



HAL
open science

Rôle de la cytokine Leukemia Inhibitory Factor (LIF) dans l'activation et le maintien des fibroblastes pro-invasifs lors de la carcinogénèse

Jean Albregues

► **To cite this version:**

Jean Albregues. Rôle de la cytokine Leukemia Inhibitory Factor (LIF) dans l'activation et le maintien des fibroblastes pro-invasifs lors de la carcinogénèse. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4107 . tel-01249587

HAL Id: tel-01249587

<https://theses.hal.science/tel-01249587v1>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'université de Nice Sophia Antipolis.

Discipline: Science de la Vie et de la Santé.
Spécialité: Interactions moléculaires et cellulaires.

Présenté et soutenu par Albregues Jean,
le 3 décembre 2014.

**Titre: Rôle de la cytokine Leukemia Inhibitory Factor (LIF) dans
l'activation et le maintien des fibroblastes pro-invasifs lors de
la carcinogénèse**

Jury.

Dr Sophie Tartare-Deckert.
Dr Fatima Mehta-grigoriou.
Pr Olivier De Wever.
Dr Richard Tomasini.
Dr Cedric Gaggioli.
Dr Guerrino Meneguzzi.

Président du Jury.
Rapporteur.
Rapporteur.
Examineur.
Examineur
Directeur de thèse.

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Nice (ED85).
Unité de Recherche: Equipe 7 de l'IRCAN (Institute of Research on Cancer and
Aging, Nice), INSERM U1081: « Tumor-Stroma crosstalk in invasive cancer ».

Remerciements.

Tout d'abord, merci à vous, membres du jury, Docteur Fatima Mechta-Grigoriou, docteur Sophie Tartare-Deckert, Professeur Olivier De Wever et Docteur Richard Tomasini d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse et de prendre le temps de juger ce travail.

Merci à tous ceux qui m'ont épaulé depuis les 5 dernières années, et qui ont su m'entouré aussi bien scientifiquement que humainement. Je pense bien sur principalement à toi, Cédric, avec qui j'ai quasiment passé cinq jours sur sept depuis le début de mon stage de master 2 en janvier 2010, le tout début de la « baby team ». Tu m'as beaucoup appris, toujours aiguillé sur la bonne voie et a su me faire partager ta passion et ton enthousiasme pour la science. Les meilleurs moments étaient sûrement les matins ou tu arrivais tout souriant avec une super nouvelle idée, et cette envie de toujours aller plus loin. Je ne me rappelle que de très peu de jours ou je suis venu travailler à reculons. Merci de m'avoir fais confiance, et de m'avoir laissé le temps libre nécessaire pour m'épanouir humainement et musicalement.

Merci également à Gim pour nous avoir soutenu depuis le début, et pour les multiples corrections effectuées, et conseils donnés depuis mon arrivée au laboratoire.

Merci à toi Isa, pour toujours avoir été là, pour tes conseils, services et discussions (et pour avoir contaminé mes cultures à chaque fois que je suis parti en vacance!). Ce fut un énorme plaisir de travailler avec toi et de passer du temps avec toi: de discuter en culture, de s'occuper de l'azote; mais également d'avoir pu parler de tout avec toi. Tu es une personne avec qui je me suis toujours entendu, que j'apprécie énormément, même si j'ai eu tendance à te faire râler un bon paquet de fois !

Merci à vous, Diogo, Sylvana, Majdi, (H)eloïse et Stéphanie pour votre aide précieuse et les bons moments passés ensemble.

Merci à l'équipe de Chloé pour leurs conseils avisés. Merci notamment à toi Etienne, pour ces merveilleux moments d'humour. Le courant est toujours bien passé et on a vraiment bien rigolé surtout quand nos paillasses étaient dans la même pièce au 9ème.

Merci également à toi Catherine pour toujours avoir pris avec le sourire mes passages plus ou moins dévastateur en salle d'histologie. Ca a toujours été un plaisir de discuter avec toi!

Merci a mes deux acolytes du groupe du fond, Franck (binôme) et Mica, qui suivons la même route depuis des années maintenant, pour tout ces moments passés en haut de l'amphi, et le nombre d'histoires à raconter plus débiles les unes que les autres.

Finalement, j'aimerais remercier les personnes qui ont fait parti intégrante de cette aventure, et avec qui j'ai pu parler des années sans qu'ils ne comprennent jamais vraiment ce que je faisais au laboratoire: mes parents, Claire, mes grands parents, mes amis (avec une attention particulière pour Brian et Gogo qui ont toujours pris le temps de s'y

intéresser) et Paty (je sais que tu vas râler car j'aurais pu te remercier un peu plus et te consacrer un chapitre, mais comme on dit: le meilleur pour la fin).

Table des matières

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	5
<u>INTRODUCTION</u>	11
<u>I] Le microenvironnement tumoral des tissus épithéliaux</u>	11
<u>A) Généralités</u>	11
<u>1) Le microenvironnement « normal », physiologique</u>	11
<u>2) Le microenvironnement tumoral</u>	13
<u>B) Les carcinomes</u>	15
<u>1) Caractéristiques des cellules tumorales</u>	15
<u>2) La cascade métastatique</u>	17
<u>3) Invasion tumorale</u>	19
<u>a) L'invasion mésenchymateuse</u>	19
<u>b) Invasion amoéboïde</u>	19
<u>c) L'invasion collective</u>	21
<u>d) Plasticité de l'invasion tumorale</u>	25
<u>C) La matrice extracellulaire</u>	25
<u>II] Fibroblastes et carcinogénèse</u>	31
<u>A) rôle physiologique des fibroblastes</u>	31
<u>1) Les fibroblastes, généralités</u>	31
<u>2) Fibroblastes et homéostasie tissulaire</u>	33
<u>3) Fibroblastes et cicatrisation</u>	35
<u>a) Les myofibroblastes, généralités</u>	35
<u>b) Les myofibroblastes participent à la fermeture de la blessure</u>	35
<u>B) Fibroblastes associés aux carcinomes</u>	39
<u>1) Généralités</u>	39
<u>2) Caractérisation des FACs</u>	41
<u>a) Origines</u>	41
<u>b) Marqueurs</u>	41
<u>c) Activation</u>	43
<u>3) Les fibroblastes associés aux carcinomes participent à toutes les étapes de la carcinogénèse</u>	49
<u>a) FACs et évolution de la tumeur primaire</u>	49
<u>b) FACs et cellules souche cancéreuses</u>	55
<u>c) FACs et efficacité des traitements chimiothérapeutiques</u>	57
<u>d) FACs et niche métastatique</u>	63
<u>4) Le rôle des FACs dans le remodelage matriciel et l'invasion tumorale</u>	65
<u>a) Sécrétion de protéines matricielles exerçant une activité pro-tumorale</u>	65
<u>b) Rigidification de la MEC</u>	65
<u>c) FACs et Protéases</u>	73
<u>5) Les FACs comme cible thérapeutique</u>	77
<u>6) Conclusion</u>	83
<u>III] Inflammation et cancer</u>	85
<u>A) Généralités</u>	85
<u>B) Inflammation et microenvironnement tumoral</u>	87
<u>C) Inflammation et fibrose</u>	91
<u>IV) Epigénétique et cancer</u>	93
<u>A) Méthylation de l'ADN, généralités</u>	93
<u>B) Méthylation de l'ADN et cancer</u>	95
<u>C) Méthylation de l'ADN et fibroses</u>	95

<u>D) Methylation de l'ADN chez les FACs.....</u>	<u>99</u>
<u>RESULTATS.....</u>	<u>103</u>
<u>I) 1er article: LIF mediates pro-invasive pro-invasive activation of stromal fibroblasts in cancer.....</u>	<u>103</u>
<u>II) 2ème article : Epigenetic-dependent loss of Shp1 expression governs constitutive activation of pro-invasive stromal fibroblasts.....</u>	<u>145</u>
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</u>	<u>195</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>210</u>

LISTE DES ABREVIATIONS.

5aza: 5aza cytidine.

Abl: Abelson.

ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia.

Ang II: Angiotensine II

ANLN: Anillin

α -SMA: Alpha Smooth-Muscle-Actin

ATP: Adenosine triphosphate

B catenin: Beta catenin.

Bcr: Breakpoint Cluster Region protein

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor

BFGF: basic Fibroblasts Growth Factor.

CAF: Carcinoma Associated Fibroblasts.

CAM-DR: cell adhesion mediated drug resistance.

Cav-1: Caveolin 1.

CCL: CC chemokine ligand.

CD: Cluster of Differentiation.

cdc42: cell division control protein 42 homolog

CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor

COX: Cyclo Oxygenase.

CpG: Cytosine phosphate Guanine.

CSC: Cellule Souche Cancéreuse

CSM: Cellule Souche Mésoenchymateuse.

CT-1: Cardiotrophin-1

CTGF: Connective Tissue Growth Factor.

CXCL12: (C-X-C) chemokine Ligand 12

CXCR: CXC chemokine receptor

DIAPH3: diaphanous homolog 3

DNMT: Dna Methyltranserase.

E-cadherin: Epithelial-Cadherin

EDA-fibronectin: Extra Domain A fibronectin

EGF: Epidermal Growth Factor

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition

ETS2: v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog2
Ets2: v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
FAC: Fibroblastes Associés aux Carcinomes.
FACs: Fibroblastes Associes aux Carcinomes
FAK: Focal Adhesion Kinase.
FAP: Fibroblast Activated Protein
FERM: four-point-one, ezrin, radixin, moesin
FGF: Fibroblast Growth Factor.
FGF: Fibroblasts Growth Factor.
FSP1: Fibroblast-Specific Protein 1
G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GAP: GTPase Activating Protein
GAS: Gamma Activated Sequence
GEF: Guanine Exchange Factor
GDP: Guanosine Diphosphate
GP130: Glycoprotein 130
GST1: Glutathione S Transferase 1.
GTP: Guanosine Triphosphate
GTPase: Guanosine TriPhosphatase.
HA: Hyaluronic Acid.
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HIF:Hypoxia-Inducible Factor
IFN: Interferon.
IGF-1/2: Insulin Growth Factor
IL: Interleukin
IL6-ST: Interleukin 6 Signal Transducer
IPF: Idiopathic Pulmonary Fibrosis
JAK: Janus Kinase
JH: Janus Homology.
K14: cytokeratine 14.
KRas: Kirsten rat sarcoma.
LIF: Leukaemia Inhibitory Factor
LIFR: Leukemia Inhibitory Factor Receptor
LIMK: LIM domain kinase 1

LOX: Lysil Oxydase.
LOXL: Lysil Oxydase Like.
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.
MBP: methyl binding protein.
MDR: MultiDrug Resistance.
MEC: Matrice ExtraCellulaire.
MecP2: méthyl cytosine-binding protein 2
MET: Hepatocyte Growth Factor receptor
MLC2: Myosin Light Chain 2
MLCPase: Myosin Light Chain Phosphatase
MLH1: MutL Homolog 1
MMP: Matrix Metalloproteinase
MRTF: Myocardin-Related Transcription Factor
MT1-MMP: Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase.
MYPT1: Myosin Phosphatase Target Subunit 1
NcoA2: Nu
NcoA2: Nuclear Receptor coactivator
NF- κ B: Nuclear Factor kappa B
NGF: Nerve Growth Factor
OSM: Oncostatin M
OSMR: Oncostatin M receptor
P16: cyclin-dependant kinase inhibitor 2A.
P53: tumor protein p53.
P6: Pyridone 6
PAR: Protein Activated Receptor
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PIAS: protein inhibitor of activated STAT
PITCH: Patched
PKC: Protein Kinase C.
PTEN: Phosphatase and TENsing homolog.
PTP1B: Protein Tyrosine Phosphatase 1B
PTPN6: Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor 6.
Rab: Ras-related in brain.
RAF: proto-oncogene serine/threonine-protein kinase

RAR-beta 2: Retinoic Acid Receptor beta 2.
Rb: Rétinoblastome.
Rho: Ras homolo
ROCK: Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase
S1P: Sphingosine 1 phosphate
S1PR1: Sphingosine 1 phosphate Receptor 1
SCC: Squamous cell carcinoma
ScS: Sclérodemie Systémique
SDF-1: Stromal Cell-Derived Factor 1
SH2: Src-homology domain
Shh: Sonic hedgehog
SHP: Src Homology-2 domain-containing phosphatase.
SMAD: Mother against decapentaplegic homolog.
Smo: Smoothened
SOCS: suppressor of cytokine signaling
SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SRF: Serum Reponse Factor
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
TAD: Trans-Activating Domain.
TAZ: Taffazin.
TC-PTP: T-cell Protein Tyrosine Phosphatase.
TEM: Transition Epithélio-Mesenchymateuse.
TGF β : Transforming Growth Factor beta
Th: T helper
Thy1: Thymus cell antigen 1.
TNC: Tenascin C.
TNF: Tumor Necrosis Factor.
TRAF: TNF Receptor Associated Factor
TRPC: Transient Receptor Potential Channel.
TYK2: Tyrosine Kinase 2
uPA: urokinase Plasminogen Activator
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt: Wingless
WNT16B: wingles-type MMTV integration site family member 16B
YAP: Yes-Associated Protein.

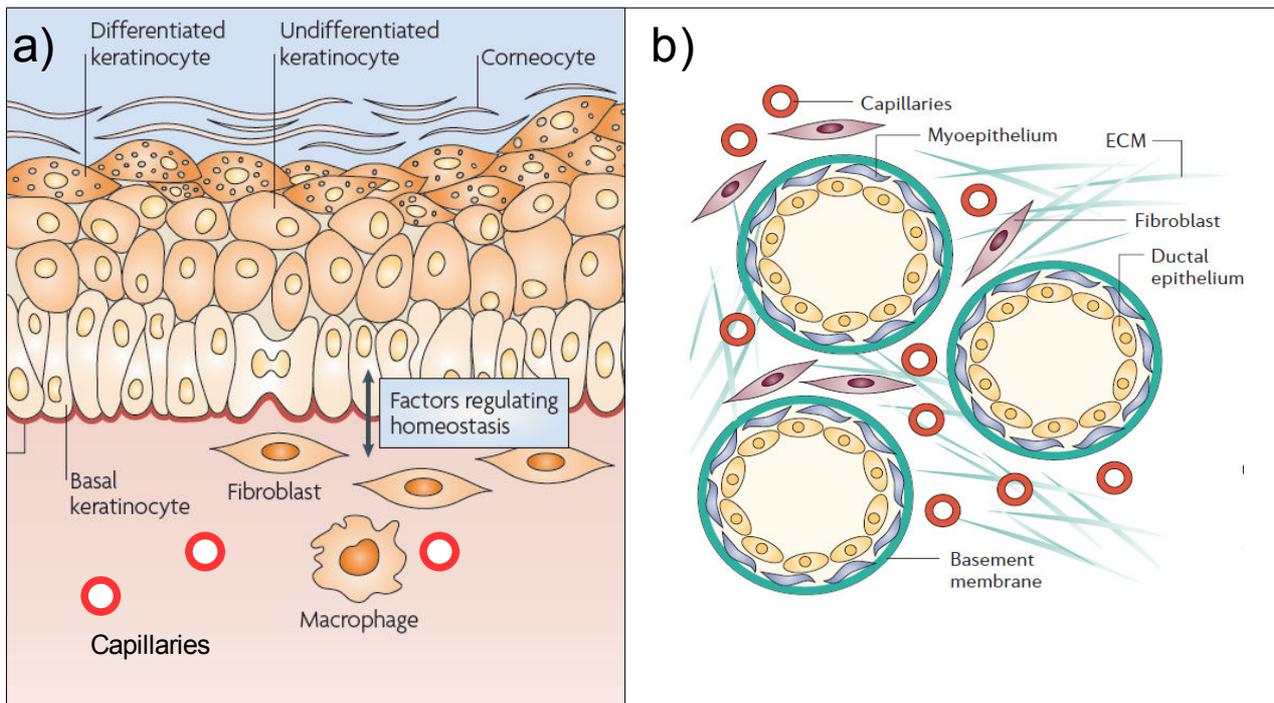


Figure 1. Le microenvironnement tissulaire: exemples de la peau et des glandes mammaire

a) Peau: l'homéostasie cutanée est assurée par des échanges bidirectionnels entre les cellules épithéliales, essentiellement les kératinocytes, et les cellules du derme: fibroblastes, cellules endothéliales de la microvascularisation et cellules immunitaires. La membrane basale, essentielle pour l'adhérence des kératinocytes au stroma, permet un échange soutenu des fluides, éléments nutritifs et facteurs, comme les chimiokines, entre les deux compartiments tissulaires. Les constituants de la membrane basale sont essentiellement sécrétés par les kératinocytes basaux et les fibroblastes. Les fibroblastes sont aussi responsables de la sécrétion et de l'assemblage de la plus grande partie des protéines de la MEC dans le derme. D'après (Pasparakis, 2009)

b) Tissus mammaire: les acinis sont composé d'un épithélium monocouche entouré par les cellules myoépithéliales qui sont séparés du tissu conjonctif par une membrane basale. Le tissu conjonctif est composé de matrice extracellulaire (ECM), de capillaires sanguins, de fibroblastes, et il contient aussi des cellules immunitaires, comme les macrophages. D'après (Kalluri & Zeisberg, 2006)

INTRODUCTION.

1] Le microenvironnement tumoral des tissus épithéliaux.

A) Généralités.

1) Le microenvironnement « normal », physiologique.

Le maintien de l'organisation architecturale et fonctionnelle d'un tissu requiert un courant constant et dynamique de communications entre les cellules qui le composent. Cet échange d'informations organisées est nécessaire à l'état différencié de l'organe et de sa fonction. Les cellules épithéliales communiquent entre elles et le stroma environnant de manière dynamique et interactive, soit par contacts physiques, par le biais de complexes d'adhérence jonctionnels, soit grâce à des molécules secrétées dans le milieu extracellulaire (hormones, facteurs de croissance, cytokines et chemokines) qui agissent sur des récepteurs spécifiques à la surface de leurs cellules cibles. Ces échanges permanents et réciproques entre les cellules et leur environnement permettent le maintien de l'architecture, l'organisation fonctionnelle et la quiescence des tissus et des organes (figure 1). Ainsi, le terme de microenvironnement définit un contexte complexe et dynamique, spécifique à chaque tissu et organe. Dans chaque situation, la composante cellulaire d'un microenvironnement englobe l'ensemble des cellules avoisinantes, c'est à dire, les cellules adjacentes du même tissu et les cellules résidant dans l'environnement direct (notamment les fibroblastes, les cellules vasculaires, et celles du système immunitaire). Ces cellules baignent dans la Matrice Extra-Cellulaire (MEC), un élément déterminant du microenvironnement formé de macromolécules et facteurs secrétés majoritairement par les fibroblastes (Perez-Losada & Balmain, 2003). Les microenvironnements les plus spécialisés, incluent les lamelles basales sur lesquelles reposent les cellules épithéliales et les « niches » entourant les cellules souches (Kalluri & Zeisberg, 2006; Eckfeldt, Mendenhall, & Verfaillie, 2005; Kalluri, 2003) (figure 1). Dans les conditions physiologiques, le stroma s'associe à la composante épithéliale dans la régulation et le maintien de l'intégrité tissulaire, et notamment en réponse aux dommages, comme lors de la cicatrisation qui enclenche des réactions caractérisant le « stroma

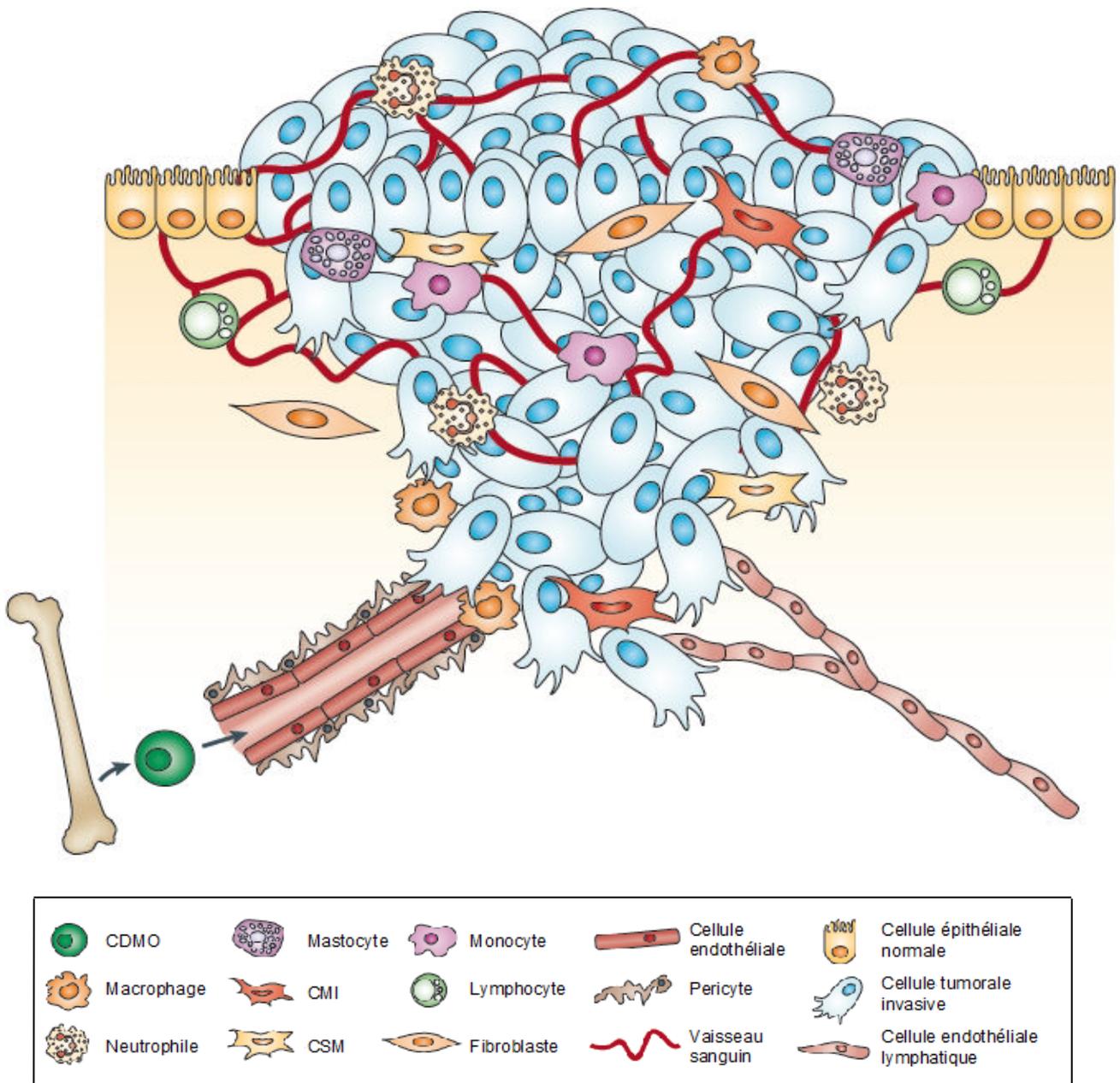


Figure 2. Le microenvironnement tumoral.

Les cellules tumorales se présentent sous forme d'amas désorganisés, qui, dans les stades avancés du processus, peuvent franchir la membrane basale. Le tumeur est entourée par un microenvironnement complexe comprenant les cellules endothéliales, qui tapissent les vaisseaux sanguins et lymphatiques entourés de pericytes, et qui est peuplée par des fibroblastes et une grande variété de cellules dérivées de la moelle osseuse (CDMO) comme les macrophages, les lymphocytes, les mastocytes, les neutrophiles, les cellules myéloïdes immunosuppressives (CMI), et les cellules souches mésenchymateuse (CSM). D'après (Joyce & Pollard, 2009)

réactionnel ». Il n'est donc pas surprenant que le stroma puisse jouer un rôle important dans des situations pathologiques, tel que la survenue d'une lésion néoplasique, et générer des modifications le rendant permissif au développement tumoral, voir le favorisant (Bissell & Hines, 2011; Schafer & Werner, 2008). Des perturbations de l'homéostasie du microenvironnement peuvent en effet avoir des effets pro-oncogéniques et favoriser la transformation des cellules en cellules cancéreuses. De même, la transformation cellulaire entraîne des modifications profondes du microenvironnement.

2) Le microenvironnement tumoral.

Il est maintenant admis que la croissance tumorale à partir d'une cellule initiale requiert un concours de circonstances et de conditions que seulement un environnement complexe comprenant une MEC riche en divers types cellulaires peut fournir. Cela nécessite la présence de cellules inflammatoires et immunitaires (macrophages et lymphocytes par exemple, qui selon leur type et l'état d'avancement de la maladie peuvent voir leur fonctions affectées et alors favoriser la croissance tumorale), un grand nombre de fibroblastes qui participent à la sécrétion d'une MEC « pro-tumorale », ainsi que des cellules assurant la vascularisation de la tumeur (cellules endothéliales et péricytes) (Balkwill, Capasso, & Hagemann, 2012; Frantz, Stewart, & Weaver, 2010). Le terme de stroma tumoral est ainsi appliqué à l'ensemble des éléments entourant le tissu tumoral proprement dit, et qui constituent un stroma histologiquement très différent de celui d'origine. Le stroma des lésions cancéreuses est en effet plus abondant et plus riche en molécules à activité pro-tumorale (Mueller & Fusenig, 2004) (figure 2).

Le stroma tumoral diffère du microenvironnement physiologique par sa composition biochimique, mais surtout par le fait que les populations cellulaires qu'il héberge, bien que non transformées, sont recrutées et contrôlées par les cellules tumorales ce qui permet à ses dernières de survivre, croître et disséminer loin de la tumeur primaire (Joyce & Pollard, 2009). Dans ce contexte, les communications étroites entre les cellules de carcinome et les cellules stromales sont amplement documentées (Lorusso & Ruegg, 2008; Koontongkaew, 2013). A présent, nous savons que les cellules cancéreuses peuvent altérer leur microenvironnement afin de le rendre propice au développement tumoral en favorisant la constitution d'un stroma « réactif » par une cascade d'évènements définis comme « réaction desmoplasique » (Schafer & Werner, 2008). Celle-ci se caractérise par une production excessive de MEC, par l'activation des diverses composantes cellulaires du stroma, et, notamment dans les tumeurs d'origine épithéliales, par l'apparition de

myofibroblastes, couramment appelés Fibroblastes Associés aux Carcinomes (FACs). Le terme FAC désigne collectivement une population de fibroblastes activés d'origine hétéroclite (Kalluri & Zeisberg, 2006; Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004; Pietras & Ostman, 2010). (Sujet approfondi dans le paragraphe IIB2c « [Origines des FACs](#) »).

La cancérisation et la modification du microenvironnement tumoral sont intimement liés et complémentaires pour la croissance tumorale: l'un participant au développement et au maintien de l'autre, et vice et versa. La compréhension des mécanismes permettant l'évolution d'un microenvironnement vers un phénotype tumoral paraît donc essentielle pour le développement de traitements efficaces ciblant les différents acteurs impliqués dans la cancérisation tissulaire: les cellules cancéreuses, bien sûr, mais également le microenvironnement qui leur permet de croître et de se propager.

B) Les carcinomes.

1) Caractéristiques des cellules tumorales.

La caractérisation des altérations génétiques et épigénétiques affectant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes a permis de poser les principes fondamentaux de la biologie du cancer. À l'image de la théorie de l'évolution des espèces, le développement d'une tumeur maligne est ainsi présenté comme un processus sélectionnant les cellules ayant acquis des caractères leur conférant un avantage de croissance et se traduisant par des vagues d'expansions clonales (Merlo, Pepper, Reid, & Maley, 2006). La notion d'avantage de croissance résulte de l'acquisition de capacités des cellules tumorales à se diviser plus rapidement (Jancik, Drabek, Radzioch, & Hajdich, 2010), d'une insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération (Classon & Harlow, 2002; Liggett & Sidransky, 1998; Hollander, Blumenthal, & Dennis, 2011), d'un échappement au processus de vieillissement cellulaire (sénescence répllicative) (Y. Kong, Cui, Ramkumar, & Zhang, 2011), de la mort cellulaire programmée (apoptose) (Brady & Attardi, 2010), (Levine & Oren, 2009), et la réponse immune (Kerkar & Restifo, 2012), de la capacité à induire l'angiogenèse (Weis & Cheresh, 2011) ainsi que l'acquisition de capacités d'invasion et de dissémination à distance (formation de métastases) (Hanahan & Weinberg, 2000; Friedl & Wolf, 2003). Le phénotype cancéreux est acquis progressivement par accumulation aléatoire de nombreuses altérations génétiques conduisant tout au long de la progression tumorale à la naissance d'une tumeur primaire hétérogène constituée de cellules ayant des phénotypes différents, et ne possédant donc

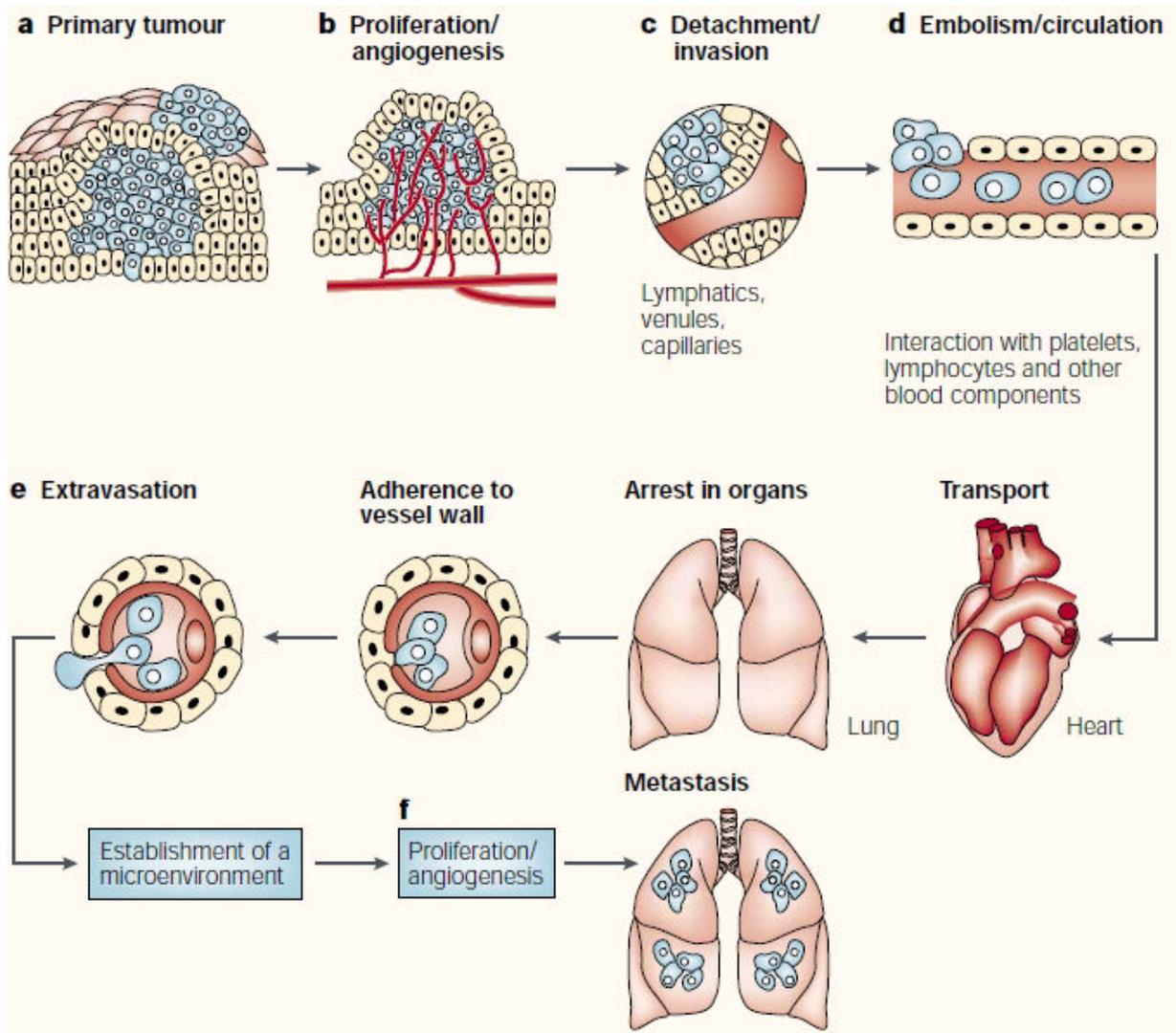


Figure 3. Les étapes dans la formation de métastases: la cascade métastatique.

La genèse d'une métastase comporte une série d'étapes qui permet à une cellule de la tumeur primaire de se déplacer, se greffer sur un autre tissu et développer une tumeur. Pour cela, les cellules ayant proliféré dans la tumeur, après vascularisation de celle-ci par un processus d'angiogenèse, dégradent la membrane basale, évadent dans le tissu conjonctif et, par un processus d'intravasation, pénètrent dans les vaisseaux sanguins pour essaimer dans l'organisme grâce à la circulation. Dans les vaisseaux sanguins, les cellules tumorales interagissent avec des cellules du système immunitaire et les plaquettes qui les protègent durant le transport (d'où le terme « embolie tumorale » lorsqu'on observe la présence d'un amas de cellules tumorales circulantes), puis elle adhèrent à la paroi vasculaire interne du vaisseau, elles en sortent par extravasation, s'adaptent au nouveau microenvironnement et en collaborant avec les cellules stromales, elles s'encrent et prolifèrent dans le nouveau tissu en générant un amas cellulaire qui entame un cycle de vascularisation. L'accomplissement de toutes ces étapes signent l'installation de la métastase. D'après (Fidler, 2003)

pas les mêmes potentiels de progression tumorale et de dissémination métastatique (Marusyk, Almendro, & Polyak, 2012). Le développement d'un cancer n'est cependant pas limité à l'accumulation d'anomalies intrinsèques aux cellules le constituant. En effet, le microenvironnement tumoral, longtemps relayé au rang d'acteur secondaire et considéré pour être seulement sous l'influence de la composante épithéliale, est aujourd'hui, reconnu pour jouer un rôle actif (Hanahan & Coussens, 2012).

2) La cascade métastatique.

Les échanges bidirectionnels entre la tumeur et son microenvironnement peuvent induire la stimulation et/ou l'activation de voies de signalisation qui contribuent à l'évolution de la tumeur (Joyce & Pollard, 2009) dont la phase la plus avancée, le processus métastatique, repose également sur une séquence d'étapes, définies comme « cascade métastatique » (Chambers, Groom, & MacDonald, 2002) (figure 3).

Dans les tumeurs d'origine épithéliale, l'épithélium est délimité par la membrane basale qui l'ancre au stroma sous-jacent et aux compartiments mésenchymateux (figure 1). La rupture de cette barrière physique, possible grâce à l'action de protéases secrétées par les cellules tumorales elles mêmes et par les cellules du stroma définit la transition d'un carcinome *in situ* vers un carcinome invasif, potentiellement métastatique, et constitue la première étape de la cascade métastatique. A ce stade, des cellules tumorales se séparent de la masse de la tumeur primaire, soit de manière isolée, soit collectivement (mécanismes abordés dans le chapitre IB3 « [invasion tumorale](#) »), et envahissent la MEC, étape indispensable à la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme. En effet, l'invasion de la MEC met les cellules tumorales en rapport direct avec le microenvironnement tumoral et notamment avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elles peuvent y pénétrer par le processus d'intravasation, puis circuler grâce aux flux sanguin et lymphatique pour se loger dans des vaisseaux irriguant des tissus très loin de celui d'origine. Après extravasation (sortie des cellules des vaisseaux), les cellules tumorales peuvent alors envahir le parenchyme d'un nouveau tissu pour former des micros métastases: certaines d'entre elles peuvent évoluer ultérieurement pour coloniser ce tissu et former des métastases dans ce que l'on appelle aujourd'hui des niches métastatiques (Pantel & Brakenhoff, 2004; Psaila & Lyden, 2009). Le franchissement de chacune de ces étapes par les cellules tumorales implique des cellules stromales (Spano & Zollo, 2012; Lorusso & Ruegg, 2008; B. Z. Qian & Pollard, 2010) (figure 3).

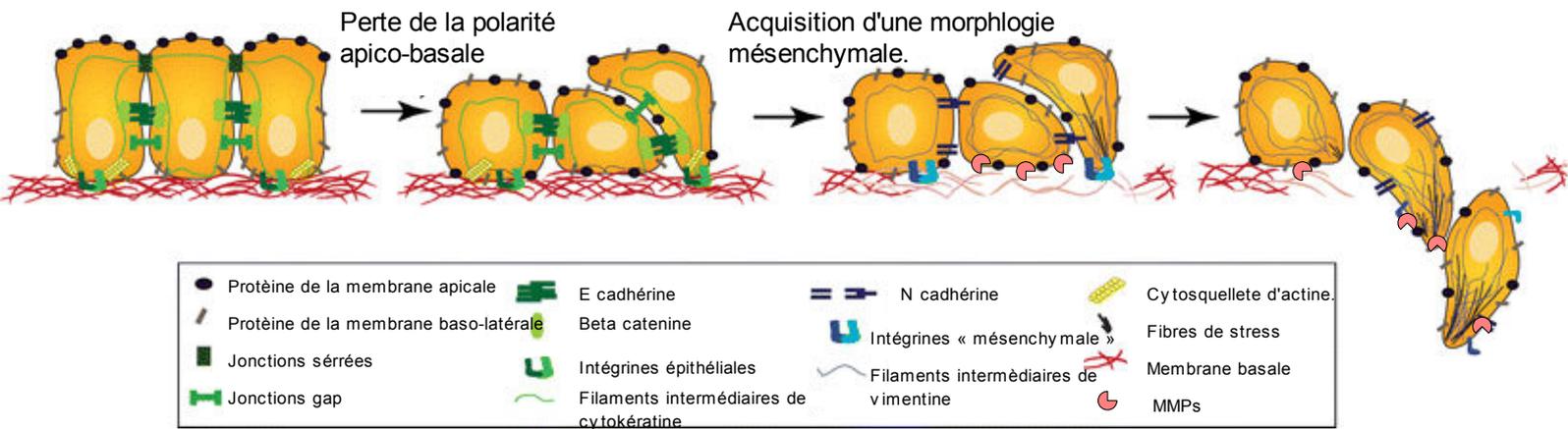


Figure 4: Transition épithélio-mésenchymateuse et invasion tumorale.

