (105). Il est possible que les MSC contribuent à l'angiogenèse tumorale par différenciation en des fibroblastes ou en des



cellules musculaires lisses aussi. Les MSC pourraient donc participer dans l'établissement du réseau capillaire au sein de la tumeur, ou dans sa stabilisation. Ces propriétés angiogéniques pourraient avoir des répercussions dans la mise en place de thérapies utilisant des MSC.

Plusieurs approches thérapeutiques sont utilisées dans le traitement de divers cancers dont la chirurgie, la chimiothérapie, l'immunothérapie, la radiothérapie, et la thérapie génique entre autres. L'option thérapeutique à utiliser dépend de la nature, et du stade de la pathologie, puisque les différents cancers aux différents stades de développement peuvent être pathophysiologiquement différents et donc pas toutes répondraient de la même façon aux divers traitements de la maladie.

La thérapie génique constitue une nouvelle option thérapeutique consistant à transférer un gène dans un organisme malade pour réparer des défauts génétiques et ainsi le guérir. Cette technique implique deux éléments principaux, soit un gène et un vecteur pour le transporter vers une cellule cible. Cette approche pourrait s'avérer très utile pour le traitement des cancers aux tumeurs solides et permettrait de cibler spécifiquement les tumeurs et/ou les cellules endothéliales impliquées dans leurs vascularisation. Trois grandes stratégies pour la thérapie génique du cancer sont actuellement développées: la stimulation du système immunitaire, la manipulation des oncogènes et l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Une quatrième stratégie ciblant l'angiogenèse tumorale pourrait aussi être efficace dans l'éradication de la tumeur, car elle couperait l'approvisionnement des nutriments et de l'oxygène aux tumeurs en ciblant les réseaux capillaires tumoraux. Certaines études ont démontré l'efficacité antitumorale de l'angiostatine, un inhibiteur angiogénique physiologique, en agissant spécifiquement sur les cellules endothéliales (107, 108).

Les adénovirus modifiés sont souvent utilisés comme des vecteurs pour la thérapie génique. Nos données et d'autres études (119) soutiennent l'hypothèse que les MSC pourraient servir aussi comme vecteurs dans la thérapie génique contre les cancers. Nous suggérons que les MSC puissent s'infiltrer dans les masses tumorales, réguler la formation des réseaux capillaires et potentiellement y exprimer des gènes encodant des protéines anti-cancéreuses pour stimuler soit des réponses immunitaires, soit apoptotiques, soit anti-invasives contre les tumeurs, soit

même induire une régression des tumeurs en détruisant leurs réseaux capillaires et donc leur approvisionnement en nutriments et oxygène. Cependant, il serait important de bien coordonner le temps d'expression des gènes par les MSC uniquement une fois recrutées dans les tumeurs et non pas avant, car une manifestation trop tôt de ces traitements thérapeutiques pourraient agir sur les MSC et empêcherait leur infiltration dans la tumeur.

L'apparition des tumeurs secondaires suite au traitement d'une tumeur à la radiothérapie pourrait être expliquée par une augmentation du profil invasif de certaines lignées des cellules cancéreuses radio résistantes par l'irradiation. Dans cette étude nous avons démontré que l'irradiation à des doses sublétales induit la migration et la tubulogénèse des cellules endothéliales. Cela corrèle avec des études démontrant que l'irradiation augmente l'angiogénèse (110, 120). De cette façon, l'angiogénèse précéderait l'apparition des tumeurs secondaires. D'après nos observations et d'autres études, il est très probable que ce phénomène soit modulé par la cavéoline-1, la MT1-MMP et l'intégrine  $\beta 3$ .

La cavéoline-1 est souvent localisée dans des domaines membranaires riches en cholestérol, qui caractérisent les cavéoles. Il a été démontré que la MT1-MMP et l'intégrine  $\alpha \beta 3$  se localisent en partie dans ces mêmes domaines membranaires (35, 98). À la lumière de ces observations et de nos résultats, nous suggérons que les mécanismes moléculaires pouvant potentiellement réguler les effets de l'irradiation sur le phénotype angiogénique des cellules endothéliales pourraient impliquer des interactions entre la cavéoline-1, la MT1-MMP, et l'intégrine  $\alpha \beta 3$ . Ces molécules seraient donc des cibles moléculaires importantes dans le développement des thérapies contre l'angiogénèse tumorale. Une approche thérapeutique ciblant ces molécules devrait viser soit à inhiber leurs activités et leurs interactions, ou à diminuer leur expression génique dans les cellules endothéliales participant à la néovascularisation tumorale.

Que ce soit dans les MSC ou dans les cellules endothéliales, on rapporte l'importance de la MT1-MMP et du VEGF dans les propriétés angiogéniques induites par des conditions de stress cellulaire comme l'hypoxie ou l'irradiation. Ceci aurait des implications importantes dans l'efficacité des traitements anti-cancéreux puisque la MT1-MMP est non seulement indispensable pour le déroulement de l'angiogénèse, mais son activité est aussi important pour

les propriétés malignes des divers lignées cancéreuses (121, 122). De plus l'activation de la pro-MMP2 par la MT1-MMP (123) a été corrélée avec le potentiel invasif des tumeurs (124) et avec l'angiogenèse tumorale (34, 42). Il semble que le domaine catalytique extracellulaire seul serait important pour l'activation de la proMMP-2, tandis que la structure complète de cette protéine, c'est-à-dire les domaines extracellulaire, transmembranaire et cytosolique sont indispensables pour la transduction d'une voie de signalisation intracellulaire qui active ERK, une protéine kinase qui agit sur divers effecteurs pour réguler plusieurs fonctions cellulaires dont la prolifération et la migration (125). Le VEGF quant à lui a été identifié comme agent anti-apoptotique, et promoteur de la survie et la prolifération des cellules endothéliales et des cellules tumorales face à divers modes de traitement chimio ou radio thérapeutiques (126).

Plusieurs agents synthétiques ciblant ces molécules sont disponibles. Les inhibiteurs dérivés de l'hydroxamate par exemple comme l'ilomastat et le marimastat inhibent l'activité catalytique des MMPs (69). Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur de VEGF, VEGFR-2, comme le PTK787 (127) et le SU5416 (128) ont aussi des effets anti-tumoraux puissants. Cependant on suggère comme alternative à ces agents une approche nutrathérapeutique, par l'utilisation des agents naturels trouvés facilement dans les aliments qu'on consomme pour un traitement en synergie avec la radiothérapie ou autres agents anticancéreux. L'homme utilise depuis des millénaires des produits naturels possédant de propriétés médicales et donc a développé des mécanismes lui permettant de les métaboliser sans toxicité; ceci n'est pas souvent le cas pour les substances synthétiques. Donc, on suggère l'utilisation des agents naturels anti-angiogéniques à longue portée comme l'EGCg, que l'homme consomme sous forme de thé vert depuis 5000 ans, qui sert d'anti-oxidant, bloque la MT1-MMP au niveau de son expression génique ainsi que de son activité catalytique y compris l'activation de la proMMP-2 (123), et inhibe la signalisation du VEGF par l'intermédiaire de son récepteur VEGFR-2 (89, 91), en co-traitement avec des faibles doses d'irradiation, pour optimiser leur potentiel anti-cancéreux, tout en réduisant les effets secondaires. D'autres produits naturels ont aussi des potentiels anti-cancéreux intéressants. Par exemple, la curcumine, une composante de la poudre du curry est un puissant anti-oxidant, capable d'antagoniser la migration cellulaire des cellules endothéliales induite en inhibant l'expression des MMPs (129) et même l'angiogenèse *in vivo* (130). De plus, il a été démontré que la curcumine réduit la

production de VEGF (131) et induit l'apoptose dans des astrocytomes (132). Il s'agit aussi d'un produit naturel, et pourrait donc être potentiellement utilisée comme traitement anti-angiogénique et anti-cancéreux en conjonction avec la radiothérapie. Cependant ses mécanismes d'action sont beaucoup moins connus au niveau moléculaire que l'EGCg, il faudrait donc des études plus approfondies avant qu'elle puisse être utilisée dans ce genre de co-traitement. Nos travaux suggèrent que les protocoles présentement utilisés en radiothérapie devraient être ré-évalués et possiblement modifiés pour les optimiser dans le traitement contre le cancer.

En conclusion, les MSC pourraient s'avérer être très utiles et efficaces dans la thérapie génique anti-cancéreuse, étant donné leur habilité à être recrutées aux sites d'angiogenèse tumorale actifs et d'y interagir potentiellement avec les cellules tumorales et endothéliales formant le réseau vasculaire. Elles pourraient y délivrer des protéines recombinantes pour induire une réponse thérapeutique qui pourrait agir seule pour l'éradication des tumeurs ou en combinaison avec d'autres approches thérapeutiques comme la radiothérapie ou les traitements anti-angiogéniques pour optimiser leur efficacité. Des investigations plus approfondies pourraient éventuellement permettre de changer les paramètres des thérapies utilisées contre le cancer. Par exemple, en augmentant la dose des agents anti-angiogéniques ou en utilisant des substances de nature plus puissantes, on pourrait réduire les doses d'irradiation utilisées, et donc diminuer les effets nocifs de la radiothérapie sans perturber l'efficacité du traitement. On espère alors qu'un jour nos efforts permettront de sauver plus de vies contre le cancer.

## Chapitre 7

# **RÉFÉRENCES**

- 1) Scoazec J Y; *Ann Pathol* 2000, vol20 num 1:25-37 ; L'angiogenese tumorale.
- 2) Sclessinger J; *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):211-225 ; Cell signaling by receptor tyrosine kinases.
- 3) Dor Y, Porat R, Keshet E; *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jun;280(6):C1367-1374, Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis.
- 4) Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, Igarashi Y ; *Prostaglandins and other lipid mediators* Vol64 2001:107-122 ; Sphingosine-1-phosphate : synthesis and release.
- 5) Ortega N, Hutchings H, Plouet J; *Front Biosci*. 1999 ;4:D141-152; Signal relays in the VEGF system.
- 6) Koong A C, Denko N, Hudson K, et al; *Cancer Research* 2000(60): 883-887; Candidate Genes for the Hypoxic Tumor Phenotype.
- 7) Fang J, Shing Y, Moses M; *Cancer Research* 2001 (61):5731-5735; HIF-1 $\alpha$ -mediated Up-regulation of Vascular Endothelial Growth Factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis.
- 8) Mechtcheriakova D, Wlachos A, Holzmuller H, Binder B R, Hofer E; *Blood*. 1999 Jun 1; 93(11):3811-23; Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1.
- 9) Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, Buttrick PM, Cooper DR, Steinberg SF, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM; *J Biol Chem*. 1999 274(21):15030-15040; Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression.
- 10) Okada-Ban M, Thiery J P, Jouanneau J; *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 Mar 32(3):263-267; Fibroblast growth factor-2.
- 11) Pyne S, Pyne N J; *Biochem J* 2000 (349):385-402; Sphingosine-1-Phosphate signaling in mammalian cells.
- 12) Sternlicht M, Werb Z; *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001 (17):463-516; How Matrix Metalloproteinases regulate cell behavior.
- 13) *Human physiology : the mechanisms of body function* 5<sup>th</sup> Ed, 324-326; Arthur J. Vander, James H. Sherman, Dorothy S. Luciano; New York, McGraw-Hill, Montreal : c1990.
- 14) *Fundamental Cardiovascular and Pulmonary Physiology* 2<sup>nd</sup> Ed, 139-157; Jerry Franklin Green; Philadelphia: Lea & Febiger, 1987.
- 15) Michiels C, Arnould T, Remacle J; *Biochim et Biophys Acta* 2000, 1497:1-10; Endothelial cells responses to hypoxia : initiation of a cascade of cellular interactions.

