

Université de Montréal

**Impact du statut de différenciation des cellules  
promyélocytaires HL-60 sur l'efficacité anticancéreuse et  
antiinflammatoire de l'EGCG**

par

Amélie Vézina

Département de physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise es sciences  
en Physiologie  
option Physiologie et biophysique moléculaires

Mai 2012

© Amélie Vézina, 2012

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Impact du statut de différenciation des cellules promyélocytaires HL-60 sur l'efficacité anticancéreuse et antiinflammatoire de l'EGCG

Présenté par :  
Amélie Vézina

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Josette Noël, président-rapporteur  
Borhane Annabi, directeur de recherche  
Christian Beauséjour, membre du jury

## Résumé

L'altération de la barrière hématoencéphalique (BHE) par les cellules tumorales et les cellules immunes circulantes peut mener à la neuroinflammation. Les cellules leucémiques promyélocytaires HL-60 sont un excellent modèle pour étudier et comprendre les mécanismes de signalisation moléculaires qui caractérisent le développement tumoral et métastatique. La cancérogenèse peut s'accompagner de modulations de l'expression de biomarqueurs tels que la cyclooxygénase-2 et la métalloprotéase-9. Les recherches décrites dans ce mémoire relatent l'analyse des biomarqueurs inflammatoires et invasifs régulés lors de la différenciation induite par le PMA des cellules HL-60 en macrophages. Le statut de différenciation cellulaire pourrait avoir un impact sur les gènes cibles de la voie NF- $\kappa$ B. Nous émettons l'hypothèse que le PMA active la voie NF- $\kappa$ B et que cette signalisation peut être renversée par l'(-)-épigallocatechine-gallate (EGCG). En effet, une régulation à la hausse de l'expression de plusieurs gènes combinée à la diminution de l'expression d'I $\kappa$ B mettent en évidence l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans l'activation des mécanismes pro-inflammatoires et pro-invasifs. Les mêmes observations sont faites dans les cellules différenciées appelées «*macrophages-like*». L'EGCG, un polyphénol dérivé du thé vert, a un potentiel chimiopréventif. Il est capable d'inhiber la signalisation moléculaire passant par la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules HL-60 traitées simultanément par l'EGCG et le PMA, mais pas dans les cellules «*macrophages-like*». Cette différence peut s'expliquer par une modulation de l'expression du récepteur de surface cellulaire de l'EGCG, le récepteur à la laminine de 67 kDa, et de son précurseur de 37 kDa. Collectivement, nos résultats montrent que le statut de différenciation des cellules promyélocytaires HL-60 concorde avec l'activation des mécanismes favorisant le développement d'un cancer et des métastases. Cet effet peut être prévenu par l'utilisation d'agents naturels tel l'EGCG. Le ciblage de biomarqueurs liés au statut de différenciation des cellules tumorales impliquées dans la perturbation de la barrière hématoencéphalique qui cause la neuroinflammation permettrait l'avancement des connaissances dans la prévention de la cancérogenèse.

**Mots-clés** : Cellules HL-60, inflammation, COX-2, MMP-9, NF- $\kappa$ B, EGCG

## Abstract

Blood-brain barrier (BBB) disruption by circulating tumor and immune cells leads to secondary inflammatory infections. Promyelocytic HL-60 cells represent an excellent model to study and to get a better understanding of the molecular signaling mechanisms involved in carcinogenesis and metastasis. The research described in this thesis shows the analysis of several inflammatory and invasive biomarkers regulated during PMA-induced differentiation of promyelocytic HL-60 cells into macrophages. Carcinogenesis involves some modifications in the expression of biomarkers such as cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. The differentiation status could have an impact on the NF- $\kappa$ B signaling pathway that regulates the target genes, given that these target genes expression varies during cell differentiation. We hypothesize that the activation of the NF- $\kappa$ B pathway by PMA can be reverse by (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG). Indeed, the up-regulation of downstream genes combined with the down-regulation of I $\kappa$ B expression showed the significant implication of the NF- $\kappa$ B signaling pathway to activate pro-inflammatory and pro-invasive mechanisms linked to carcinogenesis. The same evidence exhibits in the differentiated cells called «*macrophages-like*». Moreover, the green tea polyphenol, EGCG, shows chemopreventive property since it better inhibited NF- $\kappa$ B signaling in cells treated simultaneously with EGCG and PMA compared to the «*macrophages-like*». This difference could be due, in part, to the down-regulation of the 67 kDa laminin receptor, known to be the non-integrin membrane receptor for EGCG. All together, our results suggest that the differentiation status of promyelocytic cells is linked to the activation of mechanisms involved in carcinogenesis and metastasis. These phenomena can be prevented by using natural agents such as EGCG. Targeting the specific biomarkers linked to the differentiation status of tumor cells and involved in the disruption of the BBB may help reduce secondary neuroinflammation and enable the advancement of knowledge towards carcinogenesis prevention.

**Keywords** : HL-60 cells, inflammation, COX-2, MMP-9, NF- $\kappa$ B, EGCG

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 – Introduction.....	1
1. Le cancer.....	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Statistiques.....	2
1.3. Cancérogenèse.....	2
1.4. Avenues thérapeutiques.....	6
1.5. Prévenir le développement tumoral.....	7
1.5.1. Chimio-prévention par des molécules issues de la diète.....	7
1.5.1.1. Polyphénols du thé vert.....	9
1.5.1.2. Mécanismes d'action connus de l'EGCG.....	10
2. La leucémie.....	13
2.1. Définition.....	13
2.2. Statistiques.....	14
2.3. Leucémie promyéloïde aiguë.....	14
2.4. Thérapies.....	17
2.5. Modèle cellulaire – HL-60.....	17
2.5.1. Différenciation des cellules HL-60.....	18
2.5.2. Phorbol 12-myristate 13-acétate.....	19
3. Processus cellulaires et moléculaires de la cancérogenèse.....	21
3.1. Biomarqueurs de l'inflammation associés à la cancérogenèse.....	21
3.2. Biomarqueurs de l'invasion, de la migration et des métastases.....	24
3.2.1.1. Matrice extracellulaire et métalloprotéases.....	25
3.3. Voie de signalisation par NF- $\kappa$ B.....	27

3.4. Voie de signalisation par le récepteur à l'EGCG .....	31
4. Hypothèse et objectifs .....	34
Chapitre 2 – Article .....	35
Abstract .....	37
Introduction .....	38
Experimental procedures .....	40
Results .....	44
Discussion .....	48
Acknowledgments .....	52
Authorship .....	53
References .....	54
Footnotes .....	60
Tables and figures legend .....	61
Tables and figures .....	65
Table 1 .....	65
Table 2 .....	66
Figure 1 .....	67
Figure 2 .....	68
Figure 3 .....	69
Figure 4 .....	70
Figure 5 .....	71
Figure 6 .....	72
Figure 7 .....	73
Chapitre 3 – Discussion, perspectives et conclusion .....	74
5. Discussion .....	75
6. Perspectives .....	83
7. Conclusion .....	85
Bibliographie .....	87

Liste des tableaux

<b>Tableau I. Cibles thérapeutiques des molécules phytochimiques issues de l'alimentation.....</b>	<b>8</b>
--	----------

## Liste des figures

<b>Figure 1. Étapes de la cancérogenèse</b> .....	3
<b>Figure 2. Changements phénotypiques associés au développement tumoral</b> .....	4
<b>Figure 3. Les nouvelles caractéristiques tumorales</b> .....	5
<b>Figure 4. Structure moléculaire des différentes catéchines du thé vert</b> .....	9
<b>Figure 5. Mécanismes d'action des composés phytochimiques préventifs</b> .....	12
<b>Figure 6. Hématopoïèse</b> .....	16
<b>Figure 7. Morphologie des cellules HL-60</b> .....	20
<b>Figure 8. Représentation schématique de la répercussion des biomarqueurs impliqués à chaque étape de la cancérogenèse</b> .....	22
<b>Figure 9. Biosynthèse des prostaglandines</b> .....	24
<b>Figure 10. Représentation schématique de l'implication des MMPs dans les concepts entourant la progression cancéreuse</b> .....	29
<b>Figure 11. Voie de signalisation par NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	30
<b>Figure 12. Modèle du mécanisme d'action de l'EGCG par la voie de 67LR</b> .....	33
<b>Figure 13. Gènes cibles de la voie de signalisation NF-<math>\kappa</math>B activés par le PMA</b> .....	78
<b>Figure 14. Résumé de comparaison de la signalisation dans les HL-60 non-différenciées et les «<i>macrophages-like</i>»</b> .....	82



## Liste des abréviations

67LR	Récepteur à la laminine de 67 kDa
37LRP	Précurseur de 37 kDa de 67LR
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Protéine activatrice
Apaf-1	Facteur d'activation de peptidase apoptotique
ARE	Élément de réponse antioxydant
ARN	Acide ribonucléique
ATRA	Acide <i>tout-trans</i> rétinoïque
BCEC	Cellules endothéliales des capillaires cérébraux
BHE	Barrière hématoencéphalique
bZip	Domaine « <i>basic leucine zipper</i> »
CFU	Unité de formation de colonies
CFU-GEMM	Unité de formation de colonies des granulocytes, érythrocytes, monocytes, mégacaryocytes
CFU-GM	Unité de formation de colonies des granulocytes et monocytes
CLP	Cellule lymphoïde progénitrice
CMP	Cellule myéloïde progénitrice
COX-2	Cyclooxygénase-2
CPH	Cellule pluripotente hématopoïétique
CSH	Cellule souche hématopoïétique
Cyt c	Cytochrome c
DAG	Diacylglycérol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC	(-)-épicatéchine
ECG	(-)-épicatéchine-3-gallate
eEF1A	Facteur eucaryotique d'élongation de la traduction
EGC	(-)-épigallocatechine
EGCG	(-)-épigallocatechine-3-gallate

ERN	Espèces réactives nitrosylées
ERO	Espèces réactives oxygénées
HLA	Antigènes des leucocytes humains
I $\kappa$ B	Inhibiteur de NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL-1, IL-6	Interleukine
iNOS	Oxyde nitrique synthétase inductible
Keap1	« <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> »
LPA	Leucémie promyéloïde aiguë
MAPK	Protéine kinase activée par signal mitogène
MEC	Matrice extracellulaire
MDRP	Protéine de résistance aux médicaments
MLRC	Chaîne légère régulatrice de la myosine
MMP	Métalloprotéase matricielle
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle de type membranaire
MYPT1	Sous-unité myosine phosphatase
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire de transcription kappa-B
NK	Cellule « <i>natural killer</i> »
Nrf2	Facteur nucléaire relié à l'érythroïde
OMS	Organisation mondiale de la santé
PG	Prostaglandine
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
RAR $\alpha$	Récepteur de l'acide rétinoïque
SLN	Signal de localisation nucléaire
TAM	Macrophages associés aux tumeurs
TIMP	Inhibiteur tissulaire de MMP
TLR	Récepteur « <i>toll-like</i> »

TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

*À mes parents dévoués,  
À mes sœurs, mes amies*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Borhane Annabi. Merci de m'avoir fait confiance et donné la chance de faire partie de cette belle équipe. Ses encouragements et ses bonnes idées m'ont guidé tout au long de cette étape qu'a été pour moi la maîtrise. Grâce à lui j'ai pu entretenir la passion que j'ai pour la recherche en sciences.

Je veux aussi remercier tous mes collègues de laboratoire avec lesquels j'ai beaucoup appris et qui m'ont fait grandir. Je vous remercie d'avoir été présents pour échanger les connaissances et s'entraider. Merci à Sébastien Proulx-Bonneau, Elizabeth Tahanian, Eric Vaillancourt-Jean, Sabrina Peiro, Jonathan Pratt, Paula Moldovan, Rima Chokor, Alain Zgheib, Michel Desjarlais, Aroua Ben Saad et Amira Ouanouki. Je remercie de façon spéciale Simon Lord-Dufour, Julie Poirier et Sylvie Lamy pour avoir répondu aux maintes questions et incertitudes auxquelles je faisais face et pour leur professionnalisme.

Je veux remercier profondément mes parents et mes soeurs qui m'ont supportée de tout leur cœur. Merci d'avoir été patient en m'apportant le soutien et les encouragements à la réussite de mon parcours. C'est votre aide et dévouement qui m'a mené où je suis aujourd'hui.

Je veux dire merci à mon sport, le badminton. Merci à mes coéquipiers et entraîneurs qui m'ont permis de me changer les idées, de socialiser et de vivre des émotions fortes. Merci à la présence de l'activité physique dans ma vie qui m'a inculqué une discipline et une organisation des plus utiles afin de concilier les études et le sport.

## **Chapitre 1 – Introduction**

# 1. Le cancer

## 1.1. Définition

Le cancer est un terme général utilisé pour définir un grand groupe de pathologies pouvant affecter différentes parties de l'organisme (Organisation mondiale de la santé, 2012). Ces maladies sont aussi appelées tumeurs malignes et/ou néoplasmes. Ce sont des dysfonctions d'origine génétique, mais pas nécessairement héréditaire. Elles consistent essentiellement en une prolifération cellulaire anormalement élevée, puis en l'activation de plusieurs signaux favorisant le maintien et la survie de ces nouvelles cellules tumorales.

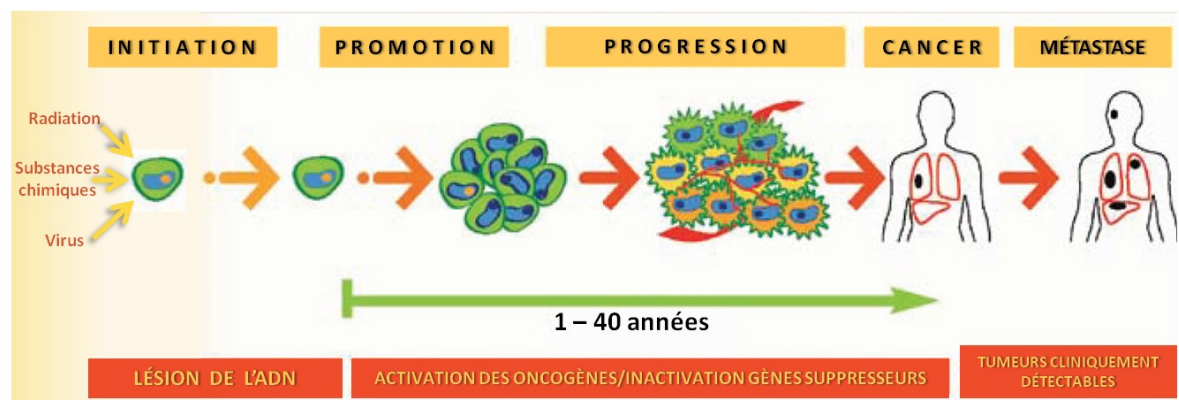
## 1.2. Statistiques

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a enregistré 7,6 millions de décès causés par le cancer à travers la planète en 2008. Cela correspond à environ 13% de la mortalité mondiale. L'OMS considère que 30% de ces cancers sont évitables. Au Canada, il est estimé qu'il y a eu environ 177 800 nouveaux cas de cancer en 2011 dont 75 000 ont causé le décès. Près de la moitié des nouveaux cas sont des cancers des poumons, colorectaux, de la prostate et du sein. Le taux de mortalité est plus élevé dans les provinces de l'Atlantique et du Québec. Le risque de cancer augmente avec l'âge pour atteindre 42% des nouveaux cas de cancer chez les 70 ans et plus, et 59% de décès causés par le cancer dans la même catégorie d'âge. L'incidence est, quant à elle, autant élevée chez les hommes que les femmes. Le type de cancer varie toutefois selon le sexe. Vers l'âge de 55 ans, l'incidence et la mortalité sont plus grandes chez les hommes que chez les femmes. L'augmentation des nouveaux cas et de la mortalité est principalement due au vieillissement et à l'accroissement de la population (Société canadienne du cancer, 2011).

## 1.3. Cancérogenèse

Le cancer se développe à partir d'une cellule qui subit une mutation puis se transforme en transitant par trois principales étapes (figure 1). La cancérogenèse débute par une phase d'**initiation**. C'est-à-dire que la conséquence d'une mutation dans l'ADN résulte

en un changement fonctionnel de la cellule atteinte. Cette cellule entre en phase de **promotion** pendant laquelle la synthèse d'ADN est augmentée. Il y a une surproduction de prostaglandines, de protéines Ras, d'oncoprotéines et de facteurs de croissance tels PDGF, TGF $\alpha$  et  $\beta$ , EGFR et bFGF. La transduction du signal est augmentée par l'activation de protéines G membranaires (Brandt-Rauf et Pincus, 1998). L'activité métabolique des cellules transformées est altérée. Les cellules tumorales se multiplient de façon incontrôlée. Pendant la dernière phase de **progression**, la prolifération continue et les gènes suppresseurs de tumeurs perdent leur activité normale. Il y a une suractivation de métalloprotéases permettant le remodelage de la matrice extracellulaire (Gialeli et al., 2011; Rundhaug, 2003). Des nouveaux vaisseaux se forment afin d'alimenter la tumeur. L'invasion vers des sites secondaires est initiée pour en arriver à la formation de métastases (Abel et DiGiovanni, 2008; Croce, 2008).

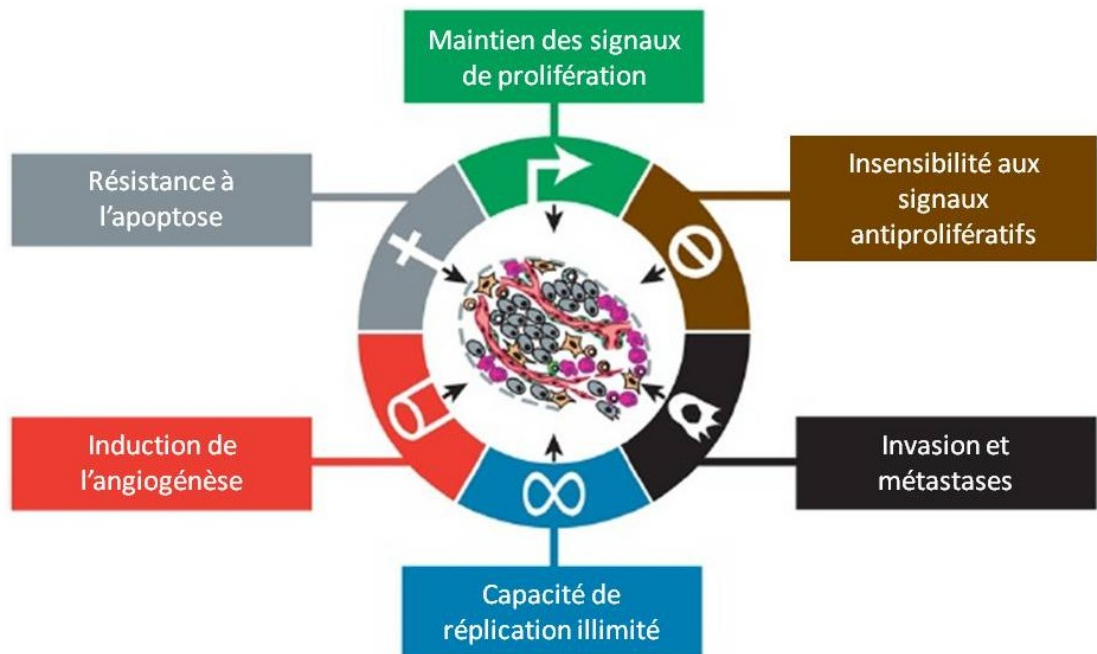


**Figure 1. Étapes de la cancérogenèse.** Des agents néfastes affectent une cellule normale et l'initient à la cancérogenèse. La cellule entre en phase de promotion tumorale. Elle subit des lésions au niveau de l'ADN et cela déclenche la prolifération incontrôlée. Des oncogènes sont activés et des gènes suppresseurs sont inactivés pour amener les cellules en phase de progression qui peut durer des années. Finalement, le cancer s'établit et peut être diagnostiqué.

[Adapté de : Béliveau et Gingras, 2007]



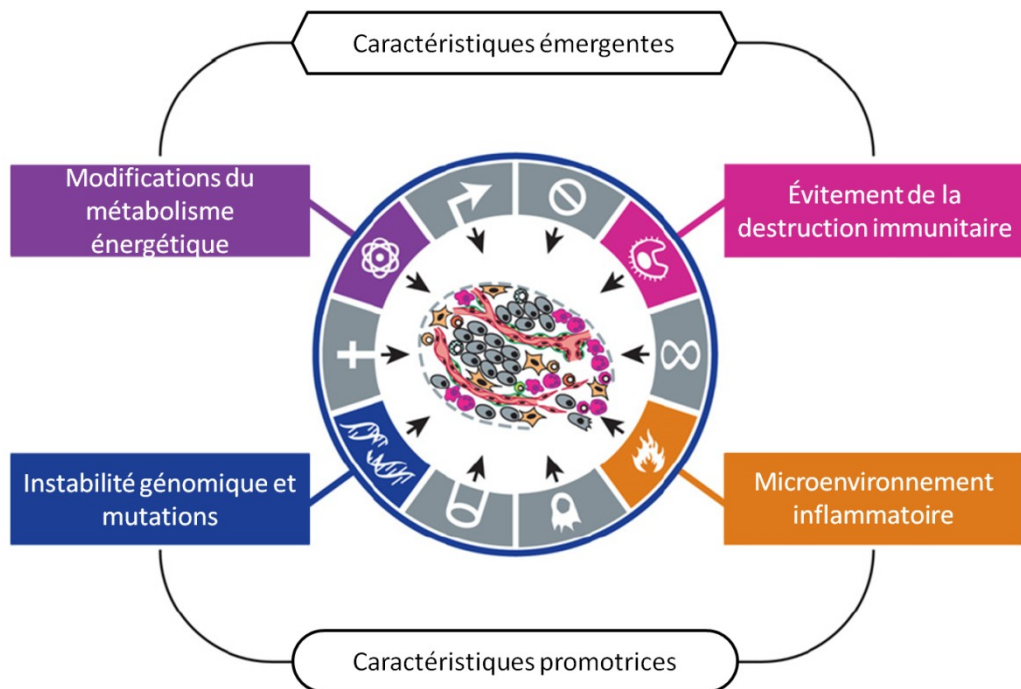
En suivant ces stades de développement, les tumeurs acquièrent des caractéristiques qui définissent leurs changements phénotypiques (figure 2). Premièrement, elles deviennent indépendantes des signaux normaux de prolifération cellulaire. Deuxièmement, elles sont insensibles aux signaux antiprolifératifs. Troisièmement, il s'installe une résistance à l'apoptose. Quatrièmement, elles adoptent une capacité anormale d'angiogénèse. Cinquièmement, elles deviennent invasives et mènent à la formation de métastases. Sixièmement, leur capacité de réplication de l'ADN est illimitée (Hanahan et Weinberg, 2000).



**Figure 2. Changements phénotypiques associés au développement tumoral.** Le développement néoplasique confère aux cellules des mécanismes moléculaires adaptatifs régulant des voies de prolifération, de survie et d'invasion pour former le cancer. Ces caractéristiques spécifiques sont nommées en fonction des phases de développement et des biomarqueurs impliqués dans la génération de lésions malignes.

[Adapté de : Hanahan et Weinberg, 2000]

En plus de ces six principales caractéristiques, deux caractéristiques émergentes ont récemment été définies (figure 3). Ainsi, les tumeurs se distinguent par la modification du métabolisme énergétique et par l'évitement de la destruction par les cellules immunitaires. Avec les années, l'approfondissement des connaissances a permis de définir deux nouvelles caractéristiques du cancer : l'instabilité du génome menée par des mutations ainsi que la présence de molécules liées au caractère inflammatoire dans le microenvironnement tumoral (Hanahan et Weinberg, 2011). La combinaison de ces dix caractéristiques permet l'identification de biomarqueurs et leur ciblage thérapeutique dans le but de mieux comprendre les composantes du cancer et de mieux les traiter (figures 2 et 3).



**Figure 3. Les nouvelles caractéristiques tumorales.** Aux six caractéristiques de base qualifiant les tumeurs présentées à la figure 2 viennent s'ajouter quatre caractéristiques décrivant le développement cancéreux. Ces nouvelles caractéristiques permettent la définition beaucoup plus précise des changements phénotypiques observés lors de la cancérogenèse.