Lors de la transition épithélio-mésenchymateuse, les cellules perdent leur polarité apico-basale (Bryant & Mostov, 2008). Les jonctions serrées, en grande partie responsable du maintien de cette polarité, sont perdues ce qui entraîne la réorganisation des protéines de la membrane apicale et de celles de la membrane baso-latérale. Les jonctions adhérentes et les gaps jonctions sont désassemblés, qui se traduit, par exemple, en la perte de la cadhérine E et une délocalisation de la Beta-catenine (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014; Cavey & Lecuit, 2009). L'expression du répertoire intégriniques est modifié (Hood & Cheresch, 2002) et certaines protéases matricielles comme les MMPs (Matrix MetalloProteinase) sont surexprimées (Egeblad & Werb, 2002). Le cytosquelette d'actine s'organise en structures appelés « fibres de stress » qui s'accumulent au niveau des protrusions cellulaires (Yilmaz & Christofori, 2009). Les filaments intermédiaires de cytokeratines sont remplacés par des filaments intermédiaires de vimentine (Bragulla & Homberger, 2009; Sun et al., 1983). Alors que les cellules acquièrent une morphologie « mésenchymateuse », la membrane basale est dégradée par les MMPs, et les cellules sont alors capables d'envahir le stroma environnant de manière isolée. D'après (Micalizzi, Farabaugh, & Ford, 2010).

3) Invasion tumorale.

Dans les tumeurs d'origine épithéliale, les plus fréquentes chez l'adulte, les métastases constituent la principale cause de décès chez les patients atteints de cancer; ainsi, la compréhension des mécanismes de l'invasion du stroma peritumorale par les cellules cancéreuses revête un intérêt thérapeutique majeur. Pour s'échapper de la tumeur primaire, les cellules tumorales mettent en place plusieurs types de stratégie pour se mouvoir. Chez les tumeurs solides humaines, deux principaux types d'invasion ont été observés et décrits par les pathologistes: l'invasion isolée (notamment de manière mésenchymateuse et amoéboïde) et l'invasion collective. Lorsque les cellules migrent de manière isolée, elles peuvent adopter des morphologies différentes, qui sont décrites dans les chapitres suivants (Biname, Pawlak, Roux, & Hibner, 2010; Sahai, 2005; Yilmaz & Christofori, 2009). En effet, les cellules tumorales adaptent leur mode d'invasion en fonction des signaux extérieurs fournis par le stroma environnant, et notamment par les cellules et la MEC qui les entourent (Friedl & Wolf, 2010).

a) L'invasion mésenchymateuse

Les tissus épithéliaux sont formés de cellules épithéliales jointives, dont la couche proliférative repose sur une membrane basale. Cependant, lors de processus tel que l'embryogénèse (délimitation des cellules de la crête neurale) et la morphogénèse (formation de la ligne primitive et du mésoderme), les cellules épithéliales migrent et/ou envahissent de manière isolée. Pour cela, les principales caractéristiques épithéliales sont perdues lors de l'invasion mésenchymateuse et on parle plus communément de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Thiery & Sleeman, 2006), ce mécanisme pouvant être réutilisé par les cellules de carcinomes pour pouvoir se détacher de la tumeur primaire (Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012) (figure 4). Dans l'invasion isolée mésenchymateuse d'une cellule tumorale on peut schématiquement distinguer cinq étapes répétées cycliquement (Friedl & Wolf, 2009) qui sont représentés figure 5.

b) Invasion amoéboïde.

Les leucocytes et certaines cellules tumorales peuvent utiliser ce type de migration (Friedl, 2004; Madsen & Sahai, 2010). Les cellules amoéboïdes sont caractérisées par une morphologie ronde sans prolongements cytoplasmiques (Lammermann & Sixt, 2009;

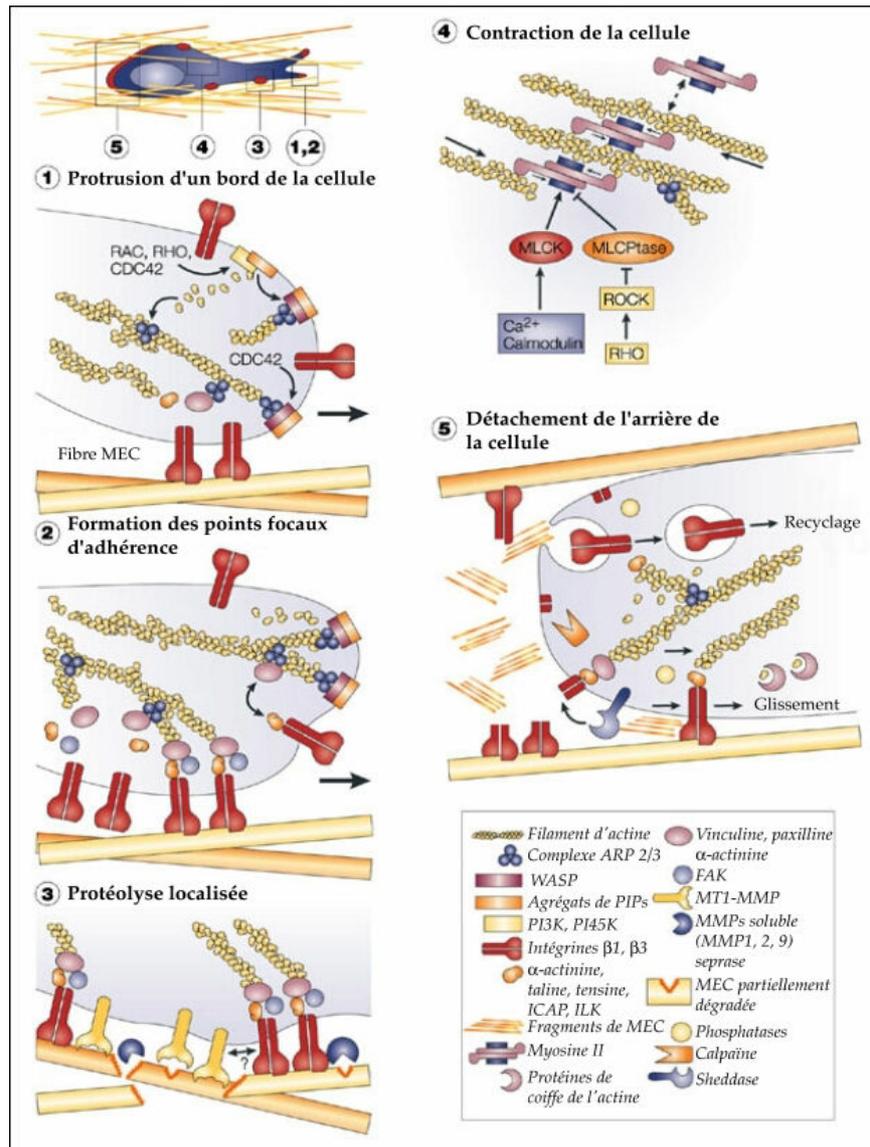


Figure 5: Les cinq étapes de l'invasion mésenchymateuse.

Etape 1: Au front d'invasion, la croissance des filaments d'actine et leur connexion à des protéines adaptatrices au niveau de la membrane cellulaire permettent la mise en place de protrusions membranaires à l'avant de la cellule. Etape 2: Les cellules interagissent avec la MEC alors que des points d'adhésions focaux se forment. Grâce à la localisation et l'activation des intégrines au niveau de la protrusion, celle-ci adhère à la MEC. L'activation des intégrines déclenche le recrutement de nombreuses protéines par leur domaine intracellulaire. Les complexes protéiques ainsi formés, appelés complexe focaux d'adhésion, permettent l'ancrage du cytosquelette de la cellule à la MEC et la transmission de signaux extérieurs vers l'intérieur de la cellule. Etape 3: Des protéases de surface, comme les MMPs, sont recrutées au front d'invasion pour frayer l'espace nécessaire au déplacement de la cellule par la dégradation de protéines de la MEC. Etape 4: Contraction du corps cellulaire par l'acto-myosine. La myosine II s'attache aux filaments d'actine (définie alors acto-myosine) et génère les forces nécessaires pour la contraction du corps cellulaire. Etape 5: Le désassemblage des sites d'adhésions à l'arrière de la cellule permet à la cellule de se déplacer vers l'avant et de recommencer un nouveau cycle de migration. Après désassemblage des adhésions focales à l'arrière de la cellule, les intégrines se détachent du substrat et sont internalisées dans la cellule via les vésicules endoplasmique pour être recyclé dans le front d'avancement de la cellule. D'après (Friedl & Wolf, 2003)

Pankova, Rosel, Novotny, & Brabek, 2010; Wolf et al., 2003). Un réseau d'actine sous-corticale se forme sous contrôle de la voie de signalisation Rho (Ras homolog)/ROCK (Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase) (Totsukawa et al., 2004) et le remodelage du cytosquelette fait des bourgeonnements membranaires dus à la contraction de l'actomyosine (Sahai & Marshall, 2003). (Un détail de la voie de signalisation Rho/ROCK et de son rôle dans la régulation de la contractilité cellulaire est présenté figure 6). Contrairement à la migration mésenchymateuse, les cellules établissent très peu d'interactions avec la MEC et se déplacent en se déformant et se faufilant entre les fibres de cette dernière. Elles établissent peu de jonctions adhérentes ou le font de façon très transitoire et peuvent donc envahir la MEC indépendamment des intégrines et de l'activité des MMPs (Matrix MetalloProteinase) (Friedl et al., 1998; Meierjohann et al., 2010; Wyckoff et al., 2006). Il semblerait que la migration amoéboïde n'ait lieu que dans certaines conditions particulières, lorsque le réseau de la MEC est relâché, ce qui ne serait pas le cas dans la plupart des tissus sains.

c) L'invasion collective.

On parle d'invasion collective lorsque deux ou plusieurs cellules se déplacent dans un environnement bi- ou tridimensionnel en préservant leurs jonctions cellulaires. Ce mode de mouvement est décrit dans différents processus, tels que le développement (mise en place de la crête neural et du mésoderme lors de la gastrulation), la morphogénèse (génération de nouveaux vaisseaux lors de la néo-angiogénèse; développement des glandes mammaires), la réparation tissulaire (cicatrisation), mais également lors de l'invasion tumorale (Lecaudey & Gilmour, 2006; Rorth, 2007; Friedl, Hegerfeldt, & Tusch, 2004) (figure 7). En effet, l'invasion collective est retrouvée sur des coupes histologiques de carcinomes mammaires, spinocellulaires, colorectaux ou encore de mélanomes: dans chaque cas des cohortes de cellules envahissent le stroma de manière collective après destruction de la membrane basale (Christiansen & Rajasekaran, 2006). Comme représenté dans la Figure 8, la cohorte de cellules tumorales envahissantes peut rester connectée à la tumeur primaire: dans ce cas on parle de « langue d'invasion » ; ou bien s'en dissocier et on parle alors de « clusters invasifs » (Friedl, Locker, Sahai, & Segall, 2012). Lors de l'invasion collective, les différentes étapes de l'invasion isolée (figure 5) vont devoir être partagées par l'ensemble de cellules que forme la cohorte invasive. Contrairement à ce qu'on observe dans l'invasion isolée, lors de l'invasion collective les

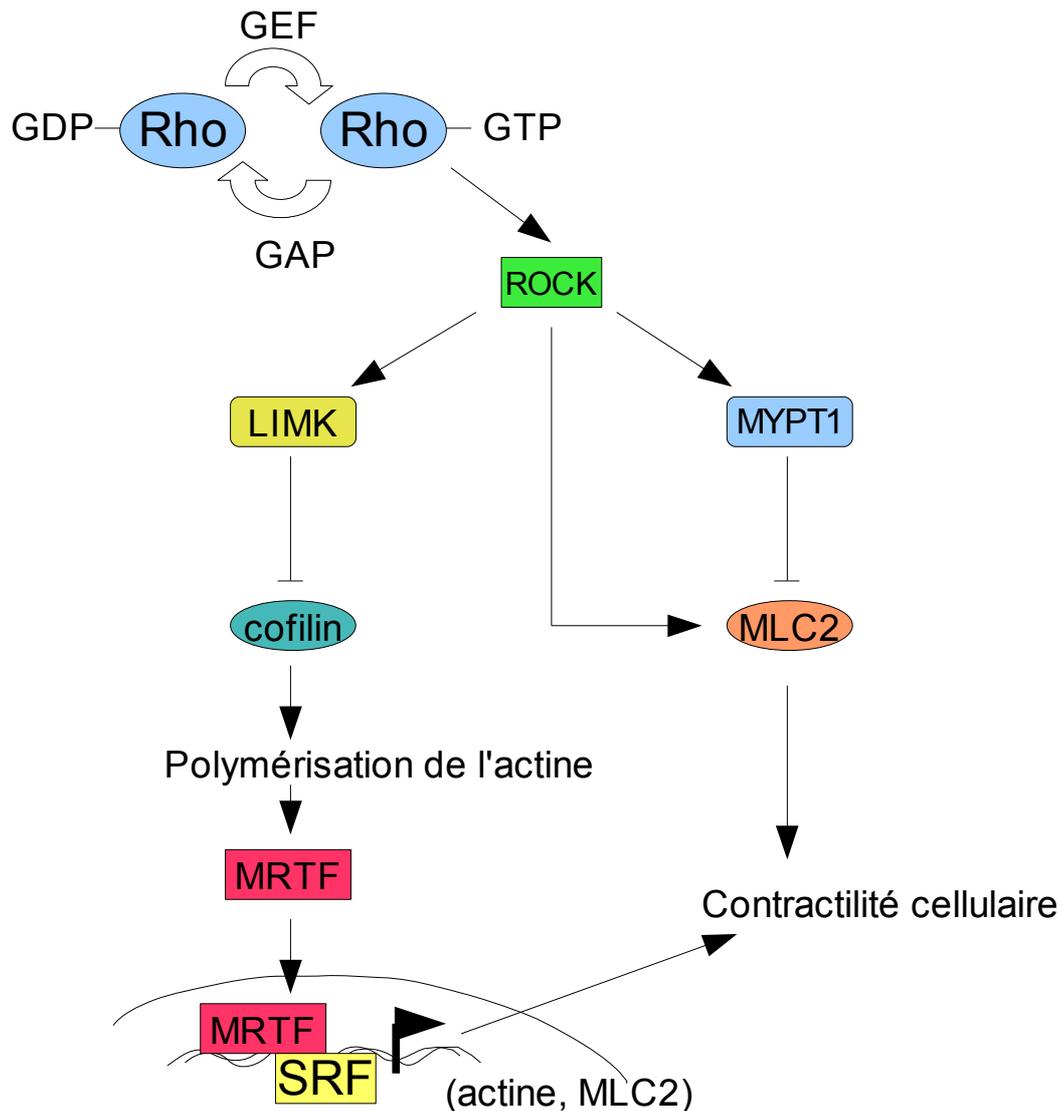


Figure 6. Voie de signalisation Rho/ROCK.

Les protéines de la famille Rho oscillent entre une forme inactive liée au GDP (Guanosine Diphosphate) et une forme active liée au GTP (Guanosine Triphosphate). L'activation est régulée par les facteurs d'échanges nucléotidiques GEF (Guanine Exchange Factor), permettant l'échange du GDP par le GTP, et les protéines GAP (GTPase Activating Protein) qui catalysent l'hydrolyse du GTP. L'activation de ROCK par Rho induit: A) La phosphorylation activatrice de la chaîne légère de la myosine2 (MLC2 pour Myosin Light Chain 2) ainsi que la phosphorylation inhibitrice de la sous-unité régulatrice MYPT1 (Myosin Phosphatase Target Subunit 1) de la phosphatase de MLC2. L'accroissement du taux de myosine phosphorylée permet ainsi une augmentation de la contractilité cellulaire grâce à une élévation de l'activité ATPase de la myosine. B) La phosphorylation activatrice de la LIMK, qui elle même permet la phosphorylation inhibitrice de la cofiline, protéine qui déstabilise les filaments d'actine. C) Le facteur de transcription MRTF (Myocardin-Related Transcription Factor) qui est normalement retenu dans le cytoplasme par son association avec l'actine globulaire rejoint alors le noyau, où, en s'associant avec le facteur de transcription SRF (Serum Reponse Factor), il régule l'expression des gènes du cytosquelette d'actine. Cette cascade de signalisation amène à une stabilisation des filaments d'actine, sur lesquels la myosine peut aller s'associer et réguler ainsi la contractilité cellulaire.

cellules de la cohorte restent physiquement et fonctionnellement connectées entre elles par les jonctions cellules-cellules qui sont préservés durant le mouvement. Cette cohésion intercellulaire est possible grâce aux protéines des jonctions adhérentes et notamment les cadhérines E et N qui, en étant connecté aux réseaux d'actine, permettent un couplage intercellulaire robuste et dynamique (Ilin & Friedl, 2009; Ewald, Brenot, Duong, Chan, & Werb, 2008; Peglion, Llense, & Etienne-Manneville, 2014; Hirata, Park, & Sahai, 2014; Theveneau et al., 2010). En effet, l'invasion collective des cellules de carcinomes nécessite également la coordination du cytosquelette d'actine de toutes les cellules de la cohorte qui se comporte ainsi comme une seule et unique unité engendrant un mouvement ordonné et coordonné des ses composantes (Rorth, 2012). Il a notamment récemment été montré qu'une forte activité contractile, régulée par le cytosquelette d'actomyosine, au niveau du cortex, et une réduction de cette activité au niveau des contacts cellule-cellule est nécessaire pour maintenir la cohésion de la cohorte cellulaire (Ewald et al., 2008).

La cohorte invasive inclut des cellules « leader » qui « guident » les cellules « suiveuses ». Ces cellules leaders, également appelées « tip cells » sont les plus dynamiques et pour guider l'ensemble de la cohorte émettent des protrusions (Friedl & Gilmour, 2009). Elles ont une morphologie plutôt mésenchymateuse; en effet, selon le contexte, la cellule leader peut être une cellule tumorale ou encore un fibroblaste. (Gaggioli et al., 2007; Gaggioli, 2008) (Ce mécanisme sera abordé chapitre IIB4 [« Rôle des FACs dans le remodelage matriciel et l'invasion tumorale »](#)). De récentes publications ont disséqué les propriétés de ces cellules « leaders » du front d'invasion: elles seraient caractérisées par l'expression d'une protéine transmembranaire, la podoplanine (Wicki et al., 2006; Nakashima et al., 2013), ou encore par l'expression de la cytokératine 14 (K14) et de p63 (tumor protein p63) (Cheung, Gabrielson, Werb, & Ewald, 2013). De même, la régulation du cytosquelette d'actine par les kinases LIMK1/2 (LIM domain Kinase 1/2) dans les cellules leaders est nécessaire à la création de chemins d'invasion que les cellules suiveuses peuvent emprunter pour envahir une matrice en 3 dimensions (Scott et al., 2010; Crighton & Olson, 2011).

Lors de l'invasion collective, des modifications majeures de la matrice extracellulaire sont observées. En effet, en opposition au mouvement isolé des cellules tumorales, l'ensemble de la cohorte doit générer de l'espace afin de pouvoir se déplacer. Ceci est rendu possible par l'expression de métalloprotéinases, les MMPs, avec notamment un rôle important de MT1-MMP (Membrane-Type 1 Matrix MetalloProteinase), localisées au niveau du front d'invasion (Friedl & Wolf, 2008; Sabeh et al., 2004; Wolf et al., 2007), et des cathepsines B

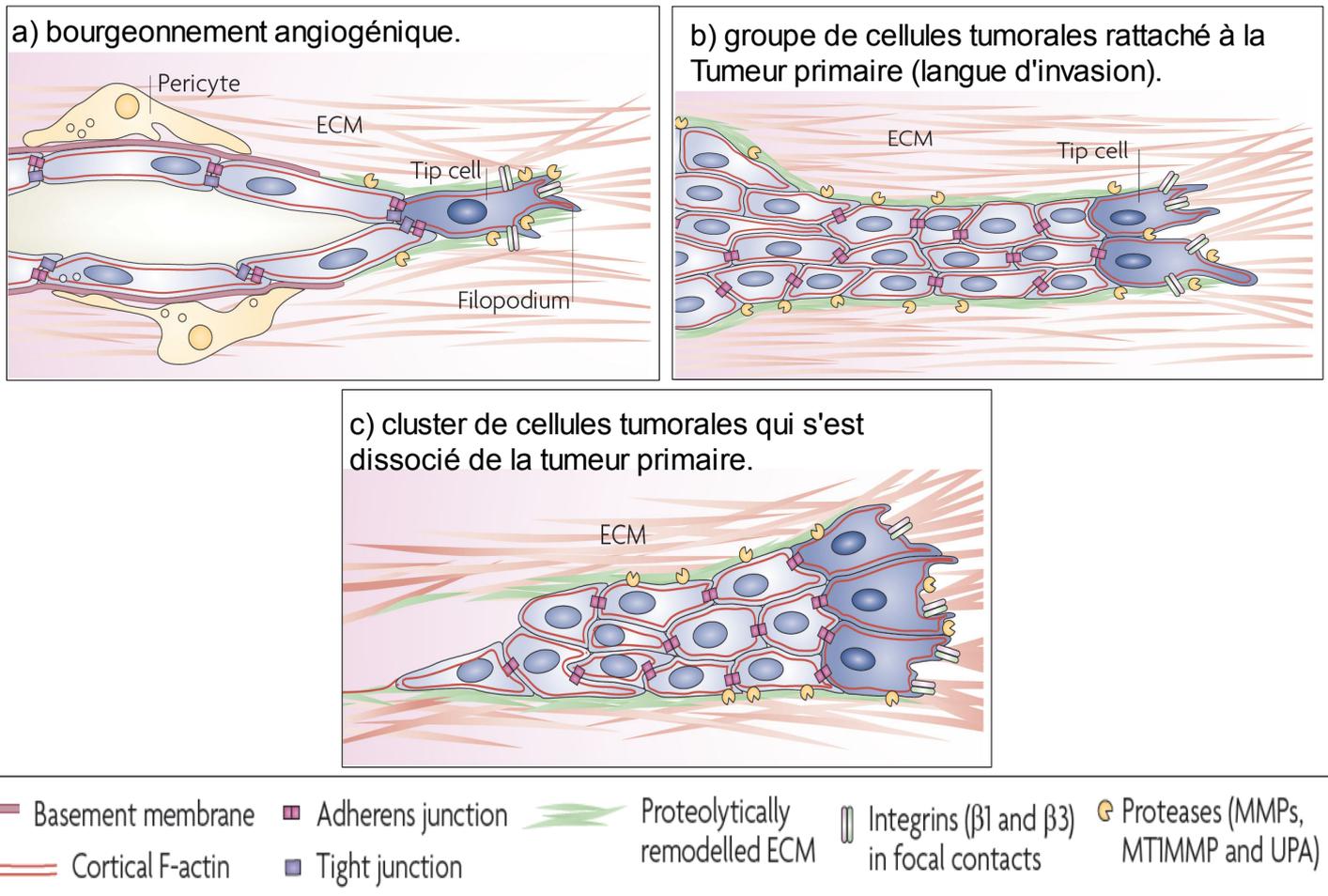


Figure 7. *L'invasion collective.*

-a) Bourgeonnement angiogénique lors de la formation ou la réparation de nouveaux vaisseaux sanguins. Une cellule leader, ou 'tip cell,' caractérisée par la présence de protrusions riches en actine (filopodes) guide la migration collective des cellules endothéliales. Une membrane basale déposée par ces dernières avec l'aide des pericytes sert de support et de guide pour les cellules qui suivent la leader.

-b) Invasion collective d'une cohorte de cellules tumorales peu différenciées, toujours attachées à la tumeur primaire, et envahissant le stroma péri-tumoral après destruction de la membrane basale.

-c) Invasion collective d'un amas (cluster) de cellules tumorales après dissociation de la tumeur primaire. Les cellules de la cohorte interagissent physiquement et fonctionnellement grâce aux protéines des jonctions adhérentes (adherent junctions) qui étant connectées aux réseaux d'actine (cortical F-actin) assurent un couplage robuste et dynamique entre les cellules. Au front d'invasion, les cellules « leaders » guident la cohorte en émettant des protrusions et en localisant des protéases tels que MT1-MMP pour guider l'ensemble du groupe. On observe également la déposition et l'assemblage d'une nouvelle matrice extracellulaire remanié par protéolyse (proteolytically remodelled ECM). D'après (Friedl & Gilmour, 2009)

(Bengsch et al., 2013). On assiste également à la déposition d'une nouvelle enveloppe matricielle par l'ensemble de la cohorte invasive en coopération avec les cellules du stroma, et notamment les fibroblastes. L'utilité de cette enveloppe est encore mal appréciée, mais on peut penser qu'elle permet aux cellules de garder la cohésion et la polarité nécessaire au mouvement collectif, et de guider la migration. Cette enveloppe servirait en effet d'«attache » aux cellules suiveuses. De plus, l'assemblage et la sécrétion de MEC, et plus particulièrement de fibronectine au sein même du groupe de cellules est impliqué dans la cohésion de la cohorte invasive de cellules de glioblastomes *in vitro* (Serres et al., 2014). L'invasion collective est également régulée par des mécanismes d'attraction cellulaire appelés chimiotactisme (Kay, Langridge, Traynor, & Hoeller, 2008). Un rôle important du gradient de la chemokine CXCL12 ((C-X-C) chemokine Ligand 12) est ainsi décrit *in vivo* lors de l'invasion collective des cellules du primordium de la ligne latérale lors de l'embryogénèse chez le poisson zèbre (Dona et al., 2013) et lors de la migration collective des cellules de la crête neurale lors de l'embryogénèse chez le xénope (Theveneau et al., 2010).

d) Plasticité de l'invasion tumorale.

Lors de l'invasion tumorale, les cellules cancéreuses peuvent s'adapter à leur environnement et mettre en place différentes stratégies pour pouvoir envahir la MEC de manière efficace. Ces mécanismes de plasticité cellulaire sont décrits dans la Figure 9.

C) La matrice extracellulaire.

La MEC est un assemblage de macromolécules de nature protéique et glucidique qui lient entre elles des cellules homologues ou hétérologues et les organisent en tissus. Les organismes unicellulaires n'ont pas de matrice extracellulaire. La MEC entoure les cellules qui la synthétisent et en retour contribue à en déterminer le phénotype en leur fournissant non seulement un support physique, mais également les signaux biochimiques et biomécaniques nécessaire à la morphogénèse, la différenciation cellulaire et l'homéostasie tissulaire (Frantz et al., 2010) (figure 10). Les macromolécules de la matrice extracellulaire sont regroupées en quatre catégories:

- les collagènes: famille de 27 membres distincts, regroupés en deux grande sous-famille: les collagènes fibrillaires et les collagènes non fibrillaires (Myllyharju & Kivirikko, 2004).

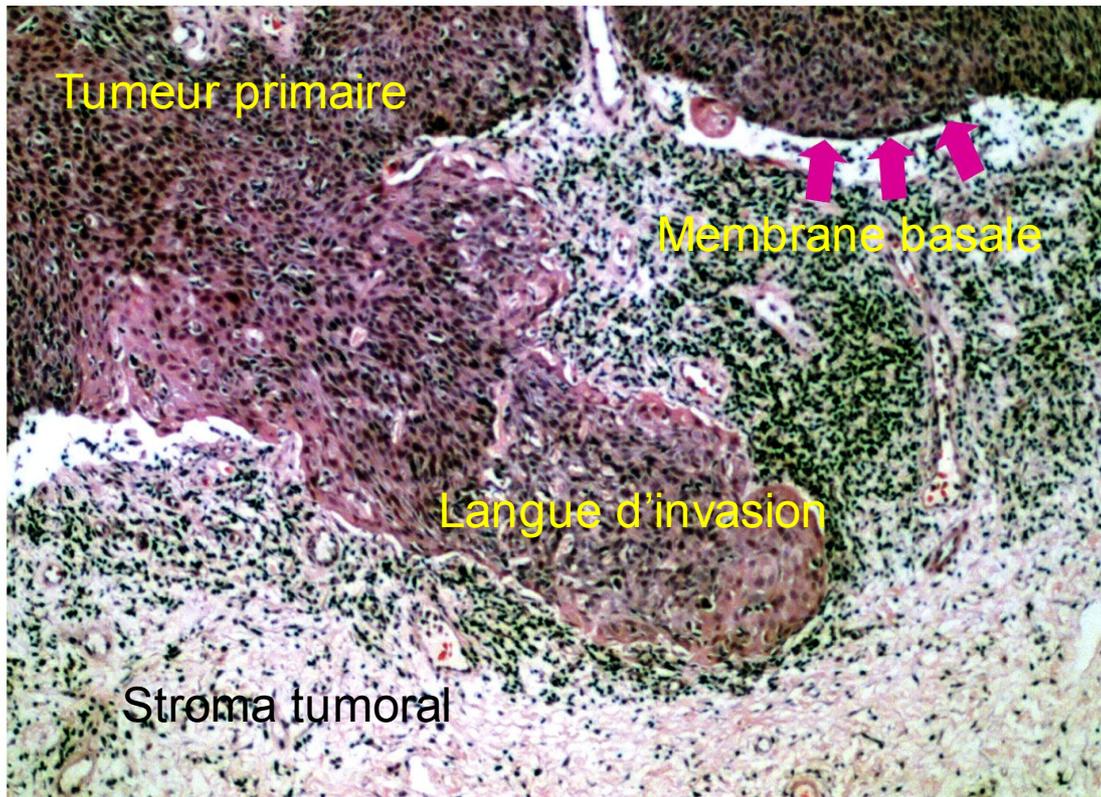


Figure 8: Invasion collective de cellules de carcinomes dans le stroma tumorale.

Des cellules de carcinomes spinocellulaires du col de l'utérus envahissent collectivement le stroma sous-jacent. La cohorte composée de plusieurs centaines de cellules encore attachées à la tumeur primaire est appelée « langue d'invasion ».

- les protéoglycanes: chaînes protéiques sur lesquelles sont liées une à plusieurs dizaines de chaînes glycosaminoglycanes, comme l'héparan sulfate (Iozzo, 1998), (Parish, 2006), (Schaefer & Schaefer, 2010).
- l'élastine: composant majeur des fibres élastiques; elle est associée à des microfibrilles composées de glycoprotéines de structure comme les fibrillines (Kielty, Sherratt, & Shuttleworth, 2002).
- les glycoprotéines de structure: protéines sur lesquelles sont greffées de courtes chaînes glucidiques (Chothia & Jones, 1997). Certaines sont ubiquitaires comme la fibronectine, d'autres, comme les laminines des membranes basales, présentent des localisations plus spécifiques.

La MEC constitue non seulement une charpente dans laquelle sont intégrées les cellules, mais elle permet aussi des interactions très étroites cellules-matrices qui se font par l'intermédiaire de récepteurs spécialisés (récepteurs d'adhérence), et qui rendent possibles les communications entre les cellules et leur environnement. Parmi ces récepteurs, on compte les intégrines, les DDR (Discoidin Domain Receptor), et les syndecans (Harburger & Calderwood, 2009; Leitinger & Hohenester, 2007; Xian, Gopal, & Couchman, 2010). Les intégrines, qui sont des hétérodimères transmembranaires, composés d'une sous unité alpha et d'une sous unité beta, sont activées lorsque leur domaine extracellulaire s'associe à des composants de la MEC (Humphries, Byron, & Humphries, 2006). En réponse à cette activation, de nombreuses protéines sont recrutées au niveau de leur domaine intracellulaire. Les complexes protéiques ainsi formés, les complexes focaux d'adhésion, permettent d'une part l'ancrage du cytosquelette de la cellule à la MEC, et d'autre part, la transmission bidirectionnelle de signaux entre la cellule et son environnement (signalisation contrôlant la migration, la survie, la prolifération et la différenciation) (Harburger & Calderwood, 2009; Ridley et al., 2003). Grâce à ces structures d'adhérence dynamiques, la MEC joue le rôle de support physique et mécanique sur lequel et à travers duquel les cellules peuvent se déplacer (Schmidt & Friedl, 2010; Ridley et al., 2003). La MEC est aussi une structure dynamique, constamment remodelée par des systèmes enzymatiques et non enzymatiques, et ses composants moléculaires subissent un très grand nombre de modifications post-traductionnelles. La rupture de cet équilibre conduit à des pathologies résultantes soit de l'accumulation de matrice, comme dans le cas des fibroses, soit de sa destruction, comme dans l'arthrose ou l'emphysème pulmonaire. La MEC est essentiellement produite,

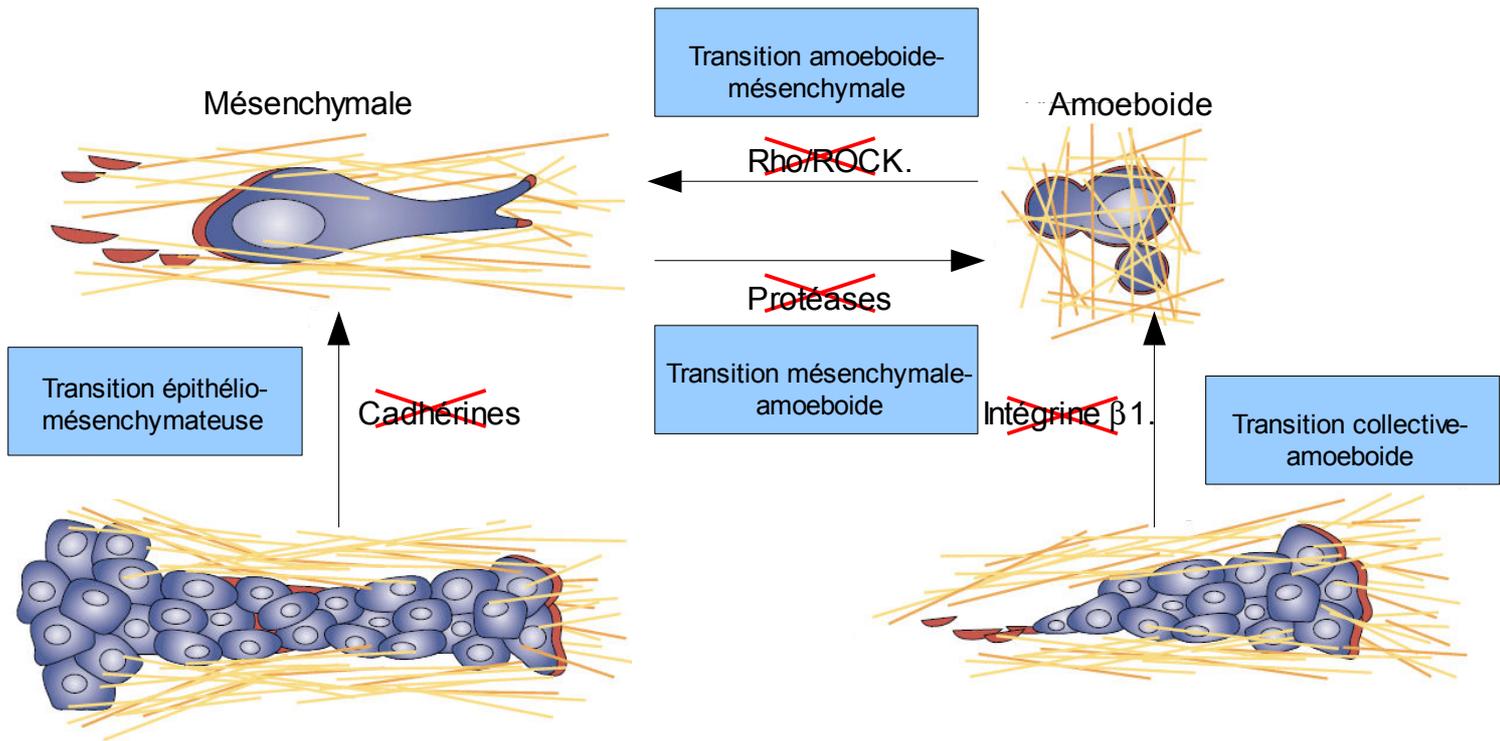


Figure 9: Mécanismes de plasticité cellulaire lors de l'invasion tumorale.