- 16) Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL; *Cancer Res* 2003 63(5):1138-1143; Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1.
- 17) Fang J, Yan L, Shing Y, Moses MA; *Cancer Res* 2001 61(15):5731-5735; HIF-1 $\alpha$ -mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis.
- 18) Semenza G L; *Nat Rev Cancer* 2003, 3(10):721-732; Targeting HIF-1 for cancer therapy.
- 19) Belkin A M, Akimov SS, Zaritskaya L S, Ratnikov B I, Deryugina E I, Strongin A Y; *Jour Biol Chem* 2001 276:18415-18422; Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion.
- 20) Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA; *J Biol Chem*. 1999 274(32):22679-22685; Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium.
- 21) Hasan RN, Phukan S, Harada S; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 23(6):988-93. Epub 2003 Apr 10; Differential regulation of early growth response gene-1 expression by insulin and glucose in vascular endothelial cells.
- 22) Neuhaus T, Stier S, Totzke G, Gruenewald E, Fronhoffs S, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y D; *Cell Prolif*. 2003 36(2):75-86; Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation.
- 23) Huang R P, Yan F, Boynton A L; *Jour Cell Bioch* 1999 73:227-236; UV Irradiation Upregulates Egr-1 Expression at the transcriptional Level.
- 24) Murphy G, Willenbrock F; *Methods Enzymol* 248:496-510; Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases.
- 25) Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H; *Jour Biol Chem* 1989 264:393-401; Human fibroblast collagenase- $\alpha$ -macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian  $\alpha$ -macroglobulins.
- 26) Koike T, Vernon R B, Hamner M A, Sadoun E, Reed M J; *J Cell Biochem* 2002 86(4):748-758; MT1-MMP, but not secreted MMPs, influences the migration of human microvascular endothelial cells in 3-dimensional collagen gels.
- 27) Lafleur M A, Handsley M M, Knäuper V, Murphy G, Edwards D R; *J Cell Biochem* 2002 115:3427-3438; Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs).

- 28) Gálvez B G, Matías-Román S, Albar J P, Sánchez-Madrid F, Arroyo A G; *J Biol Chem* 2001 276(40):37491-37500; Membrane Type-1 metalloproteinase is activated during migration of Human Endothelial Cells and Modulates Endothelial Motility and Matrix Remodeling.
- 29) Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 97(8):4052-4057; Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I.
- 30) Itoh T, Ikeda T, Gomi H, Nakao S, Suzuki T, Itohara S; *J Biol Chem* 1997 272(36):22389-22392; Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice.
- 31) Massimino M L, Griffoni C, Spisni E, Toni M, Tomasi V; *Cellular Signaling* 2002 14:93-98; Involvement of caveolae and caveolae-like domains in signaling cell survival and angiogenesis. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP; *J Biol Chem* 1998 273(10):5419-5422; Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.
- 32) Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP; *J Biol Chem* 1998 273(10):5419-5422; Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.
- 33) Liu P, Rudick M, Anderson R G W; *J Biol Chem* 2002 277(44):41295-41298; Multiple functions of Caveolin-1.
- 34) Feng Y, Venema V J, Venema R C, Tsai N, Behzadian M A, Caldwell RB; *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 40(1):157-167; VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae.
- 35) Annabi B, Lachambre M, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Béliveau R; *Biochem J*. 2001 353(Pt 3):547-553; Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains.
- 36) Liu J, Wang X B, Park D S, Lisanti M P; *J Biol Chem* 2002 277(12):10661-10668; Caveolin-1 expression enhances capillary tubule formation.
- 37) Griffoni C, Spisni E, Santi S, Riccio M, Guarnieri T, Tomasi V; *Biochem Biophys Res Commun* 2000 276(2):756-761; Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo.
- 38) Iivanainen E, Kähäri V M, Heino J, Elenius K; *Micr Res and Tech* 2003 (60):13-22; Endothelial cell-matrix interactions.
- 39) Giancotti F G, Ruoslahti E; *Science* 1999 285:1028-1032; Integrin Signalling.



- 40) Van Der Flier A, Sonnenberg A; *Cell Tissue Res* 2001 305:285-298; Function and Interaction of integrins.
- 41) Brooks P C, Stromblad S, Sanders L C, Von Schalscha T L, Aimes R T, Stetler-Stevenson WG, Quigley J P, Cheresh D A; *Cell* 1996 85:683-693; Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha V beta 3.
- 42) Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F; *EMBO J* 1999 18:882-892; Role of the alpha V beta 3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2.
- 43) Ruoslahti E, Rajotte D; *Ann Rev Imm* 2000 (18):813-827; An address system in the vasculature of normal tissues and tumors.
- 44) Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X, Weber W, Simons B, Cook BP, Chartrand SD, Wang C, Madden SL, Teicher BA. *Cancer Res* 2003, 63(18):5866-5873. Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells.
- 45) Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH. *Angiogenesis* 2001, 4(2):91-102. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research.
- 46) Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. *J Invest Dermatol* 1992, 99(6):683-690. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line.
- 47) Loganadane LD, Vassy J, Legrand C, Fauvel-Lafeve F. *Cell Adhes Commun.* 1999;7(1):57-71. Transforming growth factor-beta 1 increases the adhesion of MDA-MB-231 mammary adenocarcinoma cells to the microvascular subendothelium.
- 48) Laferriere J, Houle F, Huot J. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 973:562-72. Regulation of the metastatic process by E-selectin and stress-activated protein kinase-2/p38.
- 49) Wenzel CT, Scher RL, Richtsmeier WJ. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995, 121(11):1279-1286. Adhesion of head and neck squamous cell carcinoma to endothelial cells: The missing links.
- 50) Price EA, Coombe DR, Murray JC. *Int J Cancer* 1996, 65(4):513-8. Endothelial CD44H mediates adhesion of a melanoma cell line to quiescent human endothelial cells in vitro.
- 51) Fonsatti E, Lamaj E, Coral S, Sigalotti L, Nardi G, Gasparollo A, Colombo MP, Altomonte M, Maio M. *Cancer Immunol Immunother* 1999, 48(2-3):132-138. In vitro analysis of the melanoma/endothelium interaction increasing the release of soluble intercellular adhesion molecule 1 by endothelial cells.

- 52) Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM; Blood 2001 98(9):2615-25; Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells.
- 53) Eliopoulos N, Al-Khalidi A, Beausejour CM, Momparler RL, Momparler LF, Galipeau J; Gene Ther 2002 9(7):452-462; Human cytidine deaminase as an ex vivo drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells.
- 54) Huss R, Lange C, Weissinger EM, Kolb HJ, Thalmeier K; Stem Cells 2000 18(4):252-260; Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics.
- 55) Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM; J Clin Invest. 2002 109(3):337-346; Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow.
- 56) Hombauer H, Minguell JJ; Br J Cancer. 2000 82(7):1290-1296; Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells.
- 57) Kerr J R F, Wyllie A H, Currie A R; Br J of Cancer 1972 26: 239-257; Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
- 58) Wyllie A H, Apoptosis and cell proliferation from Boehringer Mannheim 2<sup>nd</sup> Edition:V-VI; Cell death.
- 59) Thornberry NA, Lazebnik Y; Science. 1998 Aug 28;281(5381):1312-1316; Caspases: enemies within.
- 60) Ross GM; Endocrine-Related Cancer 1999 6:41-44; Induction of Cell Death by Radiotherapy.
- 61) Fine H, Dear K, Loeffler J, Black P, Canellos G; Cancer 1993 71:2585-2597; Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults.
- 62) Wild-Bode C, Weller M, Rimmer A, Dichgans J, Wick W; Canc Res 2001 61:2744-2750; Sublethal Irradiation Promotes Migration and Invasiveness of Glioma Cells: Implications for Radiotherapy of Human Glioblastoma.
- 63) Wick W, Wick A, Schulz J B, Dichgans J, Rodeman H P, Weller M; Canc Res 2002 62:1915-1919; Prevention of Irradiation-induced Glioma Cell Invasion by Temozolomide Involves Caspase 3 Activity and Cleavage of Focal Adhesion Kinase.
- 64) Qian L W, Mizumoto K, Urashima T, Nagai E, Maehara N, Sato N, Nakajima M, Tanaka M; Clijn Canc Res 2002 8:1223-1227; Radiation-Induced Increase in Invasive Potential of Human Pancreatic Cancer Cells and Its Blockade by a Matrix Metalloproteinase Inhibitor, CGS27023.