[Adapté de : Hanahan et Weinberg, 2011]

## 1.4. Avenues thérapeutiques

Il existe des moyens de traiter le cancer une fois que celui-ci a été diagnostiqué. On doit connaître la nature de la tumeur, son stade de développement et son potentiel métastatique. Plus la tumeur est décelée à un stade précoce, plus l'impact thérapeutique est grand. Selon le cas, il est possible par chirurgie d'éliminer la masse tumorale. Sinon, on a recours à des traitements de radiothérapie ou de chimiothérapie. Cette dernière consiste en l'utilisation de médicaments destinés à tuer les cellules à prolifération rapide et incontrôlée. La chimiothérapie est surtout utilisée pour les tumeurs métastatiques (McKnight, 2003). Quant à la radiothérapie, elle consiste à l'irradiation ciblée des cellules composant une tumeur solide bien localisée et dans un stade avancé. Le but est d'envoyer des rayons X, des rayons gamma ou des particules chargées négativement sur les cellules afin d'endommager leur ADN. Elles cesseront de se multiplier et mourront (National Cancer Institute, 2010). La radiothérapie dépend de l'alimentation en oxygène des cellules. Les tumeurs possédant un centre hypoxique sont plus résistantes (Longo, 2010). Étant donné que les tumeurs solides possèdent d'importants centres hypoxiques, le microenvironnement affaibli en oxygène demeure le plus grand obstacle à la réussite de la radiothérapie (Harrison et al., 2002).

L'objectif de ces traitements est assurément la guérison de la maladie, mais aussi l'augmentation de la durée et de la qualité de vie du patient. Il est très fréquent que la thérapie soit toxique et affecte le tissu sain dans lequel s'est développée la tumeur. Ces options thérapeutiques sont souvent combinées afin d'obtenir le meilleur résultat possible avec une efficacité de traitement optimale et un minimum d'effets secondaires. Cependant, il arrive que certaines tumeurs malignes soient résistantes aux traitements (McKnight, 2003). Il devient donc impératif, jour après jour, de trouver de nouvelles cibles pharmacologiques pour rendre la thérapie plus efficace.

## **1.5. Prévenir le développement tumoral**

Le cancer est en partie évitable si l'on adopte des saines habitudes de vie et que l'on prenne les meilleures précautions. Entre autre, il est fortement recommandé d'éviter de consommer du tabac car c'est une des principales causes de cancer des poumons dans le monde (Gritz et al., 2008; Beaglehole et al., 2011). La consommation d'alcool est un autre facteur de risque principalement associé aux cancers du système digestif, du sein et du foie. Le contrôle de la consommation de tabac et d'alcool est surtout influencé par le comportement que la société adopte vis-à-vis de la vente, des médias, de la publicité et des lois (Beaglehole et al., 2011). La prudence au quotidien est de mise pour diminuer l'exposition involontaire aux agents infectieux, à la pollution environnementale, aux produits cancérigènes professionnels et au rayonnement (Stewart, 2012). Les recherches démontrent aussi qu'il est important de faire de l'activité physique chaque jour afin d'éviter des problèmes de surpoids et d'obésité en plus de réduire le risque associé au développement tumoral de plusieurs cancers s'attaquant à divers organes dont les intestins, le pancréas, les seins, les poumons, la peau, l'endomètre et la prostate (Na et Oliynyk, 2011). Une mauvaise alimentation contribue au développement de 30% de tous les cancers et de 70% des cancers du système digestif. L'incidence peut être diminuée par l'adoption d'une alimentation saine et équilibrée. Il est primordial et avantageux de choisir des aliments d'origine végétale comportant des éléments phytochimiques capables de bloquer les mécanismes de la cancérogenèse (Tableau I). Cela fait partie des habitudes à adopter pour prévenir le cancer (Beliveau et Gingras, 2007; Gingras et Beliveau, 2006).

### **1.5.1. Chimio-prévention par des molécules issues de la diète**

La chimio-prévention consiste en l'usage pharmacologique de molécules naturelles ou synthétiques pour diminuer le risque de cancer (Lippman et Lee, 2008; Tan et al., 2011; Brenner, 2008). Les principales cibles moléculaires visées sont des facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B, AP-1, EGR-1, STAT3, Nrf2,  $\beta$ -caténine, p53), des protéines kinases (IKK, Akt, JNK, TYK2, PKC, MAPK), des facteurs de croissance (TNF, PDGF, VEGF, CSF) et des

protéines impliquées dans l'apoptose, les métastases, l'adhésion et le cycle cellulaire (Bcl-2, caspase-3, COX-2, MMP-9, VCAM-1, cyclin D1) (Aggarwal et Shishodia, 2006; Béliveau et Gingras, 2007; Pan et al., 2011). On appelle agents nutraceutiques les molécules issues de l'alimentation qui sont destinées à prévenir le cancer et autres atteintes pathologiques. Ces agents nutraceutiques sont faciles à se procurer car ils font partie de notre alimentation. Les épices, les crucifères, les légumes verts, le vin rouge, le thé vert, les petits fruits et les agrumes font partie des aliments parmi lesquels on retrouve une quantité importante de molécules anticancéreuses (Gingras et Beliveau, 2006).

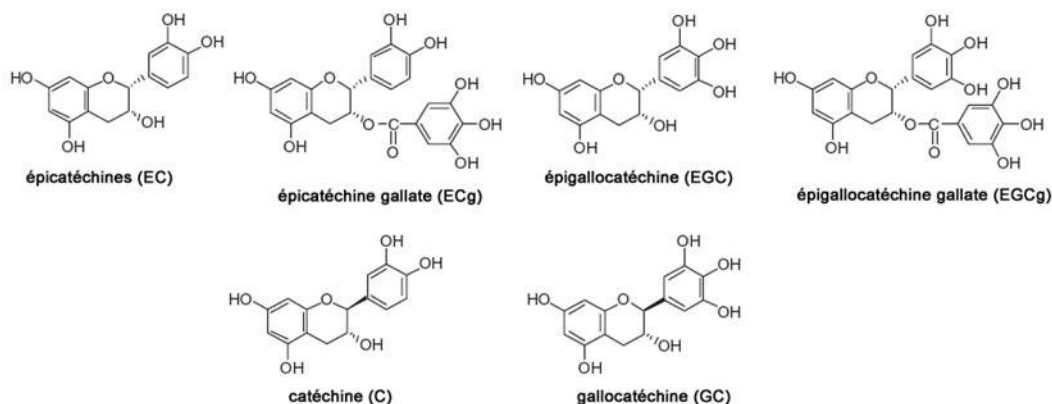
CIBLE	MOLÉCULES PHYTOCHIMIQUES	MEILLEURES SOURCES ALIMENTAIRES
<b>INHIBITION</b>		
Invasion tumorale et métastases	Epigallocatechine gallate	Thé vert
Signaux de transduction des récepteurs de facteurs de croissance	Delphinidine, acide ellagique	Bleuets, framboises, noix
Enzymes inflammatoires (ex : COX-2)	Curcumine, resvératrol	Curcuma, raisins
Activité des facteurs de transcription (ex : NFκB, AP-1)	Curcumine, resvératrol	Curcuma, raisins
Résistance aux médicaments (ex : MDRP)	Disulfure de diallyle	Ail
Angiogénèse	Epigallocatechine gallate	Thé vert
Action des oestrogènes	Génistéine	Soja
Activation métabolique des cancérogènes	Indol-3-carbinol	Chou
<b>ACTIVATION</b>		
Apoptose tumorale	Phénétyle isothicyanate	Chou, cresson
Fonction du système immunitaire	Lentinan	Champignons shiitake
Détoxification via les enzymes de phase II	Sulforaphane	Brocoli

**Tableau I. Cibles thérapeutiques des molécules phytochimiques issues de l'alimentation.** Les molécules phytochimiques dérivées de l'alimentation quotidienne visent des mécanismes impliqués dans le développement tumoral. Le but est d'inhiber ou d'activer spécifiquement ces voies afin de prévenir le développement du cancer.

**Abréviations :** COX-2 : cyclooxygénase-2; NF-κB : facteur nucléaire kappa B; AP-1 : protéine activatrice; MDRP : Protéine de résistance aux médicaments. [Adapté de Béliveau et Gingras, 2006]

### 1.5.1.1. Polyphénols du thé vert

Les polyphénols contenus dans le thé vert sont des catéchines. Elles font l'objet de maintes recherches sur la prévention du cancer. Les molécules suivantes demeurent les plus étudiées : (-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG), (-)-épigallocatechine (EGC), (-)-épicatechine-3-gallate (ECG), (-)-épicatechine (EC), catéchine (C) et gallocatechine (GC) (figure 4). EGCG et EGC sont des molécules au pouvoir antioxydant conféré par leur structure gallate (Yang et Wang, 2010; Zaveri, 2006). L'activité préventive du thé vert, ou de l'EGCG, a été documentée dans quelques centaines d'articles scientifiques portant sur les cancers de la peau, des poumons, de l'œsophage, de l'estomac et plusieurs autres. Peu de recherches ont été publiées en ce qui concerne les cancers du sang et la promotion des métastases via la perturbation de la barrière hématoencéphalique causée par les cellules immunes et tumorales circulantes.



**Figure 4. Structure moléculaire des différentes catéchines du thé vert.**

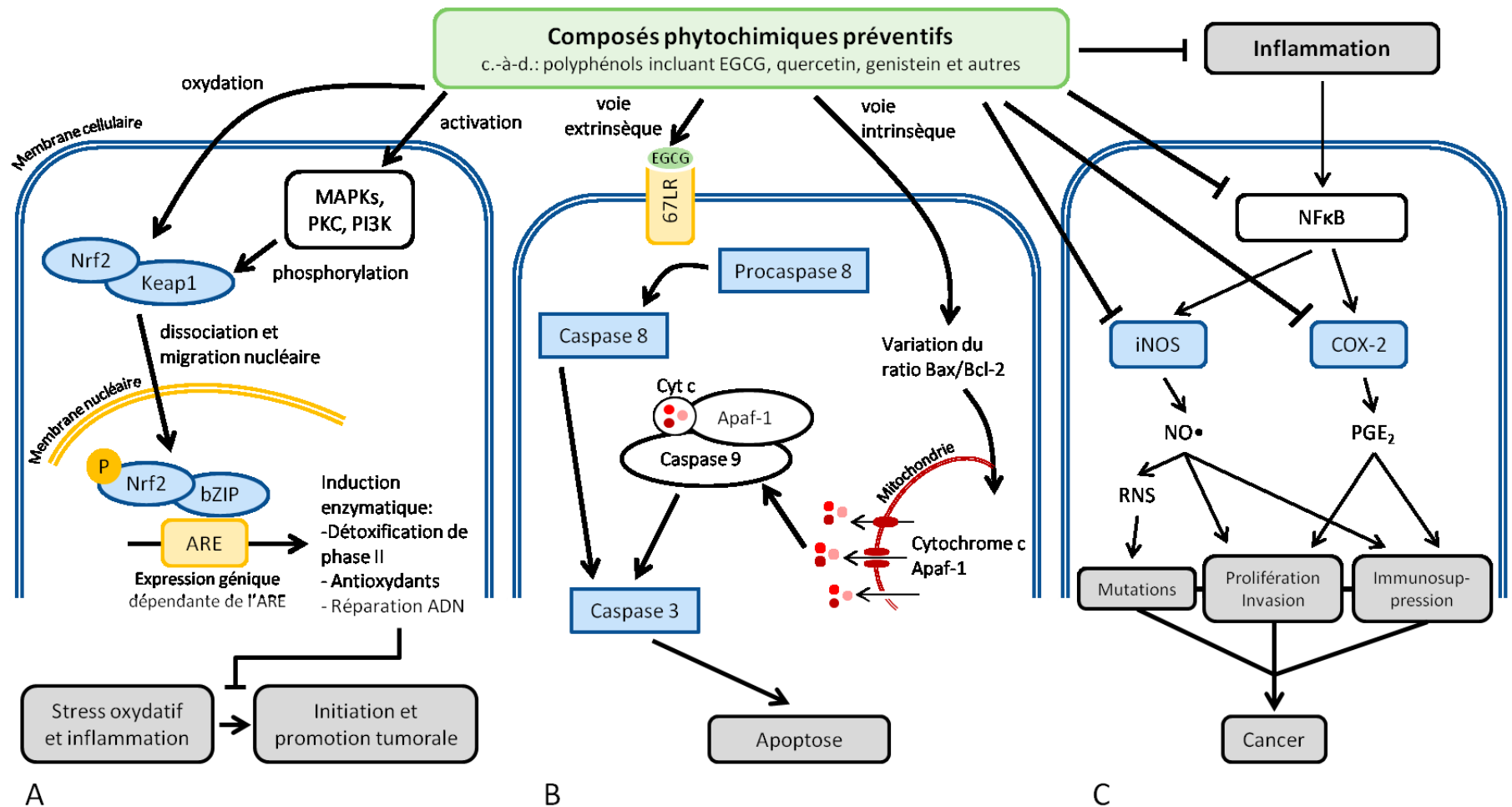
[Adapté de Zaveri, 2006]

### 1.5.1.2. Mécanismes d'action connus de l'EGCG

Lors de la cancérogenèse, les cellules se transforment et acquièrent des caractéristiques tumorales (figures 2 et 3). Il s'ensuit une instabilité génomique due au stress environnemental et à la perte de la capacité à réparer les dommages à l'ADN. Pour prévenir les conséquences induites par ce comportement cellulaire déficient, l'EGCG agit comme un antioxydant, un antiinflammatoire et un antiapoptotique (Singh et al., 2011; Tan et al., 2011). L'EGCG est la molécule la plus étudiée car celle-ci s'est révélée posséder la plus grande capacité à réagir face au stress oxydatif créé par les espèces réactives oxygénées (ERO) (Annabi et al., 2007; Hazawa et al., 2011; Yang et Wang, 2010). Dans un premier temps, l'EGCG active des protéines kinases. La phosphorylation induite par ces protéines kinases mène à la dissociation de la protéine Keap1 du facteur nucléaire Nrf2. Cette dissociation peut aussi être induite par l'oxydation directe de Keap1 par l'EGCG. Ainsi, Nrf2 phosphorylé migre dans le noyau cellulaire. Une fois dans le noyau, Nrf2 phosphorylé se lie à au domaine bZIP. La transcription est activée par l'élément de réponse antioxydant (ARE). L'ARE est présent dans plusieurs enzymes aux actions antioxydantes et détoxifiantes. En somme, la capacité cellulaire de réparation des dommages nucléiques et protéiques est augmentée et la formation d'ERO est évitée. La diminution du stress oxydatif mène à l'inhibition des phases d'initiation et de promotion tumorale (figure 5A) (Tan et al., 2011). Dans un deuxième temps, l'EGCG peut induire l'apoptose, phénomène connu comme un des meilleurs moyens de défense cellulaire contre le cancer car elle est en fait la mort programmée des cellules (Tan et al., 2011). L'EGCG peut induire les voies intrinsèque ou extrinsèque (figure 5B). Dans la voie intrinsèque, la membrane mitochondriale devient perméabilisée par la création de pores transitoires qui adoptent une conformation ouverte. Le ratio Bax/Bcl-2 est augmenté faisant gonfler la matrice mitochondriale. La membrane se fragmente puis des protéines pro-apoptotiques sont relâchées : le cytochrome c, l'Apaf-1 et l'endonucléase G. Ensemble, elles forment un apoptosome qui va activer la voie de la caspase-3 puis l'apoptose. La voie extrinsèque, quant à elle, est activée par la liaison du ligand de la mort (EGCG) à son récepteur (67LR).

Cela active le clivage de la procaspase-8 en caspase-8 permettant l'activation de la caspase-3 puis l'apoptose (Tan et al., 2011). Dans un troisième temps, l'EGCG inhibe les cytokines pro-inflammatoires qui activent la voie de signalisation par le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) (figure 5C). Les gènes transcrits par cette voie sont responsables de la formation d'espèces réactives nitrosylées (ERN) et des prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), c'est-à-dire l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) respectivement. Ces produits font partie de la chaîne d'action menant au développement du cancer (Tan et al., 2011). L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B diminue les risques de mutations, d'invasions métastatiques, de prolifération et d'immunosuppression.





**Figure 5. Mécanismes d'action des composés phytochimiques préventifs.** (A) Activation transcriptionnelle de l'ARE par Nrf2 menant à la diminution du stress oxydatif, impliqué dans le développement tumoral. (B) Activation de l'apoptose via la voie extrinsèque par l'EGCG et via voie intrinsèque par la régulation des signaux anti/pro-apoptotiques. (C) Inhibition des voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse.

[Adapté de : Tan, 2011]

## **2. La leucémie**

### **2.1. Définition**

La leucémie est l'accumulation de globules blancs, ou leucocytes, dans le sang et la moelle osseuse. Dans l'hématopoïèse normale (figure 6A), on remarque qu'à partir des cellules souches hématopoïétiques un progéniteur pluripotent se différencie en deux autres types de cellules progénitrices, myéloïde (CMP) et lymphoïde (CLP). Les CMP et les CLP se différencient ensuite en des cellules sanguines matures (érythrocytes et leucocytes) ayant chacune une fonction respective au sein de l'organisme. Les érythrocytes, aussi appelés globules rouges, servent au transport des gaz à travers les vaisseaux sanguins en passant par les poumons. Les leucocytes regroupent plusieurs types cellulaires; granulocytes, monocytes et lymphocytes. Ils servent à la défense de l'organisme face aux infections et substances étrangères (Société canadienne du cancer, 2011). La différenciation des cellules hématopoïétiques est caractérisée par la répression sélective d'opérons résultant en des changements physiques et fonctionnels au niveau du génome cellulaire. Arrivé à un certain stade, il y a production des protéines régulatrices de l'expression constitutive des gènes réprimés (Guyton et Hall, 2006). C'est ce qui se produit lors de chaque étape de l'hématopoïèse pour que chaque nouvelle cellule croisse et se divise répliquant avec elle son génome.

Toutefois, des changements et des mutations peuvent survenir dans l'ADN des cellules souches ou progénitrices empêchant leur différenciation en cellules matures. Cela cause l'accumulation des CLP ou CMP dans le sang et dans la moelle osseuse. L'hématopoïèse normale et plusieurs voies de signalisation sont déstabilisées augmentant la prolifération des cellules mutées, diminuant la différenciation, rendant le génome instable, augmentant la survie cellulaire et favorisant l'auto-renouvellement (Lensch, 2011; Passegue et al., 2003). Ces caractéristiques sont propres au développement du cancer et plus particulièrement de la leucémie lorsque les cellules hématopoïétiques sont impliquées.

Il existe plusieurs types de leucémies. On reconnaît quatre principaux groupes de leucémies classées selon l'atteinte cellulaire, soit les cellules lymphoïdes ou les cellules

myéloïdes, et selon la vitesse d'évolution de la maladie, soit lente ou rapide, qu'on appelle chronique ou aiguë. Les changements au niveau de l'ADN sont induits par des facteurs de risque dont de fortes radiations parfois dues à l'administration antérieure de radiothérapie. Des réarrangements génétiques sont aussi à l'origine des leucémies : les syndromes myélodysplasique, de Down, de Bloom, de Schwachman-Diamond, de Louis-Bar et la dyskératose congénitale (Faderl et Kantarjian, 2011). Les effets secondaires à la chimiothérapie peuvent aussi se manifester par des lésions de l'ADN. L'exposition à des produits chimiques (benzène et formaldéhyde) est aussi un des facteurs de risque pouvant mener au développement de la leucémie (Société canadienne du cancer, 2011).

## **2.2. Statistiques**

En 2011, il y a eu environ 5000 nouveaux cas de leucémie au Canada et on estime que 50 % de ceux-ci sont décédés de la maladie. Entre 2003 et 2007, c'était le cancer infantile le plus diagnostiqué. L'incidence est d'environ 3,7/100 000 par année et elle augmente avec l'âge jusqu'à 18,6 pour les 65 ans et plus (Longo, 2010). Suite au diagnostic de la maladie, la survie relative est d'environ cinq ans. Une importante amélioration de 10% a été observée favorisant la survie relative une fois la leucémie diagnostiquée (Société canadienne du cancer, 2011). C'est-à-dire que 10% de plus de patients seront encore en vie après une période de 5 ans suivant le diagnostic ramenant le taux de survie relative à 55% (Société de recherche sur le cancer, 2010). Ceci est principalement dû à la combinaison chimiothérapeutique du trioxide d'arsenic et de l'acide *tout-trans*-rétinoïque comme choix de thérapie d'induction mais aussi de consolidation (Ferrara, 2010).

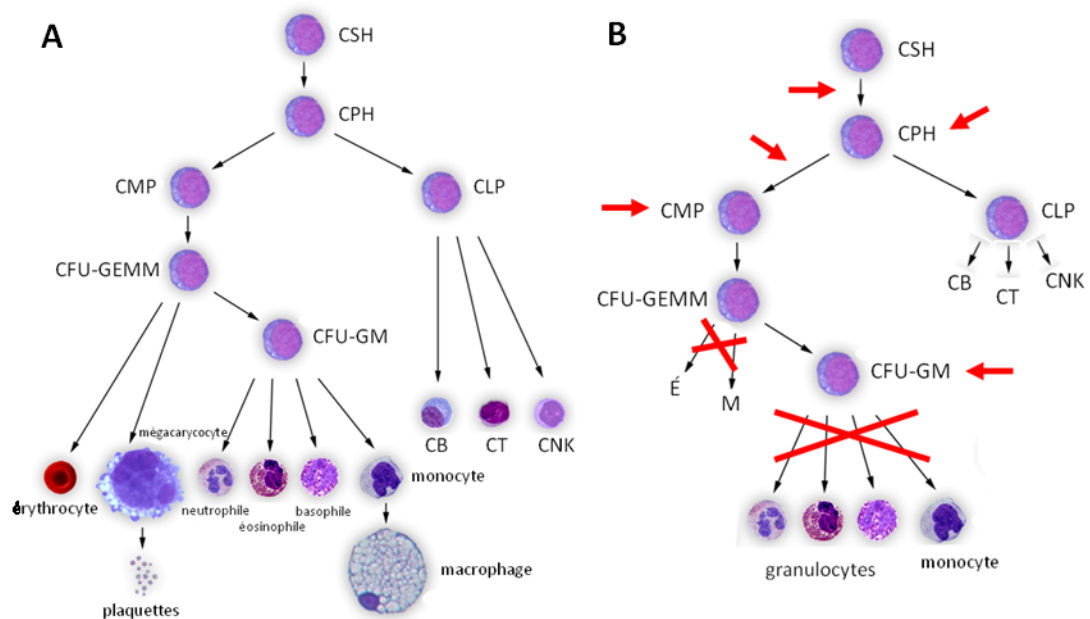
## **2.3. Leucémie promyéloïde aiguë**

La leucémie promyéloïde aiguë (LPA) est la forme la plus commune des leucémies aiguës. Elle représente 16% des nouveaux cas de leucémies infantiles au Canada. Son incidence augmente avec l'âge et le taux de survie chez les moins de 65 ans est de 40% (Lowenberg et al., 1999). La LPA implique une diminution de la différenciation des unités

de formation de colonies des granulocytes et monocytes (CFU-GM). En conséquence, il y a l'accumulation de ces précurseurs immatures dans le sang et la moelle osseuse (figure 6B). La LPA origine d'une translocation sur le chromosome 17q21 menant au réarrangement du gène encodant pour le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR $\alpha$ ). Le RAR $\alpha$  est normalement impliqué dans la différenciation des cellules myéloïdes. Quatre-vingt-quinze pour cent des cas de LPA sont associés avec la protéine de fusion «*promyelocytic-leukemia retinoic-acid receptor  $\alpha$* » (PML-RAR $\alpha$ ) caractérisée par la translocation t(15;17)(q22;q12-21) (Grimwade et Enver, 2004).

Les tissus normaux sont régulés par des facteurs pro et antiangiogéniques. Un dérèglement dans la balance de ces facteurs est associé à la croissance tumorale et aux métastases. Les cellules tumorales sécrètent aussi des facteurs angiogéniques. Cela promeut la chimioattraction de cellules endothéliales et cause l'augmentation de l'angiogénèse dans la moelle osseuse de patients atteints de leucémie. L'angiogénèse est stimulée par les cellules leucémiques qui infiltrent la moelle osseuse. Plus spécifiquement, les cellules de leucémie myéloïde aiguë et les macrophages sont recrutés puis activent la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Schmidt et Carmeliet, 2011). D'une part, ce facteur peut lier son récepteur à activité tyrosine kinase à la surface de ces mêmes cellules leucémiques pour créer une boucle autocrine. D'autre part, il peut lier son récepteur à la surface de cellules endothéliales avoisinantes pour créer une boucle paracrine. L'activation de VEGF via son récepteur par les cellules endothéliales cause la relâche d'autres facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF, facteur des cellules souches : SCF) et induit la prolifération cellulaire. Ces facteurs de croissance activent ensuite les neutrophiles et les macrophages impliqués dans l'inflammation. De plus, les cellules endothéliales stimulent la relâche de métalloprotéases menant à l'extravasation et la migration (Keyhani et al., 2001). Par exemple, VEGF induit la relâche de MMP-9 des cellules leucémiques promyélocytaire HL-60 et des cellules leucémiques myéloïdes fraîchement isolées (Dickson et Shami, 2001). Cela induit la migration cellulaire *in vivo* chez les patients atteints de la leucémie myéloïde aiguë. La néovascularisation dans les

tumeurs solides est importante pour la croissance tumorale et l'induction du phénomène métastatique. Dans les cancers du sang, le développement microvasculaire contribue à la propagation des facteurs de croissance à travers le système sanguin. Ces facteurs altèrent la barrière hématoencéphalique pouvant dégénérer en neuroinflammation cérébrale (Mangi et Newland, 2000).