Lors de l'invasion tumorale, les cellules cancéreuses peuvent s'adapter à leur environnement et mettre en place différentes stratégies leur permettant d'envahir la MEC de manière efficace. Les clusters de cellules invasives peuvent ainsi perdre leur cohésions (par exemple par inhibition de la E cadhérine), ou se détacher les unes des autres et utiliser un répertoire intégrinique et protéolytique particulier pour développer un mode d'invasion mésenchymateuse (transition épithélio-mésenchymateuse) (Kalluri & Weinberg, 2009). Quand les protéases matricielles, comme les MMPs, les sérines protéases ou encore les cathepsines sont bloqués, ces cellules tumorales peuvent s'adapter et opter pour un mode d'invasion amoéboïde (transition mesenchymal-amoeboïde) (Carragher et al., 2006; Friedl & Wolf, 2003; Pankova, Rosel, Novotny, & Brabek, 2010; Wolf et al., 2003). Ce mode d'invasion peut également être mis en place par une cohorte de cellules invasives après inhibition de l'adhésion par un anticorps bloquant l'intégrine beta-1 (transition collective-amoeboïde) (Hegerfeldt, Tusch, Brocker, & Friedl, 2002). L'inhibition de la voie de signalisation Rho/ROCK (qui contrôle la formation de blebs chez la cellule amoéboïde) entraîne une transition amoeboïde-mésenchymale (Friedl & Wolf, 2010). L'utilisation d'antagonistes des intégrines et des cadhérines, d'inhibiteurs des protéases et de la kinase ROCK pour contrer l'invasion des cellules tumorales est responsable de ces changements lors d'études menées *in vitro* et *in vivo*. Ces transitions permettent aux cellules tumorales de se déplacer efficacement dans les différents environnements rencontrés lors de la progression tumorale. D'après (Friedl & Wolf, 2003)

sécrétée et assemblée par les fibroblastes dans des situations à la fois physiologiques ou pathologiques (Eckes, Kessler, Aumailley, & Krieg, 1999).

La MEC du microenvironnement tumoral fournit non seulement un support physique aux cellules qui la composent, mais elle joue également un rôle actif et dynamique dans l'évolution et la progression de la maladie (Hood & Cheresh, 2002). Lors de la progression tumorale, on observe des changements profonds dans le répertoire, la production et l'assemblage des molécules de la MEC sécrétés et agencés par les différentes populations cellulaires du microenvironnement tumoral (Jinka, Kapoor, Sistla, Raj, & Pande, 2012). En parallèle, se produisent des changements d'expression dans le répertoire des récepteurs cellulaires d'adhérence et des protéases utilisées par les cellules tumorales et stromales. Les modifications des capacités protéolytiques et d'adhésion des cellules cancéreuses tout au long de la progression tumorale influent directement sur les propriétés de migration et d'invasion de ces dernières. D'autre part, les tumeurs sont plus rigides que les tissus sains qui l'entourent principalement à cause d'un dépôt et à un remodelage accru de la MEC par les FACs qui contribuent à l'invasion des cellules tumorales (Weigelt & Bissell, 2008) (Le rôle des FACs et du remodelage matricielle lors de la carcinogénèse sera plus amplement détaillé dans la partie IIB4 [« le rôle des FACs dans le remodelage matriciel et l'invasion tumorale »](#)). Le dépôt excessif et le remodelage de la MEC par les fibroblastes sont également responsables de fibroses pouvant favoriser le développement de cancers. La fibrose tumorale étant intimement liée aux caractères prolifératifs et invasif des cellules tumorales (Samuel et al., 2011; Lu, Weaver, & Werb, 2012; Cox & Erler, 2011). Les fibres de collagènes et d'élastines sont organisés, réorientés et assemblés par les enzymes LOX (Lysil OXydase) (LOX) et les transglutaminases présentes dans le microenvironnement tumoral, ce qui entraîne une augmentation de la largeur et de la rigidité de ces fibres (Butcher, Alliston, & Weaver, 2009; Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005). Les MMPs et cathepsines, qui dégradent la MEC, sont sécrétés et activés par les différents types cellulaires de la tumeur: les cellules tumorales elles mêmes mais également les FACs et les macrophages associés aux tumeurs (MATs). Ces protéases participent aussi activement au relargage de chimiokines, facteurs de croissance (IGF (Insulin Growth factor), TGF β (Transforming Growth Factor Beta), FGF (Fibroblast Growth Factor)) et facteurs angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui favorisent la progression tumorale (Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010; Egeblad & Werb, 2002; Lerner et al., 2011; Edovitsky et al., 2004; Gocheva et al., 2006; Gocheva et al., 2010).

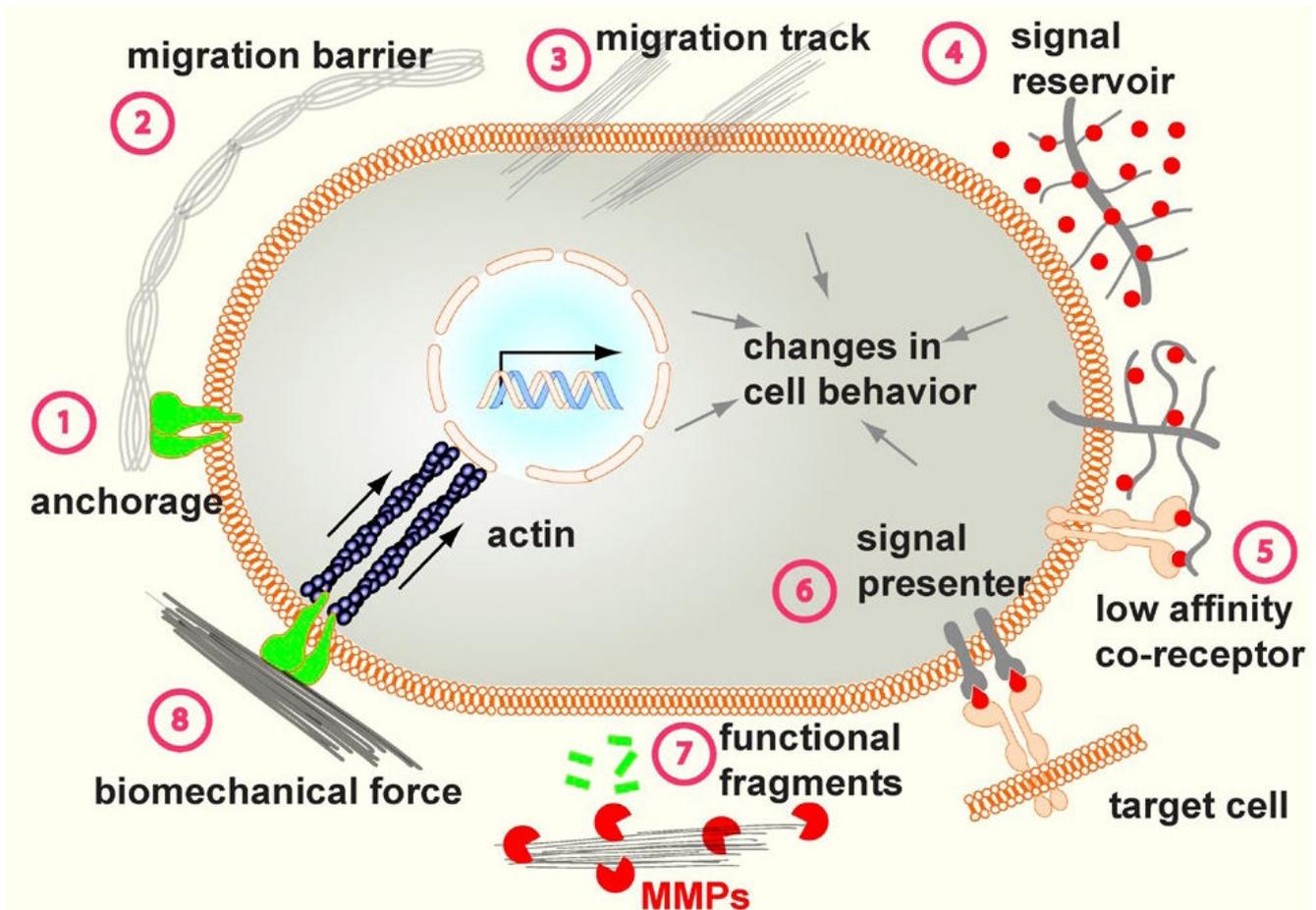


Figure 10. La matrice extracellulaire: fonction.

Les multiples fonctions exercées par la MEC, et illustrées dans cette figure, dépendent de ses diverses propriétés physiques, biochimiques et biomécanique. (-1) L'ancrage des cellules à la matrice par les intégrines permet la transmission bidirectionnelle des signaux entre l'environnement de la cellule et le cytoplasme et le noyau. Par exemple l'ancrage de la cellule aux membranes basales est essentiel dans divers processus biologiques tel que la division asymétrique chez les cellules souches ou le maintien de la polarité tissulaire. (-2, -3) Selon le contexte et le remodelage de la MEC par les cellules, celle-ci peut bloquer ou au contraire faciliter la migration cellulaire. (-4) La MEC est également une importante source de facteurs de croissance; et en accrochant ces molécules, elle peut empêcher leur diffusion et créer des gradients de concentration. (-5) Certains éléments de la MEC, comme les proteoglycanes et le récepteur de l'acide hyaluronique CD44, peuvent interagir avec différents facteurs de croissance retrouvés dans la MEC et jouer un rôle de corécepteur. (-6) Cette interaction peut également permettre de transmettre le signal à une cellule voisine. (-7) La dégradation de la MEC par des protéases comme les MMPs permet également le relargage et l'activation protéolytique de facteurs de croissance, cytokines ou chemokines. (-8) Finalement, les cellules sont sensibles aux propriétés biomécaniques de la MEC, comme un gain de rigidité, ce qui entraîne une gamme de réponses biologiques diverses (mécanotransduction). D'après (Lu, Weaver, & Werb, 2012)

Au vu de tous ces éléments, il apparaît évident que le microenvironnement normal et tumoral influence le comportement des cellules épithéliales, que ce soit dans un contexte physiologique ou physiopathologique (Werb et al., 1996; Mueller & Fusenig, 2004). Ainsi au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'influence des fibroblastes associés aux carcinomes lors de la progression tumorale et plus particulièrement aux rôles que ces cellules jouent lors du remodelage matriciel pro-invasif. Le but de ma thèse était de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent l'activation et le maintien des fibroblastes normaux en fibroblastes pro-invasifs *in vitro* et *in vivo*.

III] Fibroblastes et carcinogénèse.

A) rôle physiologique des fibroblastes

1) Les fibroblastes, généralités.

Les fibroblastes constituent le type cellulaire le plus abondant du tissu conjonctif. Ces grandes cellules (100µm) fusiformes ou étoilées possèdent de longs prolongements cytoplasmiques. Ils proviennent d'une cellule-souche mésenchymateuse multipotente qui est également à l'origine des adipoblastes, des chondroblastes, des ostéoblastes et des myoblastes (Baum & Duffy, 2011). En microscopie optique, leur cytoplasme est peu visible et seul leur noyau, ovoïdale, allongé, avec un ou deux nucléoles, est bien visible. En microscopie électronique, on y décèle tous les organites cellulaires canoniques et surtout, dans les fibroblastes en pleine activité proliférative comme dans les tissus en cours de cicatrisation, les organites impliqués dans la synthèse des protéines (réticulum endoplasmique granuleux abondant, un appareil de Golgi développé, des ribosomes libres ou en amas nombreux). La morphologie et le phénotype des fibroblastes est modulable, comme on l'observe lors de leur activation en myofibroblaste dans les tissus soit en cours de cicatrisation ou fibrotiques (Kalluri & Zeisberg, 2006). Les fibroblastes sont habituellement identifiés sur la base de caractères non spécifiques tel que leur morphologie, la présence d'un cytosquelette riche en actine et de filaments intermédiaires de vimentine, ou encore la synthèse de protéines de la MEC. L'expression de la vimentine et de la protéine FSP1 (Fibroblast-Specific Protein 1) est utilisée pour identifier les fibroblastes, mais, en l'absence de critères spécifiques permettant de bien différencier ces

cellules d'origine très hétérogène, il est actuellement impossible d'établir une classification précise. La peau étant un système modèle intéressant pour l'étude des interactions entre l'épithélium et son microenvironnement, c'est en utilisant ce modèle que je vais décrire le rôle des fibroblastes dans les conditions physiologiques, notamment son rôle dans l'homéostasie tissulaire et lors de la cicatrisation.

2) Fibroblastes et homéostasie tissulaire.

Les fibroblastes constituent la population cellulaire la plus abondante du derme. Ils sont plus nombreux et métaboliquement plus actifs dans le derme papillaire que dans le derme réticulaire. Leur fonction principale est de produire ou de dégrader, et donc d'organiser, les composants de la MEC avec laquelle, ils interagissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de type intégrinique (Tarin & Croft, 1969) afin de maintenir l'homéostasie du tissu. Les fibroblastes normaux, peu prolifératifs, sécrètent et assemblent les majeurs constituants de la MEC du derme: des collagènes (notamment les type I, III et V), de la fibronectine, de l'élastine, de la fibrilline, des glycoprotéines de structure, des protéoglycannes, (Bremnes et al., 2011; Tomasek, Gabbiani, Hinz, Chaponnier, & Brown, 2002; Rodemann & Muller, 1991), des facteurs de croissance, des cytokines (Wiseman & Werb, 2002) et des enzymes, dont les MMPs, mais aussi des inhibiteurs de protéases matricielles ce qui leur permet de dégrader la MEC, la renouveler et la réorganiser (H. Y. Chang et al., 2002; Simian et al., 2001). Les fibroblastes sont sensibles à leur environnement et aux messages qu'ils reçoivent de celui-ci. Par exemple, dans la peau humaine, les fibroblastes du derme en collaboration avec les kératinocytes basaux produisent et assemblent du collagène et des laminines qui se localisent dans la membrane basale de la jonction dermo-épidermique (H. Y. Chang et al., 2002; Paulsson, 1992; Contard et al., 1993) (figure 1).

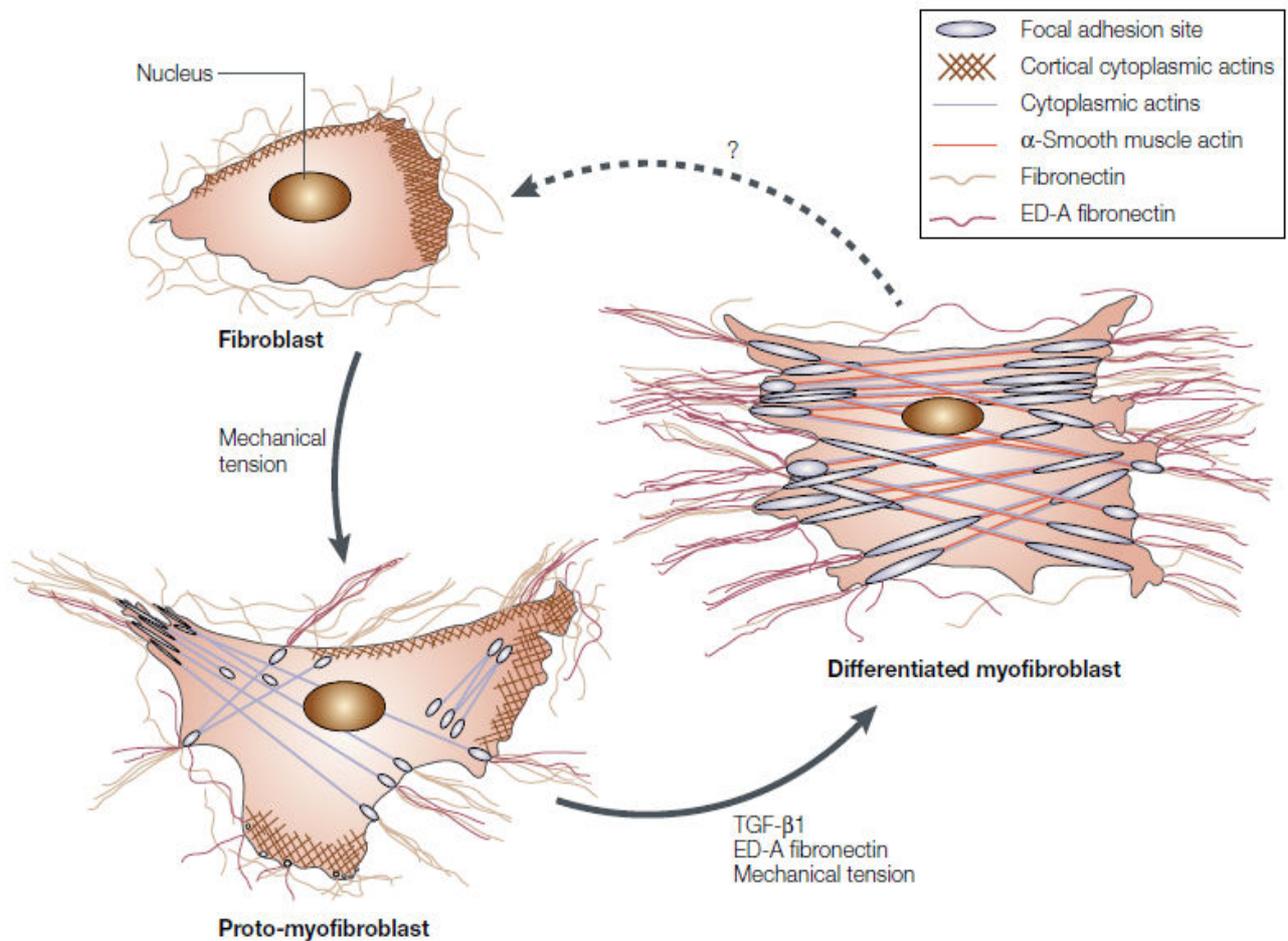


Figure 11. Différenciation des myofibroblastes.

Soumis à un stress mécanique, les fibroblastes se différencient en protomyofibroblastes et on assiste alors à la formation de fibres de stress qui, via les points focaux d'adhésion, commencent à exercer des forces de tension sur la MEC. Les protomyofibroblastes expriment et organisent le collagène et l' ED-A (Extra domain A) fibronectine cellulaire à leur surface. Ces cellules peuvent en effet générer une force contractile, mais un environnement riche en TGF β , en ED-A fibronectine et en présence d'un stress mécanique élevé, elles se différencient en myofibroblastes et peuvent alors générer une force contractile beaucoup plus élevée. Les myofibroblastes expriment des fibres de stress riches en alpha-actine de muscle lisse (α -SMA) et développent de larges complexes d'adhésion focaux. La séquence d'événements qui mènent à la disparition des myofibroblastes est encore mal expliquée: selon une des théories acceptées, l'apoptose des cellules myofibroblastiques pourrait l'expliquer. De même, il n'est à ce jour toujours pas prouvé que les myofibroblastes sont capables de se différencier en fibroblastes normaux. D'après (Tomasek, Gabbiani, Hinz, Chaponnier, & Brown, 2002)

3) Fibroblastes et cicatrisation.

La réparation tissulaire est un événement complexe qui nécessite la coordination souvent simultanée, d'un ensemble de processus biologiques dont l'activation dépend en grande partie de la gravité des plaies. Dans le cas des plaies profondes, on distingue différentes phases de cicatrisation : une réponse précoce, une phase inflammatoire, une phase de prolifération, migration et contraction et la phase de résolution. Une plaie peut présenter des zones engagées des différentes phases du processus, la progression de la réparation cutanée se faisant à partir des berges de la blessure (Shaw & Martin, 2009).

a) Les myofibroblastes, généralités

En 1971, dans des tissus en cours de cicatrisation, fut observée la présence de cellules à propriétés contractiles (Desmouliere, 1995), nommées « myofibroblastes » de par leur nature fibroblastique et la présence d'un important réseau de micro filaments composés d'alpha-actine de muscle lisse (α -SMA; α -Smooth Muscle Actin) (Gabbiani, 2003) (figure 11). Ces myofibroblastes, ou « fibroblastes activés », sont retrouvés dans les tissus en régénération ou intéressés par des pathologies comportant une inflammation ou un remodelage tissulaire accru (Desmouliere, Guyot, & Gabbiani, 2004). Ils sont particulièrement abondants dans les fibroses, où ils synthétisent et organisent une quantité excessive de MEC, et dans le stroma des carcinomes (Schafer & Werner, 2008). Au cours de la cicatrisation, le tissu de granulation est riche en myofibroblastes qui participent à la réparation tissulaire en réorganisant la matrice. Pour cela ils synthétisent les principaux composants de la MEC, sécrètent des protéases nécessaires à sa dégradation, et génèrent des forces contractiles. La coordination de ces différents mécanismes permet le remodelage matriciel nécessaire à la réduction de la taille de la plaie, ce qui permet la ré-épithélisation du tissu connectif régénéré (figure 12) (Hinz, 2007; Tomasek et al., 2002). L'activation pathologique des fibroblastes en myofibroblastes peut également entraîner une fibrose, qui augmente le risque de développement de cancer (Desmouliere et al., 2004; Radisky, Kenny, & Bissell, 2007).

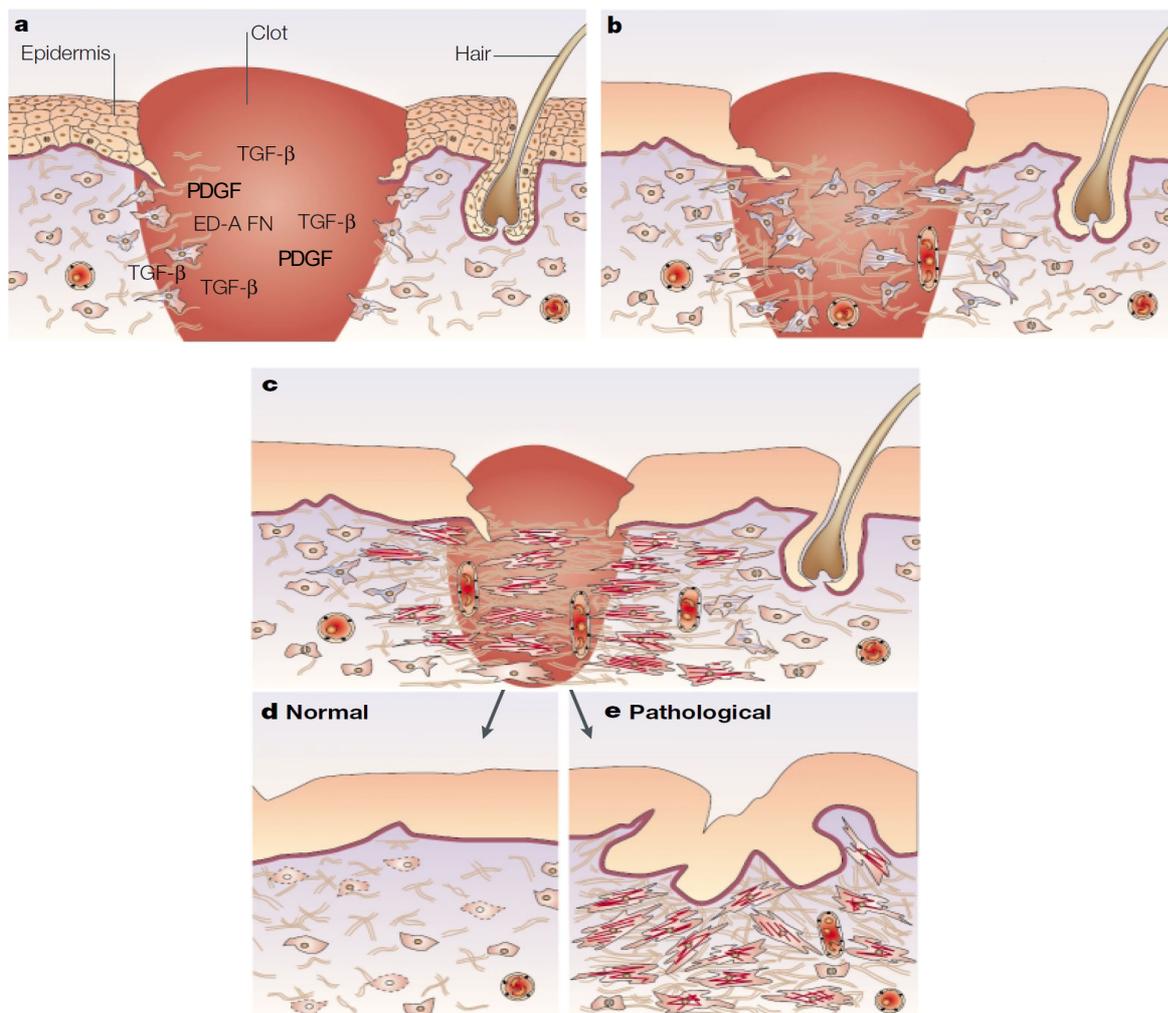


Figure 12: Rôle des fibroblastes lors de la cicatrisation.

- a) Lorsque le derme est endommagé, la blessure est comblée par la fibrine. Les fibroblastes et les cellules endothéliales des vaisseaux adjacents à la plaie sont stimulés par les facteurs de croissance, et notamment le PDGF, relâchés au moment de la coagulation sanguine. Une fois activés elles migrent vers la plaie et colonisent la matrice de fibrine formant ainsi le tissu de granulation, - b) Au cours de leur migration, les fibroblastes exercent des forces de traction sur le collagène, ce qui conduit à sa réorganisation. Ce stress mécanique, en parallèle avec la synthèse de fibronectine ED-A (ED-A FN), stimule la différenciation des fibroblastes. Ces derniers acquièrent alors le phénotype de protomyofibroblaste qui se caractérise par l'apparition de fibres de stress et une augmentation de la synthèse du collagène et de ED-A fibronectine. Les forces de tension et des facteurs de croissance comme le PDGF et le TGF β abondants dans cet environnement favorisent la synthèse de la ED-A FN par les protomyofibroblastes. - c) L'addition de forces de tensions supplémentaires, la présence de TGF β et de ED-A FN permettent l'activation complète des fibroblastes en myofibroblastes, riches en l'isoforme alpha actine de muscle lisse (α -SMA) et donc capables d'exercer une importante force contractile sur la matrice. Les myofibroblastes synthétisent également différents éléments matriciels et les protéinases nécessaires au remodelage. - d) À la fin du processus de cicatrisation, les myofibroblastes disparaissent progressivement, vraisemblablement par apoptose. - e) En situation pathologique, comme au cours des cicatrisations hypertrophiques, les myofibroblastes persistent et continuent de synthétiser et d'assembler activement de la MEC. D'après (Tomasek et al., 2002)

b) Les myofibroblastes participent à la fermeture de la blessure.

La synthèse d'une nouvelle matrice cicatricielle est assurée par le recrutement et l'activation progressive des fibroblastes en proto-myofibroblastes puis en myofibroblastes. (figure 11). Les myofibroblastes dérivent essentiellement de la différenciation de fibroblastes migrants de la zone périphérique de la plaie (Hinz et al., 2007), bien que d'autres types cellulaires pourraient en être à l'origine, comme les péricytes, les cellules musculaires lisses vasculaires, ou des progéniteurs de la moelle osseuse (Rajkumar et al., 2005; Abe, Donnelly, Peng, Bucala, & Metz, 2001). Le recrutement des fibroblastes est régulé par un ensemble de facteurs. Il est communément admis que le bFGF (basic Fibroblasts Growth Factor), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) permettent le recrutement des fibroblastes par induction de la migration et la prolifération de ces cellules en provenance des berges de la plaie (Rajkumar et al., 2006; Steed, 1997). Leur différenciation en proto-myofibroblastes puis en myofibroblastes est induite par un enrichissement de l'environnement en TGF β , la présence de l'isoforme Extra domain A de la fibronectine (EDA-Fn: Extra Domain A Fibronectin) et de tensions mécaniques dans le tissu (Desmouliere, Chaponnier, & Gabbiani, 2005; Hinz, Dugina, Ballestrem, Wehrle-Haller, & Chaponnier, 2003; Tomasek et al., 2002). Le TGF β induit l'expression de α -SMA qui, via les points focaux d'adhérences, exerce une force contractile sur la MEC et permet ainsi la contraction du tissu, le rapprochement des extrémités de la plaie, diminuant ainsi la taille de la lésion et favorisant sa ré-épithélialisation (Martin, 1997), (Germain, Jean, Auger, & Garrel, 1994; Hinz, 2007) (figure 12) (Pour une description de la voie de signalisation TGF β /SMAD (Mother against decapentaplegic homolog) et de ses effets pro-fibrotique, se référer à la figure 13). Les myofibroblastes sont en effet morphologiquement reconnaissable par la présence du réseau de fibres de stress riches en α -SMA. Celles-ci sont reliées à la matrice par de larges complexes d'adhésion que l'on appelle des points d'adhésion focaux (Parsons, Horwitz, & Schwartz, 2010; Grinnell, 2008). Ces complexes relient les récepteurs intégriniques de la cellule au cytosquelette d'acto-myosine (riche en isoforme α -SMA), permettant à la cellule de réagir aux stimuli extérieurs et d'exercer, en retour, une importante force de contraction sur la matrice (Parsons et al., 2010) (figure 11). Les myofibroblastes synthétisent des nouveaux constituants de la MEC: au départ, cette synthèse de protéines matricielles est très riche en EDA-Fn, et en acide hyaluronique, ce qui favorise le déplacement des cellules. Plus tardivement, les myofibroblastes

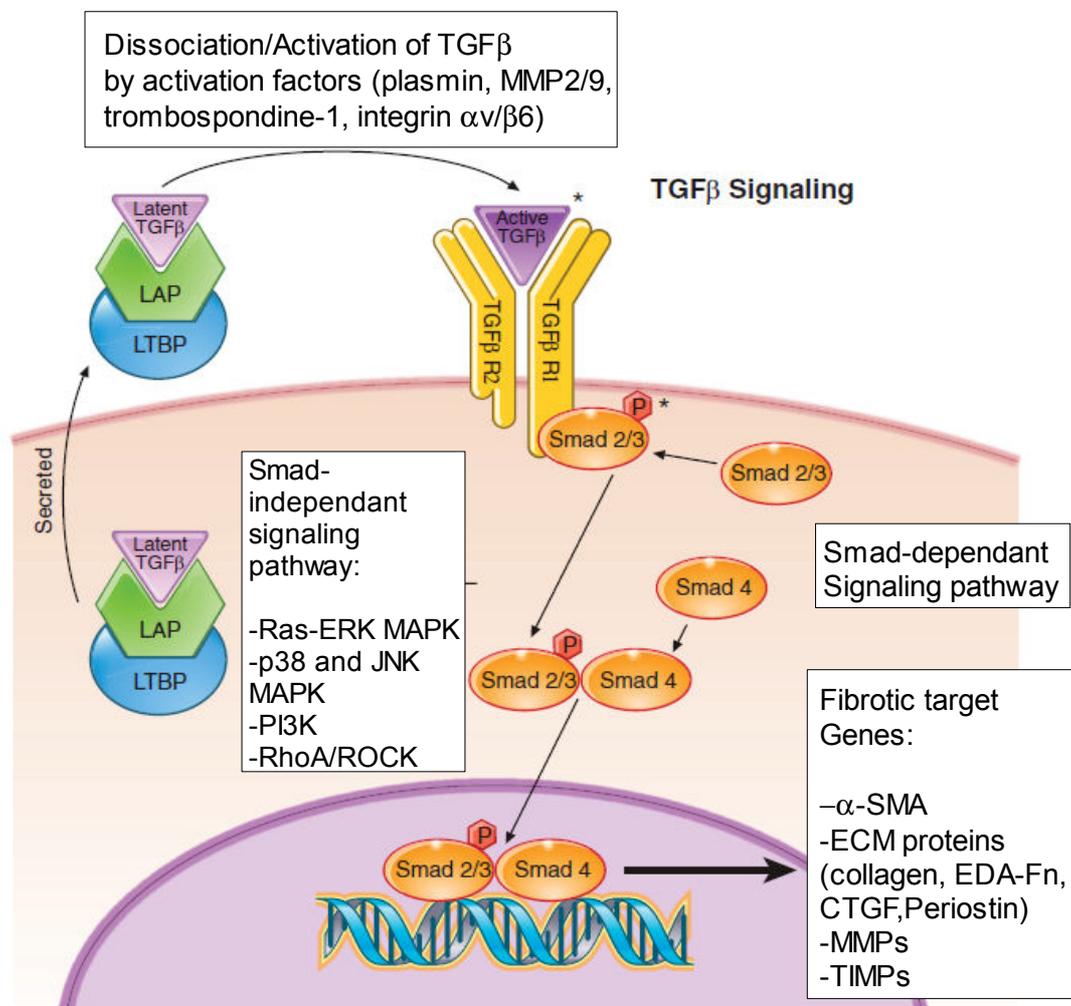


Figure 13. La voie de signalisation pro-fibrotique du TGFβ.

Il existe trois isoformes humaines du TGF-β, TGF-β1, 2 et 3. Elles sont synthétisées sous forme d'un précurseur latent (LTGF-β pour Latent TGF-β) constitué d'un peptide signal de sécrétion dans sa région amino-terminale, d'une région centrale appelée LAP (pour Latency-Associated Peptide), et d'une région carboxy-terminale constituant le TGF-β bioactif après maturation. Le LTGF-β peut être sécrété sous forme d'un petit complexe latent (SLC pour Small Latent Complex) ou sous forme d'un large complexe latent (LLC pour Large Latent Complex) lorsque le LAP est associé de façon covalente au LTBP (pour LTGF-β-binding protein). Les peptides LAPs confèrent la latence du complexe alors que les LTBPs permettent la fixation du TGF-β à la MEC et son stockage. Les changements de conformation du LLC ou du SLC sont induits soit par un clivage protéolytique des LAPs par différentes protéases, comme la plasmine, les MMP2 et MMP9, ou encore la thrombospondine-1 et par l'intégrine alpha-v/beta-6 (Wipff, Rifkin, Meister, & Hinz, 2007; Bierie & Moses, 2010). Le TGF-β1, une fois actif, se lie à deux sortes de récepteurs à activité sérine-thréonine kinase: les récepteurs de type I et II. Le TGF-β se lie d'abord à son récepteur de type II, qui recrute et transphosphoryle le récepteur de type I au niveau d'un domaine GS (riche en glycine et sérine). Le complexe ligand/récepteur permet ensuite la phosphorylation des protéines transductrices SMAD (2 et 3 (R-SMAD: récepteur SMAD)). Ces dernières phosphorylées forment un complexe hétérodimérique avec la CO-SMAD (médiateur commun-SMAD) SMAD 4, complexe qui est transloqué dans le noyau des cellules, où il favorise l'expression des gènes cibles du TGF-β1 en interagissant avec divers facteurs de transcription, coactivateurs et corépresseurs (Schmierer & Hill, 2007). Parmi ces gènes, plusieurs sont décrits pour servir d'intermédiaires dans les effets pro-fibrotique du TGFβ, comme l'α-SMA, des composants de la MEC, comme le collagène, la fibronectine et sa forme épissée EDA-Fn, le CTGF, et la periostine, ainsi que des MMPs et des TIMPs. Selon le contexte et le type cellulaire étudié, d'autres voies indépendantes de la transcription par les protéines SMAD peuvent être activées par le TGFβ. Parmi celles-ci, les voies Ras/ERK et les MAPKineses p38 et JNK et ERK, la PI3kinase/AKT, et la voie RhoA/ROCK (Derynck & Zhang, 2003). D'après (Cheng, Souza, & Spechler, 2012).

synthétisent également des proteoglycans, du collagène de type I et de type III (Klingberg, Hinz, & White, 2013). La sécrétion de protéases par les myofibroblastes est aussi nécessaire au remodelage de la matrice. Parmi celles-ci, on retrouve l'uPA (urokinase Plasminogen Activator) et plusieurs MMPs et leurs inhibiteurs, les TIMPs (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase) (Toriseva & Kahari, 2009). A la fin du processus de cicatrisation physiologique, les myofibroblastes diminuent en nombre puis ils disparaissent selon une cascade d'événements encore mal expliquée; selon une théorie acceptée les cellules myofibroblastiques entreraient en apoptose. Une dérégulation de l'apoptose chez les myofibroblastes semblerait être à l'origine de certaines fibroses, dont la cicatrisation hypertrophique et les chéloïdes (Moulin et al., 2004). La fibrose se caractérise par une persistance d'un tissu riche en myofibroblastes responsables à la fois d'une production anormalement élevée de MEC et de sa contraction aboutissant à un durcissement du tissu (Wynn & Ramalingam, 2012; Rosenbloom, Castro, & Jimenez, 2010). On observe ce phénotype dans le stroma des carcinomes, ou l'on parle communément de fibrose tumorale. Dvorak avait déjà souligné en 1986 des similitudes entre cicatrisation et développement tumoral en définissant la tumeur comme « une cicatrice qui ne guérit pas » (Dvorak, 1986).

B) Fibroblastes associés aux carcinomes.

1) Généralités.