- 65) Camphaussen K, Moses M A, Beecken W D, Khan M K, Folkman J, O'Reilly M S; *Canc Res* 2001 61:2207-2211; Radiation Therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice.
- 66) Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R; *Science* 2003 300(5622):1155-1159; Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis.
- 67) Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly M S; *Nature* 1997 390:404-407; Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance.
- 68) Folkman J; *Nat Med* 1995 1:27-31; Angiogenesis in Cancer, Vascular Rheumatoid and other Diseases.
- 69) Burns F, Stack M S, Gray M S, Patterson C A; *Ophtalmol Vis Sci* 1989 30:1569-1575; Inhibition of purified collagenase from alkaline-burned rabbit corneas.
- 70) Greenwald R A, *Ann NY Acad Sci* 1994 732:181-198; Treatment of destructive arthritic disorders with MMP inhibitors, Potential role of Tetracyclins.
- 71) Izquierdo-Martin M, Stein R L; *Bioorg Med Chem* 1993 1:19-26; Mechanistic studies on the inhibition of Stromelysin by a peptide phosphoramidate.
- 72) Wojtowicz-Praga S M, Dickson R B, Hawkins M J; *Inv New Drugs* 15: 61-75; Matrix metalloproteinase inhibitors.
- 73) Brown F K, Brown P J, Bickett D M, Chambers C L, Davis H G, Deaton D N, Drewry D, Foley M, McElroy A B, Gregson M, McGeehan G M, Myers P L, Norton D, Salovich J M, Schoenen F J, Ward P; *J Med Chem* 1994 37:674-688; Matrix Metalloproteinase inhibitors containing a (carboxyalkyl) amino zinc ligand: modification of the P1 and P2 residues.
- 74) Gingras D, Batist G, Béliveau R; *Expert Rev Anticancer Ther* 2001 1(3):341-347; Æ-941(Neovastat): a novel multifunctional antiangiogenic compound.
- 75) Gingras D, Renaud A, Mousseau N, Beaulieu E, Kachra Z, Béliveau R; *Anticancer Res* 2001 21:145-155; Matrix Metalloproteinase inhibition by Æ-941, a multifunctional antiangiogenic compound.
- 76) Stetler-Stevenson W G, *Am J Path* 1996 148:1345-1350; Dynamics of matrix turnover during pathological remodeling of the extracellular matrix.
- 77) Stetler-Stevenson W G; *J Clin Inv* 1999 103 :1237-1241; Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention.

- 78) Béliveau R, Sirois P, Tranqui L et al, Proceedings of the 91<sup>st</sup> Meeting of the American Association for Cancer Research. San Francisco, CA, USA, 2000; Antiangiogenic agent  $\text{AE-941}$  induces in vivo and in vitro inhibition of VEGF.
- 79) Waltenberg J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C H; J Biol Chem 1994 269:26988-26995; Different signal transduction properties of KDR and Flt 1, two receptors for Vascular Endothelial Growth Factor.
- 80) Rousseau S, Houle F, Kotanides H et al; Jour Biol Chem 2000 275: 10661-10672; Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR-2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase.
- 81) Gerber H P, McMurtrey A, Kowaski J et al; Jour Biol Chem 1998 375: 30336-30343; Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway: Requirement for Flk-1/KDR activation.
- 82) Gingras D, Mousseau N, Gaumont-Leclerc M F, Béliveau R; Proceedings of the 92<sup>nd</sup> Meeting of the American Association for Cancer Research;  $\text{AE-941}$  (Neovastat) induces endothelial cell apoptosis through activation of caspase-3 activity.
- 83) Berger F, Jourdes P, Benabid A L; Proceedings of the 36<sup>th</sup> Meeting of the American Society of Clinical Oncology San Francisco, CA, USA, 2001;  $\text{AE-941}$  (Neovastat) induces the expression of angiostatin in experimental glioma.
- 84) McCulloch PG, Ochiai A, O'Dowd GM, Nash JR, Sasako M, Hirohashi S; Cancer. 1995 75(4):920-925; Comparison of the molecular genetics of c-erb-B2 and p53 expression in stomach cancer in Britain and Japan.
- 85) Inoue M, Tajima K, Hirose K, Hamajima N, Takezaki T, Kuroishi T, Tominaga S; Cancer Causes Control 1998 9(2):209-216; Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: data from a comparative case-referent study in Japan.
- 86) Inoue M, Tajima K, Mizutani M, Iwata H, Iwase T, Miura S, Hirose K, Hamajima N, Tominaga S; Cancer Lett. 2001 167(2):175-182; Regular consumption of green tea and the risk of breast cancer recurrence: follow-up study from the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC), Japan.
- 87) Bushman J L; Nutr Cancer 1998 3:151-159; Green tea and cancer in humans: a review of the literature.
- 88) Katiyar SK, Mohan RR, Agarwal R, Mukhtar H; Carcinogenesis. 1997 18(3):497-502; Protection against induction of mouse skin papillomas with low and high risk of conversion to malignancy by green tea polyphenols.

- 89) Demeule M, Michaud-Levesque J, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J, Lamy S, Bertrand Y, Béliveau R; *Curr Med Chem – Anti-Cancer Agents* 2002 2:441-463; Green Tea Catechins as Novel Antitumor and Antiangiogenic Compounds.
- 90) Chung J Y, Huang C, Meng X, Dong Z, Yang C S; *Cancer Res* 1999 59(18):4610-4617; Inhibition of activator protein 1 activity and cell growth by purified green tea and black tea polyphenols in H-ras-transformed cells: structure-activity relationship and mechanisms involved.
- 91) Lamy S, Gingras D, Béliveau R; *Cancer Res.* 2002 Jan 15;62(2):381-385; Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation.
- 92) Barthelman M, Bair WB 3rd, Stickland KK, Chen W, Timmermann BN, Valcic S, Dong Z, Bowden GT; *Carcinogenesis* 1998 19(12):2201-2204; (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity.
- 93) Chen W, Dong Z, Valcic S, Timmermann BN, Bowden GT; *Mol Carcinog.* 1999 24(2):79-84; Inhibition of ultraviolet B-induced c-fos gene expression and p38 mitogen-activated protein kinase activation by (-)-epigallocatechin gallate in a human keratinocyte cell line.
- 94) Nomura M, Ma W Y, Huang C, Yang C S, Bowden GT, Miyamoto K, Dong Z; *Mol Carcinog.* 2000 28(3):148-155; Inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activation by theaflavins from black tea.
- 95) Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Béliveau R; *Biochim Biophys Acta* 2000 1478(1):51-60; Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins.
- 96) Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Béliveau R; *Biochim Biophys Acta.* 2002 1542(1-3):209-20; Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells.
- 97) Curran WJ; *Oncology* 2002 63 Suppl 2:29-38; New chemotherapeutic agents: update of major chemoradiation trials in solid tumors.
- 98) Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski D H, Staba MJ, Stellato KA, Bigelow K, Heimann R, Gately S, Dhanabal M, Soff GA, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR; *Nature* 1998 394(6690):287-291; Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy.
- 99) Griscelli F, Li H, Cheong C, Opolon P, Bennaceur-Griscelli A, Vassal G, Soria J, Soria C, Lu H, Perricaudet M, Yeh P; *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 97(12):6698-6703; Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model.
- 100) Annabi B, Naud E, Lee Y T, Bousquet-Gagnon N, Eliopoulos N, Galipeau J, Béliveau R. *Biochem et Biophys Acta* 2003, submitted.

- 101) Malonne H, Langer I, Kiss R; Clin Exp Metastasis 1999 17:1-14; Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors.
- 102) Wang D, Mayo MW, Baldwin AS Jr; Oncogene 1997 14(19):2291-2299; Basic fibroblast growth factor transcriptional autoregulation requires EGR-1.
- 103) Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ. Cancer Res 2000 60(4):883-887. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype.
- 104) Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, Buttrick PM, Cooper DR, Steinberg SF, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM. J Biol Chem. 1999 274(21):15030-15040. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression.
- 105) Annabi B, Thibeault S, Lee YT, Bousquet-Gagnon N, Eliopoulos N, Barrette S, Galipeau J, Béliveau R; Exp Hematol 2003 31(7):640-649; Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. Lee S H, Schloss D J, Swain J L; J Biol Chem 2000 275(43):33679-33687; Maintenance of vascular integrity in the embryo requires signaling through the fibroblast growth factor receptor.
- 106) Velazquez O C, Snyder R, Liu Z J, Fairman R M, Herlyn M; FASEB J 2002 16(10):1316-1318; Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks.
- 107) Dennis J E, Charbord P; Stem Cells 2002 20(3):205-214; Origin and differentiation of human and murine stroma.
- 108) Michiels C, De Leener F, Arnould T, Dieu M, Remacle J; Exp Cell Res 1994 213(1):43-54; Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: role of prostaglandins and bFGF.
- 109) Coulombel L; Médecine Sciences 2003 19:683-694; Cellules souches tissulaires adultes:seeing is not being.
- 110) Hast J, Schiffer IB, Neugebauer B, Teichman E, Schreiber W, Brieger J, Kim D W, Gebhard S, Born C J, Strugala M, Sagemuller J, Brenner W, Mann W J, Oesch F, Thelen M, Hengstler JG; Anticancer Res. 2002 22(2A):677-688; Angiogenesis and fibroblast proliferation precede formation of recurrent tumors after radiation therapy in nude mice.
- 111) Sonveaux P, Brouet A, Havaux X, Grégoire V, Dessy C, Balligand J L, Feron O; Cancer Research 2003 63:4145-1019. Irradiation-induced angiogenesis through the up-regulation of the nitric oxide pathway.

- 112) Ishii Y, Ogura T, Tatemichi M, Fujisawa H, Otsuka F, Esumi H; *Int J Cancer* 2003 103:161-168; Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cells.
- 113) Novaro V, Colman-Lerner A, Vadillo-Ortega F V, Jawerbaum A, Paz D, Lo Nostro F, Pustovrh C, Gimeno M F, González E; *Reprod Fertil Dev* 2001 13:411-420; Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture.
- 114) Gorski D H, Mauceri H J, Slloum R M, Halpern A, Seetharam S, Weichselbaum R R; *Canc Res* 2003 63:308-311; Prolonged treatment with angiostatin reduces metastatic burden during radiation therapy.
- 115) Heckmann M, Dowes K, Peter R; *Exp Cell Res* 1998 235:148-154; Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation.
- 116) Akimov SS, Belkin AM; *Blood* 2001 98(5):1567-1576; Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin.
- 117) Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH. *Oncogene* 2003 22(21):3213-3220. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy.
- 118) Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. *Cancer Res* 2001 61(7):2911-1916. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer.
- 119) Gunsilius E; *Jour of Hematotherapy and Stem Cell research* 2002 11:153-155; An hematotherapist's point of view.
- 120) Mirsky N, Krispel Y, Shoshany Y, Maltz L, Oron U; *Antioxidants and redox Signaling* 2002 4(5):785-790; Promotion of Angiogenesis by Low Energy Laser Irradiation.
- 121) Sato H, Okada Y, Seiki M; *Thromb Haemost* 1997 78:497-500; Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion.
- 122) Belien A T, Paganetti P A, Schwab M E; *J Cell Biol* 1999 144:373-384; Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter.
- 123) Dell'Aica I, Dona M, Sartor L, Pezzato E, Garbisa S; *Lab Invest* 2002 82(12):1685-1693; (-)-Epigallocatechin-3-gallate directly inhibits MT1-MMP activity, leading to accumulation of nonactivated MMP-2 at the cell surface.
- 124) Egeblad M, Werb Z; *Nat Reviews (Cancer)* 2002 2:161-174; New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.