**Figure 6. Hématopoïèse.** Hématopoïèse normale (A) en comparaison à l'hématopoïèse dysfonctionnelle de la leucémie promyéloïde aiguë (LPA) (B). (→) : atteintes génétiques possibles de la LPA.

**Abréviations :** CSH : cellule souche hématopoïétique; CPH : cellule pluripotente hématopoïétique; CMP : progéniteur myéloïde commun; CLP : progéniteur lymphoïde commun; CFU-GEMM : unité de formation de colonies des granulocytes, érythrocytes, monocytes, mégacaryocytes; CFU-GM : unité de formation de colonies des granulocytes, monocytes; CB : cellule B; CT : cellule T; CNK : cellule «*natural killer*»; LPA : leucémie promyélocytaire aiguë. [Adapté de Lensch, 2011; Grimwade et Enver, 2004]

## 2.4. Thérapies

Actuellement, lorsqu'une leucémie est diagnostiquée, il existe plusieurs options de traitements. Les patients atteints de la LPA sont traités avec une combinaison d'acide *trans-trans*-rétinoïque (ATRA) et d'une chimiothérapie au trioxide d'arsenic pour induire la rémission (de The et Chen, 2010; Mi et al., 2012; Rubnitz et al., 2010). Puisque la chimiothérapie seule ne guérit pas tout, il est essentiel de prévenir la rechute grâce à la transplantation de moelle osseuse. On recherche alors un donneur compatible avec le receveur pour les antigènes des leucocytes humains (HLA). Cette transplantation va contribuer au renouvellement des cellules hématopoïétiques et engendrer l'hématopoïèse normale. Ces démarches thérapeutiques sont applicables et tolérables surtout chez les enfants et les adultes de moins de 65 ans. Chez les personnes plus âgées, la chimiothérapie intensive est toxique et moins supportée. En dernier recours, l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques peut aider à stimuler l'hématopoïèse et à mobiliser les granulocytes et monocytes de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. De plus, le pouvoir thérapeutique est limité par des effets secondaires comme l'aplasie médullaire, la perte de cheveux, les douleurs cutanées, musculaires et articulaires, les phlébites, les dommages aux organes et les infections et cancers secondaires incluant la neuroinflammation. Dans tous les cas, peu importe l'âge, des nouvelles options de thérapie doivent être explorées.

## 2.5. Modèle cellulaire – HL-60

Les cellules promyélocyaires humaines HL-60 sont utilisées dans plusieurs laboratoires en tant que modèle de la leucémie promyéloïde aiguë (Jasek et al., 2008). Elles ont été isolées d'une femme caucasienne de 36 ans atteinte de la LPA (Gallagher et al., 1979). Elles sont cultivées en suspension dans leur milieu de culture et prolifèrent de façon exponentielle (Collins, 1987). Elles demeurent un excellent modèle *in vitro* pour étudier les événements moléculaires de développement et de différenciation spécifiques aux lignées cellulaires myéloïdes. Elles sont immortelles et pluripotentes. Elles peuvent se différencier

en granulocytes, monocytes ou macrophages (Esendagli et al., 2009; Beltran et al., 2006). Les cellules HL-60 différenciées contribuent à la propagation des facteurs pro et antiangiogéniques pouvant mener à la perturbation de la barrière hématoencéphalique. Cela facilite la transmigration de cellules immunes, de cellules leucémiques et de pathogènes. Par exemple, les macrophages circulants dérivés des cellules HL-60 perturbent la BHE et migrent au travers de celle-ci. Ils contribuent à prolonger la survie des cellules affectées (Seidel et al., 2011).

### **2.5.1. Différenciation des cellules HL-60**

Les cellules HL-60 ont la capacité de se différencier en une variété de lignées cellulaires, tels les granulocytes, les monocytes puis les «*macrophages-like*» Collin 1987, (Gallagher et al., 1979). Cela se fait par l'ajout d'agents spécifiques dans le milieu de culture des cellules. Une exposition au diméthylsulfoxyde (DMSO) ou à l'acide rétinoïque *tout-trans* (ATRA) d'au moins 12 heures est nécessaire avant que les cellules ne commencent à se différencier en granulocytes. L'exposition au DMSO ou à l'ATRA doit demeurer entre 3 et 5 jours pour obtenir une quantité maximale de cellules différenciées. La vitamine D3 (1,25 dihydroxyvitamine D3) induit la différenciation en monocytes. Cette différenciation n'est pas terminale et les monocytes conservent leur capacité de prolifération. Les cellules HL-60 peuvent se différencier en monocytes/macrophages grâce au phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). On appelle ces cellules «*macrophages-like*», car ce sont des macrophages qui comportent des caractéristiques phénotypiques, enzymatiques, histochimiques et fonctionnelles semblables aux cellules monocytaires. Les «*macrophages-like*» acquièrent une capacité d'adhésion au flacon de culture beaucoup plus intense que les cellules HL-60 différenciées en monocytes (Collins, 1987). La différenciation en monocytes/macrophages par le PMA est associée à la perte de la prolifération. Cela est intéressant pour le traitement car cet effet antiprolifératif a été observé dans des cellules leucémiques fraîchement isolées. Par contre, les effets adverses induits par le PMA, un promoteur de tumeurs, font en sorte que les cellules HL-60

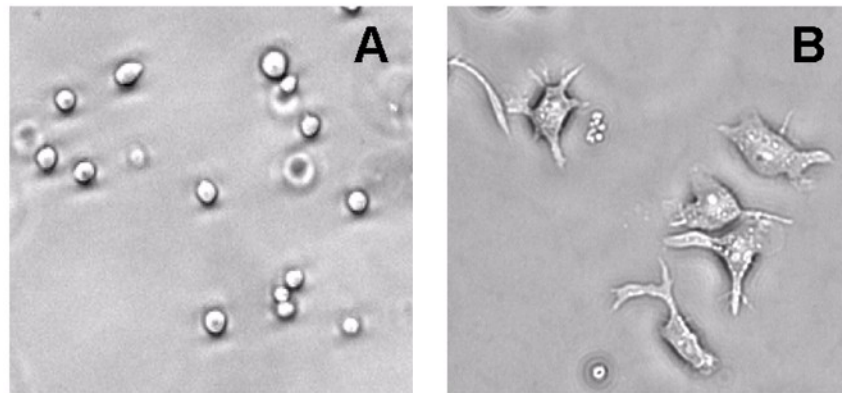
différenciées en «*macrophages-like*» ont un grand potentiel métastatique. Le PMA devient donc un mauvais candidat thérapeutique (Collins, 1987; Gallagher et al., 1979). Par contre, l'utilisation du PMA comme agent de différenciation des cellules HL-60 est d'un intérêt particulier. Son usage *in vitro* permet l'activation de diverses voies de signalisation et l'obtention de cellules «*macrophages-like*». Ces cellules expriment alors des caractéristiques différentes des cellules HL-60 non différenciées. Principalement, elles sont capables de pénétrer la BHE. Elles produisent également une quantité élevée de biomarqueurs de la cancérogénèse et des métastases. Ainsi, grâce au PMA, il est possible à partir de cellules non différenciées d'obtenir des cellules exprimant des marqueurs inflammatoires, invasifs et stressants pouvant causer des infections secondaires à la perturbation de la BHE.

### **2.5.2. Phorbol 12-myristate 13-acétate**

Le PMA, aussi connu sous le nom de 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), est le principal ester de phorbol dérivé de la plante *Croton tiglium*. Le PMA est un promoteur de tumeurs et un homologue stable du 2,3-diacylglycérol (DAG) duquel il mime les effets (Jasek et al., 2008; Sigma-Aldrich, 1997). Il agit en se liant et en activant de façon soutenue les enzymes de la famille des protéines kinases C (PKC), contrairement au DAG qui active la PKC de façon transitoire. Le PMA est aussi connu comme l'agent de différenciation primaire des cellules promyélocytaires humaines (HL-60). Il n'est pas un composé sélectif, alors il peut activer d'autres enzymes. Grâce à l'activation de la PKC et la phosphorylation de protéines (récepteur de la transferrine, protéines cytosoliques, topoisomérase II), le PMA mène à la différenciation des cellules HL-60 et leur confère le phénotype atypique des cellules «*macrophages-like*». De plus, l'activation de la PKC est reliée aux phénomènes d'invasion et de métastases par la régulation de l'expression et de la sécrétion de la MMP-9 par des voies de transcription telles NF- $\kappa$ B. Une fois la PKC activée, il y a aussi modulation d'autres facteurs de croissance tel le VEGF impliqué dans le remodelage vasculaire. En liant la PKC, le PMA promeut les tumeurs et a un impact



important dans la cancérogenèse. À des doses aussi faibles que 1 nM, les cellules HL-60 normalement en suspension adhèrent au pétri de culture, étendent leur cytoplasme et leur membrane plasmique se déforme en pseudopodes (figure 7) (Huberman et Callaham, 1979; Brock et al., 2003).



**Figure 7. Morphologie des cellules HL-60.** Normalement en suspension dans leur milieu de culture et de forme ronde (A), lorsqu'on ajoute le PMA, les cellules HL-60 se différencient en macrophages et adhèrent au pétri de culture en s'étendant et en formant des pseudopodes (B).

[Brock et al., 2003]

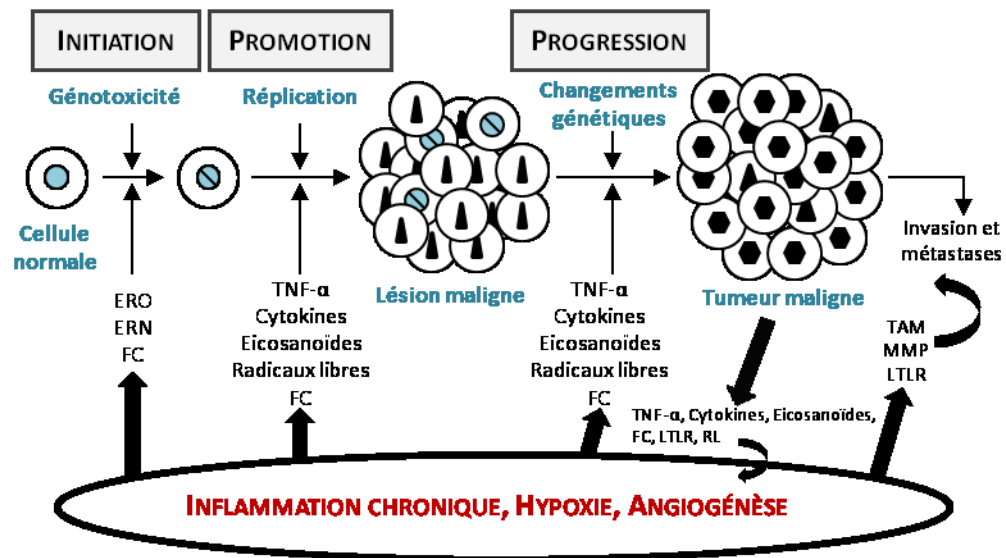
### **3. Processus cellulaires et moléculaires de la cancérogenèse**

Tel que mentionné précédemment, la cancérogenèse est un procédé qui se concrétise en plusieurs étapes : initiation, promotion et progression. La promotion tumorale requiert la survie des cellules initiées grâce aux processus cellulaires et moléculaires caractérisés par des biomarqueurs spécifiques présentés dans le texte des sections qui suivent. La progression tumorale peut mener au mécanisme d'invasion. Cela peut amener les toxines et cellules immunes circulantes à déstabiliser et pénétrer la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette dernière contribue au maintien de l'homéostasie du cerveau et joue un rôle protecteur en contrôlant l'accès des molécules solubles et toxiques au système nerveux central. Elle est formée de cellules endothéliales spécifiques aux capillaires cérébraux (BCEC) interconnectées par des jonctions serrées. Les BCEC sont entourées de la matrice extracellulaire, d'astrocytes, de péricytes et de la microglie. La membrane basale des BCEC est primordiale dans le développement et la conservation des propriétés de la BHE et dans le contrôle des échanges entre le sang et le cerveau (Pardridge, 2002; Van den Steen et al., 2002). La perturbation de la BHE reliée à la surexpression des biomarqueurs associés à la cancérogenèse telles la métalloprotéase matricielle-9 (MMP-9) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) peut mener à des complications secondaires comme la neuroinflammation (Candelario-Jalil et al., 2007).

#### **3.1. Biomarqueurs de l'inflammation associés à la cancérogenèse**

Le développement tumoral est régi par des processus cellulaires et moléculaires caractérisés par des biomarqueurs tels les facteurs de transcription, les facteurs de croissance, les chemokines et cytokines, les voies de signalisation telles les voie de Wnt, NF- $\kappa$ B, Caspase et 67LR. L'interrelation entre le processus inflammatoire et le cancer est caractérisée par plusieurs biomarqueurs (figure 8). L'infiltration leucocytaire survient lors de la phase d'inflammation aiguë. L'infiltration par les macrophages et les lymphocytes T caractérise la phase d'inflammation chronique. Un microenvironnement complexe et dynamique composé de cellules inflammatoires et immunitaires se crée autour de la tumeur. La sécrétion subséquente de cytokines, chemokines et facteurs de croissance

affecte le développement cancéreux dès l'initiation jusqu'à l'invasion (Sgambato et Cittadini, 2010).



**Figure 8. Représentation schématique de la répercussion des biomarqueurs impliqués à chaque étape de la cancérogenèse.** Pendant les phases d'initiation, de promotion et de progression tumorale, plusieurs biomarqueurs sont surexprimés. Ces biomarqueurs originent des phénomènes d'inflammation, d'hypoxie et d'angiogénèse. Ils peuvent aussi être produits par la tumeur elle-même créant un cercle vicieux de développement néoplasique. Les cellules immunes associées aux tumeurs expriment aussi les biomarqueurs responsables de l'invasion et des métastases.

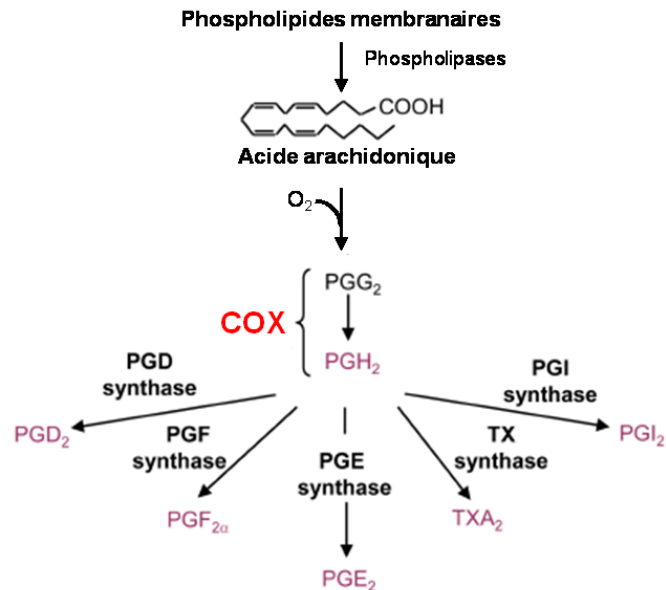
**Abréviations :** ERO : espèces réactives de l'oxygène; ERN : espèces réactives nitrosylées; FC : facteurs de croissance; LTLR : ligand des récepteurs «*toll-like*»; RL : radicaux libres; TAM : macrophages associés aux tumeurs; MMP : métalloprotéase matricielle. [Adapté de : Sgambato et Cittadini, 2010]

Lors de la phase inflammatoire aiguë, les cellules immunitaires recrutées au foyer tumoral éliminent les pathogènes dans le but de ralentir le développement pathologique. Les cellules dendritiques et «*natural killers*» relâchent les médiateurs inflammatoires tels les chemokines, TNF- $\alpha$ , éicosanoïdes, facteurs de croissances, radicaux libres et COX-2. Par la suite, l'immunité adaptative est activée. La famille des récepteurs «*toll-like*» (TLR)

est grandement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et inflammatoires (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B). L'activation des TLR induit la réponse inflammatoire et la production subséquente de cytokines. Les ligands des TLR influencent les fonctions cellulaires telles l'apoptose, la prolifération et la différenciation (Sgambato et Cittadini, 2010).

L'inflammation chronique favorise la promotion tumorale. Le risque de mutations géniques est augmenté par la génotoxicité causée par la surproduction d'ERO et d'ERN. Cela favorise l'apparition de cellules initiées. Un microenvironnement inflammatoire se crée autour de la tumeur. Cela engendre la promotion des signaux favorisant la survie et la prolifération. La voie de Wnt, les cyclooxygénases et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B sont des biomarqueurs importants de l'inflammation reliée au cancer (Sgambato et Cittadini, 2010).

La cancérogenèse promeut l'inflammation via la production d'eicosanoïdes, principalement des prostaglandines par la COX-2, enzyme proinflammatoire inducible hautement exprimée dans les cellules inflammatoires de l'environnement tumoral (Annabi et al., 2007; Kalinski, 2012; Sgambato et Cittadini, 2010). Les cyclooxygénases catalysent la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (figure 9). La COX-2 est induite dès l'initiation de la cancérogenèse et son expression dépasse souvent les niveaux physiologiques. La transcription du gène encodant pour la COX-2 est activée par des médiateurs inflammatoires et des cytokines telles IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ . La cyclooxygénase-2 est surexprimée de façon constitutive dans les cellules tumorales. La régulation de son expression se fait autant au niveau transcriptionnel que traductionnel (Cerella et al., 2010). La surexpression de la COX-2 implique l'augmentation de la production de prostaglandines et particulièrement la prostaglandine E<sub>2</sub> qui contribue à attirer les neutrophiles, macrophages et mastocytes vers les tissus endommagés (Kalinski, 2012). Le ciblage thérapeutique et préventif de la COX-2 est de plus en plus populaire, car elle constitue un biomarqueur important de l'inflammation reliée au développement carcinogénique.



**Figure 9. Biosynthèse des prostaglandines.** Les cyclooxygénases catalysent la production de PGH<sub>2</sub> à partir de l'oxydation de l'acide arachidonique. La synthèse des autres prostaglandines (PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) se fait ensuite via leur synthase respective.

**Abréviation :** COX : cyclooxygénase; PG : prostaglandine; PGH<sub>2</sub> : prostaglandine H<sub>2</sub>; PGD : prostaglandine D; PGF : prostaglandine F; PGE : prostaglandine E; PGI : prostacycline; PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>; TX : thromboxane; TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>. [Adapté de : Blackwell, 2010]

### 3.2. Biomarqueurs de l'invasion, de la migration et des métastases

Pendant que la tumeur progresse, les cellules atteintes activent les processus de transmigration au travers des membranes basales et infiltrent les tissus interstitiels. L'invasion se fait en cinq étapes avec des réactions secondaires dépendamment des molécules impliquées et/ou sécrétées par les cellules ou la matrice extracellulaire (MEC). La polarisation et la protrusion cellulaire enclenchent le processus migratoire. Les cellules s'attachent ensuite aux fibres de la MEC. Ces fibres sont dégradées par la protéolyse localisée à la surface cellulaire afin de générer l'espace nécessaire à l'avancement du corps

cellulaire. Les fibres d'actomyosine se contractent et génèrent une force capable de déformer la cellule et la MEC. Finalement, la cellule adhère puis son corps traînant se rétracte (Faderl et Kantarjian, 2011; Wolf et Friedl, 2011). L'invasion et la migration mènent au phénomène de métastases et à la création de nouveaux microenvironnements hypoxiques. La carence en oxygène et en nutriments devient évidente. Alors, le phénomène d'angiogénèse est déclenché. C'est-à-dire que des nouveaux vaisseaux sanguins se forment pour alimenter la tumeur et/ou les métastases. Les signaux proangiogéniques, comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), activent les cellules endothéliales des vaisseaux existants avoisinants afin qu'elles deviennent mobiles et invasives. La métalloprotéase membranaire MT1-MMP collabore en dégradant la MEC et en activant à son tour des facteurs de croissance proangiogéniques (Potente et al., 2011). De plus, des chemokines et cytokines recrutent des macrophages associés aux tumeurs (TAM) pour contribuer à l'invasion tumorale. Les TAMs sécrètent à leur tour des cytokines proangiogéniques, IL-1, COX-2 et TNF- $\alpha$ . Ces sécrétions induisent la MMP-9 et conduisent au relâchement du VEGF de la MEC. Les niveaux des facteurs de transcription inductibles HIF-1 $\alpha$  et iNOS sont aussi augmentés (Pollard, 2004).

### **3.2.1.1. Matrice extracellulaire et métalloprotéases**

La matrice extracellulaire (MEC) constitue le tissu conjonctif. Elle représente tout le matériel entourant les cellules. Dans la MEC, on retrouve deux principales composantes : la membrane basale et la matrice interstitielle. La membrane basale est une couche condensée de la MEC adjacente aux cellules épithéliales, endothéliales, musculaires, de Schwann ainsi que les adipocytes (Bosman et Stamenkovic, 2003). La MEC est composée de polysaccharides, de protéines fibreuses, de protéines de structure (collagène, élastine) et de protéines d'adhésion (fibronectine, laminine) jouant un rôle important dans l'interaction cellule-cellule ou cellule-MEC (Weber et Kuo, 2011; Wheeler et al., 2001). Par sa grande diversité, la MEC possède plusieurs fonctions. Elle procure un support et un ancrage pour les cellules. Elle sert aussi à séparer les différents tissus et elle est impliquée dans la régulation de la communication intercellulaire (Mueller et Fusenig, 2004). La MEC module

donc le comportement dynamique des cellules. La MEC est constamment en remodelage par des protéases, notamment la famille des métalloprotéases matricielles (MMPs).

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des endopeptidases capables de dégrader tous les types de composants protéiques de la MEC. Elles sont aussi impliquées dans le remodelage tissulaire, le développement embryonnaire, la croissance et la cicatrisation. Jusqu'à présent, il existe plus d'une vingtaine de MMPs : collagénases (MMP-1, 8 et 13), gélatinase A (MMP-2), gélatinase B (MMP-9), stromélysine 1 (MMP-3), stromélysine 2 (MMP10), matrilysine (MMP-7), enamélysine (MMP-20), métalloélastase des macrophages (MMP-12) et MMP-19. Il existe aussi les métalloprotéases membranaires (MT-MMP) : 1 à 4, stromélysine 3 et MMP-11. L'expression des MMPs est régulée par les facteurs de croissance, les hormones, les cytokines et les transformations cellulaires. Toutes les MMPs sont synthétisées sous une proforme latente pour ensuite être activées par divers stimuli (Nagase et al., 2006; Nagase et Woessner, 1999). Les proMMPs sont sécrétées puis activées dans la MEC. La proMMP-9 peut être modulée par l'augmentation de l'oxyde nitrique, la plasmine et les protéinases. La MT1-MMP régule l'activation de la proMMP-2 à la surface cellulaire (Nagase et al., 2006). La proMMP-2 est activée suite à son recrutement à la surface cellulaire. La MT1-MMP est son principal activateur physiologique (Sato et Takino, 2010). La proMMP-2 peut aussi être activée par d'autres MT-MMPs et par le système uPA/plasmine associé à la surface cellulaire (Le et al., 2003). Une fois activées, les gélatinases A et B (MMP-2 et MMP-9) dégradent le collagène de type IV, la gélatine et l'élastine. Il y a augmentation des niveaux d'expression des gélatinases lors de la cancérogenèse car elles sont spécifiquement impliquées dans les processus métastatiques et inflammatoires (figure 10) (Annabi et al., 2007; Klein, 2004; Weber et Kuo, 2011). Plus particulièrement, l'activité gélatinolytique de la MMP-9 peut être régulée selon cinq mécanismes : transcription, sécrétion, activation, inhibition et glycosylation. Dans la plupart des cellules, sa transcription est induite par des cytokines, des facteurs de croissance, des esters de phorbol et des hormones qui activent des sites transcriptionnels spécifiques sur le promoteur de la MMP-9. Par exemple, il existe 4 sites de liaison à l'AP-1, un motif NF- $\kappa$ B qui reconnaît la sous-unité p65, un deuxième motif

NF- $\kappa$ B qui reconnaît la sous-unité p50 et finalement, la séquence consensus Sp1 marquant le site de départ de la transcription (Chakraborti et al., 2003; Van den Steen et al., 2002). Ensuite, l'enzyme est sécrétée dans le milieu extracellulaire. La MMP-9 est également impliquée dans le développement tumoral et dans l'angiogénèse. La perte de contrôle des mécanismes de régulation de la MMP-9 est également observée dans les maladies inflammatoires (blessures chroniques, inflammation de la peau, des tractus pulmonaire, gastrointestinale et rénale, des articulations, des vaisseaux sanguins et du système nerveux), infectieuses, vasculaires, dégénératives et malignes (cancers) (Van den Steen et al., 2002).