Les fibroblastes représentent la principale population cellulaire du microenvironnement tumoral. Dans les étapes précoces de la carcinogénèse ils semblent contrer la prolifération des cellules précancéreuses (Schauer, Sood, Mok, & Liu, 2011). Une fois activés et recrutés, les fibroblastes entourant la tumeur évoluent en FACs, qui présentent des différences morphologiques et fonctionnelles les différenciant des fibroblastes normaux (Bhowmick, Neilson, et al., 2004). En effet les FACs acquièrent un phénotype similaire à celui des myofibroblastes. Cependant, contrairement aux myofibroblastes, les FACs ne rentrent pas en apoptose et persistent dans le microenvironnement tumoral (Cirri & Chiarugi, 2012). Ces cellules constituant une population hétérogène de cellules « activées » non-tumorales, d'origine diverse (Sugimoto, Mundel, Kieran, & Kalluri, 2006), qui, une fois recrutées au sein de la masse tumorale et activées par les cellules cancéreuses participent activement à chaque étape de la tumorigénèse, à la progression

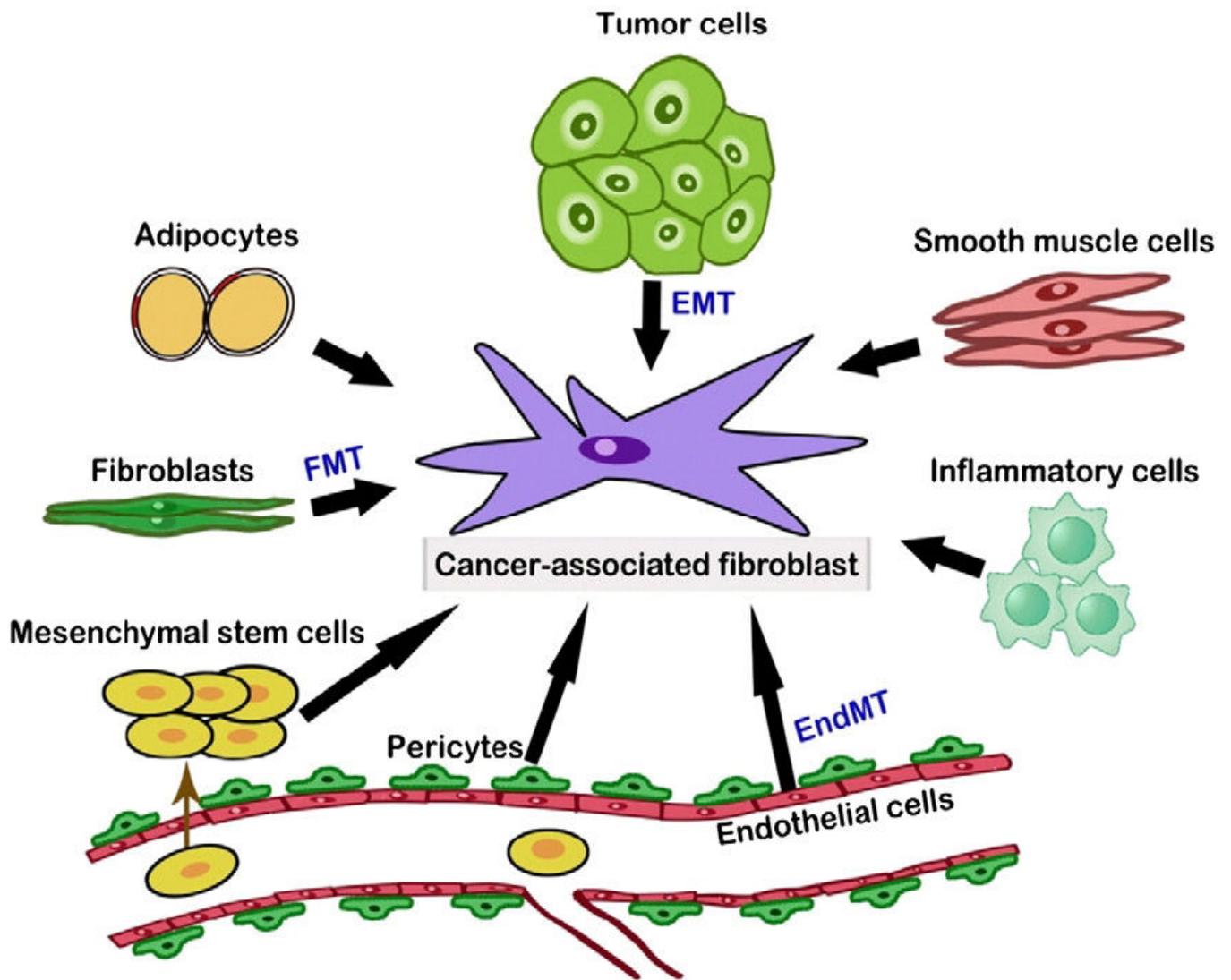


Figure 14. Origine des fibroblastes associés aux carcinomes (FACs)

A ce jour, huit types cellulaires distincts sont considérés comme pouvant être à l'origine des CAFs dans le microenvironnement tumorale: les fibroblastes résidents recrutés et activés par les cellules tumorales et le microenvironnement, les cellules de carcinomes suite à une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), les cellules endothéliales ayant subi une transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT), les cellules souches mésenchymateuse de la moelle osseuse, les pericytes, les cellules musculaires lisses, les adipocytes ainsi que des cellules de l'inflammation. D'après (J. Zhang & Liu, 2013)

de ces dernières depuis l'initiation jusqu'au développement métastatique au sein d'organes secondaires (Marsh, Pietras, & McAllister, 2013; Kalluri & Zeisberg, 2006).

2) Caractérisation des FACs.

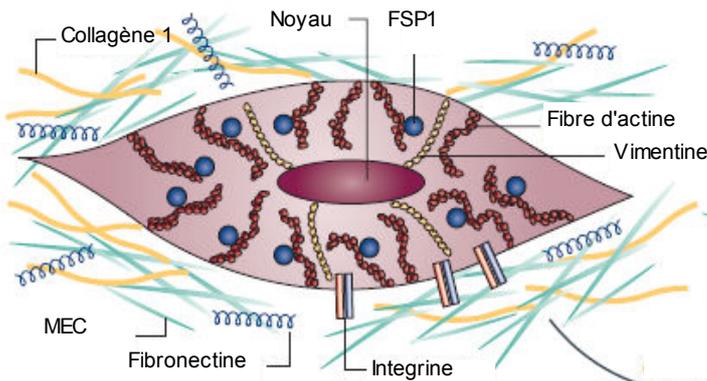
a) Origines.

Comme évoqué ci dessus, les FACs dérivent de plusieurs types cellulaires (Orimo & Weinberg, 2007; Xouri & Christian, 2010) (figure 14). A ce jour plusieurs études montrent que des facteurs de croissance comme le TGF β et le PDGF sont largement impliqués dans le processus d'activation des fibroblastes résidents (Ronnov-Jessen & Petersen, 1993; Anderberg et al., 2009; Sumida et al., 2011). Les cellules souches mésenchymateuse (CSM) issus de la moelle osseuse, constituent une autre source importante de FACs (De Wever, Demetter, Mareel, & Bracke, 2008; Quante et al., 2011), pour une contribution estimée à environ 25% du total dans un modèle murin de carcinomes pancréatique (Direkze et al., 2004) et à environ 20% dans un modèle murin de cancer de l'estomac (Quante et al., 2011). Les CSM sont recrutés et activés au sein du microenvironnement tumoral par une signalisation impliquant le TGF β et SDF1 (Stromal Cell-Derived Factor 1; Quante et al., 2011; Yang et al., 2012; Direkze & Alison, 2006). De nouvelles évidences suggèrent que les cellules de carcinomes, ainsi que les cellules endothéliales, seraient une autre source de FACs générés par des processus de transdifférentiation appelés respectivement transition épithélio-mésenchymateuse (Petersen et al., 2003) et transition endothélio-mésenchymateuse (Zeisberg, Potenta, Xie, Zeisberg, & Kalluri, 2007). En utilisant un modèle de souris transgénique, Zeisberg et al, montrent que 40% des FACs au front d'invasion sont d'origine endothéliale (Zeisberg et al., 2007). Les cellules musculaires lisses, les pericytes (Crisan et al., 2008), (Paquet-Fifield et al., 2009), les cellules adipocytaires (Y. Zhang et al., 2012; Bochet et al., 2013), ainsi que les cellules mesothéliales (Sandoval et al., 2013) pourraient également être la source des fibroblastes retrouvés dans le stroma tumorale (Xouri & Christian, 2010).

b) Marqueurs.

De nombreux marqueurs propices aux FACs ont été utilisés afin d'en déceler la présence dans les tumeurs, tels que l' α -Smooth-Muscle Actine (α -SMA) (Desmouliere et al., 2004), la tenascine C (TNC) (De Wever et al., 2004), la periostatin (Malanchi et al., 2012),

a) Fibroblaste



b) Fibroblaste activé

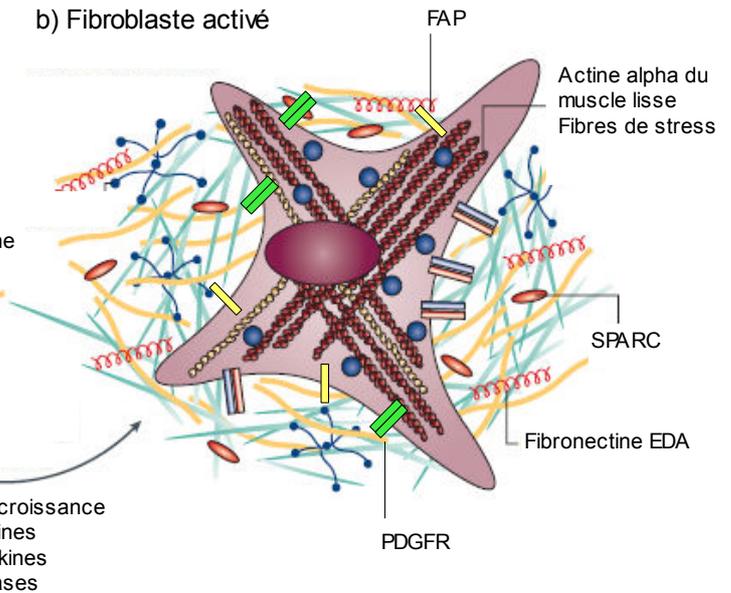


Figure 15: Les marqueurs des FACs.

- a) Les fibroblastes se trouvent dans une MEC constituée majoritairement de collagène de type I et de fibronectine et ils interagissent avec leur microenvironnement grâce aux récepteurs intégrines. Les fibroblastes assument un aspect fusiforme avec un cytosquelette riche en actine et des filaments intermédiaires de vimentine. La protéine FSP1 (Fibroblast-Specific Protein 1) est un marqueur des fibroblastes dans le tissu normal.

- b) Les fibroblastes peuvent acquérir un phénotype « activé », associé à une prolifération accrue et la sécrétion de protéines de la MEC, telles que la tenascine C, la fibronectine contenant le domaine EDA (importante dans le processus de migration cellulaire) et SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine). Phénotypiquement, les fibroblastes activés sont caractérisés par l'expression de l' α -SMA (a-smooth muscle actin), du récepteur au PDGF (platelet derived growth factor) et de la protéine FAP (fibroblasts activation protein). De nombreux facteurs de croissance, cytokines et protéases comme les MMPs sont connus pour jouer un rôle dans l'activation des fibroblastes. D'après (Zeisberg, Potenta, Xie, Zeisberg, & Kalluri, 2007).

(Kikuchi et al., 2008), SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), la NG2 (Neuron-Glial antigen 2) chondroïtin sulfate proteoglycan, (Sugimoto et al., 2006), le PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) (Erez et al., 2010; Pietras et al., 2003), la protéine FAP (Fibroblast Activated Protein) (Kraman et al., 2010), la prolyl 4-hydroxylase (Kojima et al., 2010) ou encore des marqueurs de cellules mésenchymateuses tels que la vimentine, la fibronectine, sa forme épissée l'EDA-Fn, la protéine FSP1 (Fibroblast-Specific Protein 1) ou encore l'intégrine alpha 11 (W. M. Zhang et al., 2002; Kalluri & Zeisberg, 2006) (figure 15). Ces marqueurs sont exprimés à des niveaux très variables d'une cellule à l'autre, indiquant l'existence de sous-population de FACs pouvant exercer des effets pro-tumorigéniques distincts. Cependant, à ce jour, aucun marqueur spécifique ne permet d'identifier précisément chaque composante de cette population cellulaire.

c) Activation.

Ces dix dernières années, différents mécanismes ont été décrits comme étant impliqués dans l'activation et le recrutement des fibroblastes dans le microenvironnement tumoral. Parmi ceux ci, la sécrétion de TGF β par les cellules tumorales, mais également par les autres cellules stromales est la plus importante (J. Zhang & Liu, 2013). La régulation de l' α -SMA et la déposition excessive de protéines matricielles, tel que le collagène ou l'EDA-Fn par la voie du TGF β /SMAD, est en effet largement décrite dans la littérature (Leask & Abraham, 2004). Un schéma récapitulatif de la voie TGF β /SMAD et de son rôle profibrotique est représenté figure 13. Par exemple, Orimo et al montrent que les fibroblastes résidents peuvent être activés par l'établissement de deux boucles autocrines de signalisation faisant intervenir la voie TGF β /SMAD2/3 et la voie CXCL12/CXCR4 ((C-X-C) chemokine receptor 4). Ces deux voies de signalisation coopèrent dans l'activation et le maintien du phénotype pro-tumorale des FACs *in vivo* (Kojima et al., 2010). Récemment, l'importance de la signalisation TGF β /SMAD dans l'activation des fibroblastes est confirmée avec un rôle original de la sécrétion d'exosomes tumoraux contenant cette cytokine (J. P. Webber et al., 2014; Gu et al., 2012; J. Webber et al., 2010). De même, la sécrétion de TGF β par les cellules du système immunitaire recrutées dans le microenvironnement tumorale peut également être à la cause de l'activation des fibroblastes. Dans un modèle de carcinomes mammaires murin, l'agressivité des tumeurs déplétées génétiquement pour le récepteur II du TGF β (TGF β rII) résulte de la sécrétion

accrue de LOX par les cellules fibroblastiques. Dans cette étude, la surexpression de cette enzyme impliquée dans le remodelage pro-invasif de la MEC est régulée via la sécrétion de TGF β par les cellules myéloïdes recrutées au sein de la tumeur (Pickup et al., 2013) (pour une meilleure description du rôle de LOX lors de la carcinogenèse, se référer à la partie IIB4 [« rôle des FACs dans le remodelage matriciel et l'invasion tumorale »](#)).

Si le rôle des cytokines de la famille du TGF β , notamment le TGF β 1, 2 et 3, dans l'activation des fibroblastes au cours de la carcinogenèse est bien établi, celui de la signalisation du TGF β dans «l'activation» des fibroblastes au cours de l'invasion tumorale reste controversé. En effet, la déplétion spécifique du TGF β r-II dans les fibroblastes favorise une tumorigénèse invasive chez la souris (Bhowmick, Chytil, et al., 2004). D'autres études montrent plus récemment que la déplétion du TGF β rII dans les cellules stromales est associée à une forte inflammation et à la répression épigénétique des protéines p15, p16 et p21 (impliqués dans le blocage du cycle cellulaire) dans les cellules de carcinomes, ce qui contribue au développement de la tumeur (Achyt et al., 2013). De même, dans un modèle murin de carcinogenèse induite chimiquement, l'inhibition pharmacologique du récepteur I au TGF β (TGF β r-I) réprime la formation de papillomes tout en favorisant la progression de carcinomes agressifs (Mordasky Markell et al., 2010). Des études récentes montrent également l'importance du facteur de transcription NF- κ b dans l'activation des fibroblastes. Erez et al, montrent que la sécrétion d'IL-1 β par les cellules immunitaires est responsable de l'activation des fibroblastes résidents en FACs via activation de la voie de signalisation faisant intervenir NF- κ b. Ces FACs, qui présentent une forte signature pro-inflammatoire, participent au recrutement des macrophages, à la vascularisation de la tumeur et à la croissance tumorale (Erez et al., 2010). Une autre étude montre que l'expression de la PKC- β 2 (Protein Kinase C-Beta 2) par les cellules de leucémie lymphoïde chronique dans le microenvironnement tumoral entraîne l'activation de NF- κ b dans les cellules stromales. Ces dernières, qui présentent de grande similarité avec les fibroblastes, permettent la survie des cellules tumorales par la création d'une « niche pro-tumorale » (Lutzny et al., 2013).

Le PDGF est un autre facteur de croissance sécrété par les cellules tumorales dont l'expression corrèle avec la progression de la pathologie (Bronzert et al., 1987). La plupart des cellules cancéreuses n'expriment pas les récepteurs du PDGF, ce qui suggère que sa sécrétion exerce des effets paracrines sur les cellules du stroma, notamment sur les cellules endothéliales et les fibroblastes (Forsberg et al., 1993). Alors que le TGF β induit

l'acquisition du phénotype FACs associés à une déposition excessive de protéines de la MEC, le PDGF est impliqués dans le recrutement et la prolifération des fibroblastes du microenvironnement tumoral (Shao, Nguyen, & Barsky, 2000). Par exemple, le PDGF-AA, sécrété par les cellules tumorales après xénogreffes de cellules de carcinomes mammaires et pulmonaires agit comme chemoattractant et mitogène sur les fibroblastes (Shao et al., 2000; Tejada et al., 2006). De plus, *in vivo*, la sécrétion de PDGF-AA par des cellules tumorales ne synthétisant pas du VEGF entraîne un recrutement important de fibroblastes qui participent à la croissance et à la néo-angiogénèse de la tumeur: l'inhibition de la signalisation du PDGFR-alpha à l'aide d'un anticorps bloquant aboutit à une diminution du nombre de fibroblastes sécrétant du VEGF dans la tumeur. Ces résultats montrent que la signalisation paracrine du PDGF est impliqué dans le recrutement des fibroblastes et assure un autre moyen de vasculariser la tumeur pour les cellules tumorales qui n'en sont pas capables par elles mêmes (Tejada et al., 2006). En accord avec les résultats précédent, la sécrétion des isoformes PDGF-BB et le PDGF-CC contribuent également au recrutement des fibroblastes, à leur prolifération et à leur rôle dans la croissance et l'angiogénèse tumorale (Forsberg et al., 1993; Skobe & Fusenig, 1998; Anderberg et al., 2009). De même, l'inhibition pharmacologique du PDGFR par l'inhibiteur des tyrosines kinases Dasatinib reverse le transcriptome de FACs isolés à partir de tumeurs pulmonaires et rétablit un profil transcriptomique comparable à celui de fibroblastes normaux. Lors d'expérience de co-culture *in vitro*, ces observations se traduisent par une réduction de la prolifération des cellules tumorales (Haubeiss et al., 2010).

Des études plus récentes impliquent la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh)-Smoothened (Smo) dans l'acquisition du phénotype « FACs » par les cellules stromales. Les ligands Hedgehog (Hh) sécrétés spécifiquement par les cellules tumorales permettent l'activation de Smo via leur liaison au récepteur patched1, qui lui est uniquement exprimé par les cellules stromales (Ng & Curran, 2011; Tian et al., 2009). Par exemple, la différenciation de cellules stellaires du pancréas en myofibroblastes est facilitée par la présence du ligand Shh dans le milieu de culture. De plus, l'inhibition de la voie de signalisation Shh/Smo par un inhibiteur pharmacologique du récepteur Smo, ou un anticorps bloquant du ligand Hh, diminue la croissance tumorale dans des modèles de cancers pancréatiques et colorectaux *in vivo* (Yauch et al., 2008; Bailey, Mohr, & Hollingsworth, 2009; Strand et al., 2011). Cependant, après plusieurs essais pré-cliniques et cliniques, le rôle du stroma et de la voie de signalisation Hh-Smo dans la progression

des tumeurs pancréatiques a été récemment remis en cause (Amakye, Jagani, & Dorsch, 2013; Rhim et al., 2014; J. J. Lee et al., 2014; Rosow et al., 2012). En effet, alors que la déplétion génétique de Shh dans les tumeurs pancréatiques entraîne une diminution de la réaction desmoplasmique et de la fibrose tumorale, ces tumeurs deviennent beaucoup plus agressives, indifférenciées et vascularisées (Rhim et al., 2014; J. J. Lee et al., 2014). Ces effets seraient expliqués par l'inhibition chronique (plutôt qu'aigu dans les études citées précédemment) de cette voie de signalisation (Rhim et al., 2014; J. J. Lee et al., 2014). (Le rôle controversé de la voie de signalisation Hh-Smo et des fibroblastes dans le cancer du pancréas est également discuté dans le paragraphe IIB3c [« FACs et efficacité des traitements chimiothérapeutiques »](#)). Ces résultats sont confirmés par Kalluri et collaborateurs, qui, dans le même modèle de cancer pancréatique murin, montrent que la déplétion génétique des cellules positives pour le marqueur α -SMA (déplétion des cellules myofibroblastiques à l'aide du système thymidine kinase/gancyclovir) entraîne une diminution de la fibrose tumorale qui s'accompagne de l'apparition de tumeurs plus agressives et indifférenciées (Ozdemir et al., 2014). Le rôle des FACs dans le cancer du pancréas nécessite donc confirmation et semble être dépendant du contexte et de l'avancement de la maladie (Gore & Korc, 2014; Alderton, 2014).

Dans les tumeurs épithéliales, l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène est également à l'origine de l'activation des fibroblastes résidents en FACs (Costa et al., 2014). Cette activation est notamment associée avec une augmentation d'expression de α -SMA, du PDGFR et de la sécrétion de CXCL12 (Costa et al., 2014; Toullec et al., 2010). De même, l'activation des myofibroblastes par la signalisation du TGF β requiert la présence d'espèces réactives de l'oxygène (Jain et al., 2013).

3) Les fibroblastes associés aux carcinomes participent à toutes les étapes de la carcinogenèse.

a) FACs et évolution de la tumeur primaire.

On commence tout juste à mieux comprendre le rôle important que les FACs jouent dans la progression tumorale. En effet, il est maintenant établi qu'après activation par les cellules tumorales, les FACs émettent des signaux oncogéniques, allant de la sécrétion de cytokines et facteurs de croissance à la constitution d'une matrice extracellulaire pro-tumorale, qui ciblent les cellules cancéreuses et en stimulent la progression. Parmi les

premières évidences, un travail réalisé *in vitro* et *in vivo* à l'aide de co-cultures montre que les FACs participent à l'acquisition du phénotype malin de cellules épithéliales immortalisées (Olumi et al., 1999). Des cellules épithéliales cancéreuses mises en présence de fibroblastes « activés » acquièrent des propriétés invasives accrues *in vivo* (L. W. Qian et al., 2003), et développent une résistance exacerbée aux chimiothérapies (Muerkoster et al., 2004; Wilson et al., 2012; Ostman, 2012). Ces effets sont également observés dans le cas de cellules épithéliales pancréatique immortalisées, non tumorales, cultivées en présence de FACs: elles acquièrent progressivement un phénotype transformé évoluant vers un phénotype malin (Ottaviano, Sun, Ananthanarayanan, & Munshi, 2006). Ce phénomène confirme des observations effectuées précédemment sur d'autres types de tumeurs épithéliales, notamment les carcinomes prostatiques et spinocellulaires cutanés (Mueller & Fusenig, 2004). Plus récemment dans un modèle de carcinome mammaire spontané chez la souris, il a été montré que l'inactivation du gène *pten* dans les fibroblastes du stroma, accélère l'initiation, la progression et la transformation maligne des tumeurs (Trimboli et al., 2009). Cette cancérisation est associée à un remodelage matriciel exacerbé, à une infiltration de cellules immunitaires, et à une augmentation de l'angiogenèse (Trimboli et al., 2009). Les mécanismes moléculaires sous-jacents ce phénotype observé chez ces souris ont été dévoilés par la même équipe: les effets pro-tumoraux de la délétion de *pten* dans les fibroblastes est associés à la diminution d'expression du micro-ARN miR-320 et la surexpression de sa cible directe ETS2 (v-ets erythorblastosis virus E26 oncogene homolog2). Cette cascade moléculaire est à l'origine du sécrétome oncogéniques des fibroblastes et permet la reprogrammation des autres cellules du microenvironnement (Bronisz et al., 2012).

Les interactions physiques entre les FACs et les cellules tumorales sont elles aussi importantes lors de la carcinogenèse: de nombreuses études montrent que dans des modèles de xénogreffes l'injection de cellules tumorales en présence de FACs augmente la croissance des tumeurs et leur agressivité. Hu et al. expliquent cette observation: les interactions entre fibroblastes et cellules tumorales entraînent une surexpression de la protéine COX2 (Cyclo Oxygénase 2) dans les cellules de carcinomes via une signalisation dépendante du facteur de transcription NF- κ B. L'inhibition de COX2, qui entraîne une diminution de la croissance tumorale ainsi que de son agressivité, est expliqué par une diminution d'expression des protéases MMP14 et MMP9 dans les fibroblastes (Hu et al., 2009). Enfin, il est maintenant bien établi que les FACs induisent la progression tumorale en sécrétant des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires. En effet, une

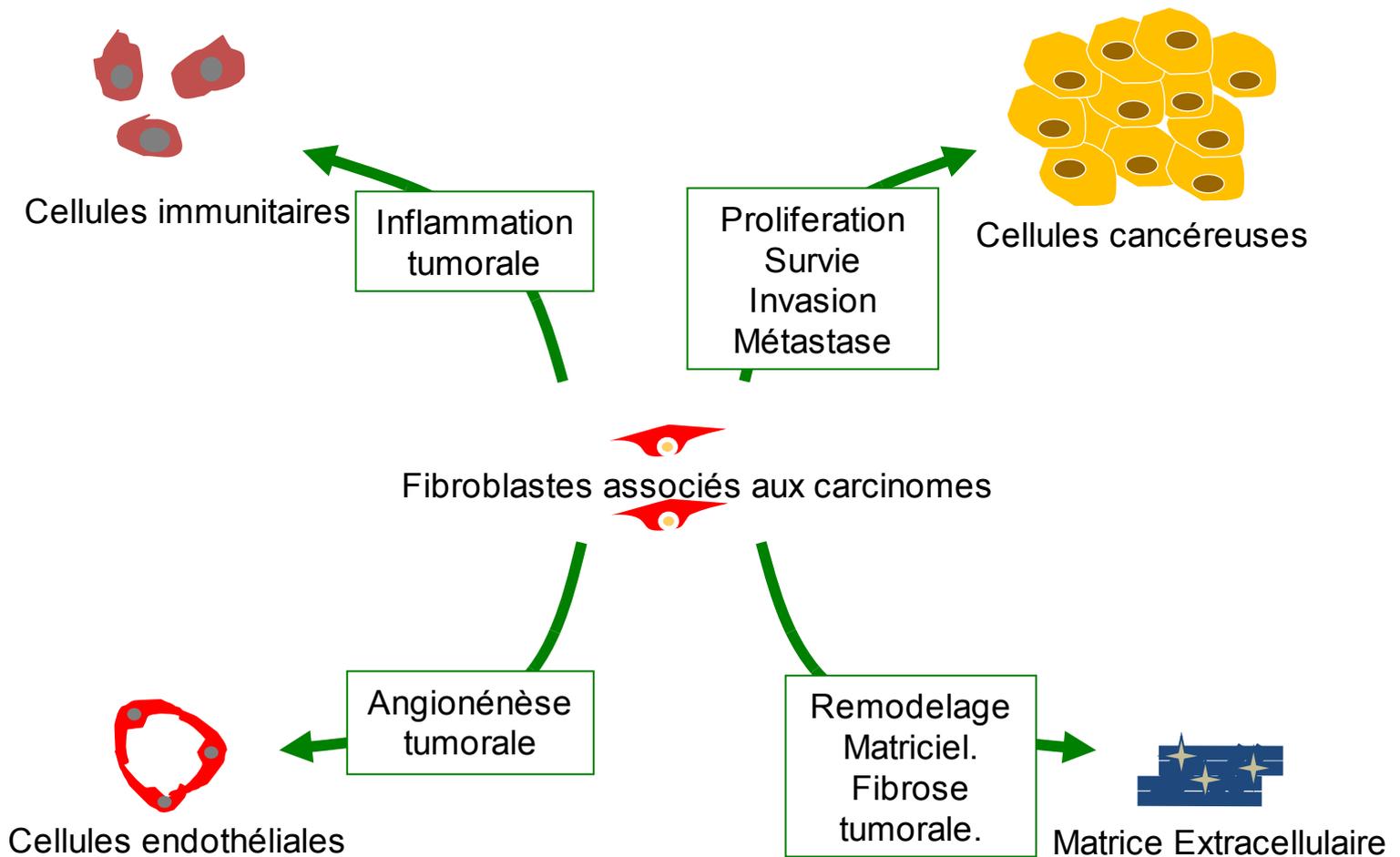


Figure 16. Les FACs au centre de la carcinogénèse.

Les FACs participent à la progression tumorale en établissant des étroites communications avec toutes les composantes, cellulaires et non cellulaires, du microenvironnement tumoral. En effet les FACs augmentent la prolifération, la survie, et les capacités invasives et métastatiques des cellules cancéreuses. Ces cellules participent à l'inflammation tumorale en recrutant les cellules de l'immunité et en détournant/empêchant leur efficacité. Elles participent à la néoangiogénèse tumorale, notamment par le recrutement de progéniteurs endothéliaux. Les FACs jouent également un rôle majeur dans la déposition et l'assemblage d'une MEC pathologique responsable de la dissémination des cellules tumorales, ainsi, on parle généralement de fibrose tumorale.

étude récente portant sur les cancers de la peau, du sein et du pancréas, a montré que les FACs expriment une signature génique pro-inflammatoire dépendant du facteur de transcription NF- κ B (Erez et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère donc que les FACs créent un environnement inflammatoire souvent associés à une carcinogénèse (S. I. Grivennikov et al., 2010) qui favorise le recrutement de cellules immunitaires, l'angiogenèse et la croissance tumorale. En effet, les FACs participent à l'angiogenèse tumorale par la production de VEGF et/ou du facteur CXCL12, ce dernier étant impliqué à la fois dans le recrutement de progéniteurs endothéliaux au sein même de la tumeur et dans la croissance tumorale par la liaison à son récepteur CXCR4 à la surface des cellules tumorales (Kojima et al., 2010; Orimo et al., 2005).

L'effet des FACs sur la prolifération, mais également sur l'acquisition du phénotype migratoire, invasif et métastatique des cellules tumorales est également régulé par la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines. Les mitogènes, les plus étudiés, exprimés de manière abondante dans le microenvironnement par les FACs sont l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor), le b-FGF, CXCL12, CCL5 ((C-C) chemokine Ligand) et l'IL-6 (Interleukin 6) (Cirri & Chiarugi, 2011). Des études exploitant des modèles en 3 dimensions de culture organotypique et de sphéroïdes montrent que la sécrétion de l'HGF par les FACs entraîne l'invasion de la MEC par les cellules tumorales (Daly et al., 2008; Grugan et al., 2010; Jedeszko et al., 2009). De même, lors d'expériences de xénogreffes, la co-injection de cellules souches mésenchymateuses (qui peuvent donner origine à des FACs) et de cellules de cancer du sein permet d'augmenter de manière significative le potentiel métastatique de ces dernières. Les auteurs identifient un dialogue moléculaire entre les deux populations cellulaires, au cours duquel les cellules tumorales favorisent la sécrétion de la chemokine CCL5 par les cellules stromales, qui en retour agit sur son récepteur CCR5 ((C-C) chemokine Receptor 5) à la surface des cellules cancéreuses, augmentant ainsi leur motilité et leur capacité invasive et métastatique (Karnoub et al., 2007). La sécrétion de facteurs de croissance, cytokines et chemokines par les FACs a également un effet sur les autres cellules du microenvironnement tumoral: par exemple sur le recrutement et l'activation des cellules immunitaires (Gerber et al., 2009; Smith & Kang, 2013). Comme autre exemple, on peut citer la sécrétion de CXCL12 par les FACs qui permet le recrutement de progéniteurs endothéliaux au sein de la tumeur et donc une vascularisation optimale de celle-ci (Orimo et al., 2005) . Les FACs sont ainsi intégrés dans un réseau complexe, où les communications entre les différents acteurs cellulaires et

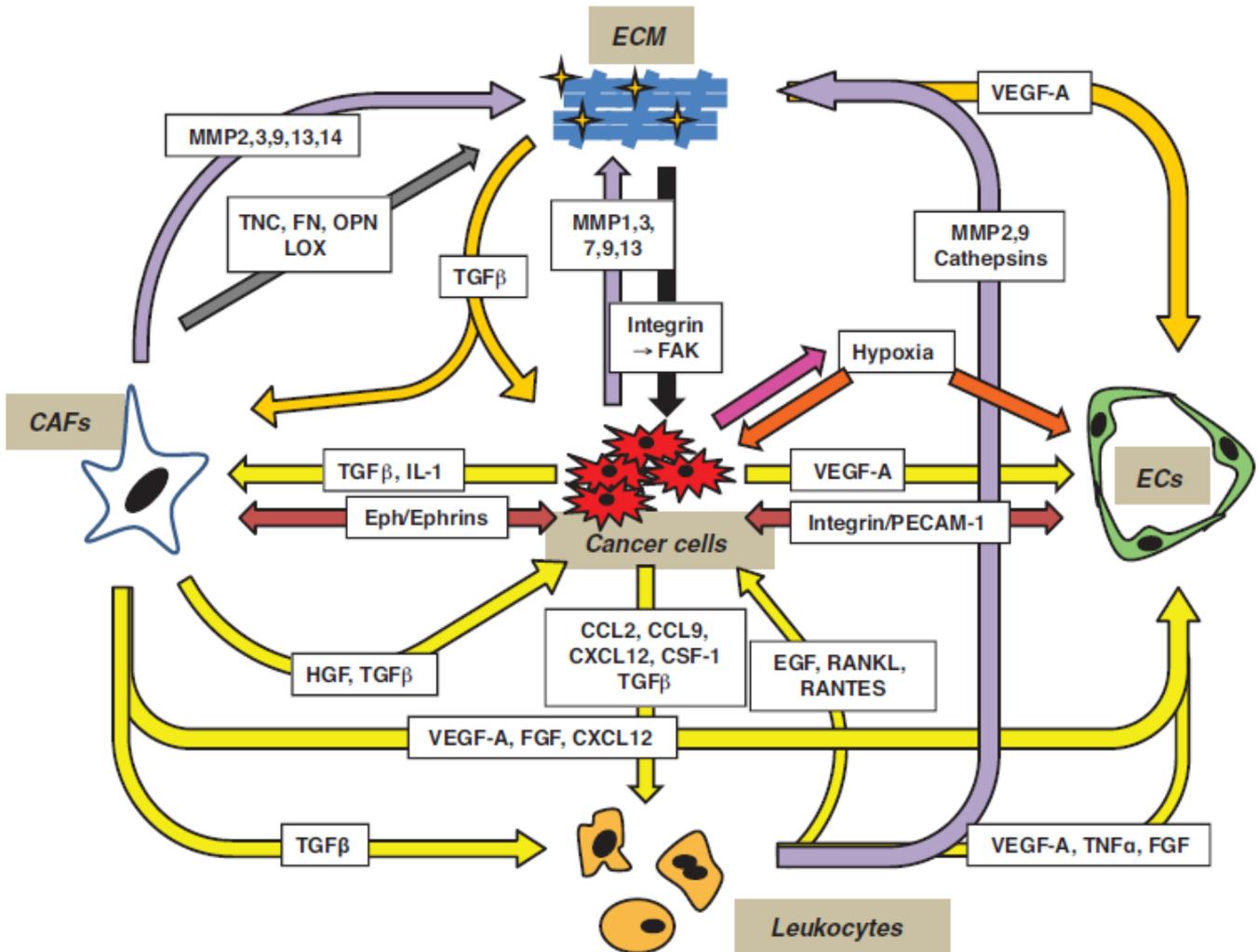


Figure 17. La progression tumorale est régulée par des communications étroites entre le microenvironnement tumoral et les cellules tumorales.