- 125) Gingras D, Bousquet-Gagnon N, Langlois S, Lachambre M P, Annabi B, Béliveau R; FEBS letters 2001 507:231-236; Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 metalloproteinase (MT1-MMP).
- 126) Harmey J, Bouchier-Hayes D; Bioessays 2002 24:280-283; Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumor cells: implications for anti-angiogenic therapy.
- 127) Hess C, Vuong V, Hegyi I, Riesterer O, Wood J, Fabbro D, Glanzmann C, Bodis S, Pruschy M; Br J Cancer 2001 85(12):2010-2016; Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth.
- 128) Ning S, Laird D, Cherrington J M, Knox S J; Radiat Res 2002 157:45-51; The anti angiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation.
- 129) Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo L A, Pham BQ, Kasahara N, Raizman M B, Fini M E; J Biol Chem 2000 275(14):10405-10412; Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B.
- 130) Arbiser J L, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang M T, Fisher C, Flynn E, Byers H R; Mol Med 1998 4(6):376-383; Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis.
- 131) Gururaj A E, Belekavadi M, Venkatesh D A, Marmé D, Salimath B P; Biochem Biophys Res Comm 2002 297:934-942; Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin.
- 132) Suman P, Tathagata C, Sreya C, Arindam B, Goutam K D, Tanya D, Gaurisankar S A; Biochem Biophys Res Comm 2001 288:658-665; Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells.



## Chapitre 8

### **ANNEXE**

## Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells

Borhane Annabi<sup>a</sup>, Sébastien Thibeault<sup>a</sup>, Ying-Ta Lee<sup>a</sup>,  
Nathalie Bousquet-Gagnon<sup>a</sup>, Nicoletta Eliopoulos<sup>b</sup>, Stéphane Barrette<sup>c</sup>,  
Jacques Galipeau<sup>b</sup>, and Richard Béliveau<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Médecine Moléculaire and <sup>c</sup>Division of Hematology-Oncology, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine and Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada; <sup>b</sup>Department of Medicine, Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Quebec, Canada

(Received 11 February 2003; revised 24 March 2003; accepted 31 March 2003)

**Objective.** Bone marrow-derived stromal cells (MSC) are able to acquire histological and immunophenotypic characteristics consistent with endothelial cells (EC). In this study we examined the effect of sphingosine-1-phosphate (S1P), a platelet-derived bioactive lysophospholipid that is believed to specifically stimulate EC migration and tube formation, on the angiogenic properties of MSC.

**Methods.** MSC were isolated from murine bone marrow and cultured in the presence of diverse angiogenic growth factors. Using a chemotaxis chamber and Matrigel tubulogenesis assay, we measured the extent of MSC migration and capillary-like structure formation. Western blots and zymography were used to assess the levels and activation states of soluble and membrane-bound matrix metalloproteinase (MMP).

**Results.** We found that S1P strongly induced MSC migration and *in vitro* capillary-like structure formation. Ilomastat, a broad-spectrum MMP inhibitor, antagonized several angiogenic and S1P-mediated events in MSC. These included 1) the inhibition of S1P-induced tube formation, 2) the inhibition of concanavalin-A (Con-A)-mediated proMMP-2 activation, and 3) the inhibition of S1P- and Con-A-induced caspase-3 activity. Moreover, S1P induced membrane type-1 (MT1)-MMP mRNA and protein expression, but paradoxically antagonized its cell surface proteolytic processing. In addition, anti-angiogenic agents such as Ilomastat, Neovastat, and green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate antagonized the S1P-induced migration of MSC as well as that of transfected COS-7 cells overexpressing the recombinant receptor for S1P, EDG-1.

**Conclusion.** Collectively, our results indicate a crucial role for S1P/EDG-1-mediated angiogenic and survival events in the regulation of microvascular network remodeling by MSC, and may provide a new molecular link between hemostasis and angiogenesis processes. © 2003 International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Inc.

The potential use of bone marrow-derived stromal cells (MSC) as a platform for the systemic delivery of therapeutic recombinant proteins *in vivo* following gene transfer has been the focus of much attention [1–3]. Several clinical applications of MSC involve their intravenous administration, which implies that these circulating systemically infused

cells have to respond to serum-derived cues that will direct their ultimate biodistribution [4,5]. MSC have the potential to differentiate along different mesenchymal lineages that include osteocytes, chondrocytes, tenocytes, adipocytes, and smooth muscle cells [6]. Recent data, however, suggest that these pluripotent stem cells can also differentiate into and adopt an endothelial cell (EC)-like phenotype functionally related to vascular structures *in vivo* [7–9] that should enable them to be regulated by circulating angiogenic growth factors. The angiogenic properties of systemically-infused MSC in response to hematopoietic growth factors have, however, so far received little attention.

Offprint requests to: Richard Béliveau, Ph.D. Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 1P3; E-mail: oncomol@nobel.si.uqam.ca

Aside from pro-angiogenic peptides such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and members of the fibroblast growth factor (FGF) family, a number of other circulating stimuli are also known to regulate angiogenesis [10]. Human serum was recently shown to possess abundant EC chemoattractive activity that can be traced almost exclusively to its content of sphingosine-1-phosphate (S1P), a platelet-derived bioactive lysophospholipid [11]. S1P is secreted by stimulated platelets and macrophages as well as by some types of tumor cells, and has been recently shown to strongly stimulate both EC migration and cell wound healing [12]. The molecular mechanisms involved in S1P-induced angiogenic responses are not fully understood. It is, however, clear that one mechanism by which S1P acts is via interaction with plasma membrane-localized G-protein-coupled receptors of the endothelial differentiation gene (EDG) family (EDG-1, -3, -5, -6, and -8) [13]. EDG-1, for instance, was shown to be required for blood vessel formation [14] and to regulate cell migration during vertebrate heart development through sphingolipid signaling [15]. More recently, invasion of primitive hematopoietic cells into stromal cell layers was also shown to be triggered by S1P [16].

The purpose of the present study was to identify early molecular events that may regulate MSC mobilization in response to hematopoietic growth factors. As activated platelets or blood cells secrete S1P, we specifically evaluated the role of S1P and of its receptor EDG-1 on the angiogenic properties of MSC including matrix metalloproteinase (MMP)-mediated extracellular matrix (ECM) degradation, cell migration, and 3D-capillary-like structure formation. We also provide evidence for the involvement of the S1P receptor EDG-1 in response to anti-angiogenic agents and propose a complex interplay between MMP and S1P activities in MSC.

## Materials and methods

### Materials

Agarose, concanavalin-A (Con-A), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCg), gelatin, lysophosphatidic acid (LPA), sphingosine-1-phosphate (S1P), and thalidomide were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ilomastat (GM-6001) was from BIOMOL (Plymouth Meeting, PA, USA), Matrigel was from Becton-Dickinson Labware (Bedford, MA, USA), b-FGF and human recombinant VEGF were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), the TriZOL reagent was from Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). The anti-MT1-MMP polyclonal antibody AB-815 (raised against the hinge domain) was from Chemicon (Temecula, CA, USA). Neovastat was from Aeterna (Quebec City, Quebec, Canada).

### Cell culture and media

The COS-7 and NIH 3T3 cell lines were purchased from ATCC and maintained in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 2 mM glutamine, 100 units/mL

penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, and were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Bone marrow-derived stromal cells (MSC) were isolated from mouse bone marrow and cultured as previously described [17]. Whole bone marrow was harvested from the femurs and tibias of 18- to 22-g female C57Bl/6 mice (Charles River, Laprairie, Quebec, Canada) sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation. Cells were plated in high-glucose DMEM supplemented with 10% FBS and 50 units/mL penicillin/streptomycin. After 5 to 7 days of incubation in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, the nonadherent hematopoietic cells were discarded. The adherent MSC were further maintained in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in the absence of any exogenous growth factor or anchoring materials such as fibronectin or collagen. MSC were kept subconfluent and expanded in number over 14 passages by a 1:2 split on a weekly basis. In vitro culture-expanded adherent MSC were uniformly fibroblast-like in appearance. 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). Progeny derived from this population were utilized for all subsequent analysis. Green fluorescent retrovirally-transduced MSC were generated and culture expanded as previously described [18].

### Cell migration assay

Cells were dislodged after brief trypsinization, washed extensively, and resuspended in DMEM at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/mL. Cells (7 × 10<sup>5</sup>) were then dispersed onto 0.5% gelatin/phosphate-buffered saline (PBS)-coated chemotaxis filters (Costar, Amherst, MA, USA; 8-µm pore size) within Boyden chamber inserts and were challenged by the addition of 600 µL of a chemoattractant solution to the lower compartments. Migration proceeded for 3 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells that had migrated to the lower surface of the filters were fixed with 10% formalin phosphate, colored with 0.1% crystal violet/20% MeOH, and counted by microscopic examination. The average number of migrating cells per field was assessed by counting at least four random fields per filter using the Northern Eclipse software. Data points indicate the mean obtained from three separate chambers within one representative experiment.

### Capillary-like structure formation assay

Aliquots (50 µL) of Matrigel were plated into individual wells of 96-well tissue culture plates (Costar) and allowed to polymerize at 37°C. Cells were dislodged as described in the cell migration assay (above). Into each culture well was added 100 µL of cell suspension (10<sup>5</sup> cells) with or without additional test substances, which were then incubated for 16 to 18 hours at 37°C. Each dose of control or test compound was assayed in duplicate and all experiments were performed at least three times.

### Fluorimetric caspase-3 activity assay

Cells were grown to about 80% confluence in 6-well dishes and treated for 16 to 18 hours with Con-A, S1P, LPA, or Ilomastat. After treatment, cells were collected and washed in ice-cold PBS, pH 7.0. Cells were lysed in Apo-Alert lysis buffer (Clontech, Palo Alto, CA, USA) for 1 hour at 4°C, and the lysates were clarified by centrifugation at 16,000g for 20 minutes. Caspase-3 activity was determined by incubation with 50 µM caspase-3-specific fluorogenic peptide substrate acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC) in assay buffer (50 mM

Hepes-NaOH [pH 7.4], 100 mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 5 mM DTT, and 1 mM EDTA) in 96-well plates. The release of AFC was monitored for at least 30 minutes at 37°C on a fluorescence plate reader (Molecular Dynamics, Albertville, MI, USA) ( $\lambda_{ex} = 400$  nm,  $\lambda_{em} = 505$  nm).