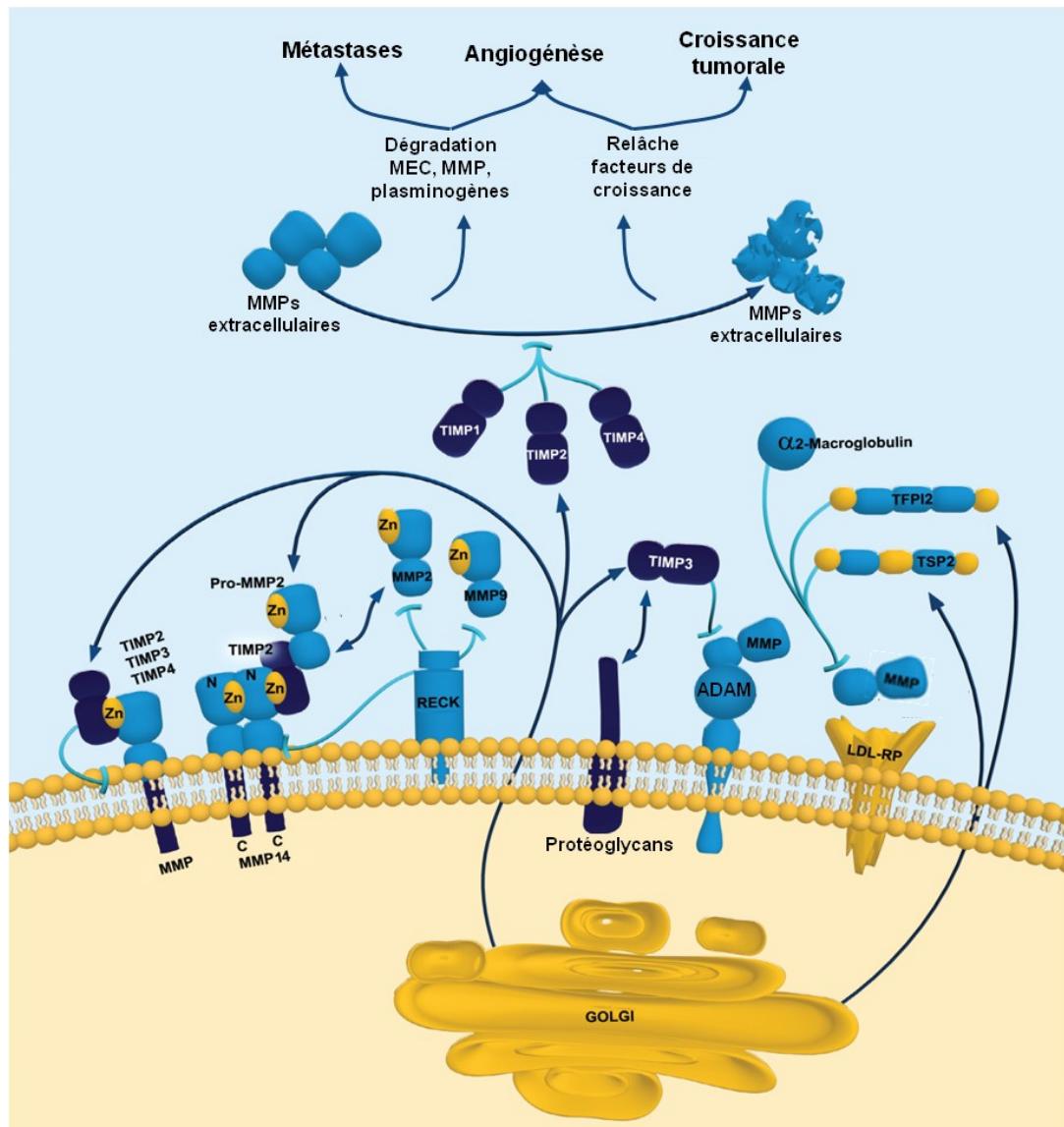
Les MMPs sont inhibées par les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP) spécifiques et les  $\alpha$ -macroglobulines (figure 10). La balance MMP/TIMP doit être maintenue sans quoi surviennent des pathologies telles l'arthrite, le cancer, les métastases et la fibrose. Les TIMPs jouent aussi un rôle comme facteurs de croissance indépendamment de leur activité inhibitrice des MMPs. Lorsqu'ils ne sont pas complexés aux MMPs et qu'ils ont un niveau réduit d'alkylation, les TIMPs stimulent la prolifération cellulaire (Hayakawa et al., 1994). Cette activité varie selon les lignées cellulaires et la quantité de TIMPs produite. L'activation de la croissance se fait via un récepteur membranaire spécifique. Les TIMPs sont donc des molécules à deux fonctions : stimulation de la prolifération cellulaire et inhibition des MMPs (Moore et Crocker, 2012). De plus, les TIMPs contribuent au maintien de l'intégrité de la MEC et ils sont exprimés de façon ubiquitaire chez l'humain (Hayakawa et al., 1994). Leur rôle d'inhibiteur de MMPs leur confère également une activité antiangiogénique (Bode et al., 1999; Nagase et Woessner, 1999; Tong et Zhang, 2012).

### **3.3. Voie de signalisation par NF- $\kappa$ B**

Les protéines de la famille de facteurs de transcription NF- $\kappa$ B jouent un rôle essentiel dans les fonctions immunitaires, prolifératives, antiapoptotiques et oncogéniques. Cette famille comprend les sous-unités p65(RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF- $\kappa$ B1) et p52 (NF- $\kappa$ B2). Les deux dernières protéines sont activées par p105 et p100, leurs précurseurs respectifs. Ces précurseurs font partie de la famille d'inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Cette

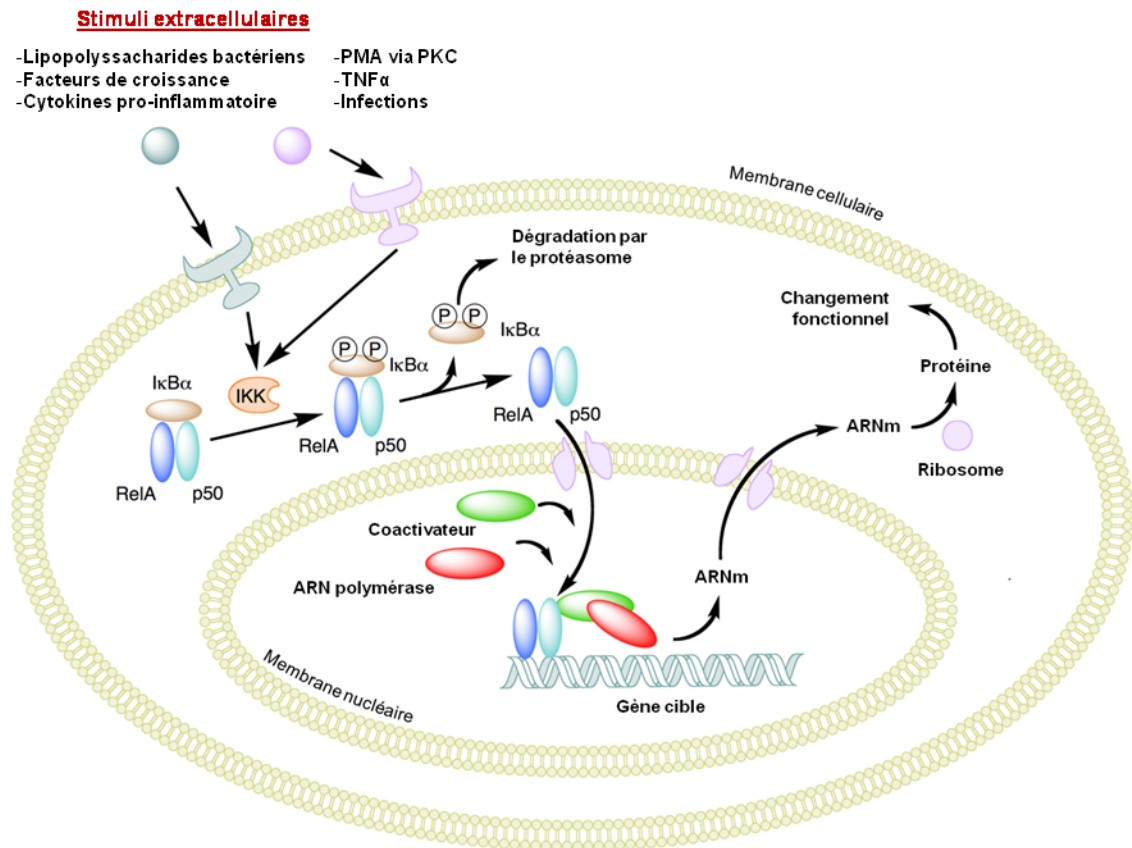


famille comprend les sous-unités I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p100 et p105 (St-Pierre et al., 2003). Les sous-unités de la famille NF- $\kappa$ B activent des gènes cibles via leur région d'homologie Rel (RHR), un domaine de liaison et de dimérisation hautement conservé. L'hétérodimère composé des sous-unités p50 et p65 constitue avec I $\kappa$ B $\alpha$  la principale forme inactive de NF- $\kappa$ B. L'interaction entre le dimère p50/p65 et le monomère I $\kappa$ B cache le signal de localisation nucléaire (SLN) qui retient les protéines NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme. Les I $\kappa$ B kinases (IKK) contiennent une spécificité pour les résidus Sérine responsables de la destruction de la boîte I $\kappa$ B. Le complexe IKK contient une kinase (IKK $\alpha$  ou IKK $\beta$ ) et la protéine régulatrice NEMO (IKK $\gamma$ ). En l'absence de NEMO, le complexe IKK ne peut être activé (Breccia et Alimena, 2010; Zheng et al., 2011). Après réception d'un signal extracellulaire provenant des cytokines, du TNF $\alpha$ , des lipopolysaccharides bactériens ou autres stimuli, l'IKK phosphoryle l'I $\kappa$ B. Cette phosphorylation induit la dégradation subséquente par le protéasome 26S (Scheidereit, 2006; St-Pierre et al., 2003). La dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  se produit généralement entre 5 et 30 minutes selon l'origine de la stimulation. Quant à I $\kappa$ B $\epsilon$ , sa dégradation se fait entre 60 et 90 minutes (Kanarek et Ben-Neriah, 2012). La phosphorylation et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  permettent la libération de l'hétérodimère p50/p65 et permet sa translocation au noyau. L'hétérodimère reconnaît la région  $\kappa$ B sur les promoteurs des gènes cibles et active leur transcription (figure 11).



**Figure 10. Représentation schématique de l'implication des MMPs dans les concepts entourant la progression cancéreuse.** Les métalloprotéases sont sécrétés et sont finement régulées par d'autres protéases telles RECK, ADAM, LDL-RP et MT-MMP ainsi que par leurs inhibiteurs naturels (TIMPs). Les MMPs modulent la dégradation de la matrice extracellulaire et la relâche de facteurs de croissance. Ensemble, ils déclenchent la formation de nouveaux vaisseaux et contribuent à la croissance tumorale et à l'invasion métastatique.

**Abréviations :** MMPs : métalloprotéases matricielles; TIMPs : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases; MEC : matrice extracellulaire; Zn : Zinc; MT-MMP : métalloprotéases de type membranaire; LDL-RP : Récepteur de lipoprotéines de faible densité. [Adapté de : ABCAM, 2012 , Klein, 2004]



**Figure 11. Voie de signalisation par NF- $\kappa$ B.** Des signaux extracellulaires activent la famille des IKKs qui catalyse la phosphorylation d'I $\kappa$ B. L'hétérodimère RelA/p50 est libéré de sa protéine inhibitrice. Le protéasome dégrade P-I $\kappa$ B dans le cytoplasme pendant que l'hétérodimère RelA/p50 subit une translocation au noyau afin de réguler la transcription qui se traduit par une augmentation de la synthèse protéique et divers changements de fonctions cellulaires.

**Abréviations :** I $\kappa$ B : inhibiteur de NF- $\kappa$ B; IKK : I $\kappa$ B kinase; ARN : acide ribonucléique; ARNm : ARN messager; P-I $\kappa$ B: I $\kappa$ B phosphorylé. [Adapté de : Toussiot, 2010]

La voie de signalisation par NF- $\kappa$ B relie les phénomènes d'inflammation et de développement tumoral. Des gènes inflammatoires, immunorégulateurs, antiapoptotiques et régulateurs du cycle cellulaire sont induits par NF- $\kappa$ B. Pendant la phase d'inflammation chronique, la voie NF- $\kappa$ B régule la transcription des gènes nécessaires à la survie des cellules et à l'induction du potentiel métastatique (Ben-Neriah et Karin, 2011; Faderl et

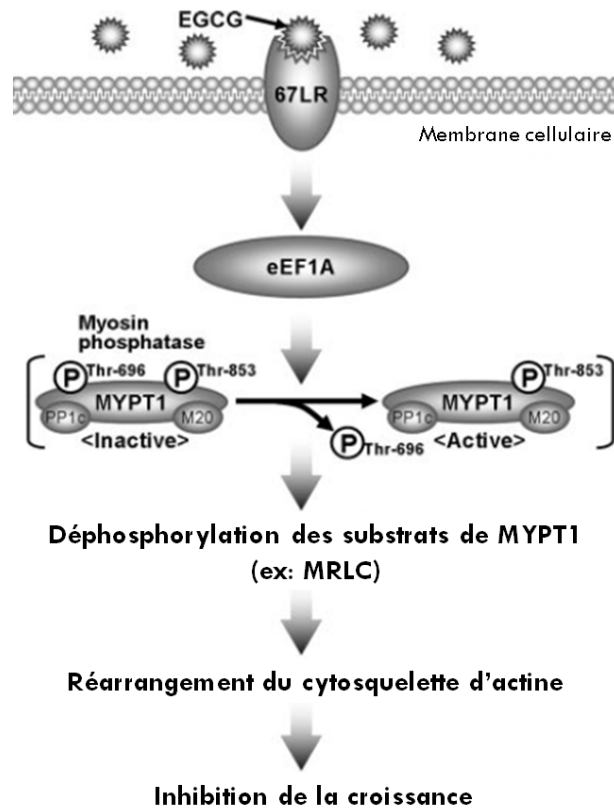
Kantarjian, 2011; Zheng et al., 2011). La voie NF- $\kappa$ B peut être inhibée par plusieurs composés naturels issus de notre alimentation. Par exemple, les composés isoprénoïdes, triterpénoïdes et les lactones sesquiterpéniques sont reconnus pour leurs propriétés antiinflammatoire et anticancéreuse. Les composés phénoliques dont les catéchines, les théflavines, le curcuma, la génistéine et la quercétine sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes. Il existe une panoplie d'agents naturels capables d'inhiber des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, AP-1 et STAT3. Le complexe IKK, la phosphorylation et la dégradation d'I $\kappa$ B sont les cibles potentielles visées par ces agents naturels afin d'inhiber la voie de signalisation impliquant NF- $\kappa$ B (Aggarwal et Shishodia, 2006; Bremner et Heinrich, 2002). Plus spécifiquement, l'EGCG inhibe la voie NF- $\kappa$ B au niveau de la phosphorylation d'I $\kappa$ B catalysée par IKK (Singh et al., 2011).

### **3.4. Voie de signalisation par le récepteur à l'EGCG**

La laminine est une glycoprotéine non-collagénique située à la membrane basale des cellules. Elle est essentielle à l'assemblage de la membrane basale. La laminine contribue à l'attachement cellulaire et à l'angiogénèse. Elle induit la croissance de neurites et affecte l'expression génique. Enfin, elle est impliquée dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. Il existe deux groupes de récepteurs à la laminine : intégrines et non-intégrines. Le récepteur à la laminine de 67 kDa (67LR) fait partie du deuxième groupe (Givant-Horwitz et al., 2005). Il lie avec une grande affinité et spécificité la laminine-1 (Nelson et al., 2008). Une protéine hautement conservée de 37 kDa (37LRP) joue le rôle de précurseur au 67LR (Givant-Horwitz et al., 2005). Le phénomène entourant la formation du 67LR à partir du 37LRP demeure incertain. Toutefois, des études publiées démontrent que c'est l'hétérodimérisation par acylation des lipides membranaires entre le 37LRP et la galectine-3, une protéine de 30 kDa portant des épitopes, qui mène à la formation du récepteur à la laminine de 67 kDa (Ardini et al., 1998; Buto et al., 1998; Nelson et al., 2008). De plus, c'est en fait le 37LRP qui comporte la séquence palindrome LMWWML servant de site de liaison de haute affinité pour la laminine-1. Suite à l'acylation du précurseur, la séquence se retrouve dans le 67LR lui permettant de lier la laminine. C'est

pourquoi il est possible de détecter, à partir du même anticorps, les résidus protéiques de 67LR et de 37LRP (Ardini et al., 1998).

Étant donné le rôle connu du 67LR dans la progression tumorale, ce récepteur s'est avéré une cible potentielle dans la prévention du cancer. À ce titre, il a récemment été identifié comme récepteur membranaire pour l'EGCG. La régulation de l'activité anticancéreuse de l'EGCG passe par le facteur eucaryotique d'élongation de la traduction 1A (eEF1A) (figure 12). La liaison de l'EGCG au 67LR mène à l'augmentation des niveaux protéiques de l'eEF1A. L'activation de l'eEF1A engendre une cascade de signalisation. D'abord, l'EGCG réduit la phosphorylation de la sous-unité myosine phosphatase 1 (MYPT1) sur son résidu Thr-696 entraînant l'activation de la myosine phosphatase. Ensuite, l'EGCG inhibe la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine (MLRC). La MLRC contrôle l'activité de la myosine, protéine motrice impliquée dans la contraction musculaire, la locomotion et la division cellulaire. La MLRC est régulée par la MLC kinase et la myosine phosphatase (Umeda et al., 2008).



**Figure 12. Modèle du mécanisme d'action de l'EGCG par la voie de 67LR.** L'EGCG se lie à son récepteur à la surface cellulaire. Il y a une augmentation des niveaux protéiques d'eEF1A. La myosine phosphatase est activée par le facteur d'élongation eEF1A. Les substrats de MYPT1 sont déphosphorylés lesquels produisent un réarrangement du cytosquelette d'actine et une inhibition de la croissance cellulaire.

**Abréviations :** EGCG : (-)-épigallocatechine-gallate; 67LR : récepteur à la laminine de 67kDa; eEF1A : facteur d'élongation de la traduction eucaryote; MYPT1 : myosine phosphatase; MRLC : chaîne légère régulatrice de la myosine [Adapté de : Umeda, 2008]

## 4. Hypothèse et objectifs

Le statut de différenciation cellulaire peut être associé à la neuroinflammation secondaire au développement tumoral, plus spécifiquement lors de l'infiltration cérébrale au travers de la BHE. De plus, à notre connaissance, les voies de signalisation impliquées dans cette différenciation demeurent inconnues. Le PMA entraîne la transduction du signal intracellulaire via une multitude de cibles et de voies de signalisation. Il est possible que la voie NF- $\kappa$ B soit activée et qu'elle induise la transcription des gènes marqueurs des phénomènes caractérisant le phénotype des cellules «*macrophages-like*». Plusieurs études ont démontré que les cellules promyélocytaires HL-60 se différencient en macrophages suite à une stimulation par l'ester de phorbol PMA. La plupart se sont intéressées au fait que cette différenciation pouvait être une avenue dans le traitement de la leucémie promyéloïde aiguë car la différenciation des précurseurs immatures permet d'en diminuer la quantité dans la moelle osseuse et le sang. Les macrophages dérivés des cellules HL-60 sont capables d'altérer et de traverser la BHE. Nous émettons l'hypothèse que la voie NF- $\kappa$ B régulant la transcription de l'expression de biomarqueurs cibles soit activée lors de la différenciation des cellules HL-60 en macrophages et que cette activation puisse être renversée par l'epigallocatechine-gallate (EGCG), une molécule chimiopréventive dérivée de notre alimentation.

Les objectifs de notre étude sont :

1. Caractériser l'expression de certains biomarqueurs associés à la différenciation des HL-60 en macrophages
2. Étudier spécifiquement l'expression des biomarqueurs inflammatoires et invasifs, COX-2 et MMP-9, suite à la différenciation des cellules promyélocytaires HL-60 en monocytes/macrophages
3. Étudier l'effet de l'EGCG sur l'expression des biomarqueurs identifiés et régulés par le PMA
4. Caractériser la contribution du récepteur à l'EGCG, le 67LR

## **Chapitre 2 – Article**



**EGCG targeting efficacy of NF- $\kappa$ B downstream gene products is dictated by the monocytic/macrophagic differentiation status of promyelocytic leukemia cells**

Amélie Vézina<sup>1,2</sup>, Rima Chokor<sup>1</sup>, and Borhane Annabi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, and <sup>2</sup>Département de Physiologie, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

Running title: NF- $\kappa$ B signalling axis regulates macrophage differentiation

Université du Québec à Montréal  
Département de Chimie  
C.P. 8888, Succ. Centre-ville  
Montréal, Québec  
CANADA, H3C 3P8  
Phone: (514) 987-3000 ext. 7610  
Fax: (514) 987-0246

## Abstract

Central nervous system infiltration by circulating leukemic cells and enhanced *in vitro* transendothelial migration of promyelocytic leukemia HL-60-derived macrophages through a blood-brain barrier (BBB) model was recently demonstrated. The intrinsic molecular and signalling mechanisms involved are however poorly documented. Drug targeting of such translocation event performed by circulating microbes and immune cells may prevent secondary cerebral infections and development of brain pathologies. In this study, we specifically investigated the *in vitro* targeting efficacy of the chemopreventive and dietary-derived epigallocatechin-3-gallate (EGCG) molecule on the NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional regulation of a panel of 89 biomarkers associated with promyelocytic HL-60 differentiation into macrophages. NF- $\kappa$ B-mediated signalling during HL-60 macrophage differentiation was reversed by EGCG, in part through reduced I $\kappa$ B phosphorylation, and led to the inhibition of moderately-to-highly expressed NF- $\kappa$ B gene targets among which the matrix metalloproteinase (MMP)-9 and the cyclooxygenase (COX)-2. In contrast, EGCG exhibited low efficacy in reversing NF- $\kappa$ B-regulated genes and showed selective antagonism towards COX-2 expression while that of MMP-9 remained high in terminally-differentiated macrophages. Decreased expression of the 67 kDa non-integrin Laminin Receptor in terminally-differentiated macrophages may explain such differential EGCG efficacy. Our results suggest that terminally-differentiated macrophage transendothelial migration associated to neuroinflammation may not be pharmacologically affected by such a specific class of flavonoid. The differentiation status of a given *in vitro* cell model must therefore be carefully considered for optimized assessment of therapeutic drugs.

Keywords : EGCG, leukemia, NF- $\kappa$ B, macrophage differentiation, blood-brain barrier

## Introduction

The identification of transcription factors such as NF- $\kappa$ B, STAT3, HIF-1 $\alpha$  and their gene products such as cytokines, chemokines and chemokine receptors have laid molecular foundation for the decisive role of inflammation in carcinogenesis [1]. More specifically, NF- $\kappa$ B-mediated signalling can intervene in oncogenesis through its capacity to further regulate the expression of a large number of downstream gene products involved in apoptosis, cell proliferation and differentiation [2]. Impaired NF- $\kappa$ B activity has now been demonstrated not only in solid cancers but also in various types of hematologic malignancies including acute myeloid leukemia (AML), chronic myelogenous leukemia and in a subset of myelodysplastic syndromes [3, 4].

Given that NF- $\kappa$ B-mediated inflammation contributes to survival and proliferation of malignant cells, tumor angiogenesis, metastasis and reduced response to chemotherapy, new therapeutic strategies combining different NF- $\kappa$ B or proteasome inhibitors has, therefore, been proposed in adjuvant therapy for cancer [5]. Unfortunately, the chemotherapeutic treatment outcome of various hematological disorders, including most adult acute promyelocytic leukemia (APL) and AML, remains unacceptable [6, 7]. Hence, novel avenues for the treatment of leukemia are required.

Considerable attention has recently been focused on identifying naturally occurring chemopreventive substances capable of inhibiting, retarding, or reversing multi-stage carcinogenesis [8]. In fact, it has been demonstrated that some edible phytochemicals alter gene expression, directly or indirectly, thereby regulating carcinogenic processes. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a principal antioxidant derived from green tea, has been ascribed proteasome inhibition properties and is one of the most extensively investigated chemopreventive phytochemicals considered in clinical trials [9-11]. EGCG has been shown to block each stage of carcinogenesis by modulating the signal transduction

pathways involved in cell proliferation, transformation, inflammation, apoptosis, metastasis and invasion [12]. Moreover, its anti-angiogenic properties make it a good candidate for targeting tumor-associated neovascularization [13]. Since the inclusion of antiangiogenic drugs into treatment protocols for leukemia and for hematologic malignancies is becoming an important task for future clinical studies [14, 15], we sought to investigate the *in vitro* anti-NF- $\kappa$ B molecular effects of EGCG on the monocytic/macrophagic differentiation processes using a myeloid leukemia cell model.