Les mécanismes de communications entre les différents acteurs (encadrés en gris) sont schématisés par des flèches de différentes couleurs; les médiateurs sont encadrés en blanc. Les cellules tumorales au centre des échanges sont responsables du recrutement et de l'activation des principaux médiateurs du microenvironnement tumoral. En retour, ceux-ci participent à l'acquisition du devenir invasif de la tumeur par le biais de différents mécanismes. Ces échanges font intervenir des molécules solubles (en jaune), des protéases (en violet), des protéines impliquées dans le remodelage de la MEC (en gris), des facteurs de croissance libérés lors du clivage protéolytique, des molécules de la MEC (en orange), ou encore des contacts cellules-cellules (en rouge). D'après (Calvo & Sahai, 2011)

non cellulaires de l'écosystème que forme le microenvironnement tumoral régissent la progression tumorale (figure 16 et 17).

b) FACs et cellules souche cancéreuses

En plus des effets directs des FACs sur la progression de la tumeur primaire, plusieurs études impliquent ces derniers dans la formation de niches qui permettent de favoriser l'état souche des cellules tumorales (Medema & Vermeulen, 2011). On parle alors de cellules souches cancéreuses (CSC) décrites dans la littérature pour être à l'origine de la résistance aux traitements, du développement de la tumeur, des récives et de l'évolution métastatique (Beck & Blanpain, 2013; Nguyen, Vanner, Dirks, & Eaves, 2012). Les FACs présents dans le microenvironnement des tumeurs colorectales produisent de hauts niveaux de HGF avec une action paracrine sur les cellules de carcinomes voisines, via le récepteur Met (Hepatocyte Growth Factor receptor). Ce mécanisme facilite l'activation de la voie de signalisation Wnt (Wingless) dans les cellules de carcinomes, et notamment la translocation nucléaire de la Beta-catenine (β -catenine) qui induit le phénotype « CSC » (Vermeulen et al., 2010). Il est intéressant de noter que les cellules tumorales présentant une localisation nucléaire de la β -catenine sont souvent retrouvées au front des langues d'invasion, dans les régions riches en FACs (Brabletz et al., 2001; Fodde & Brabletz, 2007). Une autre molécule sécrétée par les FACs, la chemokine CCL2, participe également à l'acquisition du phénotype cellules souches cancéreuses et invasif de la tumeur via son action paracrine sur les récepteurs CCR2 et CCR4 (Tsuyada et al., 2012; Dagouassat et al., 2010; M. H. Wu et al., 2011). De même l'échange moléculaire FACs/cellules tumorales via la voie de signalisation SDF1-CXCR4, serait également important pour l'auto-renouvellement et le maintien des cellules souches cancéreuses du sein, caractérisées par l'expression des marqueurs CD44+/CD24- (CD pour Cluster of Differentiation) (M. Huang, Li, Zhang, & Nan, 2010) et du pancréas, caractérisées par l'expression du marqueur CD133+ (Krohn et al., 2009). La co-culture de FACs et de cellules cancéreuses du pancréas favorisent la formation de prostasphères *in vitro*, technique utilisée pour déterminer l'état souches des cellules. Lors d'expérience de xénotransplantes chez la souris *nude*, ce phénotype est associé à une augmentation des lésions cancéreuses qui présentent un fort taux de prolifération (C. P. Liao, Adisetiyo, Liang, & Roy-Burman, 2010). Après activation par l'IL-6, les FACs peuvent également induire la TME et l'état souche des cellules tumorales de la prostate via la sécrétion des MMP2 et 9 et régulation de la

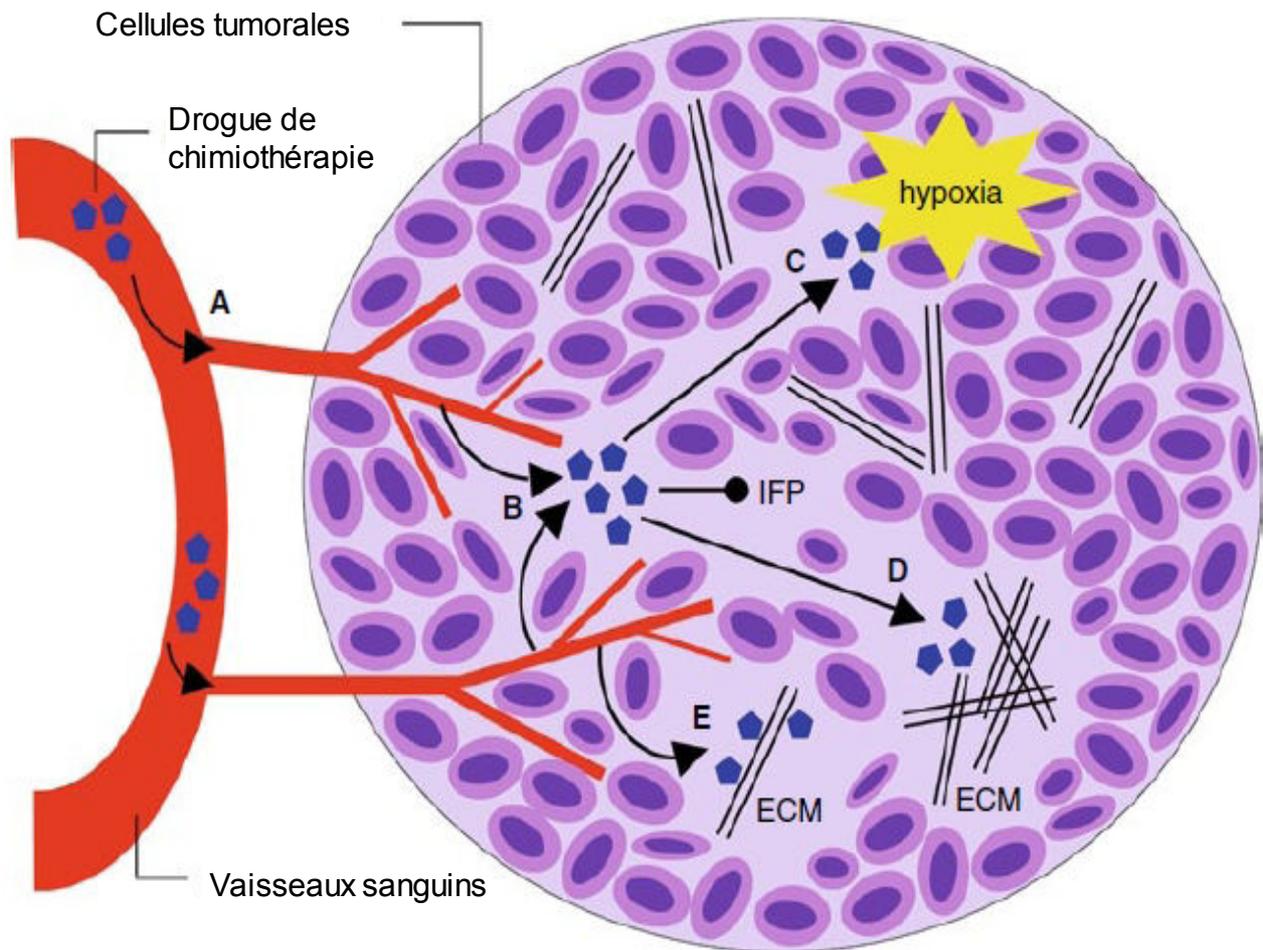


Figure 18. Diffusion des molécules pharmacologiques actives dans les tumeurs solides.

A) Distribution systémique des agents chimiothérapeutiques au sein de la tumeur par le système circulatoire sanguin.

B) Les drogues ayant atteint la tumeur sont transportés par la microvasculature intra-tumorale. Leur diffusion peut être gêné par une forte pression interstitielle (IFP: interstitial fluid pressure)

C) Dans les zones éloignés des vaisseaux sanguins, l'hypoxie locale entraine une acidification du milieu, diminuant l'assimilation des drogues par les cellules tumorales ainsi que l'activité pharmacologique de certaines d'entre elles.

D) Dans la tumeur, la production et l'assemblage accrus de protéines de la MEC (ECM: ExtraCellular Matrix) comme le collagène, la fibronectine et l'acide hyaluronique, interfèrent avec la diffusion des traitements.

E) Des composants de la MEC, comme les collagènes, peuvent aussi fixer les molécules de chimiothérapie et bloquer leur distribution vers les régions plus éloignés de la tumeur.

D'après (Mueller & Fusening, 2011)

cadhérine E. Chez la souris, l'inhibition du dialogue entre cellules tumorales et cellules stromales par un anticorps bloquant l'IL-6 limite la croissance tumorale et le nombre de métastases dans les poumons chez la souris (Giannoni et al., 2010).

c) FACs et efficacité des traitements chimiothérapeutiques.

De plus en plus de publications scientifiques viennent d'identifier des nouvelles fonctions des cellules du microenvironnement tumoral, et plus particulièrement des FACs, qui éclairent le manque d'efficacité des traitements anti-cancéreux actuels. En effet les FACs peuvent interférer avec la distribution des drogues au sein de la tumeur et être à l'origine des résistances innées et adaptatives aux traitements chimiothérapeutiques. La Figure 18 représente schématiquement la distribution d'agents chimiothérapeutiques au sein de la tumeur ainsi que les problèmes associés.

Parmi les différentes études, Crawford et al, montrent que les tumeurs peuvent résister aux traitements anti-VEGF en activant les fibroblastes du stroma. Les FACs sont alors capables de sécréter du PDGF-C, qui est à l'origine de l'angiogenèse tumorale (Crawford et al., 2009) (figure 19). Comme autre exemple, on peut citer la sécrétion de HGF par les FACs isolés chez des patients atteints de cancer du poumon qui entraîne l'activation de c-MET dans les cellules tumorales et par conséquent leur résistance aux traitements classiques (Gefitinib) dirigés contre le récepteur de l'EGF (W. Wang et al., 2009). La sécrétion de HGF par les FACs est également impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de RAF (proto-oncogène serine/thréonine-protein kinase) PLX4720 et PLX4032 par les cellules de mélanomes mutés sur B-RAF via régulation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et de la voie PI3K/PKB (Protein Kinase B) (Straussman et al., 2012; Wilson et al., 2012). Dans ces études, l'inhibition de la voie de signalisation HGF/Met permet de sensibiliser les cellules aux drogues chimiothérapeutiques. Une autre étude montre qu'en réponse aux dommages à l'ADN induits par les traitements chimiothérapeutiques, les cellules du microenvironnement tumoral sécrètent du WNT16B (wingless-type MMTV integration site family member 16B). L'expression de cette cytokine, régulée par le facteur de transcription NF- κ B entraîne l'activation de la voie de signalisation Wnt dans les cellules tumorales et ainsi une résistance adaptative au traitement (Y. Sun et al., 2012; Ostman, 2012). Il serait intéressant de déterminer si les cellules stromales sont également impliquées dans la résistance adaptative des cellules tumorales par des effets (épi)génétique sur les cellules tumorales pendant le traitement.

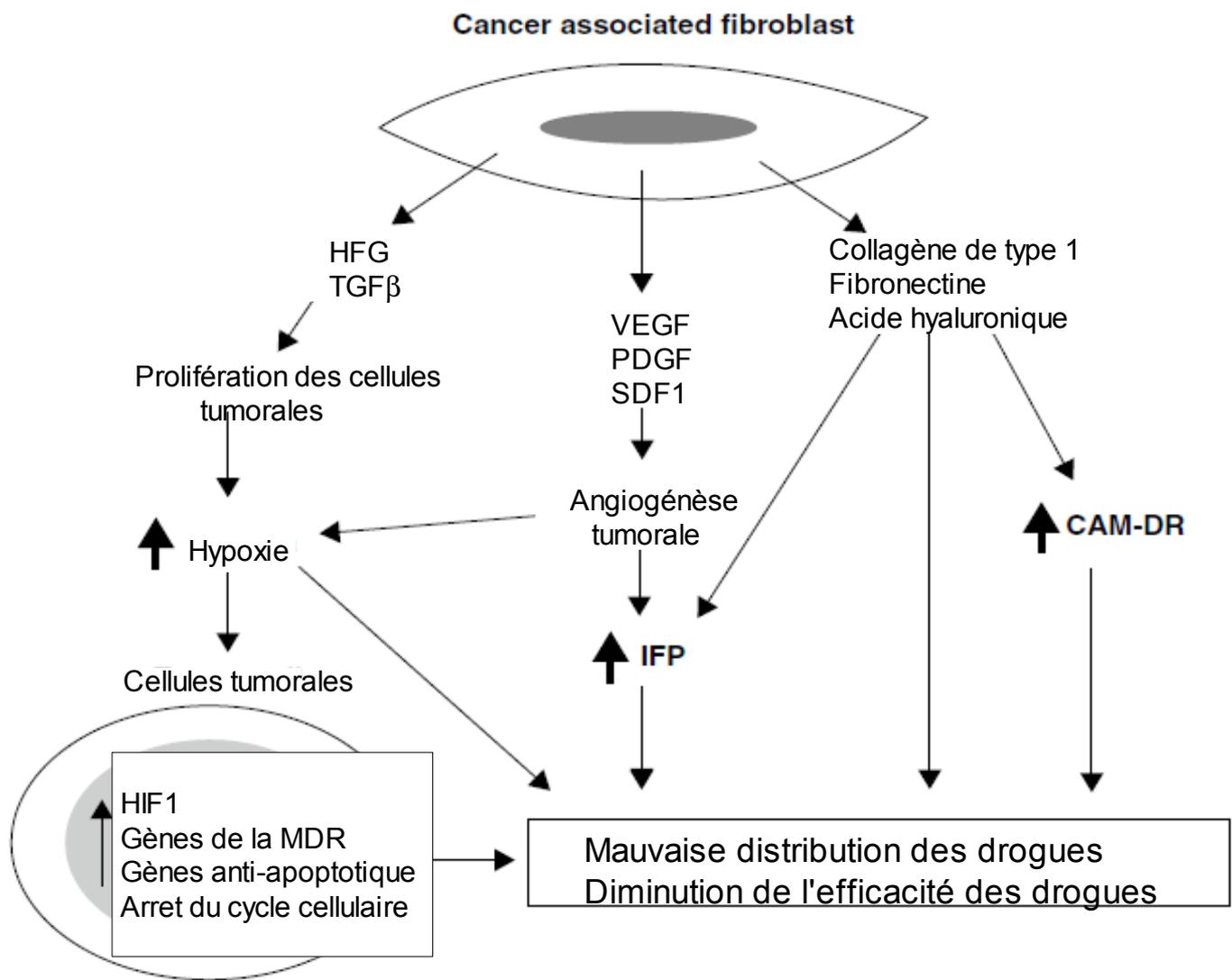


Figure 19. Les FACs affectent les traitements chimiothérapeutiques.

Les FACs expriment et sécrètent plusieurs facteurs de croissance et des protéines de la MEC qui, en participant à l'angiogenèse tumorale, en altérant la composition de la MEC au sein de la tumeur et en favorisant la survie et la prolifération des cellules cancéreuses, entravent l'action des traitements chimiothérapeutiques. La déposition et l'assemblage accrus de la MEC (collagène de type I, fibronectine, acide hyaluronique) et la sécrétion de facteur pro-angiogénique (VEGF, PDGF, SDF1) par les FACs influence la pression interstitielle des vaisseaux sanguins et entraîne une mauvaise distribution des drogues et leur pénétration dans la tumeur. Le dépôt et l'assemblage accrus de la MEC par les FACs entraînent aussi: un accès difficile des agents de chimiothérapie au sein de la tumeur; une résistance aux traitements, et notamment à l'apoptose, après adhésion des cellules tumorales à la MEC néosynthétisée (en anglais: « cell adhesion mediated drug resistance » ou CAM-DR). Les facteurs de croissances produits par les FACs, comme le TGFβ et le HGF, favorisent la croissance et l'expansion de la tumeur en entraînant l'apparition de zones hypoxiques. Celles-ci rendent les cellules tumorales résistantes aux traitements par l'augmentation de l'expression du facteur de transcription hypoxique HIF1. En effet HIF1 régule l'expression de la famille des gènes de multi résistance aux drogues (Multi-Drug Resistance, MDR) de gènes anti-apoptotique et de ceux contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire. D'après (Mueller & Fusening, 2011)

D'autres systèmes montrent que le dépôt et l'assemblage accru de la MEC par les FACs entraîne: un accès difficile des drogues chimiothérapeutiques au sein à la tumeur (Netti et al., 2000; Loeffler et al., 2006), une résistance aux traitements, et notamment une résistance à l'apoptose, après adhérence des cellules tumorales à la fibronectine déposée par les FACs (processus appelé en anglais « cell adhesion mediated drug resistance » ou « CAM-DR ») (Meads, Gatenby, & Dalton, 2009; Wiseman & Werb, 2002) (figure 19). Par ailleurs, la présence d'acide hyaluronique, un composant de la MEC abondant dans le stroma tumoral, est associée à un mauvais pronostic des carcinomes humains. Cette protéine, ainsi que ses produits de dégradation, jouent un rôle important dans les réponses de l'immunité innée via son interaction avec le récepteur cellulaire CD44 (Iijima, Konno, & Itano, 2011). Une récente étude montre que l'acide hyaluronique forme une barrière physique qui empêche les drogues d'accéder à la tumeur (Provenzano et al., 2012). Les auteurs montrent que la déplétion enzymatique de cette protéine de la MEC avant un traitement au Gemcitabine (médicament utilisé contre le cancer du pancréas) permet d'augmenter les effets du médicament dans un modèle murin d'adénocarcinomes ductal du pancréas. La réduction de la pression interstitielle observée, ainsi que l'augmentation de la microvasculature, permettent en effet d'augmenter les effets cytotoxiques du Gemcitabine, et par conséquent supprimer la croissance tumorale et la formation de métastases (Provenzano et al., 2012). Ce mécanisme est retrouvé dans le cas de la voie de signalisation Hh-Smo. L'utilisation de xénogreffes chez la souris et de modèles murins de cancer du pancréas montre que l'inhibition de cette voie de signalisation diminue la réaction desmoplasmique et la fibrose tumorale permettant ainsi de faciliter la distribution intra-tumorale de drogues cytotoxiques dont le Gemcitabine (Olive et al., 2009; Yauch et al., 2008; Strand et al., 2011). Cependant, une inhibition chronique de la voie de signalisation Hh-Smo à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique de Smo ou la déplétion génétique de son ligand Hh par les cellules tumorales favorise au contraire la progression tumorale et annule les effets anti-cancéreux du Gemcitabine (J. J. Lee et al., 2014; Rhim et al., 2014). Ces résultats très récents montrent que dans le cancer du pancréas, les FACs joueraient plutôt un rôle de « suppresseur de tumeurs ».

Les FACs influencent également le transport des drogues dans les capillaires sanguins (Jain, 1990). Ce processus implique la régulation de la pression interstitielle des vaisseaux dans la tumeur par le récepteur du PDGF (Heldin, Rubin, Pietras, & Ostman, 2004; Pietras et al., 2001; Pietras et al., 2002) (figure 18 et 19). En effet, l'inhibition de la signalisation du récepteur au PDGF par un inhibiteur de son activité kinase, le STI571 et par un

antagoniste du PDGF-B permet de réduire la pression interstitielle des vaisseaux et de faciliter l'acheminement des drogues chimiothérapeutiques au sein de la tumeur (Pietras et al., 2001).

Les FACs sont également responsables du développement de l'hypoxie tumorale par la production de facteurs de croissance qui permettent autant la prolifération (TGF β et HGF) que l'angiogenèse tumorale (VEGF, PDGF, SDF1). L'hypoxie peut alors influencer l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques car leur activité est souvent affectée par les propriétés d'oxygénisation du microenvironnement tumoral. Par exemple, dans des expériences *in vitro* et *in vivo*, les effets cytotoxiques du cyclophosphamide et de la Doxorubicin sont dépendants de la présence d'oxygène et sont diminués lors de l'hypoxie (Harrison & Blackwell, 2004). De plus, un environnement hypoxique entraîne un environnement acide par une augmentation de la respiration anaérobie qui génère de l'acide lactique dans le milieu extracellulaire alors que le pH intracellulaire reste inchangé (Harrison & Blackwell, 2004). L'environnement acide entraîne des dérégulations du gradient de pH extracellulaire/intracellulaire et empêche ainsi l'assimilation de certains agents chimiothérapeutiques par les cellules tumorales (Gerweck & Seetharaman, 1996); Vukovic & Tannock, 1997; Cowan & Tannock, 2001). La sensibilité des cellules cancéreuses aux drogues cytotoxiques est diminuée dans un environnement hypoxique. En effet, certains agents ciblent les cellules qui se divisent activement; dans des situations d'hypoxie, associées à augmentation de l'expression du facteur de transcription HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1), on observe un arrêt du cycle cellulaire qui limite les effets de ces drogues (Vukovic & Tannock, 1997). De plus, en réponse à un environnement hypoxique, HIF1 induit l'expression de protéines codées par la famille des gènes de multi-résistance aux drogues (Multi-Drug resistance ou MDR) (Wartenberg et al., 2003). Ces protéines appartiennent à la famille des transporteurs ABC et permettent la sortie des drogues anti-tumorales de la cellule cancéreuse (Gottesman, Fojo, & Bates, 2002) (figure 19). La création d'un environnement hypoxique, à laquelle participent les FACs, entraîne donc une diminution de l'assimilation et de l'efficacité des molécules chimiothérapeutiques, une diminution de la sensibilité des cellules tumorales aux traitements et une résistance par l'expression de gènes qui favorisent l'arrêt du cycle cellulaire et la survie des cellules tumorales.

d) FACs et niche métastatique.

L'hypothèse du « seed and soil » selon laquelle une cellule tumorale bien que disséminée doit trouver un organe permissif au développement de métastase est aujourd'hui communément acceptée, le « seed » étant la cellule tumorale et le « soil » le stroma, la niche, ou le microenvironnement de l'organe cible. Plusieurs études ont montrés le rôle important des FACs dans la création de la « niche métastatique ». La colonisation du site métastatique par les cellules tumorales est en effet soutenue par la création d'un microenvironnement par les FACs par le dépôt et l'assemblage d'une MEC permissive. De cette manière, le dépôt de TNC et de Periostine aux sites métastatiques permet l'activation des voies Notch et Wnt dans les cellules tumorales, qui acquièrent un phénotype de cellules souches tumorales et un taux accru de croissance (Malanchi et al., 2012; Oskarsson & Massague, 2012; O'Connell et al., 2011; Oskarsson et al., 2011). La TNC ainsi que le VEGF-A, déposés et sécrétés par les FACs au niveau de la niche métastatique, permettent respectivement de protéger les cellules tumorales de l'apoptose et de fournir l'environnement angiogénique nécessaire à la colonisation de l'organe secondaire par les cellules tumorales (O'Connell et al., 2011). Dans ce contexte, Duda et al montrent que lors de leur migration de la tumeur primaire au site métastatique, les cellules tumorales emmènent avec elles des composants du stroma: en effet, les fibroblastes recrutés au niveau de la tumeur primaire leur facilitent la colonisation des poumons (Duda et al., 2010). Une étude plus récente montre que les cellules tumorales, par la sécrétion d'exosomes sont capables « d'éduquer » les cellules stromales du futur site métastatique avant même leur arrivée. En effet la sécrétion par les cellules de mélanomes d'exosomes recelant de l'HGF permet l'activation de cellules dérivées de la moelle osseuse (qui sont une source de FACs) au site métastatique. L'activation du récepteur c-Met à la surface des cellules stromales entraîne des augmentations focalisées du remodelage matriciel, de l'inflammation, de la perméabilité des vaisseaux sanguins et favorise ainsi la colonisation de l'organe par les cellules tumorales (Peinado et al., 2012).

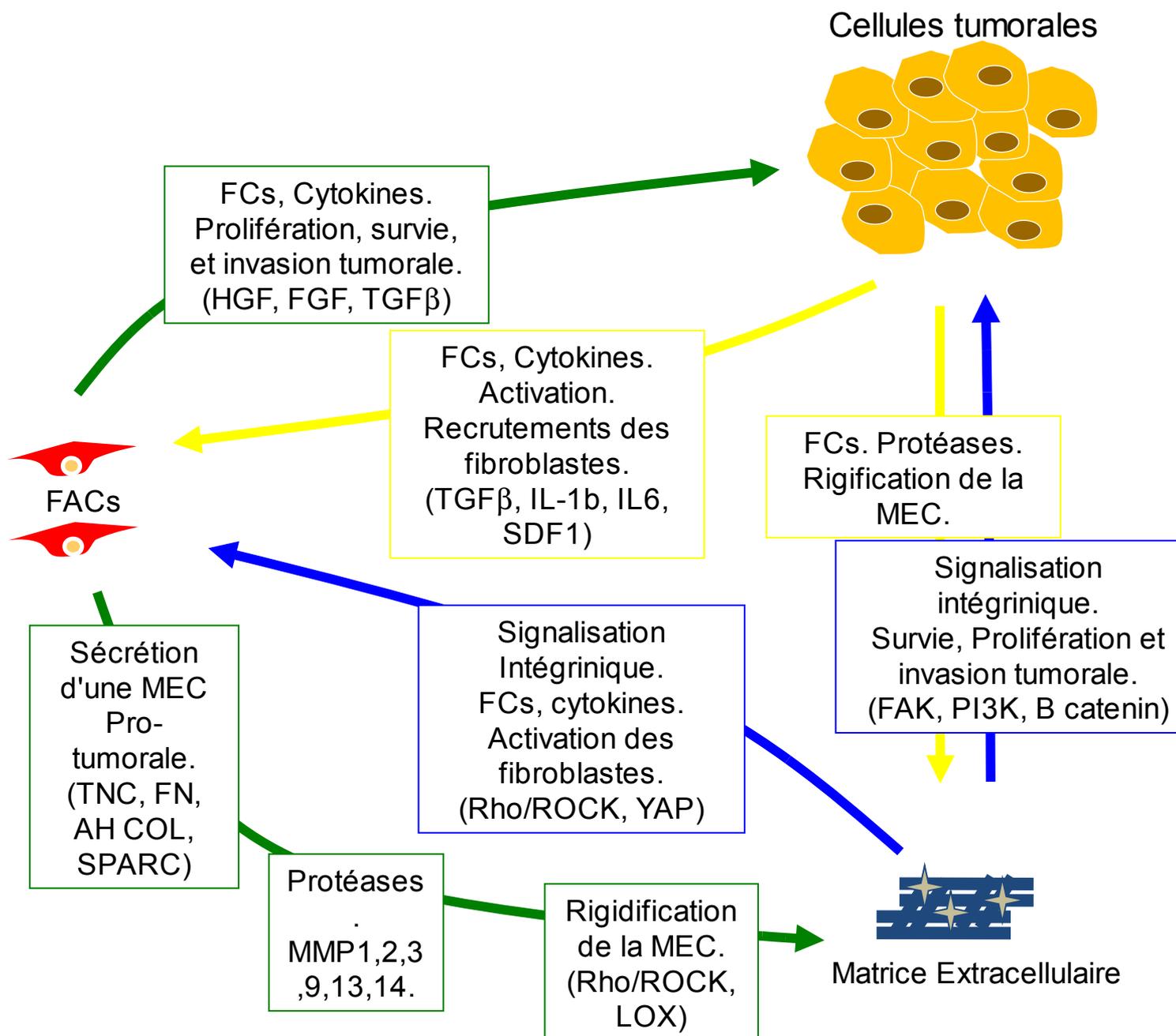


Figure 20. Les FAC et le remodelage matriciel.

Après activation par les cellules tumorales par sécrétion de facteurs de croissance, cytokines mais aussi par une augmentation de la rigidité de la MEC consécutive à un remodelage excessif, les fibroblastes participent à la régulation des processus clés de la progression tumorale: la prolifération, la survie et l'invasion des cellules tumorales. Le remodelage de la MEC néo synthétisée, son dépôt, et sa rigidification aboutissent sur une fibrose cancéreuse qui, d'une part, favorise la survie, la prolifération et les capacités invasives des cellules tumorales, et, d'autre part, agit sur les fibroblastes en permettant la création d'une boucle d'activation autocrine via une augmentation de la contractilité cellulaire.

4) Le rôle des FACs dans le remodelage matriciel et l'invasion tumorale.

a) Sécrétion de protéines matricielles exerçant une activité pro-tumorale.

Le stroma tumoral présente une architecture profondément différente de celle du tissu conjonctif physiologique (Butcher et al., 2009), et, comme déjà évoqué ci-dessus, les FACs sont à l'origine des modifications des propriétés de la MEC et en la rendant permissive à l'invasion des cellules cancéreuses favorisent la progression tumorale. Les protéines de la MEC sont étroitement liées à la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. La survenue de carcinomes invasifs est souvent accompagnée d'une expansion du stroma tumoral et d'une augmentation du dépôt de protéines dans la MEC (Butcher et al., 2009). Ces dernières incluent, entre autres, la TNC, l'EDA-Fn, ou encore la protéine SPARC qui, absente de la MEC des tissus sains, joue un rôle important non seulement dans le processus invasif des cellules tumorales (Kalluri & Zeisberg, 2006) mais aussi dans les fibroses pathologiques (Atorrasagasti et al., 2013) (figure 20). Par ailleurs, il a été montré qu'une MEC riche en collagène de type I déposée par les FACs confère un phénotype tumorale aux cellules pancréatiques ductales non transformées (Mueller & Fusenig, 2004). En accord avec ces données, la sécrétion par les fibroblastes d'une MEC exerçant une activité pro-tumorale, permet la création d'une niche métastatique. Par exemple Malanchi et collaborateurs montrent que les fibroblastes activés par des cellules de cancer du sein expriment et déposent de la periostine dans les sites métastatiques créant ainsi le microenvironnement nécessaire à la colonisation des poumons et le maintient des cellules souches tumorales par l'activation de leur voie Wnt (Malanchi et al., 2008; Malanchi & Huelsken, 2009).

b) Rigidification de la MEC.

L'augmentation de la rigidité matricielle est une conséquence du développement tumoral, et cette caractéristique est exploitée en médecine pour le dépistage des cancers du sein par mammographie. La rigidité de la MEC découle d'un dépôt accru de protéines de la MEC, notamment de collagène, et de modifications post-traductionnelles des protéines qui la composent. Les FACs sont les principaux médiateurs de ces changements qui jouent un rôle primordial dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules tumorales (Butcher et

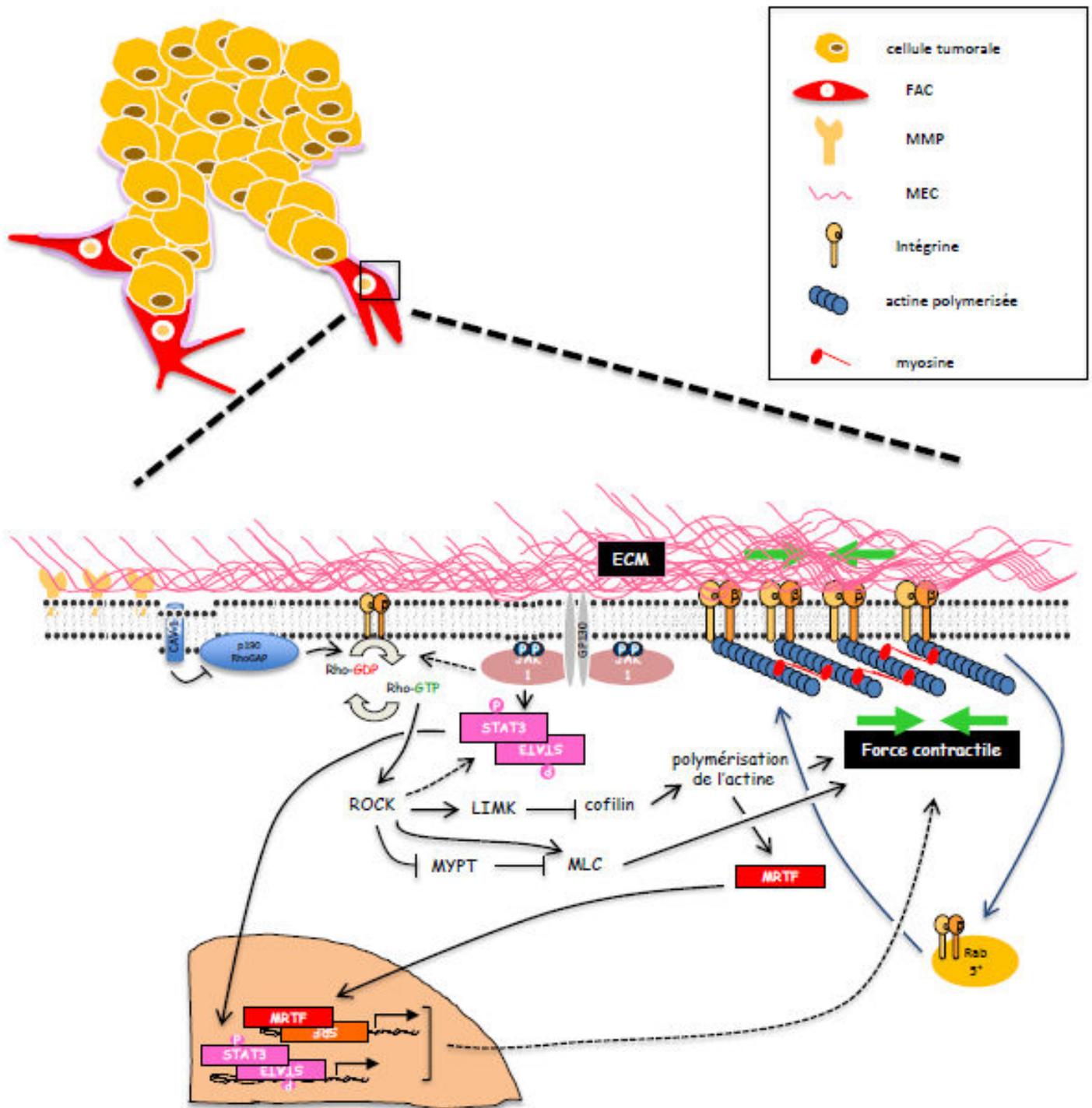


Figure 21: Les voies de signalisation régulant le remodelage matriciel par les FACS.

Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans le remodelage matriciel pro-invasif induit par les FACS. Les voies de signalisation Rho/ROCK et JAK1/STAT3 coopèrent dans la régulation de l'activité contractile du cytosquelette d'acto-myosine chez les FACS. Une telle coopération est indispensable au remodelage matriciel et à la création des chemins d'invasion dans la MEC.

al., 2009; Paszek et al., 2005). Les fibroblastes secrètent la majeure partie des constituants des matrices, quelles soient normales ou pathologiques (Lu et al., 2012). Par rapport à une matrice normale, les modifications constatées touchent aussi à l'organisation macromoléculaire de la MEC. Par exemple, les fibres de collagènes sont réorganisées perpendiculairement à la tumeur, et génèrent ainsi des chemins que les cellules tumorales invasives peuvent emprunter pour migrer dans le tissu environnant (Provenzano et al., 2006; Conklin et al., 2011).

L'invasion collective, décrite essentiellement dans le cas des cellules de carcinomes et de mélanomes, est caractérisé par le maintien des jonctions intercellulaires et d'une polarité multicellulaire à l'intérieure de la cohorte invasive (Friedl & Gilmour, 2009). Lors du processus invasif, les cellules tumorales sont guidé par des cellules « leaders », un rôle qui, selon le contexte tumorale, peut être tenu soit par une cellule tumorale soit par un FAC (Gaggioli et al., 2007). Grâce à la mise au point de cultures cellulaires en trois dimensions qui permettent de mimer une organisation tissulaire (Albregues, Meneguzzi, & Gaggioli, 2013), nous avons décelé le rôle original exercé par les FACs dans l'invasion des cellules de carcinome. En effet, les FACs, ensemencés dans une MEC reconstitué artificiellement, la remodelent et creusent des chemins d'invasion qui sont empruntés par les cellules tumorales, qui peuvent ainsi migrer et envahir la matrice sous-jacente. Notre approche montre également que les FACs sont toujours les cellules leaders des cohortes invasives, celles ci ressemblant fortement aux « clusters » invasifs observés dans les carcinomes spinocelullaires humains. Le remodelage de la MEC et la création de chemin d'invasion par les FACs reposent sur l'activité protéolytique des MMPs, la médiation de récepteurs cellulaires (les intégrines) et leur connexion au cytosquelette d'actine (Gaggioli et al., 2007; (Hooper et al., 2010). Les voies de signalisation importantes pour la régulation de ces mécanismes seront décrits dans la suite de ce chapitre et sont représentés figure 21. La coordination de la liaison des intégrines à la MEC et la génération de forces contractiles, traduisant la puissance mécanique générée par la cellule sur son substrat, via le cytosquelette d'acto-myosine, permet aux fibroblastes de remodeler les macromolécules de la MEC telles que les fibres des collagènes (Grinnell, 2003; Rhee & Grinnell, 2007). L'alignement des fibres de collagènes et la formation des fibres linéaires de fibronectine requièrent l'activité de la voie de signalisation de la petite GTPase Rho et de sa kinase effectrice ROCK, permettant la génération de force contractile par le cytosquelette d'actine par les fibroblastes (Gaggioli et al., 2007; Meshel, Wei, Adelstein, & Sheetz, 2005; Samuel et al., 2011; Scott et al., 2010). La LIMK, elle aussi régulée par

ROCK va participer au remodelage matricielle par les FACs en phosphorylant la coffiline. L'inactivation de la coffiline par phosphorylation entraine ensuite la stabilisation des filaments d'actine, sur lesquelles la myosine peut venir s'associer pour réguler la contractilité des FACs et la rigidification de la matrice qui en découle (Scott et al., 2010). La régulation du cytosquelette d'actine est donc directement impliquée dans le remodelage matriciel et dans l'augmentation de la rigidité de la MEC induite par les FACs (Calvo et al., 2013). *In vitro*, dans les cultures organotypiques contenant des FACs, la rigidité de la MEC est mimée par la contraction des gels riches en collagène I et laminine (Hooper et al., 2010). Des modèles sophistiqués de cultures organotypiques en 3 dimensions, qui reproduisent les compartiments cutanés derme/épiderme, corrént parfaitement l'augmentation de la rigidité matricielle induite par les FACs avec la capacité de ces cellules à promouvoir l'invasion tumorale (Hooper et al., 2010). Ces résultats, obtenus *in vitro* ont été récemment confirmés *in vivo*, montrant que l'activation de la petite GTPase Rho par la cavéolin-1 entraine la rigidité et l'organisation matricielle nécessaire à l'invasion des cellules tumorales (Goetz et al., 2011). D'autres études désignent également les facteurs de transcription SRF (Serum Reponse Factor) et MRTF (Myocardin-Related Transcription Factor) comme étant les médiateurs de l'activité contractile des FACs. De manière intéressante, la signalisation de la petite GTPase Rho et la dynamique des réseaux d'actine régulent l'activation du facteur de transcription SRF par MRTF, qui à son tour est impliqué dans la contraction *in vitro* de matrices de collagène de type I par les FACs (Cridder et al. 2011; Small, 2012; Scott et al., 2010) (figure 21). Ces observations ont été confirmées récemment par la découverte que la contractilité des myofibroblasts *in vitro* et *in vivo* dépend de la régulation de SRF par les canaux calcium TRPC6 (Transient Receptor Potential Channel (Davis et al., 2012). La rigidité de la MEC peut être censée par les cellules pour s'y adapter, et on parle de mécanotransduction. Ainsi, les forces exercé sur les intégrines et les complexes d'adhésion cellulaire associés peut entrainer l'activation de FAK (Focal Adhesion Kinase), les kinases de la famille Src et RhoA (Levental et al., 2009; Guilluy et al., 2011; Sawada et al., 2006). Dans ce contexte, les travaux de Mouw et al, montrent que l'augmentation de rigidité des tissus tumoraux corréle avec une augmentation de l'activation des kinases FAK et PKB dans les cellules tumorales. Il en résulte une activation soutenue de la β -caténine et de l'oncogène MYC qui, via la régulation du micro ARN18a entraine une diminution d'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN et favorise ainsi la progression tumorale (Mouw et al., 2014). Récemment, il a été montré qu'une matrice rigide entraine l'activation des

régulateurs transcriptionnelle YAP (Yes-Associated Protein) et TAZ (Taffazin) (Dupont et al., 2011). L'activation élevée de ces deux protéines est associée au caractère métastatique des tumeurs, et à une augmentation des propriétés cellules souches cancéreuses (Cordenonsi et al., 2011; Lamar et al., 2012). Dernièrement Calvo et al. montrent qu'une forte activité du facteur de transcription YAP est également retrouvée dans les FACs, et permet à ces cellules de remodeler la MEC de manière accrue, d'induire l'invasion tumorale et d'augmenter l'angiogénèse tumorale. En effet YAP contrôle la synthèse des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine, comme ANLN (Anillin), DIAPH3 (Diaphanous homolog 3) et MLC2 (Myosin Light Chain 2). Les auteurs montrent que l'activation soutenue de YAP dans les FACs permet une augmentation de la rigidité matricielle qui elle-même augmente l'activité du facteur de transcription. Cette boucle d'activation autocrine permet de maintenir le phénotype contractile et pro-invasif des FACs (Calvo et al., 2013). Cependant les mécanismes moléculaires et/ou cellulaires permettant dans un premier temps l'activation de YAP ne sont pas expliqués.