#### Total RNA isolation and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA was extracted from monolayer cultured cells using the TriZOL reagent. One microgram of total RNA was used for first-strand cDNA synthesis followed by specific gene product amplification with the One-Step RT-PCR kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Primers for EDG-1 (forward: 5'-GTCCGGCATTACAACACTACAC-3', reverse: 5'-TATAGTGCTTGTGGTAGAGC-3') and MT1-MMP (forward: 5'-ATCGATACAGCTCTCTCTGG-3', reverse: 5'-GTCAAGACTTCATCGCTGCC-3') were derived from murine sequences, and PCR conditions optimized so that the gene products were found to be at the exponential phase of the amplification (MT1-MMP: 94°C for 5 minutes and run for 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute, followed by 10 minutes elongation at 72°C; EDG-1: same as for MT1-MMP except that 58°C was used for annealing).  $\beta$ -actin was used as an internal control. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels containing 1  $\mu$ g/mL ethidium bromide.

#### Immunoblotting procedures

Proteins from control and treated cells were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked overnight at 4°C with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM Tris,

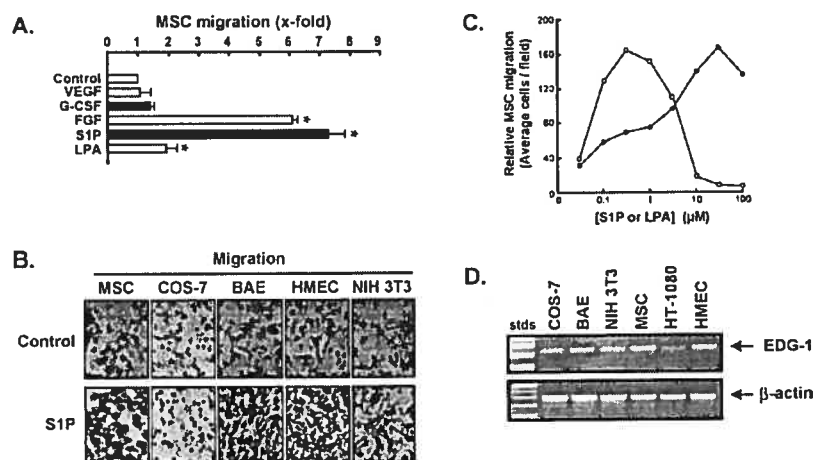
20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween 20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin, followed by a 1-hour incubation with horseradish peroxidase–conjugated anti-rabbit IgG (1/10,000 dilution) in TBST containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, Quebec, Canada).

#### Gelatin zymography

Gelatinolytic activity in culture media from monolayer cultures was detected by gelatin zymography as described previously [19]. Briefly, an aliquot (30  $\mu$ L) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE containing 0.1 mg/mL gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in ddH<sub>2</sub>O. The gels were further incubated at 37°C for 20 hours in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H<sub>2</sub>O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

#### Transfection methods

A plasmid EDG-1-GFP chimera, generated by fusing the Myc epitope-tagged EDG-1 to the NH<sub>2</sub> terminus of GFP by PCR using the Myc-tagged EDG1 cDNA as the template, was used [20]. COS-7 cells were transiently transfected with Myc-GFP-EDG-1 with the use of the nonliposomal formulation FUGENE-6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada). Transfection efficiency was confirmed by fluorescence microscopy. All experiments involving these cells were performed 36 hours following transfection. Mock transfections of COS-7 cultures with pcDNA (3.1+) expression vector alone were used as controls.



**Figure 1.** Sphingosine-1-phosphate is the most potent growth factor to induce cell migration in MSC and differentiated endothelial cell lines. (A): MSC were seeded on gelatin-coated filters and allowed to migrate for 3 hours in the presence of 10 ng/mL VEGF, 1 ng/mL b-FGF, 300 ng/mL G-CSF, 1  $\mu$ M S1P, or 1  $\mu$ M LPA. Cells that had migrated were counted as described in the Methods section. \* indicates statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) compared with the control (serum-free medium) using Student's *t*-test. (B): Representative staining of the filters on which MSC, epithelial COS-7, bovine aortic endothelial (BAE), human microvascular endothelial (HMEC), and murine fibroblast NIH 3T3 cells had migrated in response to 1  $\mu$ M S1P. Note that differentiated EC (BAE and HMEC) had a strong migration similar to MSC. (C): MSC migration was assessed in the presence of varying concentrations of either sphingosine-1-phosphate (S1P, open circles) or lysophosphatidic acid (LPA, closed circles) in the lower chamber as described in the Methods section. A representative migration profile is shown. (D): Total RNA was isolated from several cell lines and EDG-1 (546 bp) and  $\beta$ -actin (324 bp) cDNA amplified using RT-PCR as described in the Methods section and resolved on agarose gels. Note that the EDG-1 transcript levels are higher in MSC and differentiated EC.

## Results

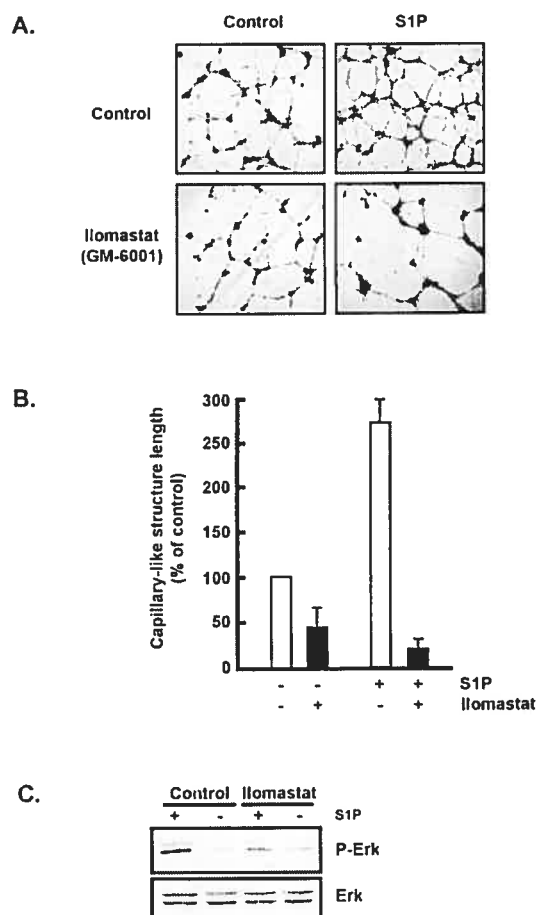
### *Sphingosine-1-phosphate specifically induces MSC migration*

We used modified Boyden chambers to examine MSC migration in response to chemotactic pro-angiogenic growth factors. These included vascular endothelial growth factor (VEGF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), S1P, and lysophosphatidic acid (LPA). MSC migration was induced by sixfold when b-FGF was used as chemoattractant, 7.5-fold by S1P, and twofold by LPA (Fig. 1A). However, VEGF and G-CSF did not significantly induce MSC migration. The migratory potential of several other cell lines was further assessed in response to S1P. Interestingly, S1P induced a marked increase in the migration of bovine aortic (BAEC) and human microvascular (HMEC) EC as well as in MSC, whereas it had virtually no effect on non-EC lines such as kidney epithelial (COS-7) or murine fibroblast (NIH 3T3) cell lines (Fig. 1B). This robust effect of S1P in MSC prompted us to investigate the effect of LPA, another potent lipid growth factor, on cell migration in order to identify the subclass of endothelial differentiation gene (EDG) receptor family involved. A dose-response curve to LPA and S1P was thus performed and MSC migration induction was found shifted from 0.3 to 1  $\mu$ M for S1P towards higher concentrations (30  $\mu$ M) when LPA was added as a chemoattractant (Fig. 1C). This suggests that members of the EDG family known to specifically bind S1P (i.e., EDG-1, -3, -5, -6, and -8) may transduce intracellular signals leading to increased MSC migration. Although not all EDG gene expression levels were assessed, we show that high levels of the EDG-1 transcript may in part account for the S1P-induced MSC migration. Moreover, the EDG-1 gene seems to be ubiquitously expressed in cell lines such as COS-7, NIH 3T3, or fibrosarcoma HT-1080 (Fig. 1D), and its gene expression is increased in differentiated EC such as BAEC and HMEC, and in undifferentiated MSC. This observation suggests that MSC may share with differentiated EC some common S1P/EDG-mediated regulation of angiogenic cellular and molecular processes.

### *MSCs' capillary-like structure formation ability is induced by sphingosine-1-phosphate and is dependent on matrix metalloproteinase activity*

We have observed that MSC 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 [21]. We thus examined whether MSC capillary tube formation could also be regulated by S1P on a 3D-Matrigel basement membrane model. This reconstituted basement membrane is known to contain several endogenous growth factors, such as transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , EGF, b-FGF, and PDGF,

which influence cellular network formation [22]. Capillary-like network formation was observed when MSC were plated on Matrigel and this process was found to be significantly induced  $\sim$ 2.5-fold by S1P (Fig. 2A). In order to further define the role of MMPs in the S1P-induced capillary-like structure formation ability of MSC, Ilomastat, a broad-spectrum MMP inhibitor [23], was used. We observed that the formation of basal MSC capillary-like structures was inhibited by 53% when MSC were treated with Ilomastat alone (Fig. 2B). Interestingly, S1P-treated MSC were unable to overcome the inhibitory effect of Ilomastat. Furthermore,



**Figure 2.** MSCs' capillary-like structure formation on a 3D-Matrigel basement membrane model is triggered by sphingosine-1-phosphate and is dependent on matrix metalloproteinase activity. (A): MSC were seeded on Matrigel in the presence of 1  $\mu$ M S1P, 20  $\mu$ M Ilomastat, or a combination of both agents in serum-free media, and incubated for 18 hours at 37°C as described in the Methods section. (B): For quantitation of tube formation, the total length of the tubes formed in a unit area was digitized and measured using the ECLIPSE software program. For each test, five randomly chosen areas were measured and averaged. \* indicates statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) compared with the control untreated MSC using Student's *t*-test. (C): MSC homogenates were isolated from Matrigel and 20  $\mu$ g of proteins loaded on 12% SDS gels. The extent of total ERK and ERK phosphorylation was assessed by Western blotting and immunodetection.