Among the several leukemic cell lines that have been established over the years, the human promyelocytic HL-60 leukemia cells have proven useful in understanding the process whereby immature cells differentiate into cells of distinct mature myelomonocytic lineages [16]. The differentiation of HL-60 cells into mature macrophagic-like cells by the tumor-promoting and protein kinase C activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, also known as TPA) is of particular interest [17, 18]. Macrophage differentiation of HL-60 cells involves secretion and activation of collagenase MMP-9 [19], a very active component of the extracellular matrix degradation. The matrix metalloproteinase-9 is also involved in the tumor metastasis process and in inflammatory disorders [20].

The involvement of the inflammatory response mediated by tumor-associated macrophage (TAM) is tightly related to tumor progression [21]. Phytochemicals like polyphenolic compound have then been suggested to regulate the anti-tumorigenic properties of TAM [22]. The transcriptional chemopreventive efficacy of EGCG on NF- $\kappa$ B targets involved in PMA-mediated signaling was investigated in late stage terminally-differentiated HL-60 macrophages.

## Experimental procedures

*Materials.* Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Perkin Elmer (Waltham, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against I $\kappa$ B and phospho-I $\kappa$ B were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). The polyclonal antibody against COX-2 was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). The polyclonal antibody against the 67 kDa Laminin Receptor was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The monoclonal antibody against GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). EGCG and other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

*Cell culture:* The HL-60 promyelocytic cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (Gibco Invitrogen Cell Culture Systems, Burlington, ON) containing 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Slides of PMA-treated HL-60 cells were mounted for light microscopy and air-dried, stained with Diff-Quick (Baxter Healthcare Corp., Miami, FL) and examined for morulae. Given that numerous protocols can be found in the literature to differentiate resting HL-60 cells into "macrophage-like cells" with PMA (between 2 to 8 days with various PMA concentrations, alone or in combination with other molecules), we wish to emphasise that we termed our cell models as follows throughout the text : The "HL-60 macrophage differentiation" condition represents the adherent subpopulation of HL-60

cells immediately harvested upon PMA treatment. We termed "terminally-differentiated macrophages" those same adherent cells, which were subsequently maintained in culture for 24-48 hours more.

*Gelatin zymography* : Gelatin zymography was used to assess the extent of proMMP-9 gelatinolytic activity as previously described for proMMP-2.<sup>23</sup> Briefly, an aliquot (20  $\mu$ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin, a substrate that is efficiently hydrolyzed by both proMMP-2 and proMMP-9. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H<sub>2</sub>O. 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.

*Immunoblotting procedures*: Proteins from control and treated cells were separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

*Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR* : Total RNA was extracted from cell suspensions or monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 2  $\mu$ g of total RNA were reverse-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems,

Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icycler iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The QuantiTect primer sets were provided by Qiagen (Valencia, CA): MMP-9 (QT00040040), COX-2 (QT00040586),  $\beta$ -Actin (QT01136772). GAPDH primer sets were synthesized by Biocorp (Dollard-des-Ormeaux, QC) with the following sequences: forward CCATCACCATCTTCCAGGAG and reverse CCTGCTTCACCACCTTCTTG. The relative quantities of target gene mRNA compared against two internal controls, GAPDH and  $\beta$ -Actin mRNA, were measured by following a  $\Delta C_T$  method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference ( $\Delta C_T$ ) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of GAPDH and  $\beta$ -actin mRNAs were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (Bio-Rad, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as  $2^{-\Delta C_T}$ .

*Human NF- $\kappa$ B signaling targets PCR array:* The Human NF- $\kappa$ B Signaling Targets RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays (PAHS-225, SA Biosciences, Frederick, MD) were used according to the manufacturer's protocol. The detailed list of these key genes responsive to NF- $\kappa$ B signal transduction can be found on the manufacturer's website ([http://www.sabiosciences.com/rt\\_pcr\\_product/HTML/PAHS-225A.html](http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-225A.html)). Using real-time quantitative PCR, we reliably analyzed expression of a focused panel of genes related to NF- $\kappa$ B-downstream gene targets. Relative gene expressions were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, in which  $C_T$  indicates the fractional cycle number where the fluorescent signal reaches detection threshold. The 'delta-delta' method uses the normalized  $\Delta C_T$  value of each sample, calculated using a total of five endogenous control genes (*B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH*, and *ACTB*). Fold change values are then presented as average fold change =  $2^{(\text{average } \Delta\Delta C_T)}$  for genes in adherent PMA-differentiated macrophages relative to control HL-60 cells in suspension. Detectable PCR products were obtained and defined as

requiring <35 cycles. The resulting raw data were then analyzed using the PCR Array Data Analysis Template (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). This integrated web-based software package automatically performs all  $\Delta\Delta C_T$  based fold-change calculations from our uploaded raw threshold cycle data.

*Statistical data analysis:* Unless otherwise stated, data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures. Error bars in all figures represent standard error means (s.e.m.) values.



## Results

*EGCG reverses PMA-mediated I $\kappa$ B degradation in adherent HL-60 cells.* Among the agents well documented to induce differentiation of HL-60 cells, the tumor-promoting agent phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) triggers a terminal differentiated monocytic/macrophage phenotype [17]. We have previously validated that PMA treatment of serum-starved HL-60 cells induced an adhesive phenotype accompanied by macrophage differentiation in these cells which originally remain in suspension [24]. In order to first assess whether any NF- $\kappa$ B signalling was involved upon PMA stimulation, we performed immunoblotting on lysates isolated from adherent cells and found that I $\kappa$ B expression (Fig.1A) decreased dose-dependently, as a consequence of its prior phosphorylation, and to be almost completely degraded at 10 nM PMA (Fig.1C, left panel). When increasing EGCG concentrations were added simultaneously to PMA, I $\kappa$ B degradation by PMA was prevented (Fig.1B) and almost completely reversed at 3  $\mu$ M EGCG (Fig.1C, right panel). This evidence suggests that NF- $\kappa$ B signalling is involved in PMA-induced differentiation process, and that NF- $\kappa$ B gene targets are potentially modulated.

*EGCG reverses PMA-induced I $\kappa$ B phosphorylation in adherent HL-60 cells.* I $\kappa$ B phosphorylation status was next investigated and the effect of EGCG assessed. PMA is shown to trigger maximal I $\kappa$ B phosphorylation upon 30 minutes treatment with PMA (Fig.2A), which phosphorylation is subsequently followed by significant I $\kappa$ B degradation within the next hour (Fig.2B). When such PMA treatment is performed in the presence of EGCG (Fig.2C), I $\kappa$ B phosphorylation by PMA is significantly reduced (Fig.2D, black bars). One may now conclude that EGCG's significant reduction in PMA-induced I $\kappa$ B phosphorylation may prevent p65/p50 NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus that would regulate transcription of NF- $\kappa$ B gene targets during HL60 differentiation.

*Gene array analysis reveals NF- $\kappa$ B gene targets are associated with macrophage differentiation status and with differential inhibitory potential of EGCG.* In light of the evidence that PMA-induced macrophage differentiation involves NF- $\kappa$ B signalling, we used a gene array approach to explore some NF- $\kappa$ B downstream gene targets. Transcriptional profiling was performed on genes involved in inflammation, apoptosis, development and cell differentiation, stress response, and immune response. Among the 89 NF- $\kappa$ B downstream gene targets assessed, 25% were highly (>10-fold, Table.1) induced in differentiated HL-60 macrophage-like cells when compared to vehicle-treated HL-60 cells (Fig.3A). Among these, COX-2 and MMP-9 gene expression is specifically shown (Fig.3A, arrows) as these two biomarkers are thought to contribute to transendothelial migration by immune cells. Anti-PMA inhibitory potential of EGCG was subsequently assessed on the gene expression of the similar NF- $\kappa$ B gene targets using gene array strategy. We found that EGCG inhibited, by more than 70% approximately half of the PMA-inducible NF- $\kappa$ B targets assessed (Fig.3B) including COX-2 and MMP-9. Collectively, we identified several NF- $\kappa$ B downstream target genes that are significantly induced during PMA-induced HL-60 differentiation into macrophages, and demonstrated that EGCG can very efficiently inhibit the expression of those highly induced genes as well as that of moderately induced genes (Table.2).

*EGCG antagonizes COX-2 and MMP-9 biomarkers expression induced upon PMA-mediated HL-60 cell differentiation into macrophages.* Given that MMP-9 is the major MMP that contributes to BBB disruption [25] and that COX-2 inhibition was demonstrated to limit BBB disruption [26], we next aimed at validating those transcriptional profiling data obtained through gene arrays (Table.1 and Table.2) at the molecular level, and further wished to investigate the chemopreventive efficacy of EGCG on these two biomarkers' expression regulation. Serum-starved HL-60 cells were therefore treated with increasing PMA concentrations, or with combined 3 nM PMA and increasing concentrations of EGCG for 18 hrs. Cell lysates from the adherent PMA-differentiated cells increasingly expressed COX-2 (Fig.4A, upper panel), while MMP-9 secreted into the conditioned media also dose-

dependently increased as assessed by gelatin zymography (Fig.4A, lower panel). Total RNA was isolated from the above described conditions and qRT-PCR performed to confirm that both MMP-9 and COX-2 transcriptional regulation (Fig.4B) paralleled that of their respective protein expression. When increasing concentrations of EGCG were added during PMA-induced HL-60 differentiation, we found in accordance to the gene array data that both MMP-9 and COX-2 PMA-mediated induction was reversed (Fig.4C). Interestingly, EGCG had effect on neither MMP-9 (Fig.4D) nor COX-2 (Fig.4E) basal levels. Given the paralleled effects on MMP-9 gene expression and MMP-9 gelatinolytic activity, one can safely rule out the possible contribution of TIMP-1 on MMP-9. Further quantification of MMP-9 protein levels, through ELISA measures, may be required to strengthen and complement our enzymatic and gene expression assessment.

*Differential efficacy of EGCG to inhibit NF- $\kappa$ B gene targets between PMA-mediated HL-60 cell differentiation into macrophages and differentiated macrophages.* We next sought at investigating the effect of EGCG on terminally-differentiated macrophage-like cells. We treated HL-60 cells with PMA for 18 hours. Media containing PMA was removed and adherent terminally-differentiated cells further cultured for 24 hours in serum-free media containing or not 30  $\mu$ M EGCG. Gene expression levels of key NF- $\kappa$ B targets were compared between adherent terminally-differentiated cells and adherent PMA-induced differentiation cells using gene arrays. We found that similar transcriptional profiling characterized both cell populations with a correlation of  $>0.9$  (Fig.5A). When adherent terminally-differentiated cells were then treated with EGCG, we found that only 23% of the NF- $\kappa$ B gene targets were inhibited by more than 70% (Fig.5B, black bars) as compared to PMA-induced differentiation cells (Fig.5B, dotted line). Interestingly, while COX-2 gene expression was still inhibitable by EGCG, that of MMP-9 was found insensitive to EGCG (Fig.5B, arrows).

*EGCG antagonizes COX-2 but not MMP-9 expression induced upon PMA-mediated HL-60 cell differentiation into macrophages.* In order to further validate the gene array data

obtained above, immunoblotting and qPCR were performed to assess the impact of EGCG on COX-2 and MMP-9 protein (Fig.6A) and gene (Fig.6B) expression in terminally-differentiated HL-60 macrophages. While EGCG efficiently inhibited COX-2 protein (Fig.6A, upper panel) and gene expression (Fig.6B, open circles), lack of MMP-9 inhibition by EGCG was observed in terminally-differentiated cells both at the protein (Fig.6A, lower panel) and transcriptional level (Fig.6B, closed circle).

*The 67 kDa Laminin Receptor expression is decreased in terminally-differentiated HL-60 macrophages.* The 67 kDa non-integrin Laminin Receptor (LR) has recently been identified as a direct cell surface receptor for EGCG [27]. We therefore tested the expression of both LR subunits during PMA-induced differentiation as well as in terminally-differentiated HL-60 macrophages. We found that the 67 kDa LR expression remained unaffected, as compared to expression in non-differentiated HL-60 cells (Susp.) during PMA treatment regardless of EGCG (Fig.7A, closed circles). In contrast, EGCG efficiently inhibited the induction of the 37 kDa LR precursor (Fig.7A, open circle). When PMA alone was first used to terminally-differentiate HL-60 cells into macrophages, the expression of both the 37 kDa and 67 kDa LR subunits was significantly reduced (Fig.7B).

## Discussion

Molecular evidences that demonstrate the various functions of NF- $\kappa$ B during different tumor stages and that supports the rationale to target NF- $\kappa$ B in cancer prevention and therapy have recently been provided [28]. Accordingly, pharmacological targeting of NF- $\kappa$ B-regulated downstream gene products may reasonably be envisioned in the inhibition of inflammatory [29-32] and carcinogenic processes [5, 33, 34]. Recent findings in the anti-inflammatory activity of plant and diet-derived compounds, demonstrate that most of them belong to the chemical group of alkaloids, coumarins, flavonoids, polyphenols and terpenoids [33]. Although flavonoids have been used in inflammatory pathways targeting [35, 36], and that evidence from cancer genetics and cancer genome studies supports the involvement of NF- $\kappa$ B in human cancer, particularly in multiple myeloma, the therapeutic potential and benefit of targeting NF- $\kappa$ B still remain debatable [37], partly because of the heterogeneous cellular composition and status in cell differentiation within the tumour microenvironment. As such, the recruitment and infiltration of macrophages in the tumour microenvironment activates them to support the malignant progression of cancer cells, and administration of either NF- $\kappa$ B-targeting drugs or COX-2 inhibitors was shown to block both inflammatory angiogenesis and tumour angiogenesis [38].

In this study, we analyzed the transcriptional regulation of 89 NF- $\kappa$ B-regulated genes by assessing their expression in PMA-mediated signalling and in terminally-differentiated HL-60 macrophages. The respective gene expression profiles were, not surprisingly, found induced within the cell differentiation, immune response, and inflammation functions (Table.1) and were relatively similar between PMA-treated and terminally-differentiated cell populations ( $r^2 = 0.91$ ; Fig.4A). In contrast, high EGCG inhibitory activity was found in PMA-mediated pro-carcinogenic stimulation of HL-60 cells (Fig.3B), while significantly lower inhibitory capacity were attributed to such flavonoid in terminally-differentiated macrophages (Fig.5B). Altogether, this supports the chemopreventive, rather than

therapeutic, efficacy of EGCG, and provides rational for its crucial role as a signal transduction inhibitor. Moreover, we show that the macrophagic/monocytic differentiation status significantly influences EGCG's ability to inhibit PMA-induced downstream NF- $\kappa$ B gene targets. The latter may, in part, be explained by the downregulation of the 67 kDa LR expression, which is considered as the EGCG receptor [27]. Although significantly less efficient in terminally-differentiated macrophages, the fact that EGCG is still able to abrogate the expression of some NF- $\kappa$ B gene targets is suggestive of pharmacological effects independent of the 67 kDa LR expression as reported elsewhere [39].

The differential targeting efficacy of EGCG is further demonstrated in our study in relation to the NF- $\kappa$ B downstream gene targets COX-2 and MMP-9, both considered as inflammation biomarkers [36, 40]. While COX-2 protein and gene expression is inhibited both during PMA-treatment and in terminally-differentiated macrophages, we show that MMP-9 in contrast can no longer be inhibited in those cells that acquired macrophagic phenotype. Given the lack of MMP-9 inhibition by EGCG in terminally-differentiated macrophages (Fig.6), our data therefore imply that EGCG may not be efficient in inhibiting the ability of macrophages to disrupt the BBB and to infiltrate the brain. While human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) play an essential role as structural and functional components of the BBB, its disruption by the macrophage-secreted MMP-9 may therefore favor secondary cerebral infections and development of brain pathologies [41, 42]. Moreover, although some studies report pharmacological effects of EGCG at submicromolar levels, most experiments require concentrations of >10-20  $\mu$ M to demonstrate that effect. Given that in humans, tea polyphenols undergo glucuronidation, sulfation, methylation, and ring fission, the peak plasma concentration of EGCG is believed to approximate 1  $\mu$ M [43]. Accordingly, IC<sub>50</sub> effects in our current study were reached at ~3  $\mu$ M or less in accordance with those plasma concentrations reported, while optimal effects were achieved at 30  $\mu$ M in accordance with *in vitro* data reported above (i.e. 10-20  $\mu$ M). Finally, unmetabolized EGCG was directly tested within an acellular system and on the activity of recombinant MMPs [44]. The authors reported an IC<sub>50</sub> value for EGCG of

0.8  $\mu\text{M}$ , again nicely approximating that EGCG concentration we report in this current study. Given the very close  $\text{IC}_{50}$  values calculated between cellular and acellular *in vitro* models, one may therefore safely consider that the impact of EGCG we evaluated may well originate from the parental non-metabolized molecule.

Only few reports documented an association between COX-2 expression and ECM degradation consequent to pro-carcinogenic stimulation. Among the intracellular events that could link PMA-induced signaling to COX-2 induction, NF- $\kappa\text{B}$  can contribute to regulate the expression of COX-2 through endoplasmic reticulum stress and, in part, through induction of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP, which is expressed at high levels in a variety of tumors and which confers drug resistance to both proliferating and dormant cancer cells [45]. As for the transcriptional control of MMP-9 expression upon PMA stimulation, there is increasing evidence that its expression can also be regulated at the levels of mRNA stability, translation and protein secretion. The ability to modulate MMP-9 expression at multiple steps through distinct signaling pathways may be particularly important during malignant conversion, when tumor cells need to induce or maintain MMP-9 levels in response to changing environmental cues. Among the nuclear factors shown to stabilize the mRNA and augment the expression of MMP-9, the RNA-binding protein HuR has been ascribed a pivotal role in the development of tumors [46, 47], and increased nucleocytoplasmic shuttling was also reported to promote COX-2 mRNA stabilization [48]. More importantly, HuR has been found to be a key mediator in PMA-treated HL-60 cells where inhibition of HuR expression by EGCG was reported [24].

In recent years, a large number of mechanisms of action have been attributed to flavonoids commonly found in fruits, vegetables, wine, or tea as they can act as potent antioxidants and free radical scavengers [49, 50]. Flavonoids targeting of NF- $\kappa\text{B}$  has also been shown to inhibit *in vitro* brain endothelial cell tubulogenesis [51]. Accordingly, among strategies developed to jointly inhibit ECM degradation and inflammation processes in carcinogenesis, the design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives has not

surprisingly emerged as a potent strategy to also target neurodegenerative disorders including different forms of dementia, as well as Alzheimer's disease [52, 53]. Our data support the chemopreventive potential of such a class of molecules, but prompt for caution when interpreting the data particularly regarding the differentiation status of a given *in vitro* experimental cell model. Finally, our data support a crucial role for MMP-9 and provide a molecular rationale explaining how the disruption of the BBB [54, 55], and subsequent transendothelial migration of terminally differentiated HL-60 macrophages [56], may lead to cerebral infections and development of brain pathologies.



## **Acknowledgments**

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

## **Authorship**

Contribution: A.V. designed the experiments, performed research experiments, analyzed the data and wrote the paper. R.C. performed phosphorylation experiments and analyzed the data. B.A. designed the experiments, analyzed the data, provided financial support and wrote the paper. All authors approved the final version.

## References

1. Zhu Z, Zhong S, Shen Z. (2011) Targeting the inflammatory pathways to enhance chemotherapy of cancer. *Cancer Biol Ther.* 12(2):95-105.
2. Cilloni D, Martinelli G, Messa F, et al. (2007) Nuclear factor kB as a target for new drug development in myeloid malignancies. *Haematologica.* 92(9):1224-1229.
3. Breccia M, Alimena G. (2010) NF- $\kappa$ B as a potential therapeutic target in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Expert Opin Ther Targets.* 14(11):1157-1176.
4. Pepper C, Hewamana S, Brennan P, et al. (2009) NF-kappaB as a prognostic marker and therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncol.* 5(7):1027-1037.
5. Fuchs O. (2010) Transcription factor NF- $\kappa$ B inhibitors as single therapeutic agents or in combination with classical chemotherapeutic agents for the treatment of hematologic malignancies. *Curr Mol Pharmacol.* 3(3):98-122.
6. Larson RA, Daley GQ, Schiffer CA, et al. (2003) Treatment by design in leukemia, a meeting report, Philadelphia, Pennsylvania, December 2002. *Leukemia* 2003; 17(12):2358-2382.
7. Park JH, Tallman MS. (2011) Treatment of acute promyelocytic leukemia without cytotoxic chemotherapy. *Oncology (Williston Park)* 25(8):733-741.
8. Surh Y. (1999) Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 428(1-2):305-327.
9. Yang H, Landis-Piwowar K, H Chan T, et al. (2011) Green tea polyphenols as proteasome inhibitors: implication in chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets.* 11(3):296-306.
10. Khan N, Afaq F, Saleem M, et al. (2006) Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 66(5):2500-2505.
11. Mereles D, Hunstein W. (2011) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for Clinical Trials: More Pitfalls than Promises? *Int J Mol Sci.* 12(9):5592-5603.
12. Na HK, Surh YJ. (2006) Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Mol Nutr Food Res* 50(2):152-159.

13. Demeule M, Michaud-Levesque J, Annabi B, et al. (2002) Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2(4):441-463.
14. Thomas DA, Giles FJ, Cortes J, et al. (2001) Antiangiogenic therapy in leukemia. *Acta Haematol* 106(4):190-207.
15. Moehler TM, Hillengass J, Goldschmidt H, et al. (2004) Antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Curr Pharm Des* 10(11):1221-1234.
16. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, et al. (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(5):2458-2462.
17. Huberman E, Callahan MF. (1979) Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3):1293-1297.
18. Tonetti DA, Henning-Chubb C, Yamanishi DT, et al. (1994) Protein kinase C-beta is required for macrophage differentiation of human HL-60 leukemia cells. *J Biol Chem* 269(37):23230-23235.
19. Xie B, Laouar A, Huberman E. (1998) Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor necrosis factor-alpha via alpha5 beta1 integrin in HL-60 cells. *J Biol Chem* 273(19):11583-11588.
20. McMillan JI, Weeks R, West JW, et al. (1996) Pharmacological inhibition of gelatinase B induction and tumor cell invasion. *Int J Cancer* 67(4):523-531.
21. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196(3):254-265.
22. D'Alessandro T, Prasain J, Benton MR, et al. (2003) Polyphenols, inflammatory response, and cancer prevention: chlorination of isoflavones by human neutrophils. *J Nutr* 133(11 Suppl 1):3773S-3777S.

23. Belkaid A, Fortier S, Cao J, et al. (2007) Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* 9(4):332-340.
24. Annabi B, Currie JC, Moghrabi A, et al. (2007) Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg. *Leuk Res.* 31(9):1277-1284.
25. Jin R, Yang G, Li G. (2010) Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis.* 38(3):376-385.
26. Candelario-Jalil E, Taheri S, Yang Y, et al. (2007) Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 323(2):488-498.
27. Umeda D, Yano S, Yamada K, et al. (2008) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem.* 283(6):3050-3058.
28. Arkan MC, Greten FR. (2011) IKK- and NF- $\kappa$ B-mediated functions in carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 349:159-169.
29. Cabrini G, Bezzerri V, Mancini I, et al. (2010) Targeting transcription factor activity as a strategy to inhibit pro-inflammatory genes involved in cystic fibrosis: decoy oligonucleotides and low-molecular weight compounds. *Curr Med Chem.* 17(35):4392-4404.
30. Bamborough P, Morse MA, Ray KP. (2010) Targeting IKK $\beta$  for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug News Perspect.* 23(8):483-490.
31. Chen S. (2011) Natural products triggering biological targets--a review of the anti-inflammatory phytochemicals targeting the arachidonic acid pathway in allergy asthma and rheumatoid arthritis. *Curr Drug Targets.* 12(3):288-301.
32. Zhu Z, Zhong S, Shen Z. (2011) Targeting the inflammatory pathways to enhance chemotherapy of cancer. *Cancer Biol Ther.* 12(2):95-105.