Les cytokines inflammatoires sont fréquemment retrouvées dans le microenvironnement tumoral et l'inflammation chronique est largement impliquée dans l'initiation et la progression tumorale. Dans ce contexte, nous avons montré que la signalisation des cytokines inflammatoires par le récepteur GP130 (Glycoprotein 130) et la kinase JAK1 régulent la contractilité des FACs via la régulation de la voie de signalisation Rho/ROCK. L'inhibition de cette voie bloque totalement le remodelage de la MEC qui est nécessaire aux cellules de carcinomes pour initier *in vitro* toute invasion collective. La mise en évidence d'une boucle de régulation positive entre ces deux voies pourrait de plus expliquer l'acquisition par les FACs d'un potentiel accru de contractilité qui leur confère un pouvoir pro-invasif (Sanz-Moreno et al., 2011) (figure 21). Une autre étude vient confirmer le rôle des kinases JAKs, et notamment de JAK2, dans la sclérose systémique, maladie associée à une fibrose accrue caractérisée par une surproduction de MEC par les fibroblastes qui ensuite la remodelent (Dees et al., 2012). Une autre cytokine inflammatoire, le $TNF\alpha$, produite par les cellules de carcinomes spinocellulaires, permet d'augmenter le remodelage matriciel par les FACs par la régulation du facteur de transcription NF- κ B. Il en résulte une augmentation de l'invasion collective des cellules tumorales dans des modèles d'invasion en trois dimensions (Chaudhry et al., 2013). Le remodelage de la MEC par les FACs est aussi régulé par la distribution et le recyclage des intégrines sur la membrane plasmique des cellules. Ce processus, qui requiert l'implication

Principales protéases en provenance des FACs

Rôle des protéases lors de la progression tumorale.

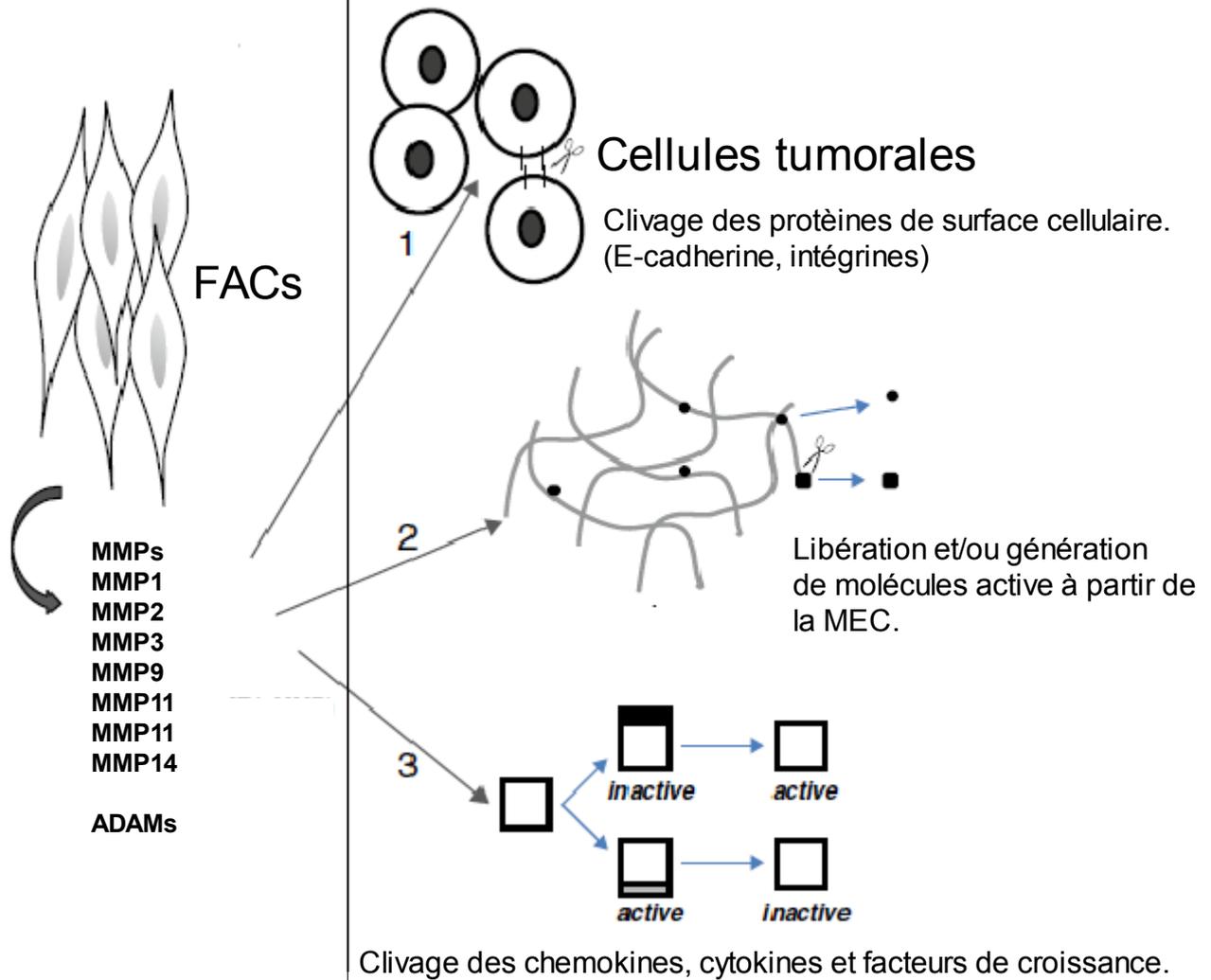


Figure 22. Protéases produites par les FACs.

Les FACs constituent une importante source de protéases telles que les MMPs et les ADAMs (A Desintegrin And Metalloproteinase). Ces enzymes aux multiples fonctions participent activement à la progression tumorale. Elles clivent des protéines à la surface des cellules et participent ainsi aux processus d'adhérence des cellules tumorales. En dégradant les protéines de la MEC, les protéases participent à la migration et à l'invasion des cellules tumorales, mais permettent également le clivage des facteurs de croissance séquestrés dans la MEC et la génération de molécules actives de la MEC. De plus, les protéases clivent certains chemokines, cytokines et facteurs de croissance sécrétés sous forme de pro-peptides pour les activer ou les inactiver. D'après (Mueller & Fusening, 2011)

active des vésicules intracellulaires, est essentiellement contrôlé par les petites GTPase de la famille rab (Ras-related in brain). La liaison des intégrines à leurs ligands initie des cascades de réponses intracellulaires et notamment la contraction des filaments d'actine par action de la myosine. Ainsi, le rôle de rab5 et rab21 dans le transport de l'intégrine $\alpha 5$ à la membrane plasmique a été dévoilé *in vitro*. La liaison de ce récepteur intégrinique à la MEC entraînerait donc les forces contractiles nécessaires au remodelage matriciel et à la création de chemins d'invasion par les FACs (Hooper et al., 2010).

L'assemblage des fibres de collagène par l'enzyme cuivre-dépendante LOX est également impliqué dans l'augmentation de la rigidité matricielle induite à la fois par les cellules tumorales et les FACs (Barker, Cox, & Ertler, 2012). La rigidité matricielle accrue entraîne une prolifération des cellules épithéliales transformées et active leur potentiel invasif. L'accroissement du processus d'assemblage des molécules de collagène et la rigidité accrue de la MEC qui en découle entraînent le regroupement des intégrines à la membrane plasmique, l'assemblage des adhésions focales et l'activation de la PI3K qui régule l'invasion des cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo* (Levental et al., 2009). Un tout nouveau rôle de LOX est récemment décrit dans la création de la niche métastatique. En effet, la mise en place d'un microenvironnement fibrotique par cette enzyme au site métastatique augmente la colonisation par les cellules tumorales ainsi que leur croissance et leur survie (Cox et al., 2013). En utilisant un modèle syngénique orthotopique de carcinomes mammaires, la même équipe montre que la sécrétion de LOXL2 par les cellules tumorales améliore leur capacité invasive et métastatique après activation des fibroblastes. La sécrétion de LOXL2 entraîne l'activation de FAK par la signalisation intégrinique, ce qui engendre le remodelage pro-invasif de la MEC par les fibroblastes (Barker, Bird, Lang, & Ertler, 2013).

c) FACs et Protéases.

Le remodelage de la MEC par l'action des MMPs constitue une des étapes cruciales de la progression tumorale et la formation du microenvironnement tumoral. Dans des conditions physiologiques, l'expression coordonnée des différentes MMPs et de leurs inhibiteurs permet l'agencement d'une MEC organisée et une homéostasie cellulaire et tissulaire équilibrée. Ces conditions sont complètement bouleversées dans le stroma tumoral, et les FACs, en tant que source importantes de protéases, jouent un rôle prépondérant dans la dérégulation d'un tel équilibre (figure 22). L'action des MMPs est tout particulièrement

cruciale dans la progression tumorale. Ces enzymes, en dégradant la MEC, assurent l'activation par clivage de nombreux facteurs de croissance, cytokines et de récepteurs cellulaires, ainsi que le clivage des molécules d'adhésion entraînant la TME des cellules tumorales, processus clé au cours de l'invasion des cellules tumorales (figure 22).

La dégradation de la MEC par les MMPs et d'autres protéases influe et régit la migration et l'invasion des cellules tumorales (Wolf et al., 2007). En effet, la génération par les FACs des chemins d'invasion requiert l'activité protéolytique des MMPs (Gaggioli et al., 2007), et notamment l'action de MT1-MMP (Scott et al., 2010). De même, l'apport de protéases par les FACs peut réguler l'activation de cytokines, des facteurs de croissance et de récepteurs tels que l'IGF, le FGF ou encore le TGF β . Par exemple, la MMP13 produite par les FACs clive la forme latente du TGF β en sa forme active (D'Angelo et al., 2001); clive le collagène I en fragments actifs et régule ainsi l'invasion tumorale (Egeblad, Littlepage, & Werb, 2005), ou encore elle promeut l'angiogénèse en libérant le VEGF associé à la MEC (Lederle et al., 2010; Bergers et al., 2000).

Par ailleurs, une autre étude montre que la MMP3, fortement exprimée par les fibroblastes, peut cliver le domaine extracellulaire de la cadherine E, une protéine impliquée dans l'adhérence intercellulaire, permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'opérer une TME, qui constitue une étape cruciale du processus métastatique (Lochter et al., 1997). Comme autre exemple, on peut citer les MMP2 et les MMP9 sécrétées par les FACs qui dans le cancer de la prostate entraînent la TME des cellules tumorales par régulation de la cadherine E. (Giannoni et al., 2010). Dans chaque cas, l'acquisition par les cellules tumorales du phénotype « mésenchymateux » et « cellule souche » qui découle de l'action des protéases corrèlent avec une capacité invasive et métastatique.

Un autre mode d'action des MMPs lors de l'invasion tumorale est illustré par celui de la MMP1 produite par les fibroblastes infiltrant la tumeur. Les protéines PARs (Proteinase-activated receptors), sont des récepteurs couplés aux protéines G connus pour être actifs lors de l'invasion tumorale après avoir subi un clivage protéolytique. L'expression de PAR1 est augmentée dans de nombreux cancers, tels que les cancers du sein, du colon et des poumons. Grâce à l'utilisation d'un modèle de xénogreffes de cellules de cancer du sein, il a été montré que MMP1, apportée à l'intérieur de la masse tumorale par les fibroblastes infiltrant, clive PAR-1, et par ce biais MMP1 augmente les capacités migratoires et invasives des cellules tumorales (Boire et al., 2005).

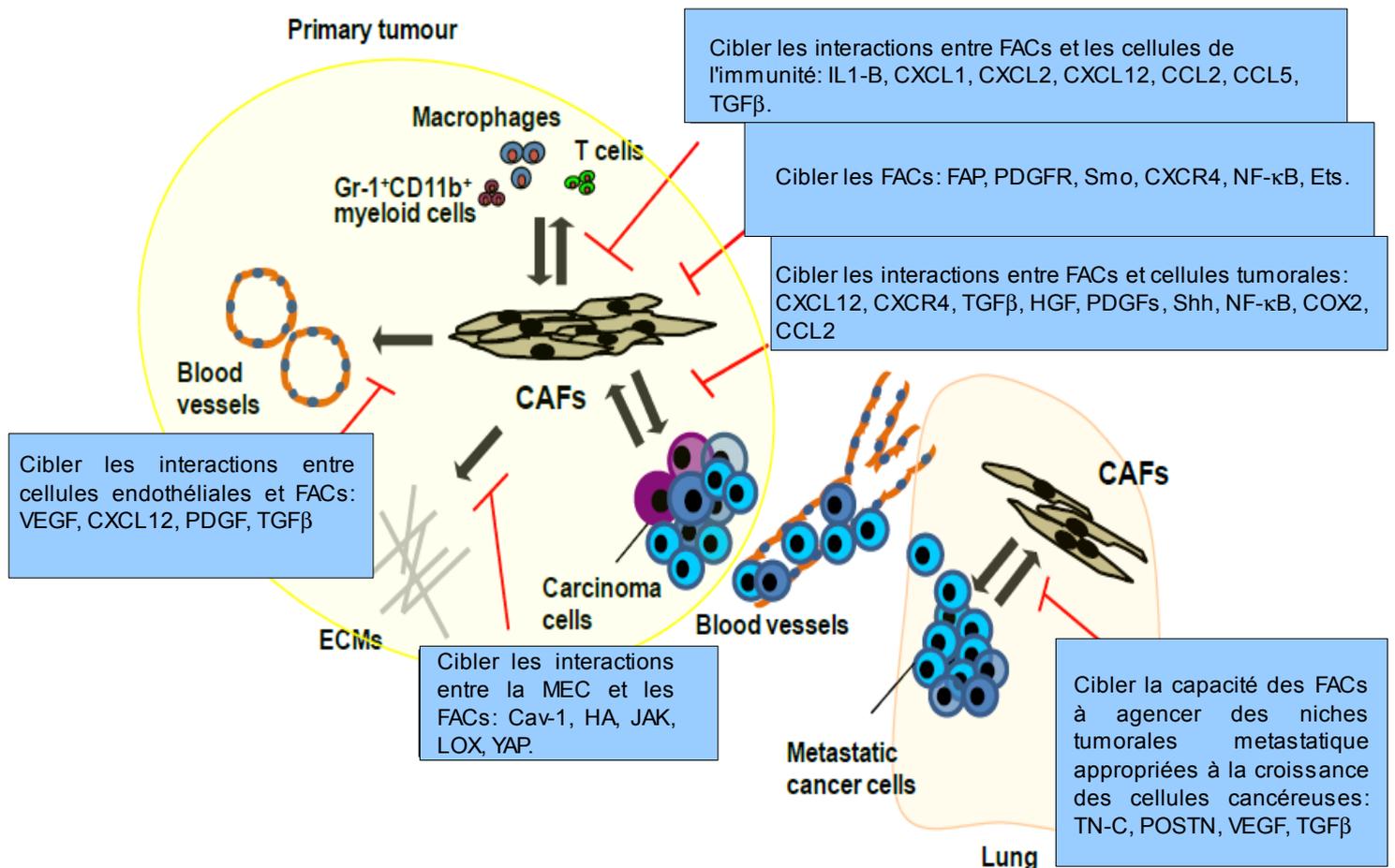


Figure 23. Ciblage des interactions entre les FAPs et leur microenvironnement lors de la progression tumorale.

Le ciblage des FAPs eux mêmes ou de leurs interactions avec les autres cellules et/ou la MEC dans différents modèles murins de carcinogénèse expérimentale a dévoilé des effets anticancéreux prometteurs. En effet, l'inhibition d'expression et/ou de l'activité de FAP, PDGFR, Smo, CXCR4, NF- κ B ou Ets dans les FAPs, permet d'atténuer la croissance et l'angiogénèse tumorale, de faciliter l'accès aux molécules chimiothérapeutiques dans de la tumeur ainsi que de restaurer l'immunité anti-tumorale. Les mêmes effets sont obtenus après blocage des interactions entre les FAPs et les cellules tumorales par les protéines CXCL12, CXCR4, TGF β , HGF, PDGF, Shh, Cox-2, NF- κ B ou CCL2. De plus, l'inhibition de molécules, comme le VEGF, CXCL12, les PDGFs ou encore le TGF β , a permis de minimiser les interactions entre les FAPs et les cellules endothéliales, aboutissant à une inhibition de la neoangiogénèse et de la stabilité des vaisseaux. L'inhibition du dépôt et du remodelage de la MEC par les FAPs par le ciblage de la caveolin-1, de l'acide hialuronique, et de JAK, LOX, YAP, permet de supprimer les capacités invasives et métastatiques des cellules tumorales *in vitro*, dans des modèles d'invasion en 3 dimensions, ou *in vivo*. L'inhibition de l'inflammation tumorale, ainsi que le rôle immunosuppresseur des FAPs via IL1- β , CXCL1, CXCL2, Cox-2, CXCL14, CCL2, CCL5 ou encore le TGF β , permettent de diminuer la progression tumorale. De plus, l'inhibition de TN-C, POSTN, VEGF, ou LOX empêche les FAPs d'agencer un environnement permissif à la formation de métastases (on parle de niches métastatiques). D'après (Togo, Polanska, Horimoto, & Orimo, 2013).

5) Les FACs comme cible thérapeutique.

La contribution des FACs lors des différentes étapes de la carcinogenèse et sur l'efficacité des traitements thérapeutiques en font une cible privilégiée pour le développement de nouveaux traitements anti-cancer utilisé en complément des traitements conventionnels (Hanahan & Coussens, 2012; Valastyan & Weinberg, 2011; Joyce, 2005; Shao et al., 2000; Quail & Joyce, 2013). En effet, cibler les protéines et les voies de signalisations impliquées dans les interactions entre FACs, cellules cancéreuses et les autres composantes du microenvironnement tumoral, pourrait être à l'origine de nouvelle cible thérapeutique pour les raisons suivantes:

-Les FACs participent activement à la progression tumorale comme nous l'avons décrit précédemment.

-Les FACs ne présentent pas d'anomalie génétique et les différences d'expression de gènes observés entre le stroma normal et tumoral peuvent donc faire l'objet de nouvelles cibles thérapeutiques.

-L'acquisition de nouvelles mutations génétique par les cellules stromales semble être minime et reste controversé, ainsi les FACs pourrait être moins enclins à échapper aux thérapies ou développer des résistances par instabilité génomique.

-Les thérapies anti-tumorales actuelles, chimiothérapie et radiothérapie, sont souvent associés à une augmentation de la fibrose tumorale qui bloque l'efficacité des traitements (Harless, 2009).

-Les FACs sécrètent des cytokines/facteurs de croissance qui interfèrent avec l'efficacité des thérapies anti-tumorale (se référer à la partie IIB3c [« FACs et efficacité des traitements chimiothérapeutiques »](#)).

-Les FACs participent à la diminution d'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale (B. Zhang, 2008)

-Il existe une corrélation négative entre l'ampleur de la réaction desmoplasmiqme et la survie des patients dans un certain nombre de cancers (Maeshima et al., 2002).

Les différentes approches possibles visant à cibler les FACs dans le traitement des cancers, ainsi que les voies de signalisation/molécules pouvant être ciblées sont représentées figure 23. Un résumé des études ciblant spécifiquement les FACs lors de tumorigenèse est représenté dans la figure 24.

Protéines et Voies de signalisation	Molécules utilisées.	Effets
FAP	-Sibrotuzumab (anticorps anti-FAP) (Scott et al., 2003), (Hofheinz et al., 2003) -FTPD et FAP5-DM1 (anticorps anti-FAP couplé a des agents anti-tumoraux.) (Ostermann et al., 2008) -Val-boro Pro (Talabostat) (Narra et al., 2007), (Eager et al., 2009) et PT630 (Santos, Jung, Aziz, Kissil, & Pure, 2009) (inhibiteurs chimiques de FAP). -Pro-drogues. (Huang et al., 2011) -Vaccin à ADN. (Liao, Luo, Markowitz, Xiang, & Reisfeld, 2009), (Loeffler, Kruger, Niethammer, & Reisfeld, 2006).	Augmente l'immunité anti-tumorale.
SDF1/CXCR4	-Anticorps bloquant dirigés contre SDF1 (Orimo et al., 2005).	Diminue l'angiogénèse et la croissance tumorale
HGF/Met	-GDC-0712 (petite molécule inhibitrice de Met (Wilson et al., 2012) . -NK4 (antagoniste de l'HGF) (Wang et al., 2009). - Anticorps bloquant dirigés contre l'HGF (Wang et al., 2009)	Diminue la résistance Innée aux drogues de chimiothérapie
Shh/Smo	-IPI-926, HhAntag, MS-0022 (inhibiteur de Smo) (Olive et al., 2009), (Yauch et al., 2008), (Strand et al., 2011) -SE1 (anticorps bloquant dirigé contre Shh) (Yauch et al., 2008), (Bailey, Mohr, & Hollingsworth, 2009)	Permet une meilleure distribution des drogues de chimiothérapie au sein de la tumeur.
	-Vismodegib (antagoniste de Smo) (Lee et al., 2014) -IPI-926 (inhibiteur de Smo) (Rhim et al., 2014)	Augmente l'agressivité des tumeurs pancréatique
PDGF/PDGFR	-Imatinib (Inhibiteur de tyrosine kinase) (Pietras, Pahler, Bergers, & Hanahan, 2008). -Anticorps bloquant du PDGF-C (Crawford et al., 2009).	Permet une meilleure distribution des drogues de chimiothérapie au sein de la tumeur via une Diminution de la pression Interstitielle des vaisseaux.
Acide Hyaluronique	-PEGPH20 (Provenzano et al., 2012)	
TGFβ/TGFβR	- Anticorps bloquant du TGFβ (1D11) (Sounni et al., 2010), (Akhurst & Hata, 2012), (Liu et al., 2012). -Antagonist du TGFβR1 (Kano et al., 2007), (Sounni et al., 2010).	Augmente la perméabilité des vaisseaux et favorise une meilleure distribution des drogues de chimiothérapies
	-SB431542 (inhibiteur du TGFβR1) (Mordasky Markell, Perez-Lorenzo, Masiuk, Kennett, & Glick, 2010)	Réprime la formation de papillomes et favorise une tumorigénèse invasive dans un modèle murin de carcinogénèse induite chimiquement.

Figure 24. Résumé des études cliniques et pré-cliniques ciblant les FACs lors de la carcinogénèse.

Les facteurs de croissance de la famille du PDGF sont impliqués dans le recrutement et l'activation des FACs lors de la tumorigenèse (Ostman & Heldin, 2007; Andrae, Gallini, & Betsholtz, 2008). Le ciblage des récepteurs du PDGF à la surface des cellules stromales permet en effet d'améliorer l'assimilation des drogues chimiothérapeutiques (Pietras et al., 2001; Pietras et al., 2002), et de diminuer significativement la croissance tumorale dans des modèles de cancer colorectal et du col de l'utérus (Pietras, Pahler, Bergers, & Hanahan, 2008; Kitadai et al., 2006). De nombreux inhibiteurs de l'activité kinase du PDGFR, tel que l'Imatinib, le Sorafenib, le Sunitinib sont actuellement en cours de développement clinique. Cependant, leur contribution dans le ciblage des cellules stromales n'est pas encore connue. Le rôle des membres de la famille du TGF β dans le recrutement et l'activation des cellules stromales est aussi abondamment documenté (Naber, ten Dijke, & Pardali, 2008). Pourtant, les thérapies anti-TGF β se sont soldées par des échecs qui peuvent être expliqués par le rôle complexe de cette voie de signalisation lors de la croissance tumorale (Massague, 2008). Son ciblage dans les FACS a amené à des effets tantôt pro- tantôt anti- tumoraux (Berking et al., 2001; Tuxhorn, McAlhany, Yang, Dang, & Rowley, 2002; Bhowmick, Chytil, et al., 2004; Cheng, Chytil, Shyr, Joly, & Moses, 2007). La voie de signalisation Hh/Smo vient d'être identifiée comme étant une nouvelle cible thérapeutique anti-tumorale par une étude dans laquelle l'inhibition de hedgehog par différents moyens, molécules inhibitrices, anticorps bloquants dirigés contre Hh ou déplétion génétique de Smo, entraîne une réduction de la croissance tumorale dans différents modèles de xénogreffes. De manière intéressante, les auteurs montrent que l'effet thérapeutique est direct sur les cellules stromales alors que les cellules cancéreuses ne répondent pas à cette voie de signalisation (Yauch et al., 2008). Cependant, comme discuté précédemment (voir chapitre IIB2c [« Activation des FACs »](#) et chapitre IIB3c [« FACs et efficacité des traitements chimiothérapeutiques »](#)), des études plus récentes remettent en cause le ciblage de cette voie de signalisation dans les cancers pancréatiques, qui après une inhibition chronique se solderait par une carcinogenèse plus agressive (Rhim et al., 2014; J. J. Lee et al., 2014).

Dans la littérature, d'autres exemples d'études des effets du ciblage des FACs lors de la carcinogenèse portent sur l'expression de la protéine FAP. Comme déjà mentionné, les FACs peuvent être caractérisés par l'expression de la protéine FAP, protéine transmembranaire à activité serine protéase. L'expression de cette protéine a été utilisée pour cibler les FACs dans différents modèles murins de carcinogenèse. Dans des modèles murins syngéniques de cancer du poumon et du colon, les souris invalidées

génétiqnement pour l'expression de la protéine FAP présentent une tumorigénicité plus faible que les animaux de départ (Santos et al., 2009). Loeffler et al ont utilisé un vaccin à ADN ciblant FAP pour éliminer les FACs du microenvironnement tumoral. Dans un modèle orthotopique de cancer du sein, l'administration orale du vaccin supprime la néo-angiogénèse, la croissance tumorale et la formation de métastases. Ces effets sont associés à une diminution du dépôt de collagène I ainsi qu'au recrutement de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ au sein de la tumeur (Loeffler et al., 2006). De plus, l'administration de ce vaccin en combinaison avec la Doxorubicine allonge la survie des souris grâce à une meilleure répartition de la Doxorubicine au niveau intra-tumoral (D. Liao et al., 2009). Ensemble, ces résultats montrent l'importance du ciblage des FACs dans la modulation de l'immunosuppression tumorale et une meilleure efficacité des traitements chimiothérapeutiques classiques. Le rôle biologique des cellules fibroblastiques FAP positive a été étudié grâce à l'utilisation d'un modèle de souris transgénique exprimant le récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de FAP. Les cellules exprimant FAP ont pu être éliminées spécifiquement par l'administration de la toxine diphtérique à des souris transgéniques atteintes de cancer du poumon de Lewis dont les cellules tumorales expriment l'ovalbumine, ce qui le rend immunogéniques. Les résultats de cette expérience montrent une nette diminution de la croissance tumorale due à une nécrose hypoxique affectant les cellules tumorales et stromales. De plus, l'administration d'anticorps bloquant le TNF-alpha (tumor necrosis factor alpha) ou l'interféron-gamma permet de restaurer la croissance tumorale, ce qui révèle un rôle primordial des fibroblastes dans la modulation de la cytotoxicité de ces cytokines sur les cellules de carcinomes (Kraman et al., 2010). Ces résultats montrent que les FACs qui expriment la sérine protéase FAP jouent un rôle immunosuppressif lors de la carcinogénèse des tumeurs immunogéniques. L'expression de FAP dans les cellules fibroblastiques du microenvironnement tumoral, ainsi que l'activité enzymatique unique de cette protéine a permis le développement de pro-drogues. Ces dernières sont composées d'agents cytotoxiques couplés à un peptide contenant le site de clivage par FAP. Une fois ce peptide clivé par les cellules exprimant FAP, les cytotoxines associés sont relargués et ciblent les cellules tumorales et stromales à proximité. L'administration de Doxorubicine et de Protoxine conjuguées à ce peptide permet d'augmenter les effets anti cancéreux des médicaments sans survenu d'effets secondaires (S. Huang et al., 2011; LeBeau, Brennen, Aggarwal, & Denmeade, 2009). Ces résultats du ciblage spécifique des FACs via

l'expression de la protéine FAC doivent cependant être vérifiés dans d'autres modèles de carcinogénèse murins.

6) Conclusion.

La mise en place progressive d'un microenvironnement pro-tumorale joue un rôle majeur dans la prolifération, la survie et l'invasion des cellules cancéreuses. Les interactions complexes et la synergie des compartiments de la tumeur, à savoir les cellules tumorales, le stroma environnant, et la MEC qui les entoure, contribuent à la création du microenvironnement dont les capacités pro-tumorales sont amplement démontrées à la fois *in vitro* et *in vivo*.

La capacité des cellules tumorales à s'affranchir de la tumeur primaire dépend en partie, du remodelage de la MEC environnante et notamment de la création de chemins d'invasion creusés par les FACs. La constitution par les FACs d'une matrice permissive à l'invasion tumorale requiert une sécrétion accrue de protéines matricielles et leur agencement dans une MEC pathologique par l'action coordonnée des MMPs, des intégrines et par la génération de forces contractiles par les cellules fibroblastiques. A la lumière des découvertes récentes, la compréhension des interactions complexes établies non seulement entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, mais aussi la mise à jour des mécanismes gouvernant le remodelage matricielle pathologique ou physiologique (cicatrisation) impliquant respectivement les FACs et les fibroblastes normaux demeurent un enjeu crucial pour le développement de thérapies anti-invasive et anti-métastatique.

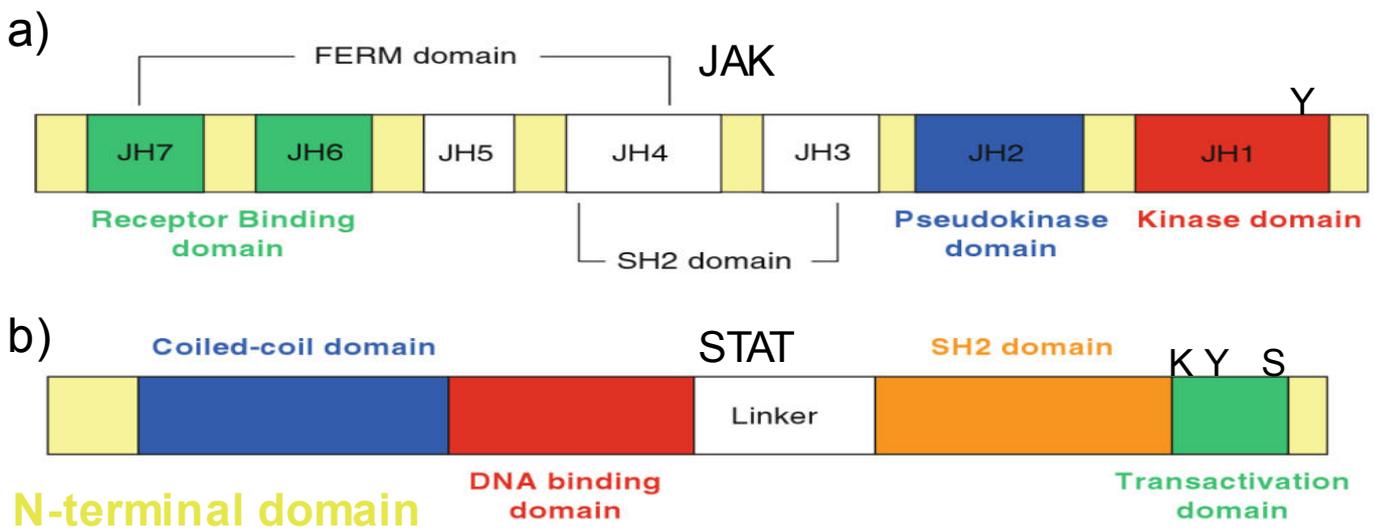


Figure 25. Représentation schématique de la structure des kinases JAK et des facteurs de transcription STAT.

-a) Les kinases JAK (JAK1, 2, 3 et TYK2) sont constituées de 1130-1142 acides aminés et elles comportent sept domaines d'homologie appelés JAK Homology. (JH1-7). Le domaine JH1 est le domaine catalytique. Il contient des tyrosines conservées (Y) impliquées dans l'autorégulation de l'activité kinase. Le domaine JH2, ou domaine pseudo-kinase, présente certaines caractéristiques structurales des domaines kinases classiques, et, bien que dépourvu d'activité catalytique propre, il est nécessaire à la fonction catalytique des JAKs (Rane & Reddy, 2000; Saharinen, Takaluoma, & Silvennoinen, 2000). Cette régulation est négative dans le cas de JAK2, puisque la délétion de JH2 ou la mutation V617F entraîne une hyper activation de cette kinase (Saharinen et al., 2000; Bandaranayake et al., 2012), alors qu'elle semble être positive dans les cas de JAK3 et de Tyk2, puisque la délétion du domaine JH2 inhibe leur activité enzymatique in vitro (Yeh, Dondi, Uze, & Pellegrini, 2000; Chen et al., 2000). Le domaine JH2 de JAK1, JAK2 et JAK3 s'associe avec les facteurs de transcription de la famille STATs (Arora et al., 2003; Clevenger, 2004). Les domaines terminaux allant de JH3 à JH7 sont impliqués dans l'association des JAK aux récepteurs de cytokines. La région N-terminale des JAK diverge selon les membres de la famille et semble être à l'origine de la spécificité de l'association des JAK avec différents récepteurs (Ihle, 2001; Ward, Touw, & Yoshimura, 2000). Des études structurales ont montré que les domaines JH3 et JH4 possèdent des similitudes avec les domaines de type SH2 (Src-homology domain) (Haan, Kreis, Margue, & Behrmann, 2006). Les domaines JH4 à JH7 constituent un motif FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) impliqué dans des interactions protéine-protéine (Giordanetto & Kroemer, 2002). Ce motif FERM est essentiel à l'interaction entre JAK1 et la partie intracytoplasmique des récepteurs aux cytokines comme gp130, le récepteur des cytokines de la famille de l'IL-6 (Hilkens et al., 2001)

- b) Les 7 membres de la famille STAT (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) sont des protéines de 748-781 résidues et possèdent une structure commune organisée en six domaines: un domaine N-terminal, impliqué dans l'interaction entre deux dimères de STATs (Yu & Jove, 2004), et aussi dans l'interaction avec les histones-acétylases (Horvath, 2000) et les protéines de la famille PIAS (Shuai, 2000); un domaine « coiled-coil », permettant l'interaction avec d'autres protéines (X. Xu, Sun, & Hoey, 1996; Levy & Darnell, 2002), participe aussi à l'ancrage des STATs inactives sur le récepteur et ainsi à leur phosphorylation sur résidu tyrosine (T. Zhang, Kee, Seow, Fung, & Cao, 2000; Ma, Zhang, Novotny-Diermayr, Tan, & Cao, 2003); un domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain), permettant aux STATs de se fixer sur des séquences palindromique consensus de type TTCN(3-4)GAA (séquences GAS pour Gamma Activated Sequence) (Darnell, 1997); un domaine linker, de fonction inconnue, mais nécessaire à la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de STAT1 en réponse à l'IFN-g (Yang et al., 2002); un domaine SH2 permettant l'interaction avec des tyrosines phosphorylés sur les récepteurs, les JAKs ou les STATs pour une homo- ou hétéro-dimérisation (Hebenstreit et al., 2006); un domaine C-terminal transactivateur de la transcription (TAD) comportant les sites majeurs de phosphorylation et acétylation impliqués dans l'activation de la protéine, notamment la tyrosine (Y) 705 (qui permet la dimérisation de la protéine, sa translocation nucléaire et sa fixation à l'ADN (Ihle, 1995), la serine (S) 727 (indispensable à l'activité transcriptionnelle (Wen, Zhong, & Darnell, 1995) et la lysine (K) 685 (qui régule la dimérisation, augmente la fixation à l'ADN et l'activité transcriptionnelle (Yuan, Guan, Chatterjee, & Chin, 2005) dans STAT3. D'après Jak-Stat Signaling : From Basics to Disease publié par Thomas Decker, Mathias Müller

III] Inflammation et cancer.