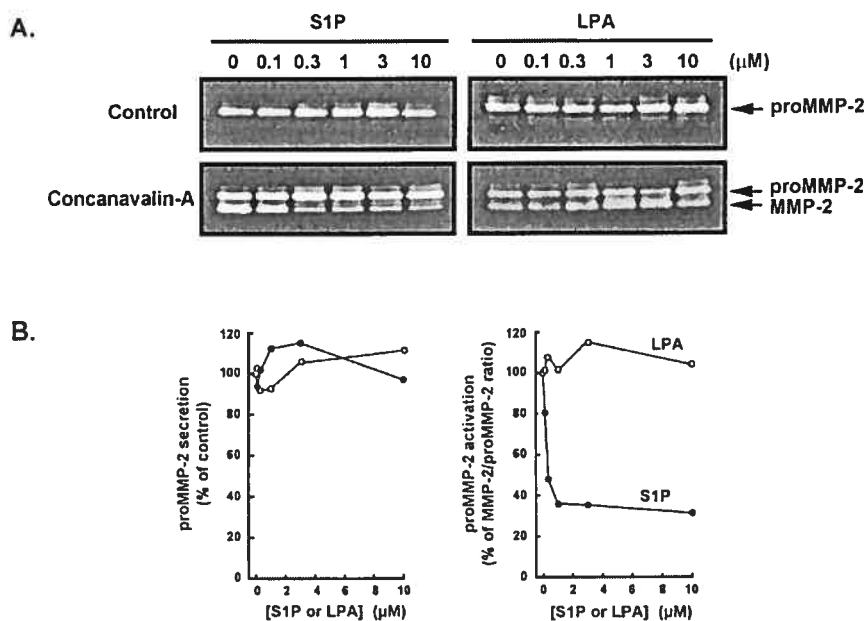
MSC homogenates were isolated from Matrigel and the extent of S1P/EDG-mediated ERK phosphorylation assessed by Western blot analysis. We observed that S1P strongly induced the phosphorylation of ERK in MSC, and that Ilo-mastat significantly antagonized that effect (Fig. 2C). This suggests that MMP inhibition directly affects the S1P/EDG intracellular signaling pathway.

*Latent proMMP-2 activation but not secretion is specifically antagonized by sphingosine-1-phosphate in MSC*

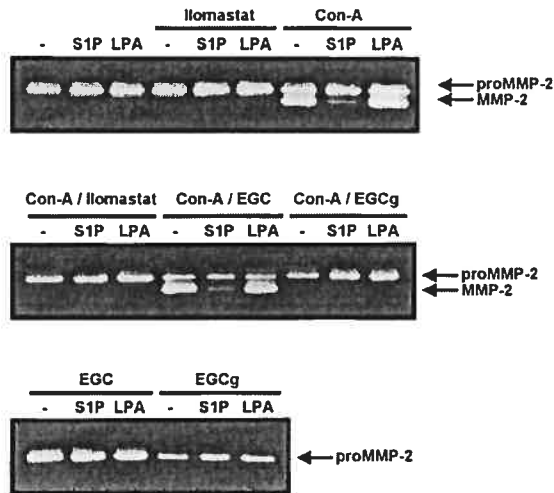
To gain further understanding on MMP-mediated events in MSC, we treated MSC with concanavalin (Con)-A, the most widely studied inducer of MT1-MMP-dependent proMMP-2 activation [24–26]. MSC were serum starved for 18 hours and the secretion of proMMP-2 into the culture media was assessed by zymography. While proMMP-2 secretion was unaffected by either S1P or LPA (Fig. 3A, upper panels; Fig. 3B, left panel), a dose-dependent inhibition of Con-A-induced proMMP-2 activation was observed with S1P but not with LPA (Fig. 3A, lower panels). Although complete inhibition of proMMP-2 activation by S1P was not attained, densitometric analysis of the extent of gelatin degradation enabled us to show that most of the S1P-mediated inhibition occurred at concentrations between 0.3 and 1  $\mu$ M (Fig. 3B, right panel), similar to the concentrations at which S1P had a maximal effect on MSC migration. To further assess the

specific MMP-dependent character of the S1P-transduced effects, we treated MSC with MMP inhibitors such as Ilo-mastat or the naturally occurring green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCg), which we recently reported to possess anti-angiogenic as well as anti-MMP activity [27,28]. We observed that both Ilo-mastat and epigallocatechin (EGC) had no effect on proMMP-2 secretion (Fig. 4, upper and lower panels), while EGCg inhibited proMMP-2 secretion in MSC (Fig. 4, lower panel) in agreement with its previously reported effect in U-87 glioma cells [29]. Interestingly, while EGC had no effects on Con-A-induced proMMP-2 activation, both Ilo-mastat and EGCg strongly antagonized the global Con-A effect whether or not MSC were cotreated with S1P or LPA (Fig. 4, middle panel). The residual MMP-2 activity, which remained after S1P-mediated inhibition of proMMP-2 activation, was further inhibited by the concomitant action of both Ilo-mastat and EGCg (Fig. 4, middle panel). Altogether, these observations specifically link the effects of S1P-mediated events to MT1-MMP-dependent functions involved either in ECM degradation or latent proMMP-2 activation.

*Sphingosine-1-phosphate specifically antagonizes concanavalin-A-mediated MT1-MMP cell surface expression and proteolytic processing in MSC*  
Since MT1-MMP-dependent events appear to be regulated by S1P, we treated MSC with Con-A in the presence of S1P



**Figure 3.** Pro-MMP-2 activation, but not secretion, is specifically antagonized by S1P. (A): MSC were treated with varying concentrations of S1P or LPA for 18 hours at 37°C in the presence of 15  $\mu$ g/mL Con-A as described in the Methods section. Twenty- $\mu$ L aliquots of the conditioned media were used to perform the gelatine-zymography. (B): A representative densitometric measurement was performed. ProMMP-2 secretion (left panel) from MSC in the presence of S1P (closed circles) or LPA (open circles) was not affected, while proMMP-2 activation by Con-A in MSC (right panel) is inhibited by increasing concentrations of S1P but not by LPA.

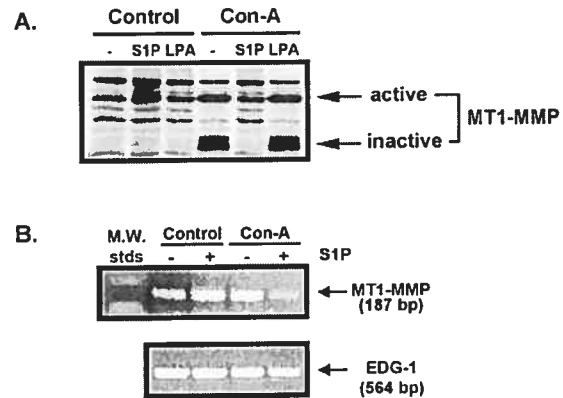


**Figure 4.** Effects of Ilomastat or green tea-derived polyphenol MMP inhibitors on proMMP-2 activation. MSC were serum-starved in the presence or absence of the indicated agents for 18 hours at 37°C. ProMMP-2 in the conditioned media was measured by gelatin zymography. Ilomastat (20  $\mu$ M) and EGCg (10  $\mu$ M) antagonized Con-A-induced proMMP-2 activation. S1P (1  $\mu$ M) but not LPA (1  $\mu$ M) also antagonized proMMP-2 activation.

or LPA. Protein electrophoresis was performed with cell lysates, followed by Western blotting and immunodetection using a MT1-MMP polyclonal antibody that is able to recognize the catalytically active form of MT1-MMP as well as its truncated inactive form lacking the catalytic domain [30]. MT1-MMP protein expression was induced in S1P- but not LPA-treated MSC (Fig. 5A). As expected, an increased protein level of MT1-MMP was observed when MSC were treated with Con-A. However, an inactive MT1-MMP proteolytic fragment of approximately 45 kDa was also immunodetected; this proteolytic processing was diminished by the presence of S1P but not by the presence of LPA (Fig. 5A). Gene expression levels for MT1-MMP were also assessed using RT-PCR in MSC treated with Con-A and/or S1P. The transcript levels of MT1-MMP were found to be induced by both S1P and Con-A treatment (Fig. 5B). Interestingly, S1P strongly antagonized the Con-A-induced MT1-MMP gene expression (Fig. 5B), in accordance with its inhibitory effect on the Con-A-induced cell surface MT1-MMP proteolytic processing (Fig. 5A). The S1P receptor EDG-1 gene levels were also assessed and were found not to be significantly modulated by either treatment (Fig. 5B). Altogether, these results suggest a specific transcriptional regulation of S1P on MT1-MMP gene expression and may explain in part the increase in MSC migration and capillary-like structure formation, as well as its inhibitory action on Con-A-mediated proMMP-2 activation.

#### *Matrix metalloproteinase-mediated events regulate S1P/EDG-1 pro-apoptotic processes in MSC*

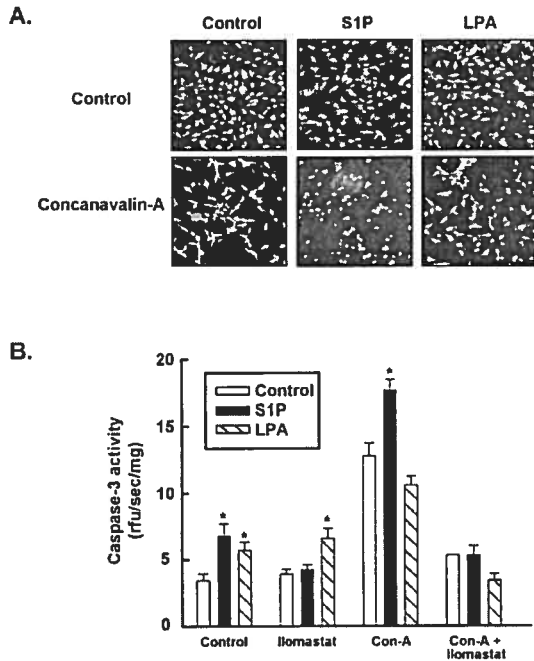
Recent reports have suggested a dual role for S1P, which can act both as a pro-apoptotic and as a survival growth factor



**Figure 5.** Sphingosine-1-phosphate specifically antagonizes concanavalin-A-mediated MT1-MMP cell-surface expression and proteolytic processing in MSC. (A): MSC were treated with 1  $\mu$ M S1P or 1  $\mu$ M LPA in the presence of 15  $\mu$ g/mL Con-A for 18 hours at 37°C as described in the Methods section. Cell lysates (20  $\mu$ g) were loaded onto 9% SDS-PAGE followed by Western blotting and immunodetection with anti-MT1-MMP antibody as described in the Methods section. (B): Total RNA was isolated from treated MSC. MT1-MMP and EDG-1 cDNA were amplified using RT-PCR as described in the Methods section and resolved on agarose gels.