33. Chen W, Li Z, Bai L, et al. (2011) NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Front Biosci.* 16:1172-1185.
34. Adams H, Obermann EC, Dirnhofer S, et al. (2011) Targetable molecular pathways in classical Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs.* 20(2):141-151.
35. Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, et al. (2010) Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med.* 76(11):1044-1063.
36. Luqman S, Pezzuto JM. (2010) NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res.* 24(7):949-963.
37. Baud V, Karin M. (2009) Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov.* 8(1):33-40
38. Ono M. (2008) Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 99(8):1501-1506.
39. Hazawa M, Takahashi K, Sugata S, et al. (2011) (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate induces nonapoptotic cell death in leukemia cells independent of the 67 kDa laminin receptor. *J Nat Prod.* 74(4):695-700.
40. Tergaonkar V. (2006) NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 38(10):1647-1653.
41. Lakka SS, Gondi CS, Rao JS. (2009) Proteases and glioma angiogenesis. *Brain Pathol* 2005; 15(4):327-341.
42. Bonoiu A, Mahajan SD, Ye L, et al. (2009) MMP-9 gene silencing by a quantum dot-siRNA nanoplex delivery to maintain the integrity of the blood brain barrier. *Brain Res* 1282:142-155.
43. Lambert JD, Yang CS. (2003) Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr.* 133(10):3262S-3267S.
44. Demeule M, Brossard M, Pagé M, et al. (2000) Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta.* 1478(1):51-60.

45. Craggs L, Kalaria RN (2011) Revisiting dietary antioxidants, neurodegeneration and dementia. *Neuroreport*. 22(1):1-3.
46. McMillan JI, Weeks R, West JW, et al. (1996) Pharmacological inhibition of gelatinase B induction and tumor cell invasion. *Int J Cancer* 67(4):523-531
47. Akool el-S, Kleinert H, Hamada FM, et al. (2003) Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 23(14):4901-4916.
48. Johann AM, Weigert A, Eberhardt W, et al. (2008) Apoptotic cell-derived sphingosine-1-phosphate promotes HuR-dependent cyclooxygenase-2 mRNA stabilization and protein expression. *J Immunol*. 180(2):1239-1248.
49. Rusak G, Gutzeit HO, Ludwig-Müller J. (2005) Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells *Nutr Res* 25(2):143-155.
50. In: C. Rice-Evans and L. Packer, Editors: *Flavonoids in Health and Disease* (second ed.), Marcel Dekker Inc., New York/Basel (2003).
51. Tahanian E, Sanchez LA, Shiao TC, et al. (2011) Flavonoids targeting of IκB phosphorylation abrogates carcinogen-induced MMP-9 and COX-2 expression in human brain endothelial cells. *Drug Des Devel Ther*. 5:299-309.
52. Williams P, Sorribas A, Howes MJ. (2011) Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Nat Prod Rep*. 28(1):48-77.
53. Howes MJ, Perry E. (2011) The role of phytochemicals in the treatment and prevention of dementia. *Drugs Aging*. 28(6):439-468.
54. Feng SR, Chen ZX, Cen JN, et al. (2011) Disruption of blood brain-barrier by leukemic cells in central nervous system leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 32(5):289-293.

55. Feng S, Cen J, Huang Y, et al. (2011) Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PLoS One*. 6(8):e20599.
56. Seidel G, Böcker K, Schulte J, et al. (2011) Pertussis toxin permeabilization enhances the traversal of Escherichia coli K1, macrophages, and monocytes in a cerebral endothelial barrier model in vitro. *Int J Med Microbiol*. 301(3):204-212.



**Footnotes**

The abbreviations used are: BBB, blood-brain barrier; ECM, extracellular matrix; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; LR, laminin receptor; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

## Tables and figures legend

**Tab.1: PMA triggers transcriptional increase of NF- $\kappa$ B gene targets in adherent HL-60 cells.** Serum-starved HL-60 cells were treated with 3 nM PMA for 18 hrs. Total RNA was isolated from vehicle-treated cells that remained in suspension and from PMA-treated cells that adhered to the flasks (macrophage-differentiated cells). The identity of only those genes that were induced by 10-fold in adherent vs. suspension cells is shown and is extracted from Fig.2A. Data are representative from 2 independent arrays. Grey highlighted data were further confirmed at the protein and/or activity level.

**Tab.2: EGCG reverses PMA-mediated I $\kappa$ B degradation in adherent HL-60 cells.** Serum-starved HL-60 cells were treated with either 30  $\mu$ M EGCG or a combination of 3 nM PMA and 30  $\mu$ M EGCG for 18 hrs. Total RNA was isolated from EGCG-treated cells that remained in suspension and from PMA-treated cells that adhered to the flasks (macrophage-differentiated cells). The identity of only those genes which expression was inhibited by 90% and more is shown and is extracted from Fig.2B. Data are representative from 2 independent arrays. Grey highlighted data were further confirmed at the protein and/or activity level.

**Fig.1: EGCG reverses PMA-mediated I $\kappa$ B degradation in adherent HL-60 cells.** (A) Serum-starved HL-60 cells were treated with increasing PMA concentrations, or (B) with combined 3 nM PMA and increasing concentrations of EGCG for 18 hrs. Cells that remained in suspension were discarded and lysates from the adherent macrophage-differentiated cells isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection of I $\kappa$ B and GAPDH proteins performed as described in the Methods section. (C) Quantification was performed by scanning densitometry of the autoradiogram. Data are representative of 4 independent experiments, and were

represented as the percent (%) expression of untreated HL-60 cells in suspension (left panel) and as the percent (%) of 3 nM PMA/30  $\mu$ M EGCG-treated adherent cells (right panel).

**Fig.2: EGCG reverses PMA-induced I $\kappa$ B phosphorylation in adherent HL-60 cells.**

(A) Serum-starved HL-60 cells were treated with 3 nM PMA for up to 120 minutes. Cells that remained in suspension were discarded and lysates from the adherent macrophage-differentiated cells isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection of I $\kappa$ B, phospho-I $\kappa$ B, and GAPDH proteins performed as described in the Methods section. (B) Quantification was performed by scanning densitometry of the autoradiogram. Data are representative of 2 independent experiments, and were represented as the x-fold expression over untreated HL-60 cells in suspension (time 0). The respective phospho-I $\kappa$ B / GAPDH ratios were blotted. (C) Similarly as in (A), cells were treated for 30 minutes in the presence of 3 nM PMA, 30  $\mu$ M EGCG, or a combination of both, and adherent cells harvested. (D) Quantification was performed as in (B).

**Fig.3: Gene array analysis reveals NF- $\kappa$ B gene targets associated with macrophage differentiation and high inhibitory potential of EGCG.**

(A) Serum-starved HL-60 cells were treated with 3 nM PMA for 18 hrs. Total RNA was isolated from vehicle-treated cells that remained in suspension and from PMA-treated cells that adhered to the flasks (macrophage-differentiated cells). (A) Histogram representation of the 89 NF- $\kappa$ B gene targets array expression levels. (B) Serum-starved HL-60 cells were treated with either 30  $\mu$ M EGCG or a combination of 3 nM PMA and 30  $\mu$ M EGCG for 18 hrs. Total RNA was isolated from EGCG-treated cells that remained in suspension and from PMA-treated cells that adhered to the flasks (macrophage-differentiated cells). Histogram representation of the gene expression array levels represents the percent of gene inhibition.

**Fig.4: EGCG antagonizes COX-2 and MMP-9 biomarkers expression induced upon PMA-mediated HL-60 cell differentiation into macrophages.** (A, B) Serum-starved HL-60 cells were treated with increasing PMA concentrations, or (C, D, E) with combined 3 nM PMA and increasing concentrations of EGCG for 18 hrs. Cells that remained in suspension were discarded and lysates from the adherent macrophage-differentiated cells isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection of COX-2 (A, C, upper panels) and GAPDH (A, C, middle panels) proteins performed as described in the Methods section. Conditioned media were collected and gelatin zymography (A, C, lower panels) performed as described in the Methods section. Total RNA was isolated from similar conditions than in A and B, and qRT-PCR performed as described in the Methods section to assess MMP-9 and COX-2 gene expression (B, D, E).

**Fig.5: Differential efficacy of EGCG to inhibit NF- $\kappa$ B gene targets between PMA-mediated HL-60 cell differentiation into macrophages and differentiated macrophages.** (A) Total RNA was isolated from adherent cells obtained upon 3 nM PMA treatment of serum-starved HL-60 cells, and gene expression profiles compared to total RNA isolated from PMA-differentiated cells cultured for 2 days. (B) EGCG inhibitory effect was evaluated from total RNA isolated from adherent cells obtained upon 3 nM PMA treatment of serum-starved HL-60 cells (dotted lines, data from Fig.3B), and gene expression profiles compared to total RNA isolated from PMA-differentiated cells cultured for 2 days and then serum-starved in the presence of 30  $\mu$ M EGCG.

**Fig.6: EGCG antagonizes COX-2 but not MMP-9 expression induced upon PMA-mediated HL-60 cell differentiation into macrophages.** Serum-starved HL-60 cells were treated for 18 hours with 3 nM PMA to induce HL-60 cell differentiation and adhesion. Adherent cells were then further cultured in serum-free conditions and in the presence of increasing concentrations of EGCG for 18 hours. (A) Cell

lysates were electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection of COX-2 (upper panels) and GAPDH (middle panels) proteins performed as described in the Methods section. Conditioned media were collected and gelatin zymography (lower panels) performed as described in the Methods section. (B) Total RNA was isolated from similar conditions as described above, and qRT-PCR performed as described in the Methods section to assess MMP-9 and COX-2 gene expression. Susp, untreated and non-differentiated HL-60 cells growing in suspension.

**Fig.7: The 67 kDa Laminin Receptor expression is decreased in terminally-differentiated HL-60 macrophages.** (A) Serum-starved HL-60 cells were treated with 3 nM PMA in the presence of increasing concentrations of EGCG to induce HL-60 cell adhesion for 18 hours. (B) PMA alone was first used to terminally-differentiate HL-60 cells into macrophages. Adherent cells were afterwards further cultured in serum-free conditions and in the presence of increasing concentrations of EGCG for 18 hours. Cell lysates from A and B were electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection of the 37 kDa (open circles) / 67 kDa (closed circles) Laminin Receptor (LR) proteins performed as described in the Methods section. Data are representative of 2 independent experiments. N.S., non specific immunoreactivity; Susp, untreated and non-differentiated HL-60 cells growing in suspension.

## Tables and figures

*Vézina et al. 2012*

*Table 1*

Gene name	Gene ID	Induction by PMA (x-fold)	Functional grouping
IL1RN	3557	556	Cytokines / chemokines
CCL5	6352	352	Differentiation, cytokines / chemokines
IL1B	3553	200	Inflammation, cytokines / chemokines
ICAM1	3383	176	Immune response
MMP9	4318	137	Differentiation, apoptosis
IL1A	3552	102	Inflammation, cytokines / chemokines
IL2RA	3559	71	Inflammation
INS	3630	40	Inflammation, apoptosis
CD40	958	27	Immune response
IL8	3576	24	Cytokines / chemokines
F3	2152	23	Anti-apoptosis
PDGFB	5155	22	Stress response
TNSF10	8743	20	Cytokines / chemokines
CD83	9308	15	Immune response
CCL2	6347	14	Immune response, cytokines / chemokines
MITF	4286	12	Differentiation, apoptosis
BIRC3	330	11	Apoptosis
COX2	5743	10	Inflammation, apoptosis
TNFRSF1B	7133	9.7	Apoptosis

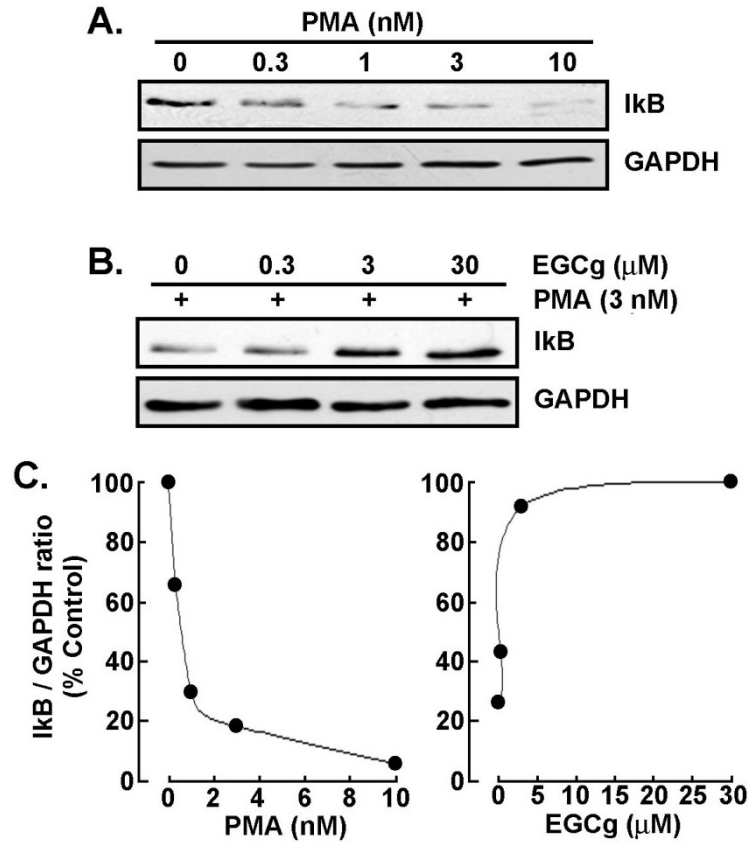
Vézina et al. 2012

Table 2

Gene name	Gene ID	EGCG Inhibition (%)	Functional grouping
MMP9	4318	99	Differentiation, apoptosis
CCR5	1234	98	Inflammation
IL1RN	3557	97	Cytokines / chemokines
CD40	958	96	Immune response
VCAM1	7412	96	Differentiation
CXCL1	2919	96	Cytokines / chemokines
CCL5	6352	95	Cytokines / chemokines, development
FASLG	356	95	Apoptosis
IL1B	3553	95	Inflammation, cytokines / chemokines,
COX2	5743	95	Inflammation, apoptosis
CXCL2	2920	94	Cytokines / chemokines
IL1R2	7850	94	Immune response
TNF	7124	94	Inflammation, development, stress response
CXCL10	3627	94	Inflammation
MITF	4286	93	Differentiation, apoptosis
PDGFB	5155	92	Stress response
IL2RA	3559	91	Inflammation
CCL2	6347	90	Immune response, cytokines / chemokines
CXCL9	4283	90	Inflammation