A) Généralités.

L'inflammation chronique est un facteur important de risque de développement de carcinomes, et réciproquement, les carcinomes sont souvent associés à une inflammation chronique des tissus (H. Yu, Pardoll, & Jove, 2009; Jarnicki, Putoczki, & Ernst, 2010). En effet, l'inflammation favorise toutes les étapes de la progression tumorale, telle que l'initiation, la croissance, la survie ainsi que les capacités métastatiques des cellules tumorales (S. I. Grivennikov et al., 2010). Dans ce contexte, l'existence d'un dialogue moléculaire entre les différentes populations cellulaires du microenvironnement tumorale et faisant intervenir les voies de signalisation JAK/STAT, du TGF β et du facteur de transcription NF- κ B a été établie (Fan, Mao, & Yang, 2013; Brierie & Moses, 2010; S. I. Grivennikov & Karin, 2010). Au cœur de l'inflammation tumorale on retrouve principalement les cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-6, responsables de l'activation des kinases JAKs et des facteurs de transcription STATs. Des schémas illustrant cette voie de signalisation à laquelle je me suis particulièrement intéressé lors de ma thèse, ainsi que les mécanismes de sa régulation positive et négative sont représentés dans les figures 25 à 28.

De nombreuses études ont mis en évidence la relation entre l'activation constitutive de la voie JAK/STAT et le processus d'oncogenèse. En accord avec le fait que STAT3 régule la transcription de gènes impliqués dans la survie, la prolifération, l'apoptose et la différenciation des cellules, son activation continue est retrouvée dans un grand nombre de cancers circulants et solides. L'activation constitutive de la voie de signalisation JAK/STAT est courante dans les cancers épithéliaux tels que les cancers du sein, du colon, du foie et les différents cancers de la peau (carcinomes spinocellulaires, basocellulaires et mélanomes). Par exemple, des mutations activatrices de gp130 sont à l'origine de tumeurs hépatiques (Rebouissou et al., 2009). L'activation constitutive du facteur de transcription STAT3 dans les cancers est un phénomène très décrit (H. Yu et al., 2009; Bowman, Garcia, Turkson, & Jove, 2000), cependant l'activation constitutive de cette protéine est presque exclusivement secondaire et consécutive à l'activation d'acteurs en amont (Sano et al., 2005; Bowman et al., 2001; Xie et al., 2006; H. Yu & Jove, 2004), comme les kinases JAKs, ou encore les oncogènes de la famille Src (C. L. Yu et al., 1995; Turkson et al., 1998), Abl (Carlesso, Frank, & Griffin, 1996) et Ras (Garcia et al., 1997).

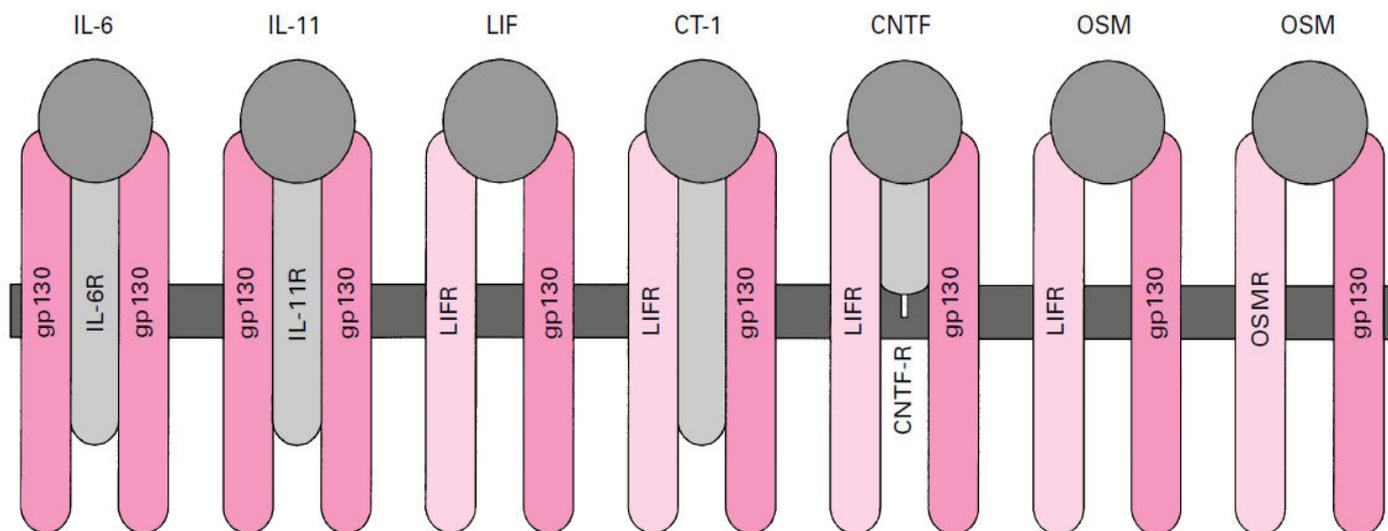


Figure 26. Récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 (IL6; IL11; LIF (Leukemia Inhibitory Factor); OSM (Oncostatin M); G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) et CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor); CT-1 (Cardiotrophin-1) utilisent des variétés de combinaisons des sous-unités réceptrices pour entraîner une réponse biologique. Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont représentées par des ronds gris. Les sous unités transductrices du signal (gp130, LIFR, OSMR), sont représentés en rose, alors que les sous unités non transductrices, impliqué dans la reconnaissance et la fixation du ligand sont représentés en gris. Les sous unités transductrices du signal sont retrouvés dans tous les complexes multiprotéiques qui servent de récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6 et sont impliqués dans l'activation intracellulaire de la voie de signalisation JAK/STAT via leur liaison avec les kinases JAKs (Heinrich et al., 1998; Heinrich et al., 2003).

D'après (Heinrich et al., 1998)

Récemment, Lee et al ont dévoilé un des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation constitutive de STAT3 dans les tumeurs épithéliales. Les auteurs montrent que la surexpression de S1PR1 (Sphingosine 1 Phosphate Receptor 1) dans les cellules tumorales est associée à l'activation constitutive de la kinase JAK2 et du facteur de transcription STAT3. S1PR1 étant une cible transcriptionnelle de STAT3, tout comme l'IL-6, cette boucle autocrine d'activation participe à la croissance des cellules tumorales et à l'acquisition du phénotype métastatique (H. Lee et al., 2010).

Les agents infectieux responsables de l'inflammation chronique et du déclenchement des tumeurs font généralement intervenir l'activation de STAT3 et son potentiel oncogénique comme dans le cas d'infection par *H. pylori*, ou *Bacteroides fragilis*, qui sont respectivement associés aux cancers de l'estomac et du colon (Bronte-Tinkew et al., 2009; S. Wu et al., 2009) ou après infection par le virus de l'hépatite B et C, le papillomavirus ou encore le virus d'Epstein-Barr (Choudhari et al., 2007; S. Sun & Steinberg, 2002; Muromoto et al., 2009). En accord avec ces observations, dans un modèle murin de cancer colorectal associé aux colites induites chimiquement, la déplétion génétique de STAT3 dans les cellules épithéliales de l'intestin diminue l'incidence et la croissance des tumeurs (Bollrath et al., 2009).

L'inflammation chronique consécutive à la formation des tumeurs fait également intervenir le facteur de transcription STAT3 qui induit la transcription d'un panel de gènes impliqués dans la réaction inflammatoire. Parmi ces gènes, les cytokines de la famille de l'IL-6 permettent une activation autocrine de cette voie (Q. Chang et al., 2013). Des cytokines et chemokines comme l'IL-6, l'IL-1 β , le M-CSF (Macrophage Colony-stimulating factor), les prostaglandines et COX2, sont cruciales dans l'induction et le maintien d'un environnement inflammatoire autant que STAT3 est crucial dans la régulation de leur expression (Mantovani, Allavena, Sica, & Balkwill, 2008).

B) Inflammation et microenvironnement tumoral.

La sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules du stroma tumorale, et plus particulièrement les cellules du système immunitaire constitue un autre moyen d'activation de la voie de signalisation JAK/STAT dans les cellules tumorales (H. Yu, Kortylewski, & Pardoll, 2007). Ceci entraîne une boucle autocrine d'activation impliquant l'activation de STAT3 entre les cellules tumorales et les cellules stromales les entourant. Par exemple, dans un modèle murin de cancer colorectal associé aux colites, la sécrétion d'IL-6 par les

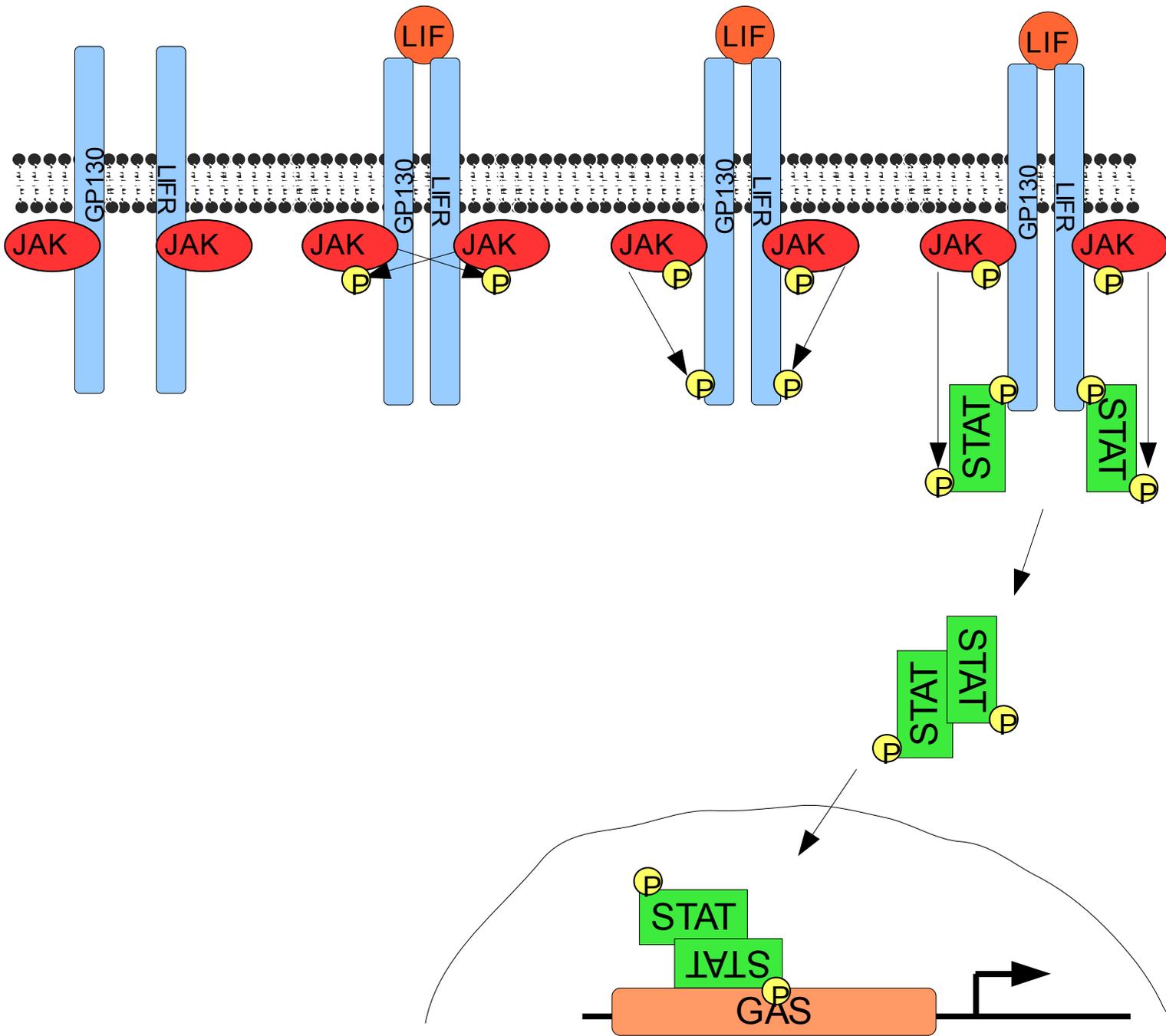


Figure 27. Activation de la voie de signalisation JAK/STAT par les cytokines de la famille de l'IL-6: exemple de LIF.

La fixation de la cytokine LIF à son récepteur entraîne la dimérisation des protéines transductrices du signal GP130 et LIFR, ce qui permet aux JAKs associées de s'activer par transphosphorylation sur tyrosine. Les JAKs alors activées phosphorylent la queue cytoplasmique de GP130 et LIFR sur tyrosine, créant ainsi des sites d'ancrage pour les protéines STATs via leur domaine SH2. Les STATs sont à leur tour activés par phosphorylation sur tyrosine par les JAKs. Les STATs activés s'homo- ou hétéro-dimérisent (par interaction réciproque du domaine SH2 de l'une et la phosphotyrosine de l'autre) et transloquent dans le noyau où elles régulent la transcription de gène par leur fixation sur les séquences consensus de type GAS.

cellules hématopoïétiques (macrophages, cellules dendritiques, et lymphocytes T) favorise la survie et la prolifération des cellules tumorales (S. Grivennikov et al., 2009). L'activation de STAT3 est également observée dans les cellules stromales de la moelle osseuse et est associée à une forte sécrétion d'IL-6 dans le microenvironnement des myélomes multiples. La sécrétion de cette cytokine est responsable de l'activation constitutive de STAT3 dans les cellules tumorales et stromales via une boucle d'activation autocrine (Shain et al., 2009). En accord avec ces exemples, STAT3 est constitutivement actif dans la majeure partie des cellules immunitaires de l'infiltrat tumorale et semble être à l'origine d'un défaut de la surveillance immunitaire. En effet, l'ablation génétique de STAT3 dans les cellules hématopoïétiques permet d'augmenter l'immunité anti-tumorale et ainsi la régression de la tumeur dans un modèle de xénogreffes (Kortylewski et al., 2005). De même, l'activation constitutive de STAT3 dans les cellules tumorales est à l'origine de la sécrétion d'un panel de facteurs qui bloquent la maturation des cellules dendritiques, ainsi que la réponse immunitaire Th1 (T helper), ce qui permet l'échappement de la tumeur aux systèmes de surveillance (T. Wang et al., 2004). Comme dans les cellules tumorales, l'activation constitutive de STAT3 dans les cellules immunitaires implique le récepteur S1PR1. L'activation de la signalisation S1PR1/STAT3 dans les cellules tumorales est en effet à l'origine de la sécrétion de facteur responsable de la surexpression de cette même voie dans les cellules myéloïdes (H. Lee et al., 2010). Ce mécanisme permet la colonisation des organes métastatiques par les cellules myéloïdes, et la création d'une niche assurant la survie et la prolifération des cellules tumorales (Deng et al., 2012). Chez le fibroblaste, une signature pro-inflammatoire et le phénotype « FACs » sont très proche, car les FACs présentent une forte sécrétion d'IL-6, d'IL-1 β et de COX2, dépendante de l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Erez et al., 2013; Erez et al., 2010, Raz & Erez, 2013; Giannoni et al., 2011; Giannoni et al., 2010). Dernièrement, Calon et al, ont decelé un dialogue moléculaire oncogénique entre les FACs et les cellules de cancer du colon. La sécrétion de TGF β par les cellules tumorales, une caractéristique des cancers colorectaux, entraîne la sécrétion d'IL-11 par les FACs. En retour, l'IL-11 active la voie de signalisation gp130/JAK/STAT dans les cellules tumorales et confère à ces dernières un avantage de survie aux sites métastatiques (Calon et al., 2012). Tous ces exemples montrent que l'inflammation tumorale et plus particulièrement l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT à la fois dans les cellules tumorales et les cellules stromales est

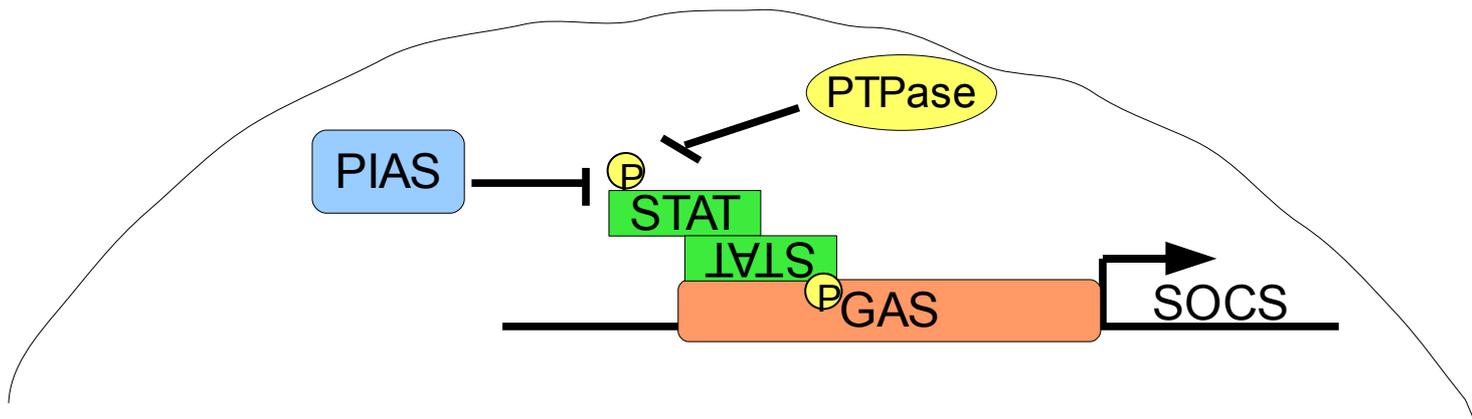
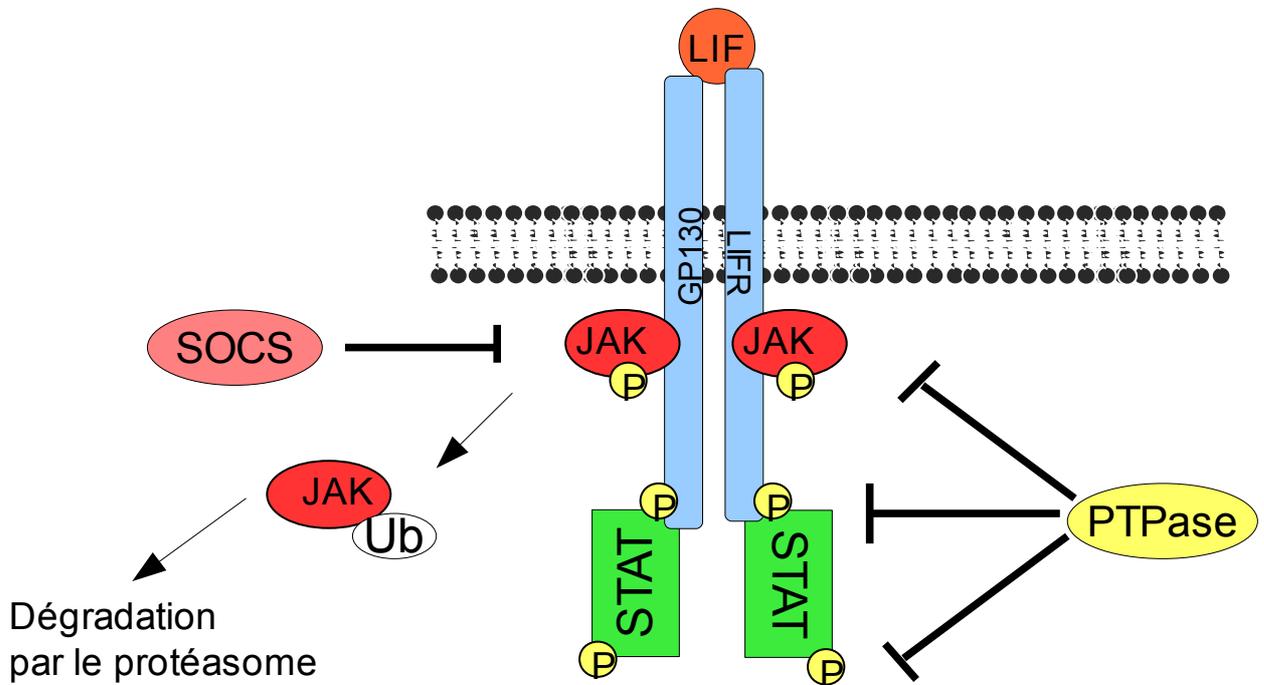


Figure 28. Régulation négative de la voie de signalisation JAK/STAT.

La voie de signalisation JAK/STAT est régulée à différents niveaux. Les acteurs principaux de régulation négative de cette voie de signalisation sont les SOCS (suppressor of cytokine signaling), les PIAS (protein inhibitor of activated STAT) et des tyrosines phosphatase (PTPase) (Greenhalgh & Hilton, 2001). Les PTPases inhibent cette voie en déphosphorylant les JAKs, les STATs ou les récepteurs activés (D. Xu & Qu, 2008). La plus caractérisé est SHP-1 qui contient deux domaines SH2 et peut se fixer à JAK et aux récepteurs phosphorylés pour faciliter leur déphosphorylation. Le mécanisme des PIAS n'est pas encore bien compris, mais ces protéines interagissent avec les STAT activées et empêchent soit leur liaison à l'ADN, soit leur activité transactivatrice, probablement en relation avec leur activité de SUMO-ligase (Rogers, Horvath, & Matunis, 2003). Les PTPases et les PIAS sont constitutivement présentes dans la cellule et constituent un premier niveau de contrôle négatif. Les protéines SOCS constituent un deuxième niveau de contrôle, car elles sont des cibles transcriptionnelles directes des facteurs de transcription STATs en réponse aux stimuli cytokines/facteurs de croissance (Alexander, 2002). Les SOCS se fixent aux JAKs ou aux récepteurs phosphorylés par leur domaine SH2 empêchant le recrutement et l'activation des STATs, inhibant l'activité des JAKs et dégradant les JAKs activés par la voie du protéasome en favorisant l'ubiquitination (Ub) de ces dernières. D'après (Shuai & Liu, 2003)

indispensable à la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire, propices au développement de cancers.

C) Inflammation et fibrose.

Les kinases JAK et les facteurs de transcription STATs semblent également être impliqués dans les pathologies fibrotiques (X. Kong, Horiguchi, Mori, & Gao, 2012). La sclérodermie systémique (ScS) est une affection généralisée des artérioles, des micro-vaisseaux et du tissu conjonctif, caractérisée par une fibrose cutanée. Les fibroblastes isolés de tissus ScS présentent une activation constitutive de la kinase JAK2 dépendante de la voie de signalisation du TGF β . L'inhibition de JAK2 dans ces fibroblastes entraîne une diminution de la production de collagènes et bloque l'activation de fibroblastes normaux en « myofibroblastes ». *In vivo*, le traitement des souris avec la bleomycine induit une fibrose cutanée qui peut être inhibée après blocage pharmacologique de JAK2. Les auteurs montrent également que dans un modèle murin de sclérodermie systémique, l'inhibition de JAK2 réduit la fibrose cutanée associée à cette maladie (Dees et al., 2012). Plus récemment, ces résultats sont confirmés dans la fibrose hépatique. Cette pathologie est associée à une production excessive de MEC due à une sécrétion excessive de CTGF (Connective Tissue Growth Factor) après activation des cellules stellaires en myofibroblastes. L'activation de ces cellules par le TGF β est dépendante de mécanismes transcriptionnels et de l'activation de la kinase JAK1 et du facteur de transcription STAT3 qui régule l'expression de CTGF (Liu et al., 2013). De même, la déplétion génétique de STAT3 dans les cellules stellaires ralentit la fibrose hépatique induite chez les souris traitées au tétrachlorure de carbone CCl₄ (Meng et al., 2012).

La myélofibrose est un envahissement de la moelle osseuse par du tissu fibreux déposé par les fibroblastes et qui empêche la formation normale des éléments sanguins par la moelle osseuse. Dans 50% des cas, l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK/STAT est associée à la mutation JAK2V617F dans les cellules souches hématopoïétiques responsable de leur expansion clonale, et de l'activation paracrine des fibroblastes. Ainsi, le Ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1 et JAK2, a récemment été mis sur le marché pour soigner cette affection. Ce médicament pris en continu par voie orale peut

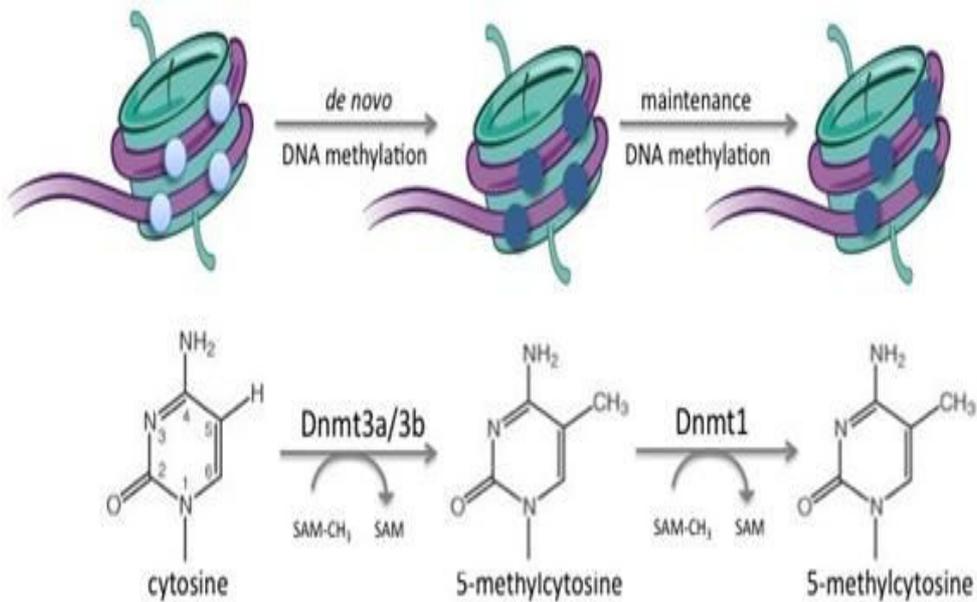


Figure 29. Les ADN méthyltransférases.

Les ADN méthyltransférases ou DNMT sont des enzymes qui assurent l'addition d'un groupement méthyl-CH₃ sur les cytosines de l'ADN à partir d'un donneur : la S-adosyl-méthionine (SAM-CH₃). DNMT3a et DNMT3b sont impliqués dans la méthylation *de novo* des séquences régulatrices de l'expression des gènes. Une fois le profil de méthylation mis en place, DNMT1 permet son maintien au cours des divisions cellulaires.

réduire la splénomégalie et améliorer la qualité et la durée de vie des patients (Harrison et al., 2012).

IV) Epigénétique et cancer.

A) Méthylation de l'ADN, généralités.

La méthylation de l'ADN est un phénomène épigénétique, réversible, transmis au cours des divisions cellulaires. Elle repose sur l'action des enzymes ADN méthyltransférases (DNMT pour DNA Methyl Transferase) qui catalysent le transfert de groupes méthyles d'une S-adénosylméthionine sur des résidus cytosines (majoritairement en position C5) ou des adénines (généralement en N6) (figure 29). Les cytosines méthylées les plus connues précèdent un résidu guanine dans des dinucléotides CpG (Cytosine phosphate Guanine). La présence de cytosines méthylées dans la séquence promotrice d'un gène indique généralement une répression transcriptionnelle. Les mécanismes associés sont représentés dans la figure 30.

Les DNMT comprennent généralement deux domaines : un domaine carboxy-terminal catalytique très conservé et un domaine amino-terminal régulateur plus variable (Ooi, O'Donnell, & Bestor, 2009). On peut différencier deux types de méthylation (Kinney & Pradhan, 2011) (figure 29):

- La méthylation *de novo*, catalysée par DNMT3a et b, permet la mise en place de nouveaux patrons de méthylation en ajoutant des groupements méthyles sur les 2 brins d'ADN. Ce processus est fréquemment observé lors de l'embryogénèse et la gamétogénèse.

- La méthylation de maintenance, catalysée par DNMT1, permet la maintenance des profils de méthylation au cours des divisions cellulaires. Lors de la réplication de l'ADN, la méthylation du brin matrice est lue et reproduite par DNMT1 sur le brin néo synthétisé. Ce processus permet la transmission de la mémoire épigénétique.

Une grande majorité (80 %) des dinucléotides CpG étant méthylés, le génome est considéré globalement hyperméthylé. Les dinucléotides CpG peuvent être concentrés en « îlots CpG », des séquences d'au moins 200 paires de bases avec un contenu en G/C d'au moins 50% et un contenu en CpG statistiquement supérieur à la moyenne (Gardiner-

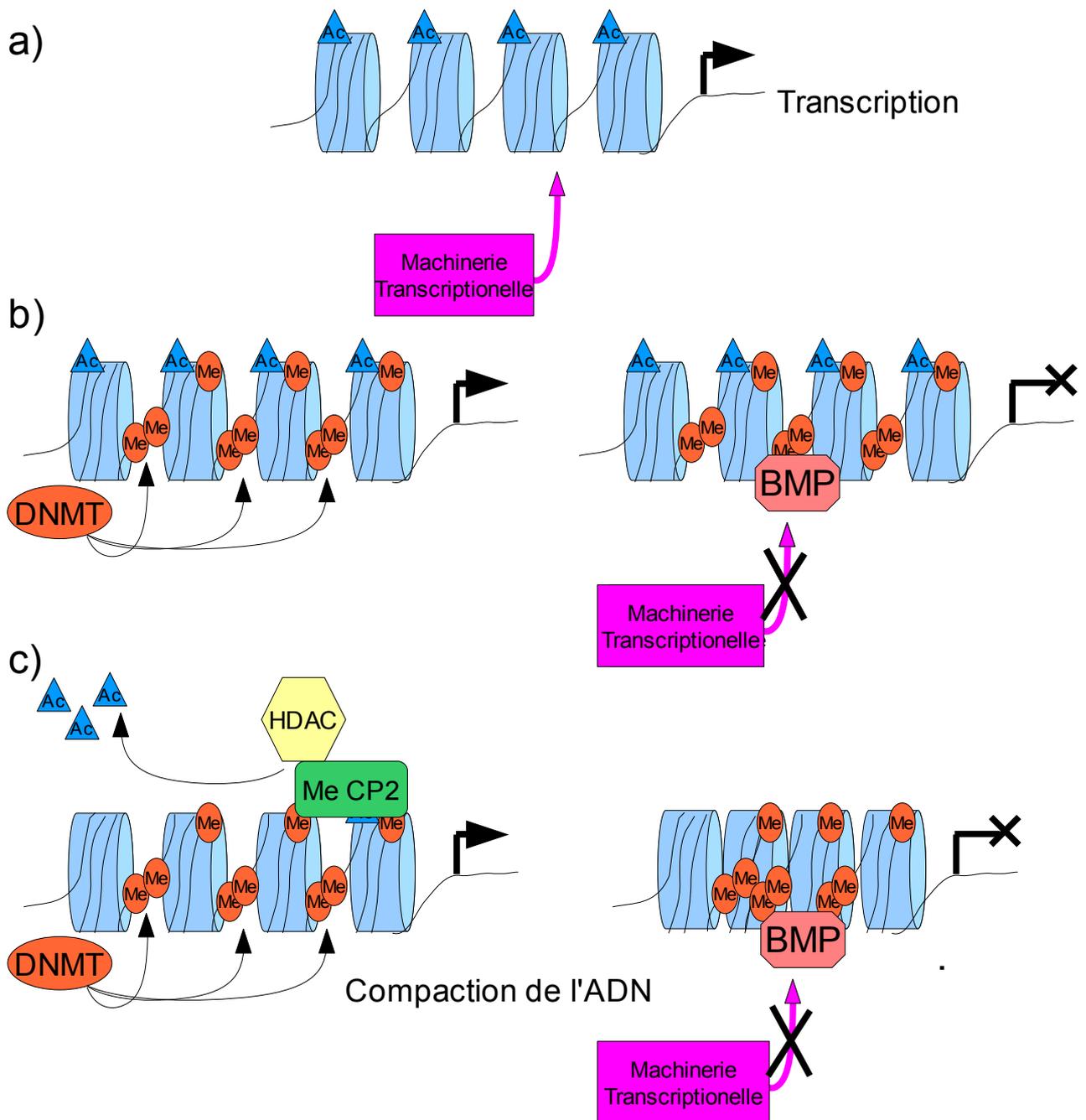


Figure 30. Mécanismes de répression de la transcription par les ADN méthyltransférases.

-a) L'acétylation des histones au niveau des promoteurs des gènes est généralement associée à une activation de la transcription, la chromatine étant décondensée et accessible à l'ARN polymérase et aux protéines de la machinerie transcriptionnelle.

-b) La méthylation de l'ADN sur cytosines dans les séquences promotrice des gènes entraîne la répression de la transcription par différents mécanismes: La présence des groupements méthyles affecte directement la liaison des facteurs de transcription sur l'ADN et permet le recrutement des répresseurs de la famille des MBP (methyl binding protein), qui, en se liant au groupement méthyles, bloque l'accès à la machinerie transcriptionnelle (Smith & Meissner, 2013).

-c) Une autre protéine de la famille des MBP, Me CP2 (methyl cytosine-binding protein), en se fixant au groupe méthyle recrute des complexes multiprotéiques contenant notamment des histones désacétylases (Kimura & Shiota, 2003). Ces dernières désacétylent les histones, ce qui entraîne une compaction de la chromatine qui bloque l'accès à la machinerie transcriptionnelle.

Garden & Frommer, 1987). Ils sont majoritairement (70-80 %) localisés dans les régions situées en 5' des gènes, au niveau des promoteurs. Contrairement au reste du génome, dans ces îlots, 80% des dinucléotides CpG ne sont pas méthylés. De ce fait, le génome est dit hyperméthylé globalement, et hypométhylé localement au niveau des îlots CpG.

B) Méthylation de l'ADN et cancer.

De plus en plus, on se rend compte que, dans le développement de cancers, des aberrations épigénétiques, notamment au niveau de l'acétylation des histones et de la méthylation de l'ADN, constituent une voie alternative aux mutations génétiques. Aujourd'hui, on sait que la méthylation de l'ADN est impliquée dans plus de 65% des cancers (Das & Singal, 2004; Kulis & Esteller, 2010). Le génome des tumeurs ou de tissus hyperplasiques pré-tumoraux est hypométhylé globalement et hyperméthylé localement (Counts & Goodman, 1995; Feinberg & Tycko, 2004). Au cours de la tumorigénèse, deux sortes d'aberrations de la méthylation de l'ADN ont été décrites (Robertson, 2005) :

- l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs, qui sont par conséquent anormalement réduits au silence et ne peuvent donc plus freiner la croissance tumorale.
- l'hypométhylation du génome conduisant à une instabilité chromosomique ou à l'expression d'oncogènes.

C) Méthylation de l'ADN et fibroses.

Bien que dans le cas des cellules du microenvironnement tumoral la présence et le rôle de modifications épigénétiques soient encore peu documentés, une accumulation de plus en plus conséquente de preuves indique que ces modifications constituent des événements importants dans l'activation des fibroblastes lors des fibroses touchant différents organes. En effet, le remodelage excessif de la matrice extracellulaire est fréquemment observé dans de nombreuses variétés de tumeurs solides et de fibroses (Wynn & Ramalingam, 2012; Zeisberg & Kalluri, 2013). Ceci corrèle avec l'observation que les FACs partagent de nombreuses caractéristiques avec les fibroblastes isolés à partir de tissus fibrotiques. Ces caractéristiques étant conservées chez les FACs et les fibroblastes fibreux après leur isolation *in vitro*, cela pourrait refléter l'acquisition d'une « mémoire épigénétique » par ces cellules (Bechtel et al., 2010; Gaggioli et al., 2007; Ostman & Augsten, 2009).

Ainsi, il a récemment été mis en évidence que la fibrose rénale est induite par modifications épigénétiques des fibroblastes résultant en un état d'activation constitutif, impliquant la méthylation, et donc l'inhibition de l'expression du gène *Rasa1* (Ras protein activator like 1), un inhibiteur de l'oncogène Ras, par l'ADN méthyltransférase DNMT1. Aussi, dans un modèle de fibrose rénale chez la souris, l'inhibition de DNMT1 par le 5'-azacytidine (5'-aza) entraîne une diminution de la fibrose consécutive à une action spécifique sur l'activation des fibroblastes. Les auteurs démontrent l'existence de deux niveaux de régulation de *Rasa1* par le TGF β : une phase à court terme réversible, indépendante de DNMT1, et une phase à long terme, irréversible, impliquant l'hyperméthylation du promoteur de *Rasa1* par DNMT1 (Bechtel et al., 2010).