[31,32]. In light of our current observations involving MT1-MMP functional regulation by S1P, we have further examined whether MMP-mediated activity may regulate any S1P pro-apoptotic events in MSC. We first assessed whether any morphological characteristics of apoptosis were triggered in treated MSC. Retrovirally GFP-transduced MSC were cultured and treated with either S1P or LPA in the presence or absence of Con-A. Regardless of the mode of induction, MSC physical attributes were clearly perturbed, as seen in the cell stretching observed with Con-A-treated MSC; more prominent was the packaging of cellular components into vesicles when MSC were concomitantly treated with Con-A and S1P (Fig. 6A). This loss of cellular structure was, however, not observed when MSC were treated with a combination of Con-A and LPA, suggesting a specific contribution of S1P receptors of the EDG family. Interestingly, although they were present, fewer “apoptotic bodies” were observed in either S1P- or LPA-treated MSC.

We next sought to assess whether the apoptotic processes observed were indeed triggered by S1P, LPA, or Con-A, and if these were dependent on MMP-mediated activity. Caspase-3, the activity of which has emerged as a powerful marker for cells undergoing apoptosis [33], was increased by approximately twofold when MSC were treated with either S1P or LPA (Fig. 6B). Interestingly, Ilomastat specifically antagonized S1P-induced caspase-3 activity but not that induced by LPA. MSC treatment with Con-A, which resulted in significant morphological changes (Fig. 6A), was found to further induce caspase-3 activity by more than fourfold (Fig. 6B). In parallel with their synergistic effect on the formation of MSC apoptotic bodies, Con-A, together



**Figure 6.** Matrix metalloproteinase-mediated events regulate S1P/EDG-1 pro-apoptotic processes in MSC. (A): MSC were treated with 1  $\mu$ M S1P or 1  $\mu$ M LPA, in combination with 15  $\mu$ g/mL Con-A for 18 hours at 37°C. Morphological characteristics of apoptosis is reflected by the cell stretching induced by the treatment of MSC with Con-A, as well as by the loss of cellular structure reflected by the presence of “apoptotic bodies” engendered by the synergistic actions of Con-A/S1P but not by Con-A/LPA. (B): MSC were treated with the indicated combinations of 1  $\mu$ M S1P, 1  $\mu$ M LPA, 20  $\mu$ M Ilomastat, 15  $\mu$ g/mL Con-A for 18 hours at 37°C. Cells were harvested and pelleted. Lysates were used to assay caspase-3 activity as described in the Methods section. Results are expressed in absolute caspase-3 values as mean  $\pm$  SD of triplicate samples from one representative experiment.

with S1P but not LPA, further significantly induced caspase-3 activity. Here again, Ilomastat antagonized all of the Con-A-induced caspase-3 activity whether or not S1P or LPA were present (Fig. 6B), suggesting that the synergistic pro-apoptotic effect of S1P involves some MMP-mediated activity.

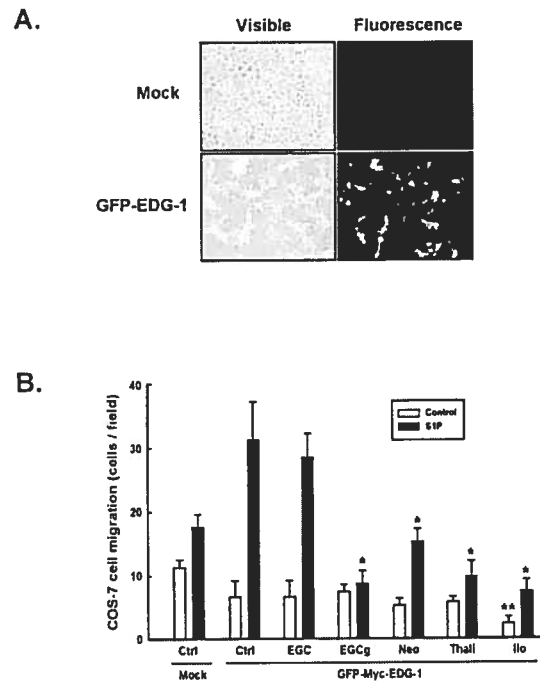
#### Anti-angiogenic agents target sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 functions in cell migration

Preliminary observations in our laboratory revealed that anti-angiogenic drugs such as Neovastat, thalidomide, and EGCg, all known for their effects on cell migration and tubulogenesis in differentiated EC, also affected S1P-induced MSC migration (not shown). In order to assess the specific contributions of the S1P/EDG pathway involved in cell migration and in response to anti-angiogenic treatment, we overexpressed recombinant EDG-1 protein in COS-7 cells, in which we had observed low expression of the EDG-1 transcript as compared to other cell lines tested (Fig. 1D). Since no antibody for EDG-1 was commercially available, we transiently

transfected COS-7 cells with a plasmid cDNA encoding the EDG-1 coding region fused to GFP. As shown in Figure 7A, COS-7 cells were efficiently transfected and the recombinant EDG-1 protein was expressed, as demonstrated by the presence of green fluorescent cells. We then treated the transfected COS-7 cells with either Neovastat (a phase III anti-angiogenic drug derived from a shark cartilage extract and shown to inhibit embryonic vascularization and endothelial cell proliferation [34,35]), thalidomide (whose anti-angiogenic effects are now recognized to play a significant role in the treatment of various malignancies [36]), Ilomastat, EGC, or EGCg. Thus, aside from Ilomastat, which independently inhibited basal cell migration, anti-angiogenic treatment significantly decreased S1P-induced cell migration in COS-7 cells overexpressing recombinant EDG-1 (Fig. 7B).

#### Discussion

Serum-derived lipid and protein growth factors exert complementary roles in the angiogenic response, as demonstrated by their ability to promote chemotaxis, angiogenic differentiation, and angiogenesis [37]. Of particular interest, abundant evidence suggests that platelet-derived S1P, which has been



**Figure 7.** Antiangiogenic agents target sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 functions in cell migration. (A): COS-7 cells were transfected with a plasmid encoding GFP-EDG-1 as described in the Methods section, and GFP-positive cells were observed under visible or fluorescent light. (B): GFP-EDG-1-transfected COS-7 cells were treated for 18 hours at 37°C with 10  $\mu$ g/mL thalidomide, 20  $\mu$ M Ilomastat, 1  $\mu$ M EGCg, or 0.5 $\times$  Neovastat. The cells were then harvested and cell migration assessed in the presence of 1  $\mu$ M S1P in the lower chamber.

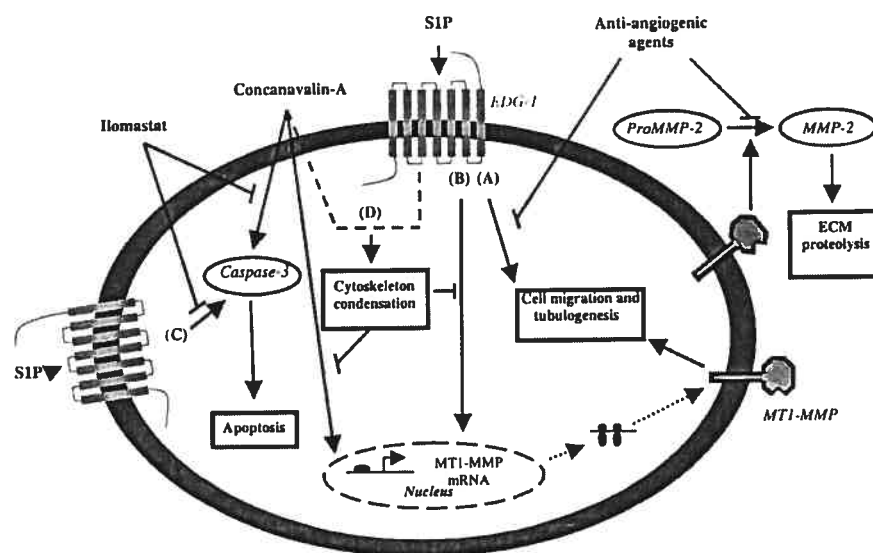


ascribed functions in regulating calcium homeostasis, cell growth, and apoptosis in several cell lines [38], is involved in regulating vascular maturation [12]. The experiments in the present report demonstrate that SIP, which is the major bioactive lysophospholipid released from platelets, is indeed an extremely effective mesenchymal stem and EC chemoattractant. Moreover, SIP may, under the conditions in which critical platelet-endothelial interactions occur (such as thrombosis, angiogenesis, and atherosclerosis), also regulate MSC recruitment and their crucial angiogenic functions. It is thus reasonable to speculate that the cellular functions of MSC at sites of active angiogenesis may be influenced by platelets through release of SIP into the bloodstream. In addition, platelet-derived SIP, which also acts as a chemoattractant for hematopoietic precursor cells [16] and immature dendritic cells [39], may control the recruitment of inflammatory cells to sites of inflammation such as those associated with cancer progression where platelets may also concomitantly contribute to the metastatic cascade [40]. Interestingly, monocyte chemoattractant protein-1 was shown to promote the migration/recruitment of intravenously injected MSC into the ischemic brain [41]. We now provide evidence for the first time that MMP-mediated events may regulate several SIP effects on MSC migration, survival, and ECM proteolysis.

Our data show that chemotaxis and capillary morphogenesis are important aspects of the MSC angiogenic response

to SIP. This provides a foundation for the hypothesis that these events may facilitate blood vessel formation and vascular remodeling at sites of transplanted stem cells, as recently suggested [8,9]. Indeed, the ability of several serum-derived growth factors to promote capillary morphogenesis in MSC is of particular importance at sites of wound healing, where factors released during clotting also influence EC to initiate the formation of new blood vessels [11]. In the present study we present evidence for a specific role of SIP in regulating both pro-angiogenic and cell survival events that are dependent upon MMP activity in MSC. Indeed, SIP, but not its analog lysophospholipid LPA, induced MSC migration and tubulogenesis, as well as expression of the MT1-MMP gene and protein (Fig. 8), the latter being in accordance with recent studies describing the crucial role that MT1-MMP plays in endothelial tubulogenesis and ECM degradation [42,43].