Vézina et al. 2012

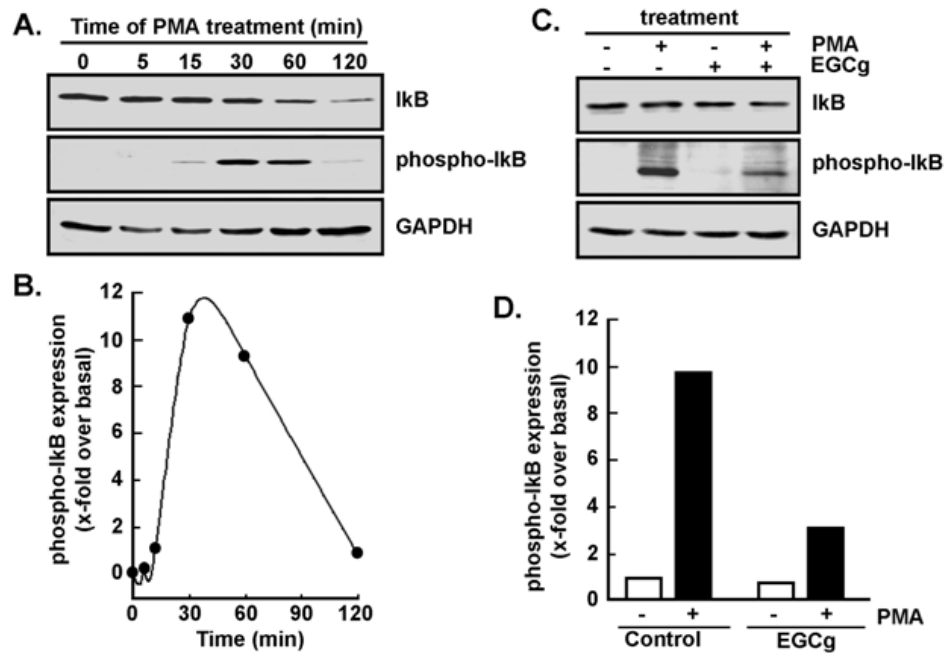
Figure 1





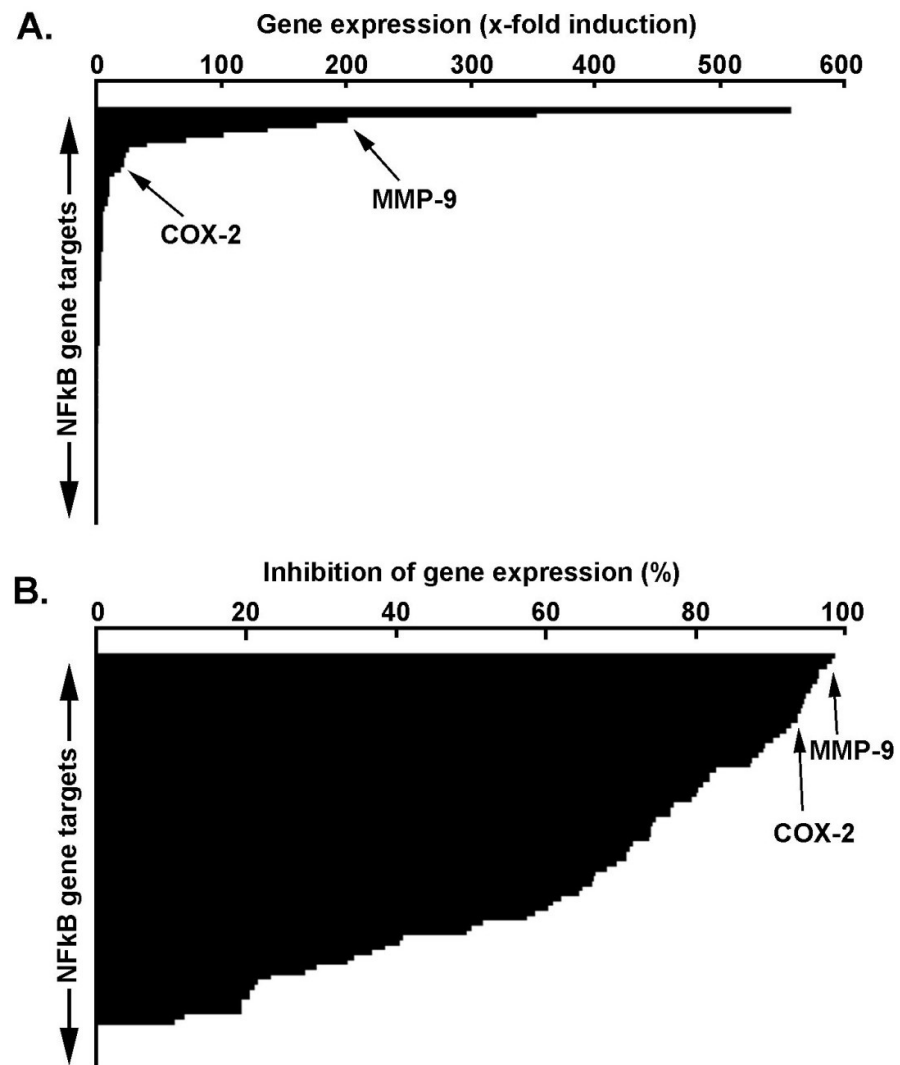
Vézina et al. 2012

Figure 2



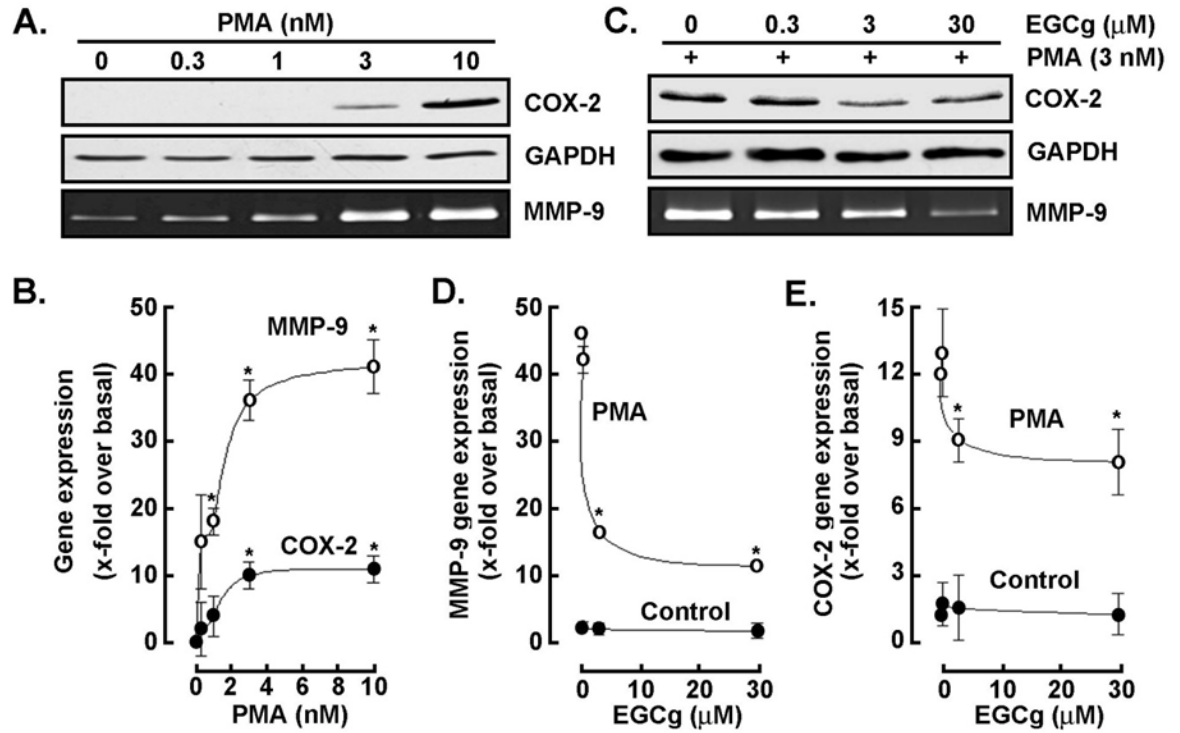
Vézina et al. 2012

Figure 3



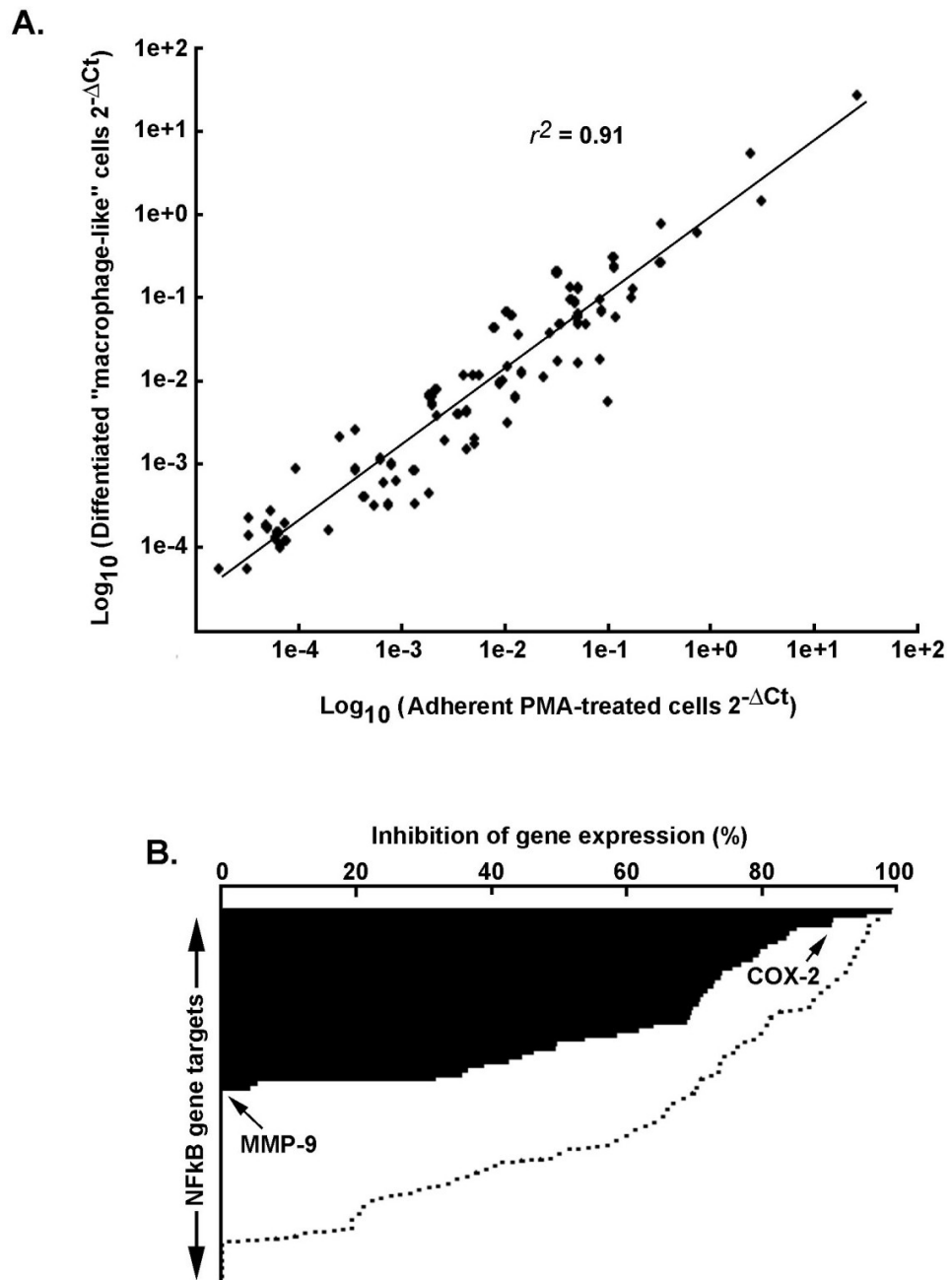
Vézina et al. 2012

Figure 4



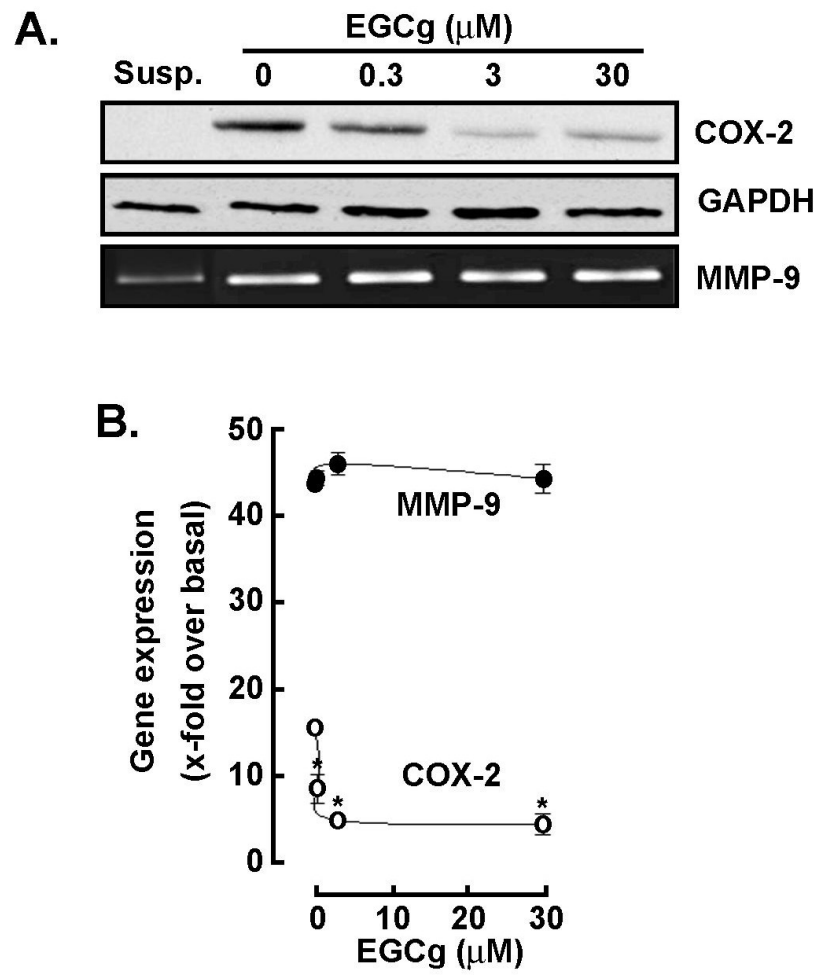
Vézina et al. 2012

Figure 5



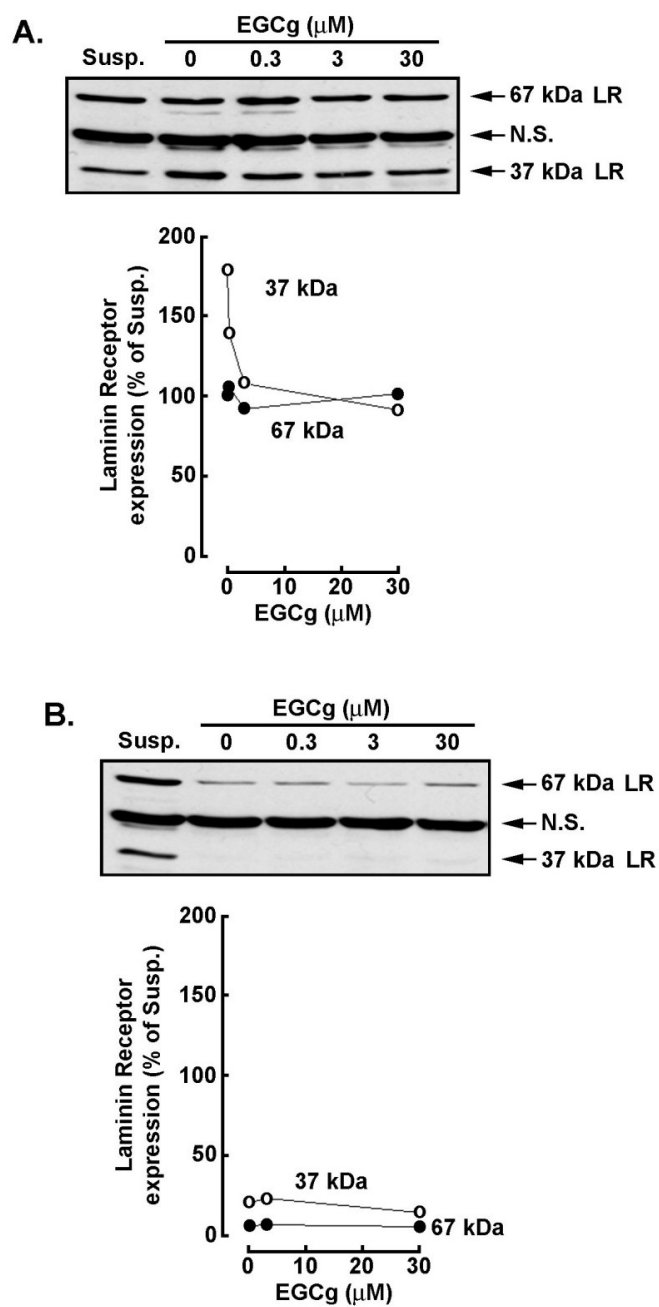
Vézina et al. 2012

Figure 6



Vézina et al. 2012

Figure 7



## **Chapitre 3 – Discussion, perspectives et conclusion**

## 5. Discussion

Le cancer apparaît au terme de plusieurs étapes complexes ayant des caractéristiques spécifiques aux types cellulaires et tissulaires atteints (Schmidt et Carmeliet, 2011). Pour comprendre les mécanismes de la cancérogenèse, une analyse adéquate des biomarqueurs impliqués est nécessaire. Cette analyse permet d'identifier et d'arrêter son choix sur des cibles thérapeutiques qui aideront à traiter la maladie et à faire avancer la recherche. L'inflammation et l'invasion sont des concepts intimement reliés dans la progression du cancer. Leurs biomarqueurs spécifiques interagissent ensemble afin d'alimenter la tumeur et d'accroître sa survie (Shanmugam et al., 2012). Pour bloquer la progression de ces mécanismes, l'utilisation de molécules phytochimiques peut s'avérer efficace (Singh et al., 2012; Gupta et al., 2010). L'EGCG est une des molécules nutraceutiques reconnues pour diminuer le risque de développement du cancer (Pan et al., 2011).

La leucémie myéloïde aiguë est la forme la plus commune des leucémies aiguës chez l'adulte (McArdle et O'Mahony, 2008). Le sous-type promyéloïde est caractérisé par la translocation chromosomale t(15;17) et par le gène de fusion PML-RAR $\alpha$  (Grimwade et al., 2010). Les cellules sont bloquées au stade de promyélocytes et sont immatures. C'est-à-dire qu'elles ont perdu la capacité de se différencier en cellules matures. La combinaison de la chimiothérapie d'induction au trioxyde d'arsenic et du traitement à l'acide *tout-trans* rétinoïque (ATRA) a permis l'avancement de la thérapie et l'augmentation de la survie d'au moins 5 ans suivant le diagnostic dans une proportion de 35 à 40% (American cancer society, 2008; Mi et al., 2012). L'utilisation de l'ATRA permet la différenciation des cellules leucémiques en granulocytes limitant leur prolifération, diminuant le nombre de cellules immatures dans la moelle osseuse, augmentant le nombre de cellules immunes circulantes et permettant le traitement de la maladie. Il est aussi possible que les cellules HL-60 se différencient en monocytes ou en macrophages via l'activation des protéines kinases C par le PMA, un ester de phorbol analogue du diacylglycérol (DAG). Suite à leur



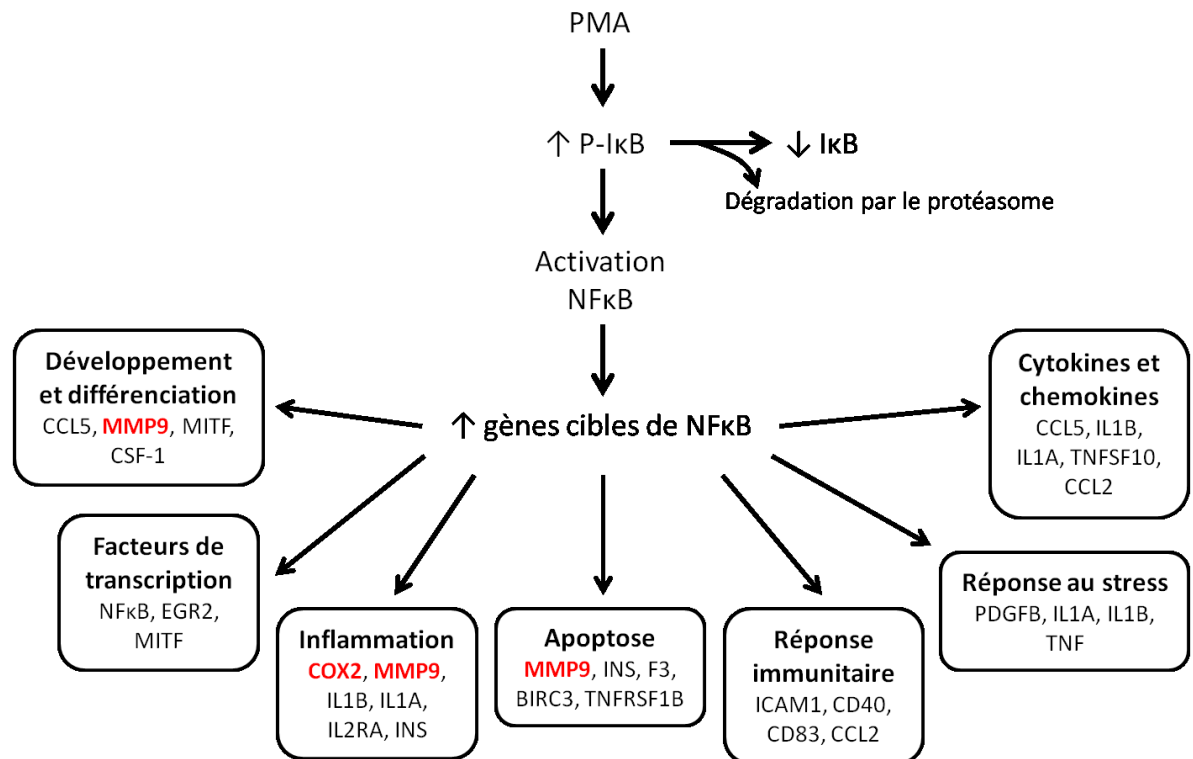
différenciation, des complications au niveau de la transduction des signaux moléculaires peuvent survenir.

Différents modèles cellulaires sont disponibles pour étudier la leucémie promyéloïde aiguë : NB4, UF-1, AP-1060 et HL-60 (Kizaki et al., 1996; Nakazato et al., 2005; Roussel et Lanotte, 2001; Sun et al., 2004). Nous avons choisi les cellules HL-60 pour leur capacité à se différencier en macrophages pouvant altérer la BHE (Collins, 1987). Les cellules HL-60 constituent un excellent modèle pour étudier *in vitro* la leucémie promyéloïde aiguë et elles sont faciles à utiliser. Nous avons choisi le traitement au PMA car il est efficace et stable afin d'étudier le comportement des cellules différenciées en «*macrophages-like*». C'est devenu notre modèle d'intérêt. L'isolation de protéines ou d'ARN est facilement réalisable et permet l'étude des voies de signalisation régulant l'adaptation moléculaire des cellules suite à l'action du PMA tant au niveau protéique que génique. Dans cet ordre d'idée, les observations rapportées sont spécifiques aux cellules HL-60 différenciées ou non en «*macrophages-like*».

Le fait que les cellules HL-60 peuvent se différencier en «*macrophages-like*» nous a beaucoup intéressé. L'étude des caractéristiques de signalisation de ces cellules pendant et après leur différenciation s'est avérée déterminante. Nous avons identifié et arrêté notre choix sur quelques biomarqueurs des phénomènes moléculaires entourant la cancérogenèse en se basant sur le fait que la COX-2 et la MMP-9 sont surexprimées dans le microenvironnement tumoral lors de la cancérogenèse (Sethi et al., 2012). La COX-2 joue son rôle dans la production des prostaglandines et est induite par les stimuli inflammatoires (Ricciotti et FitzGerald, 2011). Quant à la protéase MMP-9, elle est sécrétée par les cellules et contribue activement à la dégradation, l'hydrolyse et le remodelage de la MEC. Son rôle est associé au caractère invasif tumoral et à la formation de métastases (Nagase et al., 2006). La surexpression de ces biomarqueurs est interreliée et mène à l'augmentation de la survie des tumeurs et à la résistance thérapeutique (Scheidereit, 2006; Zhu et al., 2011). La transcription des gènes encodant pour COX-2 et MMP-9 est induite par les stimuli activant les voies de transcription impliquées dans l'inflammation, l'invasion et les métastases.

Pendant la cancérogenèse, la voie de signalisation par NF- $\kappa$ B est activée et régule la transcription (Shen et Tergaonkar, 2009). Nous avons donc étudié l'effet du PMA sur cette voie pendant et après la différenciation des cellules HL-60. Puis, nous avons étudié l'impact de l'EGCG, principal polyphénol du thé vert reconnu pour ses propriétés anticancéreuses dans plusieurs études (Yang et al., 2011).

Dans un premier temps, nous avons observé l'induction de COX-2 et MMP-9 par le PMA lors de la différenciation des cellules HL-60 en macrophages (figure 7). Nous avons démontré que la régulation se fait autant au niveau génique que protéique. Ainsi, il est plus facile de cibler les molécules à différents niveaux de leur régulation. La surexpression de COX-2 et MMP-9 corrèle avec le phénotype tumoral, mais aussi avec le phénotype des macrophages circulants impliqués dans l'invasion, les métastases et la neuroinflammation (Baay et al., 2011; Rizzo, 2011). La possible implication de la voie NF- $\kappa$ B sur l'augmentation de l'expression de COX-2 et MMP-9 a suscité notre intérêt. Nous avons démontré cette implication par la diminution de l'expression protéique d'I $\kappa$ B. L'inhibition d'I $\kappa$ B par le PMA est reliée à sa dégradation subséquente à sa phosphorylation catalysée par la famille des kinases IKK. Par conséquent, l'activation du complexe p50/p65 et sa translocation au noyau activent la transcription par la liaison de l'hétérodimère au motif  $\kappa$ B sur les promoteurs des gènes cibles. La voie NF- $\kappa$ B induit la transcription d'au moins 89 gènes cibles connus parmi lesquels nous avons montré que 25% sont induits d'au moins 10 fois sous l'action du PMA (Chap. 2, figure 2A, p. 68). Parmi ces gènes, on retrouve des cytokines, chemokines, facteurs de croissance et enzymes étant des acteurs importants dans l'inflammation, la différenciation, l'apoptose, la transcription, la réponse immunitaire et la réponse au stress (figure 13).



**Figure 13. Gènes cibles de la voie de signalisation NF-κB activés par le PMA**

Par la suite, nous avons clairement démontré l'impact positif significatif de l'EGCG quant à sa capacité à inhiber les gènes et les protéines impliqués dans la cancérogenèse et la différenciation des cellules. L'application simultanée de PMA et EGCG n'empêchait pas la différenciation en macrophages. Ainsi, nous avons pu observer les effets du PMA et de l'EGCG sur l'adaptation moléculaire des cellules HL-60 différenciées sans que l'EGCG nuise à leur différenciation par le PMA. La capacité de l'EGCG à renverser la diminution de l'expression d'IκB est concluante. Ceci démontre son pouvoir inhibiteur sur la voie NF-κB et possiblement de la transcription qui s'ensuit. Nous avons démontré l'effet antiinflammatoire de l'EGCG spécifiquement sur COX-2 et MMP-9, mais aussi de façon générale sur les gènes qui ont été modulés à la hausse par le PMA. L'EGCG a été efficace pour inhiber par au moins 70% plus de la moitié des gènes induits de façon modérée à élevée par le PMA (Chap. 2, figure 3B, p. 69).

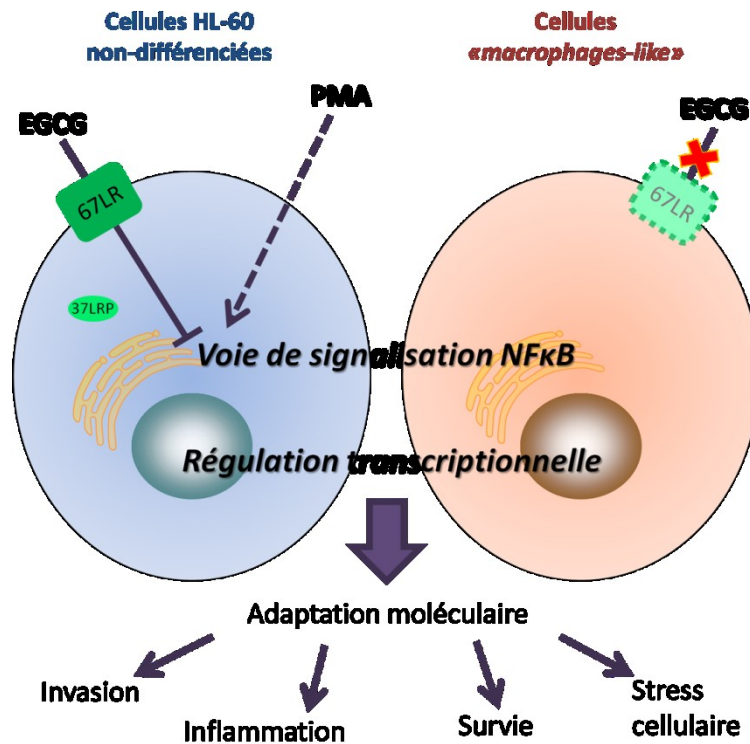
Lors de la différenciation, les cellules adhèrent au flacon de culture. Après avoir étudié la signalisation lors de la différenciation des cellules en macrophages, il a été possible de conserver en culture les nouvelles cellules différenciées en retirant les cellules non-différenciées restées en suspension. Le but était de comparer les cellules tout juste différenciées par le PMA à celles devenues des «*macrophages-like*» adaptés à leur nouveau milieu de culture. En comparant les résultats obtenus avec les essais de «*gene array*», nous avons observé un phénotype semblable entre les deux statuts de différenciation. Une fois que les cellules sont différenciées, elles maintiennent constitutivement l'expression des gènes induits. Ainsi, nous avons trouvé un taux élevé de deux biomarqueurs d'intérêt, COX-2 et MMP-9. Ces cellules «*macrophages-like*» expriment des gènes engendrant un phénotype qui favorise les phénomènes inflammatoires. Elles semblent aussi exprimer quelques gènes impliqués dans les phénomènes de migration et d'invasion, parmi lesquels nous trouvons la métalloprotéase MMP-9, les facteurs de croissance M-CSF et GM-CSF, la chemokine CCL5 et les facteurs de transcription MITF et EGR2.

L'EGCG ne s'est pas avérée aussi efficace à inhiber la transcription dans les «*macrophages-like*» que dans les cellules traitées simultanément avec le PMA et l'EGCG. Ainsi, seulement 23% des gènes ont été inhibés avec une efficacité d'au moins 70%, dont le biomarqueur inflammatoire COX-2. Par ailleurs, nous avons observé que l'expression génique et l'activité gélatinolytique de la MMP-9 n'étaient plus inhibées par l'EGCG. Une possible explication à cette différence de comportement de l'EGCG réside dans les niveaux d'expression du récepteur à la laminine de 67 kDa (67LR) et de son précurseur de 37 kDa (37LRP). Le 67LR est le récepteur non-intégrine de l'EGCG (Tachibana, 2009). Nous démontrons que dans les «*macrophages-like*», l'expression du 67LR est fortement diminuée et que celle du 37LRP est abolie en comparaison aux cellules HL-60 traitées au PMA. L'ajout de doses croissantes d'EGCG n'a pas affecté l'expression basale du 67LR et cela, peu importe le statut de différenciation des cellules HL-60. L'augmentation des doses d'EGCG mène à une légère diminution de l'expression du 37LRP dans les cellules HL-60 traitées au PMA tandis que le 37LRP demeure complètement inexprimé dans les «*macrophages-like*». Ainsi, la présence du 67LR et de son précurseur dans les cellules HL-

60 traitées au PMA signifie que l'EGCG peut activer la voie du 67LR pour inhiber la transduction du signal. La diminution du 37LRP ne semble pas affecter significativement la présence du 67LR à la surface cellulaire étant donné que son expression protéique est significativement élevée dans les cellules HL-60 traitées au PMA en comparaison aux cellules HL-60 non-différenciées. Un marquage immunofluorescent pourrait bonifier ce résultat. L'élimination du 37LRP dans les «*macrophages-like*» peut, quant à elle, expliquer la baisse de l'expression du 67LR étant donné que ce récepteur est composé de la dimérisation du 37LRP et de la galectine-3. En conséquence, la liaison de l'EGCG à son récepteur est moins importante. De cette façon, l'activation de la voie du 67LR est affaiblie justifiant en partie l'absence d'inhibition par l'EGCG de molécules telles MMP-9 dans les «*macrophages-like*» (figure 14).

Puisque l'EGCG n'est plus actif via le 67LR dans les «*macrophages-like*», il est possible que des mécanismes indépendants de la signalisation par le 67LR soient impliqués dans l'inhibition des molécules telles COX-2. Par exemple, il est connu que l'EGCG agit indépendamment du 67LR pour induire la mort des cellules HL-60 (Hazawa et al., 2011). De plus, des études ont récemment démontré l'action inhibitrice de l'EGCG sur la production de la prostaglandine E<sub>2</sub> ainsi que sur son récepteur, menant à la diminution de l'expression de COX-2 induite par les signaux inflammatoires comme le PMA (Singh et Katiyar, 2011). Sachant que COX-2 est une enzyme inductible par plusieurs médiateurs inflammatoires et stimuli mitogènes incluant les cytokines, endotoxines, facteurs de croissance, oncogènes et les esters de phorbol, il est aussi possible que l'inhibition de son expression par l'EGCG passe par des voies de signalisation comme la voie des MAP kinases, biomarqueur cible de l'EGCG (Kundu et al., 2003). Son pouvoir d'inhibition transcriptionnelle dans la cancérogenèse fait de l'EGCG une molécule naturelle à considérer pour cibler la signalisation moléculaire dans un but préventif. D'un point de vue fondamental, l'impact est important au niveau de l'inhibition des processus inflammatoires reliés à l'état de différenciation des cellules tumorales et immunes circulantes pouvant nuire aux tissus et organes. Par exemple, les macrophages dérivés des cellules HL-60 peuvent migrer au travers de la BHE (Park et al., 2003; Seidel et al., 2011). Sachant aussi que ces

macrophages surexpriment des biomarqueurs relatifs à divers mécanismes favorisant la cancérogenèse, leur transmigration peut mener à des infections secondaires et nuire aux fonctions cérébrales. De même, leur propagation au travers du système sanguin promeut l'invasion qui facilite le développement métastatique. Les infections et les métastases sont interreliées avec la neuroinflammation cérébrale. De ce fait, l'inhibition des biomarqueurs cibles est essentielle à la prévention à long terme de l'avènement de ces phénomènes délétères pour l'organisme et difficiles à traiter.



**Figure 14. Résumé de comparaison de la signalisation dans les HL-60 non-différenciées et les «macrophages-like».** Le PMA induit la différenciation des cellules promyélocytaires HL-60. La transcription est activée via la voie NF- $\kappa$ B. L'EGCG antagonise l'effet du PMA sur la transcription dans les cellules HL-60 non-différenciées. L'EGCG agit via le 67LR. La diminution de l'expression du 67LR à la surface cellulaire est en partie responsable de l'inefficacité de l'EGCG dans les «macrophages-like». L'absence du précurseur 37LRP explique la baisse des niveaux protéiques du 67LR. L'adaptation moléculaire en fonction du statut de différenciation affecte les phénomènes invasif, inflammatoire, de survie et de stress cellulaire.

**Abréviations :** PMA : 12-phorbol 13-myristate acétate; EGCG : (-)-épigallocatechine-3-gallate; 67LR : récepteur à la laminine de 67kDa; 37LRP : précurseur du 67LR.

## 6. Perspectives

Bien que notre étude permette l'identification et le ciblage de la voie NF- $\kappa$ B par le polyphénol du thé vert le plus efficace, du travail reste encore à faire. La phosphorylation d'I $\kappa$ B par le PMA implique possiblement la protéine kinase IKK lors de la différenciation des cellules HL-60 en macrophages. Il serait donc convenable de mesurer les niveaux protéiques d'IKK afin de bonifier nos hypothèses de travail. De plus, il serait intéressant de trouver les pistes complémentaires expliquant la diminution de l'expression du 67LR dans les «*macrophages-like*». Il serait approprié de justifier l'importance de la présence du 67LR avec l'utilisation d'un siRNA bloquant son expression. De cette façon, en absence du 67LR, l'EGCG devrait normalement ne pas avoir autant d'effet inhibiteur dans les cellules HL-60 traitées au PMA. Par contre, il serait intéressant d'étudier les effets possibles de l'EGCG sur d'autres voies de signalisation médiées par le traitement au PMA. L'utilisation d'un anticorps extracellulaire pourrait aussi être une alternative pour étudier le comportement du 67LR et de son précurseur 37LRP *in vitro*. Par un marquage immunofluorescent, il serait possible de voir à quel point sont-ils présents dans les cellules HL-60 dépendamment du statut de différenciation. Les différents niveaux de fluorescence pourraient être comparés entre les cellules HL-60 non-différenciées, les cellules HL-60 traitées au PMA et les «*macrophages-like*». L'étude des modulations de fluorescence subséquentes au traitement par l'EGCG serait aussi envisageable. La réponse différentielle entre les statuts de différenciation face au traitement à l'EGCG demeure ambiguë. Il se pourrait que le maintien de la surexpression de la MMP-9 dans les «*macrophages-like*» soit aussi dû à la diminution des TIMPs, inhibiteurs assurant la balance homéostatique des métalloprotéases matricielles dans les cellules. Par ailleurs, la surexpression de la COX-2 dans les cellules tumorales est associée au phénomène inflammatoire mais aussi à l'invasion et à l'angiogénèse (Khan et al., 2011). Les voies des MAP kinases (ERK, p38 et JNK) et de JAK/STAT sont impliquées dans l'inflammation, la prolifération, la différenciation hématopoïétique, l'apoptose et l'immunité (Toussiro, 2010). L'EGCG, faisant partie des composés phénoliques issus de notre alimentation, agit sur ces voies de



signalisation et module la transduction des signaux cellulaires. Il inhibe la signalisation des MAPK reliée à l'angiogénèse (Shimizu et al., 2008). De plus, il inhibe la voie de PI3K/Akt et le facteur de transcription AP-1 afin de réduire la croissance cellulaire et l'angiogénèse (Han et al., 2007). Ainsi, il serait approprié d'étudier le comportement de l'EGCG sur l'expression de la COX-2 via sa transcription par les voies de signalisation des MAPK, de JAK/STAT et PI3K/Akt.

L'identification par «*gene array*» des modulations de la signalisation engendrée par la voie NF- $\kappa$ B a permis de cibler des gènes importants dans les mécanismes reliés au cancer et aux métastases. En plus de COX-2 et MMP-9, nous avons observé une surexpression majeure des gènes codant pour les facteurs de stimulation de colonies des macrophages (CSF-1) et des granulocytes et macrophages (CSF-2) ainsi que pour le facteur de transcription «*early growth response*» (EGR2). Les CSFs sont des protéines sécrétées qui exercent un rôle dans la migration et le développement des cellules souches hématopoïétiques. Afin de peaufiner nos recherches, des expériences sont présentement en cours dans le but d'évaluer le potentiel des CSFs à influencer la migration de cellules souches mises en contact avec du milieu conditionné par les «*macrophages-like*». Quant à EGR2, il s'agit d'un facteur transcriptionnel nucléaire jouant un rôle clé dans la différenciation des macrophages. Nous aimerions démontrer le lien unissant ces facteurs et les niveaux d'expression des métalloprotéases telles MT1-MMP, proMMP-2 et MMP-9 dans le développement tumoral et métastatique ainsi que dans la neuroinflammation.

## 7. Conclusion

Comprendre et prévenir l'initiation précoce des mécanismes impliqués dans le développement tumoral et métastatique est une préoccupation d'envergure et d'actualité. Dans le but d'obtenir l'efficacité thérapeutique recherchée et d'optimiser les traitements préventifs, il est impératif d'identifier les cibles adéquates. Il est aussi essentiel d'identifier les agents potentiels qui pourront contrecarrer la transduction du signal et être néfastes pour les cellules et les tissus affectés par la maladie. Dans notre cas, nous avons choisi l'EGCG comme agent nutraceutique. Nous avons démontré ses effets bénéfiques pour empêcher les cellules HL-60 traitées au PMA d'exprimer les biomarqueurs de certains phénomènes caractérisant la cancérogenèse. L'EGCG requiert la présence de son récepteur 67LR pour être effectif sur une majorité de gènes cibles régulés par la voie NF- $\kappa$ B suite à son activation par le PMA. Dans les «*macrophages-like*» qui expriment de façon constitutive les gènes induits par leur agent de différenciation (PMA), l'effet inhibiteur de l'EGCG ne peut être confirmé. Cela s'explique, en partie, par la très faible expression du 67LR dans ces cellules par rapport aux cellules non-différenciées ou traitées au PMA. Nous n'avons pas encore exploré les autres avenues responsables de la spécificité d'inhibition de l'EGCG envers la COX-2 par rapport à la MMP-9 par exemple. Une diminution de l'expression des TIMPs pouvant aussi être affectée par l'EGCG semble être une hypothèse réaliste et pourrait rendre compte de la différence notée dans les «*macrophages-like*». Ceci n'a pas été étudié et demeure une avenue à exploiter en ce qui concerne l'expression et l'activité de la MMP-9 qui ne changent pas lorsqu'on soumet les «*macrophages-like*» à l'EGCG.

Ce mémoire documente la mise au point d'un modèle cellulaire aux propriétés macrophagiques appelées «*macrophages-like*» et de son utilité ultérieure dans l'étude des biomarqueurs impliqués à chaque étape de la cancérogenèse. Ce modèle permet l'étude des mécanismes de signalisation pendant la différenciation cellulaire par l'ajout simultané de l'agent de différenciation (PMA) et de l'agent naturel (EGCG) aux propriétés anticancéreuses. Ce modèle permet aussi de garder les cellules différenciées en culture afin d'étudier de façon indépendante l'effet de l'EGCG au niveau du ciblage de biomarqueurs et

de voies de signalisation spécifiques au développement néoplasique. C'est un modèle de macrophages qui peut éventuellement servir de comparaison à d'autres macrophages. Par ailleurs, le ciblage du statut de différenciation cellulaire de notre modèle représente un impact significatif dans l'atteinte de l'efficacité des approches thérapeutiques ou préventives. L'ultime but de ces approches est la diminution de la neuroinflammation associée au développement tumoral et à la perturbation de la BHE.

La leucémie promyéloïde aiguë a fait l'objet d'améliorations importantes au niveau de la thérapie et de la survie avec rémission. Cependant, il demeure primordial de prévenir la sécrétion de molécules aux propriétés cancérogènes par les «*macrophages-like*» dérivés des cellules promyélocytaires HL-60. Ces molécules circulantes dans les vaisseaux sanguins peuvent infiltrer les tissus environnants et perturber la barrière hématoencéphalique, structure étanche qui régule le passage des agents pathogènes et cellules circulants du sang vers le cerveau (Pardridge, 2002; Van den Steen et al., 2002). Ainsi, la sécrétion de molécules cancérogènes peut causer des effets délétères secondaires à la neuroinflammation lié à l'altération de la BHE. Spécifiquement, les niveaux d'expression élevée de COX-2 et de MMP-9 doivent être contrôlés pour éviter les complications qu'engendrent la cancérogenèse et les métastases. L'usage de molécules phytochimiques comme l'EGCG contribue à prévenir les changements phénotypiques associés au développement du cancer et des métastases. Particulièrement dans les cellules de leucémie promyéloïde aiguë HL-60, le ciblage du statut de différenciation par l'EGCG permet d'éviter ce genre de complications.

## Bibliographie

- Abcam 2012. Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs). ABCAM.
- Abel, E.L. et Digiovanni, J. (2008) *The molecular basis of cancer : Environnemental carcinogenesis*, Philadelphia, Saunders Elsevier, 91.
- Aggarwal, B.B. et Shishodia, S. (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 71, 1397-421.
- American Cancer Society. (2008) *Leukemia-Acute myeloid*.  
<http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acute/myeloidaml/detailedguide/index>. Page visitée le 28 mars 2012.
- Annabi, B., Currie, J., Moghrabi, A. et Beliveau, R. (2007) Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg. *Leukemia Research*, 31, 1277-1284.
- Ardini, E., Pesole, G., Tagliabue, E., Magnifico, A., Castronovo, V., Sobel, M.E., Colnaghi, M.I. et Menard, S. (1998) The 67-kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution. *Molecular biology and evolution*, 15, 1017-25.
- Baay, M., Brouwer, A., Pauwels, P., Peeters, M. et Lardon, F. (2011) Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical & developmental immunology*, 2011, 565187.
- Beaglehole, R., Bonita, R. et Magnusson, R. (2011) Global cancer prevention: an important pathway to global health and development. *Public health*, 125, 821-31.
- Béliveau, R. et Gingras, D. (2007) Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician*, 53, 1905-11.
- Beltran, J.A., Peek, J. et Chang, S.L. (2006) Expression and regulation of the mu opioid peptide receptor in TPA-differentiated HL-60 promyelocytic leukemia cells. *International immunopharmacology*, 6, 1331-40.
- Ben-Neriah, Y. et Karin, M. (2011) Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol*, 12, 715-23.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H. et Maskos, K. (1999) Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci*, 55, 639-52.

- Bosman, F.T. et Stamenkovic, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*, 200, 423-8.
- Brandt-Rauf, P.W. et Pincus, M.R. (1998) Molecular markers of carcinogenesis. *Pharmacol Ther*, 77, 135-48.
- Breccia, M. et Alimena, G. (2010) NF-kappaB as a potential therapeutic target in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 1157-76.
- Bremner, P. et Heinrich, M. (2002) Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol*, 54, 453-72.
- Brenner, D.E. (2008) *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer principles and practice of oncology - Principles of cancer chemoprevention*, Lippicott williams and wilkins, 609-614.
- Brock, A., Huang, S. et Ingber, D.E. (2003) Identification of a distinct class of cytoskeleton-associated mRNAs using microarray technology. *BMC Cell Biol*, 4, 6.
- Buto, S., Tagliabue, E., Ardini, E., Magnifico, A., Ghirelli, C., Van Den Brule, F., Castronovo, V., Colnaghi, M.I., Sobel, M.E. et Menard, S. (1998) Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor. *J Cell Biochem*, 69, 244-51.
- Candelario-Jalil, E., Taheri, S., Yang, Y., Sood, R., Grossetete, M., Estrada, E.Y., Fiebich, B.L. et Rosenberg, G.A. (2007) Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 323, 488-98.
- Cerella, C., Sobolewski, C., Dicato, M. et Diederich, M. (2010) Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol*, 80, 1801-15.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. et Chakraborti, T. (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*, 253, 269-85.
- Collins, S.J. (1987) The HL-60 Promyelocytic Leukemia Cell Line: Proliferation, Differentiation and Cellular Oncogene Expression. *Blood*, 70, 1233-1244.
- Croce, C.M. (2008) Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine*, 358, 502-11.

- De The, H. et Chen, Z. (2010) Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer*, 10, 775-83.
- Dickson, D.J. et Shami, P.J. (2001) Angiogenesis in acute and chronic leukemias. *Leukemia & lymphoma*, 42, 847-53.
- Esendagli, G., Canpinar, H., Yilmaz, G., Kaymaz, F.F., Kansu, E. et Guc, D. (2009) Fibronectin promotes the phorbol 12-myristate 13-acetate-induced macrophage differentiation in myeloid leukemia cells. *International Journal of Hematology*, 89, 167-172.
- Faderl, S. et Kantarjian, H. (2011) *Leukemias: Principles and Practice of Therapy*, 456.
- Ferrara, F. (2010) Acute promyelocytic leukemia: what are the treatment options? *Expert Opin Pharmacother*, 11, 587-96.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., Mccredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F. et Gallo, R. (1979) Characterization of the Continuous Differentiating Myeloid Cell Line (HL-60) From a Patient With Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood*, 54, 713-733.
- Gialeli, C., Theocharis, A.D. et Karamanos, N.K. (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J*, 278, 16-27.
- Gingras, D. et Beliveau, R. (2006) *Cuisiner avec les aliments contre le cancer*, Montréal, Éditions du Trécarré, 23-43.
- Givant-Horwitz, V., Davidson, B. et Reich, R. (2005) Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett*, 223, 1-10.
- Grimwade, D. et Enver, T. (2004) Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 18, 375-84.
- Grimwade, D., Mistry, A.R., Solomon, E. et Guidez, F. (2010) Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation therapy. *Cancer treatment and research*, 145, 219-35.
- Gritz, E.R., Lam, C.Y., Viridine, D.J. et Fingeret, M.C. (2008) *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer principles and practice of oncology - Cancer prevention: Tobacco dependence and its treatment* Lippincott williams and wilkins, 593-608.

- Gupta, S.C., Kim, J.H., Prasad, S. et Aggarwal, B.B. (2010) Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 405-34.
- Guyton, A.C. et Hall, J.E. (2006) *Textbook of medical physiology*, 40-41.
- Han, K.Y., Hong, B.S., Yoon, Y.J., Yoon, C.M., Kim, Y.K., Kwon, Y.G. et Gho, Y.S. (2007) Polyphosphate blocks tumour metastasis via anti-angiogenic activity. *Biochem J*, 406, 49-55.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Harrison, L.B., Chadha, M., Hill, R.J., Hu, K. et Shasha, D. (2002) Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist*, 7, 492-508.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E. et Shinagawa, A. (1994) Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*, 107 ( Pt 9), 2373-9.
- Hazawa, M., Takahashi, K., Sugata, S. et Kashiwakura, I. (2011) (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate induces nonapoptotic cell death in leukemia cells independent of the 67 kDa laminin receptor. *J Nat Prod*, 74, 695-700.
- Huberman, E. et Callahan, M.F. (1979) Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 1293-7.
- Jasek, E., Mirecka, J. et Litwin, J.A. (2008) Effect of differentiating agents (all-trans retinoic acid and phorbol 12-myristate 13-acetate) on drug sensitivity of HL60 and NB4 cells in vitro. *Folia Histochem Cytobiol*, 46, 323-30.
- Kalinski, P. (2012) Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, 188, 21-28.
- Kanarek, N. et Ben-Neriah, Y. (2012) Regulation of NF-kappaB by ubiquitination and degradation of the IkappaBs. *Immunological reviews*, 246, 77-94.
- Keyhani, A., Jendiroba, D.B. et Freireich, E.J. (2001) Angiogenesis and leukemia. *Leuk Res*, 25, 639-45.

- Khan, Z., Khan, N., Tiwari, R.P., Sah, N.K., Prasad, G.B. et Bisen, P.S. (2011) Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics. *Current drug targets*, 12, 1082-93.
- Kizaki, M., Matsushita, H., Takayama, N., Muto, A., Ueno, H., Awaya, N., Kawai, Y., Asou, H., Kamada, N. et Ikeda, Y. (1996) Establishment and characterization of a novel acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) with retinoic acid-resistant features. *Blood*, 88, 1824-33.
- Klein, G. (2004) The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50, 87-100.
- Kundu, J.K., Na, H.K., Chun, K.S., Kim, Y.K., Lee, S.J., Lee, S.S., Lee, O.S., Sim, Y.C. et Surh, Y.J. (2003) Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. *J Nutr*, 133, 3805S-3810S.
- Le, D.M., Besson, A., Fogg, D.K., Choi, K.S., Waisman, D.M., Goodyer, C.G., Rewcastle, B. et Yong, V.W. (2003) Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *J Neurosci*, 23, 4034-43.
- Lensch, W. (2011) *The ontogeny of blood production*.  
<https://daley.med.harvard.edu/assets/Willy/willy.htm>, Harvard Medical School.  
 Page visitée le 7 mars 2012.
- Lippman, S.M. et Lee, J.J. (2008) The molecular basis of cancer : Cancer chemoprevention. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 757.
- Longo, D.L. (2010) *Harrison's hematology and oncology*, McGraw-Hill, 346-348.
- Lowenberg, B., Downing, J.R. et Burnett, A. (1999) Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341, 1051-62.
- Mangi, M.H. et Newland, A.C. (2000) Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol*, 111, 43-51.
- Mcardle, O. et O'mahony, D. (2008) *Oncology - an illustrated colour text*, Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier, 64-67.
- Mcknight, J.A. (2003) Principles of chemotherapy. *Clin Tech Small Anim Pract*, 18, 67-72.
- Mi, J.Q., Li, J.M., Shen, Z.X., Chen, S.J. et Chen, Z. (2012) How we treat acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*.



- Moore, C.S. et Crocker, S.J. (2012) An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am J Pathol*, 180, 12-6.
- Mueller, M.M. et Fusenig, N.E. (2004) Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4, 839-49.
- Na, H.K. et Oliynyk, S. (2011) Effects of physical activity on cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 1229, 176-83.
- Nagase, H., Visse, R. et Murphy, G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69, 562-73.
- Nagase, H. et Woessner, J.F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274, 21491-4.
- Nakazato, T., Ito, K., Miyakawa, Y., Kinjo, K., Yamada, T., Hozumi, N., Ikeda, Y. et Kizaki, M. (2005) Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Haematologica*, 90, 317-25.
- National Cancer Institute. (2010) *Radiation therapy for cancer*. [www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/radiation](http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/radiation). Page visitée le 24 juillet 2012.
- Nelson, J., McFerran, N.V., Pivato, G., Chambers, E., Doherty, C., Steele, D. et Timson, D.J. (2008) The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci Rep*, 28, 33-48.
- Organisation Mondiale De La Santé. (2012) *Cancer*. <http://www.who.int/cancer/fr>. Page visitée le 5 mars 2012.
- Pan, M.H., Chiou, Y.S., Wang, Y.J., Ho, C.T. et Lin, J.K. (2011) Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate. *Food Funct*, 2, 101-10.
- Pardridge, W.M. (2002) Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nature reviews. Drug discovery*, 1, 131-9.
- Park, J., Choi, K.S., Grab, D.J. et Dumler, J.S. (2003) Divergent interactions of Ehrlichia chaffeensis- and Anaplasma phagocytophilum-infected leukocytes with endothelial cell barriers. *Infection and immunity*, 71, 6728-33.

- Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E. et Weissman, I.L. (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl 1, 11842-9.
- Pollard, J.W. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 4, 71-8.
- Potente, M., Gerhardt, H. et Carmeliet, P. (2011) Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146, 873-87.
- Ricciotti, E. et Fitzgerald, G.A. (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 986-1000.
- Rizzo, M.T. (2011) Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 412, 671-87.
- Roussel, M.J. et Lanotte, M. (2001) Maturation sensitive and resistant t(15;17) NB4 cell lines as tools for APL physiopathology: nomenclature of cells and repertory of their known genetic alterations and phenotypes. *Oncogene*, 20, 7287-91.
- Rubnitz, J.E., Gibson, B. et Smith, F.O. (2010) Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 24, 35-63.
- Rundhaug, J.E. (2003) Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart et al., Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00-00, 2003. *Clin Cancer Res*, 9, 551-4.
- Sato, H. et Takino, T. (2010) Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. *Cancer Sci*, 101, 843-7.
- Scheidereit, C. (2006) I kappa B kinase complexes: gateways to NF-kappa B activation and transcription. *Oncogene*, 25, 6685-705.
- Schmidt, T. et Carmeliet, P. (2011) Angiogenesis: a target in solid tumors, also in leukemia? *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2011, 1-8.
- Seidel, G., Bocker, K., Schulte, J., Wewer, C., Greune, L., Humberg, V. et Schmidt, M.A. (2011) Pertussis toxin permeabilization enhances the traversal of Escherichia coli K1, macrophages, and monocytes in a cerebral endothelial barrier model in vitro. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 301, 204-12.

- Sethi, G., Shanmugam, M.K., Ramachandran, L., Kumar, A.P. et Tergaonkar, V. (2012) Multifaceted link between cancer and inflammation. *Biosci Rep*, 32, 1-15.
- Sgambato, A. et Cittadini, A. (2010) Inflammation and cancer: a multifaceted link. *European review for medical and pharmacological sciences*, 14, 263-8.
- Shanmugam, M.K., Nguyen, A.H., Kumar, A.P., Tan, B.K. et Sethi, G. (2012) Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Lett.*
- Shen, H.M. et Tergaonkar, V. (2009) NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis*, 14, 348-63.
- Shimizu, M., Shirakami, Y. et Moriwaki, H. (2008) Targeting receptor tyrosine kinases for chemoprevention by green tea catechin, EGCG. *Int J Mol Sci*, 9, 1034-49.
- Sigma-Aldrich 1997. Phorbol 12-myristate 13-acétate - Product information. Sigma.
- Singh, B.N., Shankar, S. et Srivastava, R.K. (2011) Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 82, 1807-21.
- Singh, M., Singh, P. et Shukla, Y. (2012) New strategies in cancer chemoprevention by phytochemicals. *Frontiers in bioscience*, 4, 426-52.
- Singh, T. et Katiyar, S.K. (2011) Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*, 6, e25224.
- Société Canadienne Du Cancer. (2011) *Statistiques canadiennes sur le cancer*. [www.cancer.ca](http://www.cancer.ca).
- Société De Recherche Sur Le Cancer. (2010) *Leucémie*. <http://www.src-crs.ca/fr-CA/Le%20cancer/Quelques%20types%20de%20cancer/Leucemie>. Page visitée le 16 août 2012.
- St-Pierre, Y., Van Themsche, C. et Esteve, P.O. (2003) Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 2, 206-15.
- Stewart, B.W. (2012) Priorities for cancer prevention: lifestyle choices versus unavoidable exposures. *The lancet oncology*, 13, e126-33.

- Sun, Y., Kim, S.H., Zhou, D.C., Ding, W., Paietta, E., Guidez, F., Zelent, A., Ramesh, K.H., Cannizzaro, L., Warrell, R.P. et Gallagher, R.E. (2004) Acute promyelocytic leukemia cell line AP-1060 established as a cytokine-dependent culture from a patient clinically resistant to all-trans retinoic acid and arsenic trioxide. *Leukemia*, 18, 1258-69.
- Tachibana, H. (2009) Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG. *Forum of nutrition*, 61, 156-69.
- Tan, A., Konczak, I., Sze, D. et Ramzan, I. (2011) Molecular Pathways for Cancer Chemoprevention by Dietary Phytochemicals. *Nutrition and Cancer*, 63, 495-505.
- Tong, W. et Zhang, L. (2012) Fetal hypoxia and programming of matrix metalloproteinases. *Drug discovery today*, 17, 124-34.
- Toussiro, E. 2010. Réflexions rhumatologiques. In: INTRACELLULAIRE, L. V. D. S. (ed.). Besançon: JBH Santé.
- Umeda, D., Yano, S., Yamada, K. et Tachibana, H. (2008) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem*, 283, 3050-8.
- Van Den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A. et Opdenakker, G. (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 37, 375-536.
- Weber, C.E. et Kuo, P.C. (2011) The tumor microenvironment. *Surg Oncol*.
- Wheater, P.R., Young, B. et Heath, J.W. (2001) *Histologie fonctionnelle*, 65.
- Wolf, K. et Friedl, P. (2011) Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in cell biology*, 21, 736-44.
- Yang, C.S. et Wang, X. (2010) Green tea and cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62, 931-7.
- Yang, H., Landis-Piwowar, K., Chan, T.H. et Dou, Q.P. (2011) Green tea polyphenols as proteasome inhibitors: implication in chemoprevention. *Current cancer drug targets*, 11, 296-306.
- Zaveri, N.T. (2006) Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci*, 78, 2073-80.

Zheng, C., Yin, Q. et Wu, H. (2011) Structural studies of NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21, 183-95.

Zhu, Z., Zhong, S. et Shen, Z. (2011) Targeting the inflammatory pathways to enhance chemotherapy of cancer. *Cancer Biol Ther*, 12, 95-105.