SIP was recently reported to mediate pro-apoptotic events in human hepatic myofibroblasts via a receptor-independent pathway [31]. We show that other actions of SIP and Con-A also involve caspase-3 activation in MSC. This induction was also antagonized by Ilomastat, suggesting that the action of these pro-apoptotic inducers was sensitive to MMP-dependent events, which may also involve other members of the MMP family such as adamalysin/ADAM. Individually, SIP and Con-A triggered MT1-MMP mRNA and protein expression, whereas such induction was not observed



**Figure 8.** Schematic representation of the proposed MMP-dependent survival and pro-apoptotic events regulated by SIP/EDG-1 in MSC. SIP triggers cell migration and tubulogenesis in MSC (A). These events are inhibited by anti-angiogenic agents such as Neovastat, thalidomide, Ilomastat, and EGCg, which are known to affect endothelial cell functions and ECM degradation. Increases in MT1-MMP gene and cell-surface protein expression may partially explain the angiogenic effects of SIP (B). Induction of caspase-3 by SIP is indicative of the pro-apoptotic events that are also triggered by Concanavalin-A, a known proMMP-2 activator [24]. Ilomastat, a broad-spectrum MMP inhibitor, antagonizes both caspase-3 and proMMP-2 activation, suggesting that MT1-MMP may play a pivotal role in these processes. We cannot, however, exclude the possibility that the nature of the MMP involved may also be a member of the ADAM family. A synergistic action of both SIP and Concanavalin-A profoundly affects MSC cytoskeletal organization, which antagonizes MT1-MMP gene and protein expression, as well as Concanavalin-A-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP (D). This model reflects the dynamic and dual effects of platelet-derived SIP on MT1-MMP-mediated angiogenic properties of MSC.

when a combination of both was used. The MSC cytoskeletal reorganization, as reflected by the appearance of “apoptotic bodies” in the combined presence of S1P and Con-A, may in part provide a mechanism for this S1P/Con-A effect. Given the role of MMP in matrix remodeling during morphogenesis and tissue repair, their involvement in regulating the balance between cell survival and pro-apoptotic signaling is thus suggestive of a potentially complex S1P/EDG receptor-mediated cross-communication that would be critical for proper vascular maturation at sites of MSC engraftment. It was suggested that apoptosis of fibrogenic cells was a crucial event in initiating the degradation of ECM [44]. More recently, apoptosis of human myofibroblasts also promoted activation of proMMP-2, and this was thought to be mediated through an increase in MT1-MMP expression [45]. Taken together, our results strongly suggest that induction of apoptosis is closely associated with increased MT1-MMP synthesis and expression. However, it is unclear how this coupling within the same cell may regulate intracellular MSC angiogenic properties. Interestingly, the caspase-3 inducer tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  was also recently reported to increase the expression of MT1-MMP [46]. In light of these observations, it is thus tempting to suggest a pivotal role of MT1-MMP in the regulation of pro-apoptotic cellular events. Of interest is the fact that TNF- $\alpha$  is dependent on the activity of TACE, an integral membrane MMP that causes the secretion of the active form of TNF- $\alpha$  from its plasma membrane precursor [47]. In addition to inhibiting the members of the MMP family, several MMP inhibitors such as BB-94 have been shown to inhibit the activity of TACE and other ADAMs [48,49].

The intracellular mechanisms involved in the S1P-induced MSC cellular responses still remain elusive and are currently under investigation, particularly the intracellular processes that other members of the EDG family may regulate in MSC angiogenic functions. However, our results suggest that the action of several anti-angiogenic agents, which function in multiple ways, including the inhibition of EC proliferation, migration, protease activity, and tubule formation, as well as the induction of apoptosis [50], may at least target the EDG-1 cell-surface receptors for S1P (Fig. 8). Whether this inhibitory effect is mediated through a direct interaction with the EDG receptor or through the inhibition of pertussis-toxin-sensitive intracellular signaling also remains to be investigated. Changes in the intracellular levels of S1P and ceramide, another important sphingolipid metabolite associated with cell death and cell growth arrest, have been implicated in a number of pathological conditions [51]. Although their respective intracellular targets remain elusive, we cannot exclude the possibility that the dynamic balance between S1P and ceramide may ultimately determine the fate of the cell. Our observations thus suggest that the S1P/EDG pathway may constitute the first molecular clues to understanding how the MSC migration may be

regulated through critical cellular movements during angiogenesis. Moreover, the platelet-derived lipid mediator S1P, released during the activation of clotting cascades, may further provide a novel link between hemostasis and angiogenesis.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Fondation Charles-Bruneau, and Valorisation Recherche Québec. We thank Dr. Timothy Palmer for the plasmid cDNA encoding GFP/EDG-1. BA is a recipient of a Canada Research Chair in Molecular Oncology (Tier-II) from the CIHR.

### References

- Hurwitz DR, Kirchgesser M, Merrill W, et al. Systemic delivery of human growth hormone or human factor IX in dogs by reintroduced genetically modified autologous bone marrow stromal cells. *Hum Gene Ther.* 1997;8:137–156.
- Ding L, Lu S, Batchu R, Saylor III R, Munshi N. Bone marrow stromal cells as a vehicle for gene transfer. *Gene Ther.* 1999;6:1611–1616.
- Zhang XY, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P, Reiser J. Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells. *Mol Ther.* 2002;5:555–565.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.* 2001;169:12–20.
- Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into non-human primates. *Blood.* 2003;101:2999–3001.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71–74.
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002;109:337–346.
- Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Beauséjour CM, Momparler RL, Momparler LF, Galipeau J. Human cytidine deaminase as an ex vivo drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells. *Gene Ther.* 2002;9:452–462.
- Al-Khaldi A, Eliopoulos N, Martineau D, Lejeune L, Lachapelle K, Galipeau J. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther.* 2003;10:621–629.
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med.* 2002;2:537–543.
- English D, Welch Z, Kovala AT, et al. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J.* 2000;14:2255–2265.
- Spiegel S, English D, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction. *Trends Cell Biol.* 2002;12:236–242.
- Hla T, Lee MJ, Ancellin N, et al. Sphingosine-1-phosphate signaling via the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;905:16–24.
- Liu Y, Wada R, Yamashita T, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest.* 2000;106:951–961.
- Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S, Stainer DY. A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature.* 2000;406:192–195.

16. Yanai N, Matsui N, Furusawa T, Okubo T, Obinata M. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid trigger invasion of primitive hematopoietic cells into stromal cell layers. *Blood*. 2000;96:139–144.
17. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;120:999–1005.
18. Eliopoulos N, Galipeau J. Green fluorescent protein in retroviral vector constructs as marker and reporter of gene expression for cell and gene therapy applications. *Methods Mol Biol*. 2002;183:353–371.
19. Beaulieu E, Kachra Z, Mousseau N, Delbecchi L, Hardy J, Béliveau R. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human pituitary tumors. *Neurosurgery*. 1999;45:1432–1440.
20. Watterson KR, Johnston E, Chalmers C, et al. Dual regulation of EDG1/SIP(1) receptor phosphorylation and internalization by protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*. 2002;277:5767–5777.
21. Annabi B, Lee YT, Turcotte S, et al. Hypoxia promotes murine bone marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells*. 2003;21:337–347.
22. Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res*. 1992;202:1–8.
23. Galardy RE, Grobelny D, Foellmer HG, Fernandez LA. Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamido carbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res*. 1994;54:4715–4718.
24. Overall CM, Sodek J. Concanavalin A produces a matrix-degradative phenotype in human fibroblasts. Induction and endogenous activation of collagenase, 72-kDa gelatinase, and Pump-1 is accompanied by the suppression of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1990;265:21141–21151.
25. Yu M, Sato H, Seiki M, Spiegel S, Thompson EW. Elevated cyclic AMP suppresses ConA-induced MT1-MMP expression in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*. 1998;16:185–191.
26. Zucker S, Hymowitz M, Conner CE, DiYanni EA, Cao J. Rapid trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase to the cell surface regulates progelatinase-A activation. *Lab Invest*. 2002;82:1673–1684.
27. Lamy S, Gingras D, Béliveau R. Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res*. 2002;62:381–385.
28. Demeule M, Michaud-Levesque J, Annabi B, et al. Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Current Medicinal Chemistry—Anti-Cancer Agents*. 2002;2:441–463.
29. Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1542:209–220.
30. Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, et al. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*. 2000;275:12080–12089.
31. Davaille J, Li L, Mallat A, Lotersztajn S. Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts. *J Biol Chem*. 2002;277:37323–37330.
32. Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett*. 2002;531:54–57.
33. Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2001;4:313–332.
34. Dupont E, Savard PE, Thibodeau A, Vincent M, Chamberland G, Doillon C. Angiostatic activity of Neovastat (AE-941) assessed by a semi-quantitative embryonic vascularization test. In IBC's conference, Therapeutic implications and mechanisms of angiogenesis, Novel therapeutic development. 1997
35. Gingras D, Renaud A, Mousseau N, Béliveau R. Shark cartilage extracts as antiangiogenic agents: smart drinks or bitter pills? *Cancer Metastasis Rev*. 2000;19:83–86.
36. Kumar S, Witzig TE, Rajkumar SV. Thalidomide as an anti-cancer agent. *J Cell Mol Med*. 2002;6:160–174.
37. Harvey K, Siddiqui RA, Sliva D, Garcia JG, English D. Serum factors involved in human microvascular endothelial cell morphogenesis. *J Lab Clin Med*. 2002;140:188–198.
38. Spiegel S, Kolesnick R. Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia*. 2002;16:1596–1602.
39. Idzko M, Panther E, Corinti S, et al. Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *FASEB J*. 2002;16:625–627.
40. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol*. 2002;3:425–430.
41. Wang L, Li Y, Chen X, et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol*. 2002;30:831–836.
42. Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol*. 2000;149:1309–1323.
43. Lafleur MA, Handsley MM, Knauper V, Murphy G, Edwards DR. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci*. 2002;115:3427–3438.
44. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102:538–549.
45. Preaux AM, D'ortho MP, Bralet MP, Laperche Y, Mavier P. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. *Hepatology*. 2002;36:615–622.
46. Majka S, McGuire PG, Das A. Regulation of matrix metalloproteinase expression by tumor necrosis factor in a murine model of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:260–266.
47. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*. 1997;385:729–733.
48. Yamamoto M, Hirayama R, Naruse K, et al. Structure-activity relationship of hydroxamate-based inhibitors on membrane-bound Fas ligand and TNF- $\alpha$  processing. *Drug Des Discov*. 1999;16:119–130.
49. Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Pavon L, Rook G. Treatment with BB-94, a broad spectrum inhibitor of zinc-dependent metalloproteinases, causes deviation of the cytokine profile towards type-2 in experimental pulmonary tuberculosis in Balb/c mice. *Int J Exp Pathol*. 2000;81:199–209.
50. Klohs WD, Hamby JM. Antiangiogenic agents. *Curr Opin Biotechnol*. 1999;10:544–549.
51. Van Blitterswijk WJ, Van Der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J*. 2003;369:199–211.