Dans les tissus de fibroses pulmonaires idiopathiques, comme dans les cellules tumorales, on observe une hypométhylation globale et une hyperméthylation locale de l'ADN cellulaire (Kaminski et al., 2000), situation que l'on retrouve dans un modèle murin de fibrose hépatique (Komatsu et al., 2012). En accord avec l'idée qu'une altération épigénétique est courante dans les tissus fibrotiques, d'autres groupes ont montré une augmentation de l'expression de DNMT1, DNMT3a et 3b dans les tissus de fibroses pulmonaire idiopathique (Sanders et al., 2012). De même, l'hyperméthylation locale de certains gènes appelés « gènes suppresseurs de fibrose » contribue à la différenciation myofibroblastiques dans les tissus fibrotiques. Parmi ces gènes, l'hyperméthylation des régions promotrices de *Thy-1* (Thymus cell antigen 1) corrèle avec le phénotype « myofibroblaste » des fibroblastes isolés de fibrose pulmonaire idiopathique, et la restauration de l'expression de *Thy-1* après traitement avec l'inhibiteur 5'-aza altère le phénotype pro-fibrotique des cellules (Sanders et al., 2008). L'hyperméthylation de *SMAD4*, facteur de transcription qui permet la signalisation des cytokines de la famille du TGF β , est impliquée dans le développement de fibroses pulmonaire et de cancer du poumon. En effet, Takenaka et al, montrent que la perte de signalisation du TGF β due à l'hyperméthylation de *SMAD4* pourrait être associée à la progression de cancers du poumon chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique qui est caractérisée par une surexpression de TGF β (Takenaka et al., 2009). Cette étude rappelle une observation faite dans un chapitre précédent (se référer au chapitre IIB2c « [activation des FACs](#) »), et nous permet de rappeler que la voie de signalisation TGF β /SMAD dans « l'activation » des fibroblastes reste encore mal expliquée. Comme autre exemple allant dans le même sens, on peut citer la perte d'expression de *PTEN* consécutif à

l'hyperméthylation de son promoteur (mécanisme retrouvé chez les cellules tumorales), qui est constatée dans la fibrose hépatique lors de l'activation des cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes. Dans ce cas, la réexpression de PTEN dans les cellules myofibroblastiques suite à un traitement au 5'-aza, l'inhibiteur des DNMT peut reverser le phénotype de ces cellules (Bian et al., 2012). De même, le traitement de cellules stellaires hépatiques avec 5'-aza, bloque leur différenciation en myofibroblasts *in vitro* (Mann et al., 2007).

D) Méthylation de l'ADN chez les FACs.

Bien que la présence de mutations dans le génome des FACs soit controversée, les modifications épigénétiques, et plus particulièrement les méthylations de l'ADN, seraient apparemment à l'origine de l'acquisition des caractéristiques pro-tumorales par ces cellules (Jiang et al., 2008; Hu et al., 2005). Hu et al montrent en effet que les différentes populations de fibroblastes isolés à partir d'un tissu mammaire sain, de carcinomes « *in situ* » ou de carcinomes invasifs présentent des signatures épigénétiques différentes, suggérant que les changements observés jouent un rôle dans le maintien d'un microenvironnement pro-tumoral (Hu et al., 2005). Alors que l'hypométhylation globale du génome est reconnu pour être une des caractéristiques des cellules de carcinomes (Feinberg & Vogelstein, 1983; Goelz et al., 1985), des modifications analogues semblent aujourd'hui être aussi caractéristiques des FACs pouvant générer une instabilité génétique (Jiang et al., 2008; Quante et al., 2011). Les données expérimentales obtenues par plusieurs groupes montrent que les FACs isolées et propagées en culture conservent leurs caractéristiques phénotypiques, cela même en l'absence de cellules tumorales. Les mécanismes permettant le maintien de ces traits phénotypiques étant mal compris, nombre d'études ont cherché à explorer la possible implication d'altérations géniques et épigénétiques de ces cellules. La présence de mutations génomiques chez les FACs demeure très controversée. Selon certains groupes, des mutations dans le génome des FACs, notamment dans les gènes répresseurs de tumeurs *p53* et *pten*, ainsi que des pertes d'hétérozygotie sont couramment retrouvés dans les cellules stromales de carcinomes mammaires et spinocellulaire de la tête et du cou (Patocs et al., 2007; Weber et al., 2007; Fukino et al., 2007; Kurose et al., 2002; Lafkas et al., 2008). En revanche, d'autres études sur des FACs isolés de carcinomes mammaires, ovariens et

pancréatiques montrent que ces altérations géniques sont très rare voir inexistantes (Allinen et al., 2004; Qiu et al., 2008; Walter et al., 2008; Hosein et al., 2010). Il est toutefois possible que des raisons techniques, comme la précision des microdissections, la source des échantillons, ainsi que les méthodes de détection soient à l'origine de ces observations discordantes (Qiu et al., 2008; Worthley, Giraud, & Wang, 2010). Par contre, des altérations épigénétiques chez les FACs adjacents à des tumeurs mammaires et prostatiques ont été associées à des pronostics cliniques précis (Hu et al., 2005; Fiegl et al., 2006; Hanson et al., 2006). Comme dans le cas des cellules cancéreuses, dans les FACs, l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale peut être régulée par méthylation de sites spécifiques des régions promotrices, telles que les promoteurs de GST1 (glutathione S-transferase 1) et RAR β 2 (Retinoic Acid Receptor beta 2) (Hanson et al., 2006; Rodriguez-Canales et al., 2007). Les modifications épigénétique du stroma tumoral pourraient également être associées à l'agressivité et à la résistance aux traitements anti-hormonaux dans les cancers du sein HER-2/neu+ (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) (Fiegl et al., 2006).

De nouvelles stratégies thérapeutiques très prometteuses visent à corriger les anomalies épigénétiques à l'aide de composés chimiques modulant l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN. Ces type d'inhibiteurs constituent ainsi une classe de plus en plus grandissante de composés anticancéreux (Allen, 2007; Kim, Bang, & Robertson, 2006) car les approches de thérapie épigénétique pourraient jouer un rôle synergique dans le traitement des tumeurs ciblant non seulement les cellules tumorales mais également les cellules du microenvironnement tumorale et notamment les FACs (Place et al., 2011).

RESULTATS.

l) 1er article: LIF mediates pro-invasive pro-invasive activation of stromal fibroblasts in cancer.

Résumé.

Le tissu conjonctif et inflammatoire (le stroma tumoral) associé aux cellules tumorales est composé essentiellement d'une matrice extracellulaire produite et sécrétée par des fibroblastes 'activés' (FAC) présents dans le microenvironnement qui entoure la tumeur. Le stroma tumoral joue un rôle essentiel dans la survie, la prolifération, et l'invasion de cellules cancéreuses. Les FACs remodelent la matrice extracellulaire et creusent des chemins d'invasion qui sont empruntés par les cellules tumorales qui peuvent ainsi migrer et envahir le tissu entourant la tumeur. Cependant les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacent l'activation des propriétés pro-invasive des fibroblastes tumoraux sont encore mal connus.

Les cytokines de la famille du TGF β , notamment le TGF β 1, 2 et 3, sont connues pour être responsable de l'activation des fibroblastes en myofibroblastes au cours de la carcinogénèse. En accord avec la littérature, et grâce à l'utilisation de test de remodelage matriciel et de culture organotypique en 3 dimensions, j'ai montré *in vitro* que l'action de la cytokine TGF β 1 est suffisante pour induire un état pro-invasif chez les fibroblastes normaux. Cependant, dans les fibroblastes ainsi activés, tout comme dans les FACs, l'inhibition pharmacologique du récepteur au TGF β I (SB431542) n'altère pas les propriétés pro-invasive et de remodelage matriciel de ces cellules. Comme observé dans les FACs (Sanz-Moreno et al., 2011) je montre que l'activité de la voie de signalisation JAK1/STAT3 est nécessaire au remodelage de la matrice extracellulaire et à la promotion de l'invasion collective des cellules tumorales par ces fibroblastes activés. Mes résultats démontrent que la signalisation du TGF β est suffisante pour déclencher l'activité pro-invasive des fibroblastes, mais que le maintien de ce phénotype est assuré par le voie de signalisation JAK1/STAT3. L'analyse des mécanismes moléculaires de l'activation de la voie JAK1/STAT3 par le TGF β 1 dans les fibroblastes m'a permis d'identifier la cytokine LIF (Leukemia inhibitory Factor) comme étant responsable de l'activation pro-invasive des fibroblastes. Par cette étude, je démontre que l'activation de la voie de signalisation

JAK1/STAT3 par la cytokine LIF, permet la régulation de l'activité contractile des fibroblastes en agissant sur la voie de signalisation RhoA/ROCK/MLC2. La contractilité du cytosquelette d'acto-myosine qui en découle est en effet cruciale pour le remodelage matriciel pro-invasif permettant l'invasion collective des cellules de carcinomes. Mes résultats montrent également que l'acquisition du phénotype contractile et pro-invasif des fibroblastes par la cytokine LIF est indépendante de la régulation de l' α -SMA, marqueur pourtant utilisé par la communauté scientifique pour identifier les FACs et les fibroblastes activés *in vitro* et *in vivo*.

Suite à la démonstration de ce nouveau rôle de LIF, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires de l'activation des fibroblastes tumoraux par les cellules de carcinomes d'origine multiple. Je démontre, que LIF est responsable de l'activation pro-invasive des fibroblastes en réponse au sécrétôme de 11 sur 12 lignées de carcinomes (peau, colon, sein, tête et cou, poumon) et 6 lignées sur 8 de mélanomes. L'analyse immunohistologique de patients atteints de carcinomes spinocellulaire de grade 1 et 2 (n=17), de patients atteints de cancer ORL (Oto-Rhyno-Laryngée) (n=50), et de cancer du poumon (n=50) a mis en évidence une surexpression de LIF dans les tumeurs. Cette analyse *ex vivo* a révélé une forte corrélation entre la surexpression de LIF, la mise en place d'un microenvironnement fibrotique, la présence de nodules d'invasion tumorale et un mauvais pronostic clinique chez ces patients.

Ayant démontré le rôle fondamental de la voie de signalisation JAK1/STAT3 chez les fibroblastes tumoraux dans le développement d'un microenvironnement permissif à l'invasion des cellules cancéreuses, j'ai analysé le potentiel thérapeutique anti-tumoral du Ruxolitinib (petite molécule inhibitrice des kinases JAK1/2 approuvée par la FDA (agence américaine des produits alimentaire et des médicaments) en tant qu'inhibiteur de dissémination des cellules de carcinome *in vivo*. Pour cela, j'ai développé un modèle syngénique orthotopique de carcinomes mammaires chez la souris Balb/C qui avait été précédemment décrit et utilisé dans l'analyse des capacités invasives et métastatiques des cellules tumorales 67NR et 410.4 (Aslakson & Miller, 1992). Ainsi, j'ai montré que la production de LIF par les cellules de carcinomes corrèle avec une augmentation de l'assemblage des fibres de collagènes et l'invasion des cellules tumorales dans le stroma peritumoral. De même, l'inhibition des kinases JAK par gavage au Ruxolitinib des souris injectées par les cellules 410.4, productrice de LIF, entraîne une diminution de la fibrose tumorale et une réduction significative de l'invasion des cellules de carcinomes, indépendamment de l'expression du marqueur α -SMA au sein de la tumeur.

En conclusion, cette étude, met en évidence un tout nouveau rôle de LIF dans la carcinogenèse. Cette cytokine, produite et sécrétée par les fibroblastes du stroma et les cellules cancéreuses en réponse à une stimulation par le TGF β entraîne un remodelage du microenvironnement tumoral en activant les propriétés pro-invasives des fibroblastes résidants, cela indépendamment de l'expression de α -SMA. Cette dernière étant considérée comme le marqueur de référence de la conversion invasive de la tumeur, nos résultats révèlent l'existence d'une nouvelle sous population de fibroblastes activés impliqués dans l'évolution tumorale maligne non décelés par les dépistages effectués à l'heure actuelle. De même ce travail identifie la kinase JAK1 comme cible thérapeutique potentiel chez les patients atteints de carcinomes agressifs.

LIF Mediates Proinvasive Activation of Stromal Fibroblasts in Cancer

Jean Albregues,¹ Isabelle Bourget,¹ Catherine Pons,¹ Vincent Butet,² Paul Hofman,³ Sophie Tartare-Deckert,⁴ Chloe C. Feral,¹ Guerrino Meneguzzi,¹ and Cedric Gaggioli^{1,*}

¹INSERM, U1081, CNRS, UMR7284, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), University of Nice Sophia Antipolis, Medical School, 28 Avenue Valombrose, F-06107 Nice, France

²Pathological Anatomy and Cytology Laboratory, 270 Avenue Sainte-Marguerite, F-06200 Nice, France

³Laboratory of Clinical and Experimental Pathology and Hospital-Integrated Tumor Biobank, Pasteur Hospital, F-06002 Nice, France

⁴INSERM, U1065, Mediterranean Centre for Molecular Medicine (C3M), University of Nice Sophia Antipolis, F-06204 Nice, France

*Correspondence: gaggioli@unice.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.036>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

SUMMARY

Signaling crosstalk between tumor cells and fibroblasts confers proinvasive properties to the tumor microenvironment. Here, we identify leukemia inhibitory factor (LIF) as a tumor promoter that mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts independent of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) expression. We demonstrate that a pulse of transforming growth factor β (TGF- β) establishes stable proinvasive fibroblast activation by inducing LIF production in both fibroblasts and tumor cells. In fibroblasts, LIF mediates TGF- β -dependent actomyosin contractility and extracellular matrix remodeling, which results in collective carcinoma cell invasion in vitro and in vivo. Accordingly, carcinomas from multiple origins and melanomas display strong LIF upregulation, which correlates with dense collagen fiber organization, cancer cell collective invasion, and poor clinical outcome. Blockade of JAK activity by Ruxolitinib (JAK inhibitor) counteracts fibroblast-dependent carcinoma cell invasion in vitro and in vivo. These findings establish LIF as a proinvasive fibroblast producer independent of α -SMA and may open novel therapeutic perspectives for patients with aggressive primary tumors.

INTRODUCTION

Malignant evolution of solid cancers relies on complex cell-to-cell interactions sustained by a broad network of physical and chemical mediators that constitutes the tumor microenvironment (Hanahan and Weinberg, 2011). Such a cellular network involves both tumor and nontumor cells embedded in a modified extracellular matrix (ECM) rich in growth factors, chemokines, and cytokines that supports cancer cell growth and invasive spreading (Calvo and Sahai, 2011). Carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) are the most representative noncancer cells within

the tumor microenvironment (Calvo et al., 2013; Joyce and Pollard, 2009), and their presence is associated with poor clinical prognosis (Boyd et al., 2007; Lin et al., 2012; Navab et al., 2011; Shi et al., 2012; Takahashi et al., 2011). It is clear that under the influence of bioactive molecules within the tumor stroma, resident fibroblasts are activated and promote tumorigenesis (Beacham and Cukierman, 2005; Bhowmick et al., 2004b; De Wever et al., 2008; Kalluri and Zeisberg, 2006; Olumi et al., 1999). Indeed, CAFs can support tumor initiation (Trimboli et al., 2009), inflammation (Erez et al., 2010), and angiogenesis (Orimo et al., 2005). CAFs are also responsible for proinvasive ECM remodeling and track formation leading to collective carcinoma cell invasion (Gaggioli et al., 2007). Therefore, understanding how cancer cells induce a fibroblast-dependent proinvasive tumor microenvironment may provide key issues for prognosis and treatment of patients with solid cancers.

Inflammation is a hallmark of cancer progression (Coussens and Werb, 2002; Hanahan and Weinberg, 2011). It is established that paracrine secretion of multiples molecules, including transforming growth factor β (TGF- β), growth factors, and proinflammatory molecules such as interleukin-6 (IL-6) family cytokines, by cancer cells, promotes tumorigenesis (Calvo and Sahai, 2011; Lederle et al., 2011). TGF- β family cytokines are known to drive myofibroblast activation during wound healing and cancer progression (Desmoulière et al., 1993; Phan, 2008), but the role of stroma-specific TGF- β -dependent signaling during cancer invasion remains, however, unclear. Indeed, specific stromal deletion of TGF- β -receptor (TGF- β R) II in mice promotes invasive tumorigenesis (Achyut et al., 2013; Bhowmick et al., 2004a; Franco et al., 2011). Similarly, pharmacological inhibition of TGF- β R-I in a mouse model of chemically induced carcinoma development represses papilloma progression toward development of aggressive carcinoma (Mordasky Markell et al., 2010).

The role of TGF- β -dependent signaling in cancer promotion is multifaceted, and targeting TGF- β signaling in patients has been so far deceiving (Connolly et al., 2012). Here, we identify the proinflammatory cytokine LIF as a proinvasive tumor microenvironment promoter, and we show that high-level expression of LIF correlates with poor clinical outcome for patients with grade I and II head and neck and lung carcinomas. Produced

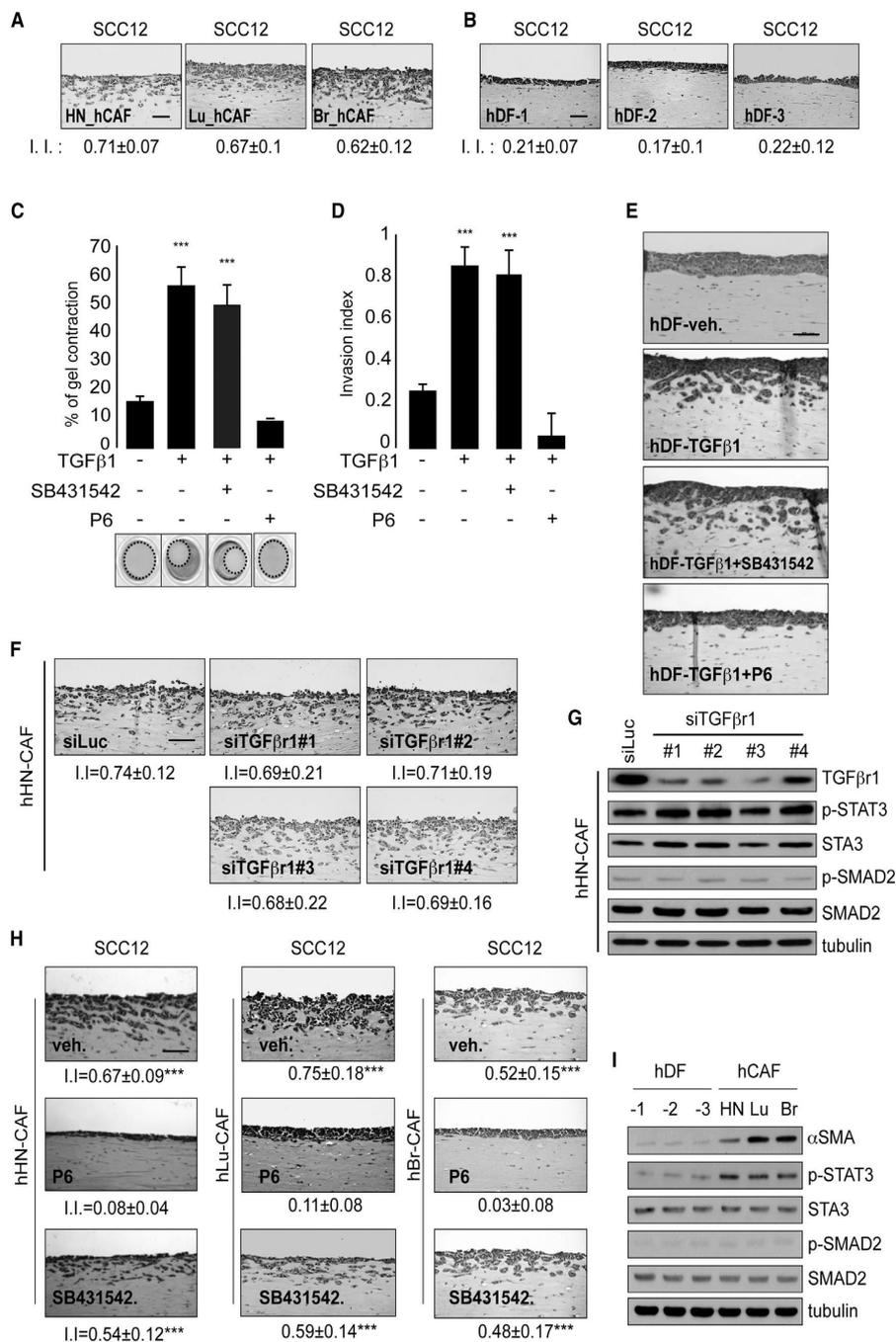


Figure 1. TGF- β 1 Signaling Initiates and JAK Signaling Sustains Proinvasive Fibroblast Property

(A) Representative images of hematoxylin and eosin (H&E) coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cells in response to three distinct hCAF, head and neck (HN), lung (Lu), and breast (Br) cell cultures. I.I., invasion index; n = 3; mean \pm SD; ***p < 0.001. Scale bar, 100 μ m.

(B) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cells in response to three hDF cell cultures (hDF-1, -2, -3). I.I., invasion index; n = 3; mean \pm SD; ***p < 0.001. Scale bar, 100 μ m.

(legend continued on next page)

by tumor cells from multiple origin and fibroblasts upon TGF- β 1 stimulation, LIF drives fibroblast-dependent proinvasive tumor microenvironment through regulation of actomyosin contractility independent of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) expression. Inhibition of JAK kinase activity by the JAK1/2 FDA-approved Ruxolitinib inhibitor blocks induction and maintenance of proinvasive ECM remodeling with consequent inhibition of cancer cell invasion in vitro and in vivo. These findings disclose potential therapeutic opportunities for patients with advanced cancer.

RESULTS

TGF- β 1 Confers Proinvasive Properties to Fibroblasts via a JAK1/STAT3-Dependent Signaling Pathway

Human CAFs isolated from head and neck squamous cell (hHN-CAF), lung (hLu-CAF), or breast (hBr-CAF) carcinoma (Table S1) support proinvasive ECM remodeling, as visualized in vitro by their capacity to contract collagen gels (Figure S1A, black bars) and human carcinoma SCC12 cell invasion (Figure 1A), whereas human primary dermal fibroblasts (hDFs) displayed no appreciable contractile phenotype (Figure S1B, black bars) and failed to induce SCC12 cell collective invasion (Figure 1B). Because the TGF- β cytokines, including TGF- β 1, 2, and 3, are known to promote myofibroblast activation during wound healing and tumorigenesis (Desmoulière et al., 1993; Phan, 2008), we speculated that the TGF- β /SMAD signaling pathway might be responsible of the hDF conversion into contractile and proinvasive human carcinoma-associated fibroblasts (hCAF)-like cells. Indeed, in hDF, transient pulse of TGF- β 1 stimulation induced both contractility (Figures 1C and S1B) and proinvasive properties (Figures 1D and 1E), but TGF- β -dependent signaling is dispensable for maintenance of the proinvasive phenotype in CAFs and activated hDF (Figures 1C–1H, S1C, and S1D; SB431542, LY364947, and A83-01 inhibitors). In agreement with the notion that JAK kinase activity is needed for proinvasive track formation by hHN-CAF (Sanz-Moreno et al., 2011), we found that hLu-CAF and hBr-CAF cells required JAK signaling to sustain their proinvasive potential (Figures 1H and S1A–S1D; P6, Ruxolitinib, Cyt387, and Tofacitinib inhibitors). The possible contribution of the JAK kinase signaling to the proinvasive properties of TGF- β 1-activated hDF was thus assessed using specific inhibitors. Similar to hCAF cells, TGF- β 1-activated fibroblasts were found to rely on JAK but not on TGF- β -I signaling to promote matrix contraction (Figures 1C, S1A, and S1B) and SCC12 cell collec-

tive invasion (Figures 1D, 1E, and 1H). This confirmed that TGF- β signaling is sufficient to promote but not necessary to sustain the proinvasive activity, a function that relies on JAK kinase signaling. Further, according with previous results (Sanz-Moreno et al., 2011), and similar to hHN-CAF, the TGF- β 1-activated hDF resulted to rely on JAK1/STAT3-specific signaling to acquire ability for proinvasion track formation within the ECM (Figures S1E–S1G). Accordingly, hCAF cells expressing the α -SMA marker displayed an enhanced endogenous activity of STAT3 (Figure 1I), which correlated with their endogenous levels of collagen gel contractility (Figures S1A and S1B, black histograms). Taken together, these data suggest that a transient stimulation of hDF by TGF- β 1 is sufficient to induce the proinvasive phenotype in hCAF, which is then sustained by a JAK1/STAT3-dependent signaling.

LIF Supports TGF- β 1-Dependent Actomyosin Contractility toward a Proinvasive Tumor Microenvironment

We next investigated the molecular mechanisms that govern TGF- β 1-dependent JAK/STAT signaling activation. Stimulation of hDF by TGF- β 1 induces phosphorylation of STAT3 and SMAD2 transcription factors. However, whereas SMAD2 activation occurs within 10 min, STAT3 activation is delayed up to 1 hr (Figure 2A), which suggests involvement of distinct molecular mechanisms. Because IL-6 cytokines are known to support JAK/STAT activation (Kishimoto et al., 1995), transcription of the *IL6* cytokine gene family members in TGF- β 1-stimulated hDF was thus assessed by quantitative real-time PCR, that disclosed a 100-fold increase of *LIF* and 5-fold increase of *IL6* mRNA steady-state levels (Figure 2B). The respective role of these two cytokines was investigated using specific blocking antibodies, which identified LIF as the major cytokine mediating STAT3 phosphorylation upon TGF- β 1 stimulation (Figure 2C). Interestingly, LIF was detected in hDF cell culture medium 1 hr after TGF- β 1 stimulation, with a 24 hr peak of 200 pg/ml (Figure 2D), and, as expected, the pan-JAK inhibitor P6 blocked the STAT3 phosphorylation induced by TGF- β 1 (Figure 2C). The involvement of LIF signaling in the TGF- β 1-mediated STAT3 phosphorylation was confirmed by small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of GP130-IL6ST. Indeed, silencing of the common subunit receptor of the IL-6 family cytokine GP130-IL6ST hampered STAT3 activation by TGF- β 1 without affecting SMAD2 activation (Figure S2A). These results support the conclusion that in hDF TGF- β 1 relies on a LIF/GP130-IL6ST/JAK1 signaling cascade to induce STAT3

(C) Quantification of matrix contraction by hDF stimulated by TGF- β 1 (2 ng/ml) for 7 days and subsequently treated by TGF- β -I inhibitor (SB431542) and pan-JAK inhibitor (P6) (n = 3 in triplicates; mean \pm SD; ***p < 0.001). Bottom panel shows scanned images of the contracted gel.

(D) Quantification of SCC12 cell organotypic invasion assay index (experiments shown in E) induced by TGF- β 1-activated hDF for 7 days and subsequently treated with TGF- β -I inhibitor (SB431542) or JAK kinase inhibitor (P6) (n = 3; mean \pm SD; ***p < 0.001).

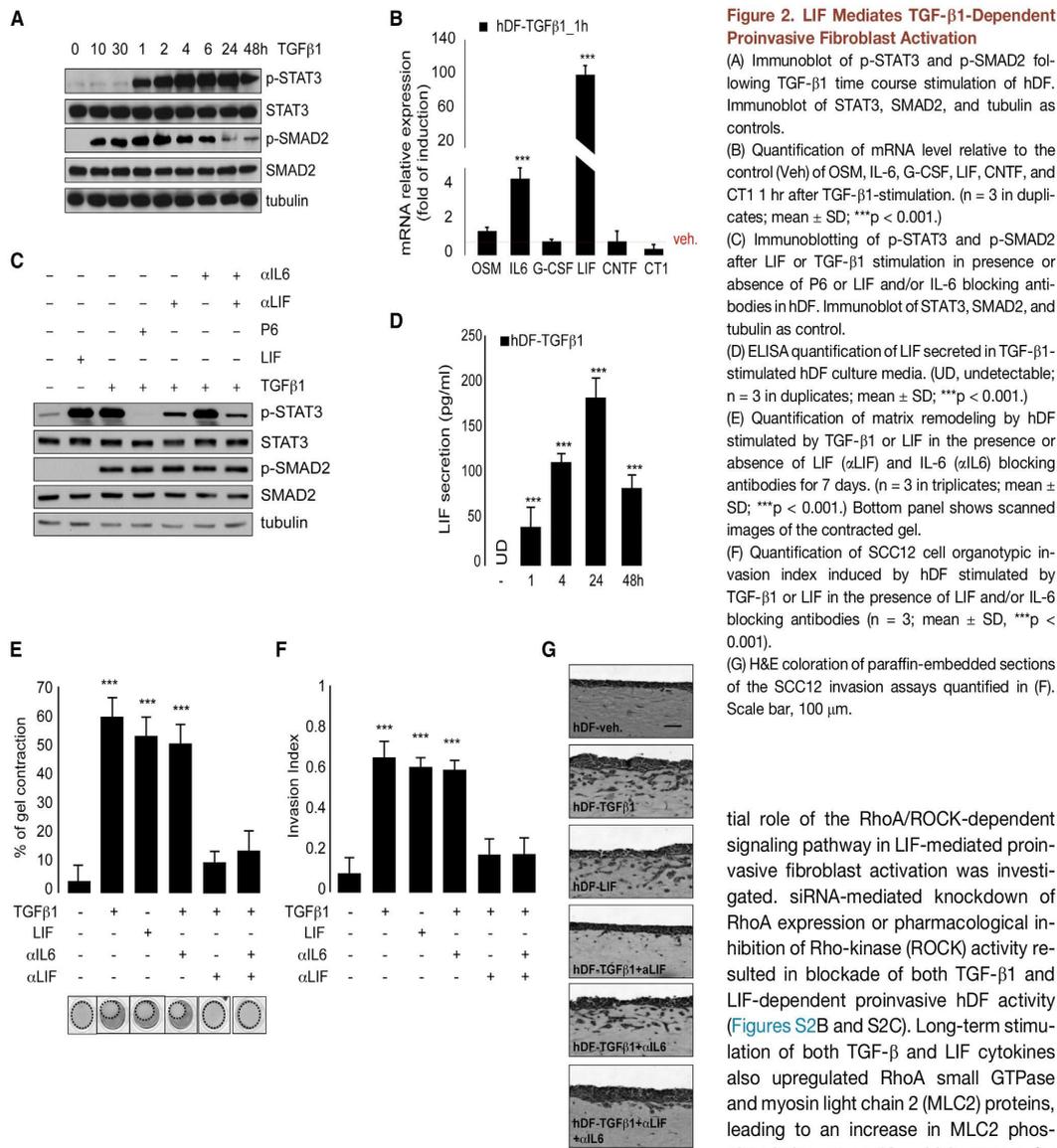
(E) H&E coloration of paraffin-embedded sections of organotypic invasion assays quantified in (D). Scale bar, 100 μ m.

(F) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cell invasion assays induced by hHN-CAF following TGF- β 1 protein depletion. siLuc is used as RNAi control transfection. Scale bar, 100 μ m. (I.I. = Invasion index; n = 3; mean \pm SD; ***p < 0.001.)

(G) Immunoblotting of TGF- β 1, STAT3, p-STAT3, SMAD2, p-SMAD2, and tubulin after RNAi-mediated TGF- β 1 depletion. siLuc as control of RNAi transfection.

(H) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cells in response to three hCAF (HN, Lu, and Br) in the presence of P6, SB431542, or control (Veh). Scale bar, 100 μ m. (I.I., invasion index; n = 3; mean \pm SD; ***p < 0.001.)

(I) Immunoblotting of α -SMA, p-STAT3, and p-SMAD2 in three hDF (hDPF-1, -2, -3) and three hCAF (HN-CAF, Lu-CAF, and Br-CAF) cells. Immunoblot of STAT3, SMAD2, and tubulin shown as controls.



activation and suggest that hDF just stimulated by LIF may promote onset of a proinvasive microenvironment. According with this idea, both matrix remodeling (Figure 2E) and SCC12 cell collective invasion were observed with hrLIF-stimulated hDF (Figures 2F and 2G); further, LIF sequestration using a specific blocking anti-LIF antibody counteracted the action of TGF- β 1 (Figures 2E–2G). In light of these observations, we deduced that TGF- β 1 specifically activates the proinvasive properties of hDF via the LIF/GP130-IL6ST/JAK1 signaling axis. Because JAK1 and ROCK cooperate to control actomyosin contractility in hHN-CAF, which results in proinvasive tracks formation within the ECM (Sanz-Moreno et al., 2011), the poten-

forced expression of an active form of ROCK (ROCK-ER) (Croft and Olson, 2006) following 4-hydroxytamoxifen (4OHT) treatment was sufficient to induce hDF contractility (Figure S2E), proinvasive capacity (Figures S2Fa and b), and MLC2 phosphorylation (Figure S2G) and also rescued the inhibitory effect of P6 or anti-LIF antibody treatments under TGF- β 1 stimulation (Figures S2Fc and d). Taken together, these data suggest that hDF activation by TGF- β 1 or LIF requires actomyosin contractility, which is regulated by JAK signaling. In conclusion, in fibroblasts, the proinflammatory cytokine LIF mediates TGF- β 1-dependent actomyosin contractility and proinvasive ECM remodeling.

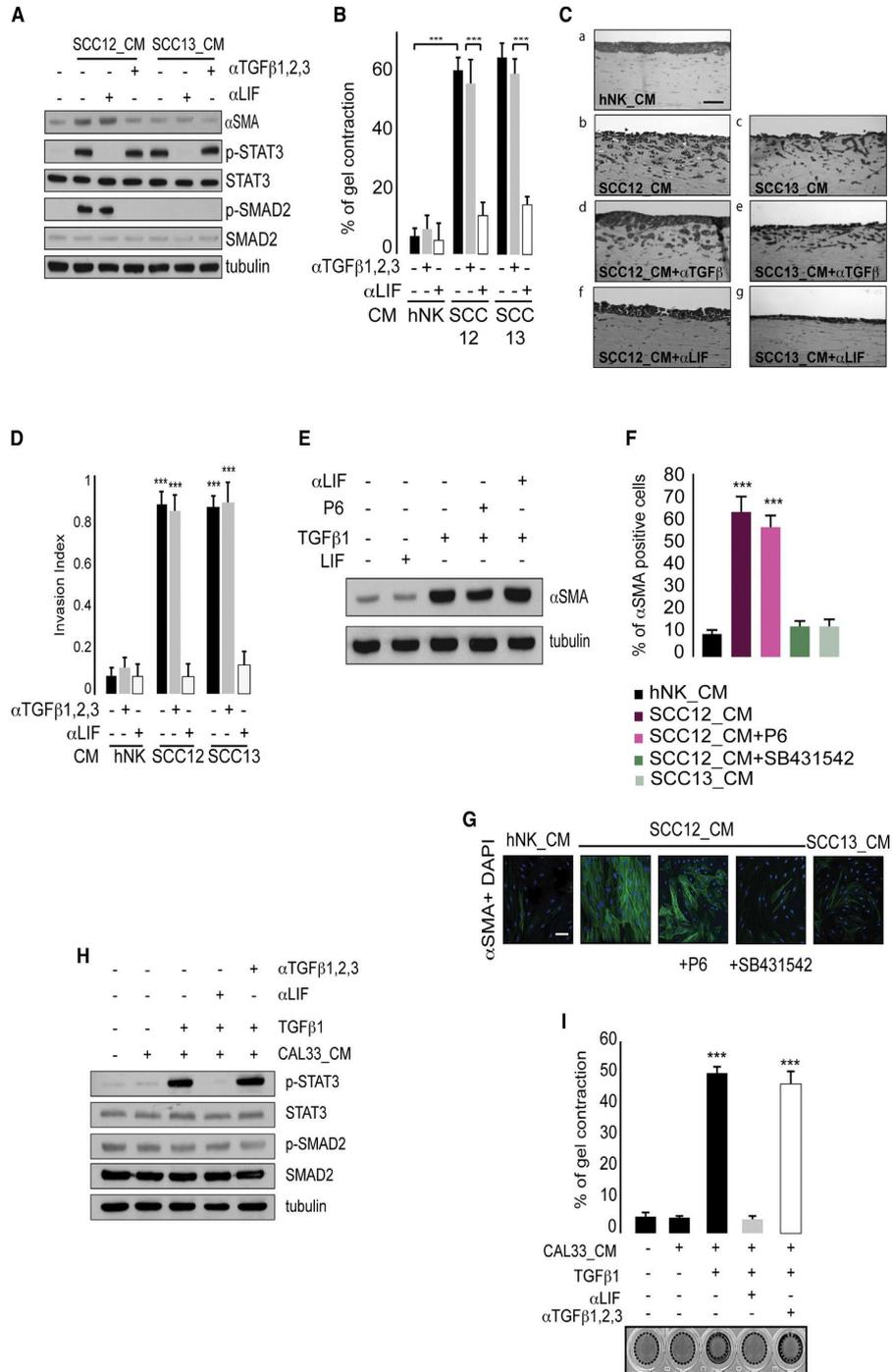


Figure 3. LIF Mediates TGF- β 1-Dependent Actomyosin Contractility Independent of α -SMA Expression
 (A) Immunoblotting of α -SMA, p-STAT3, and p-SMAD2 in hDF long-term stimulated (7 days) using SCC12 and SCC13 CM in the absence or presence of LIF and TGF- β 1, -2, -3 blocking antibodies. Immunoblotting of total STAT3, SMAD2, and tubulin shown as control.

(legend continued on next page)

LIF Mediates Fibroblast Activation to Promote Invasive Tumor Microenvironment Independent of α -SMA Expression

Within the tumor microenvironment, secretion of growth factors and cytokines (García-Tuñón et al., 2008; Sriuranpong et al., 2003; Szepietowski et al., 2004; Wysoczynski et al., 2007) by cancer cells is thought to activate the adjacent fibroblasts (Calvo and Sahai, 2011; De Wever et al., 2008; Kalluri and Zeisberg, 2006; Phan, 2008). In our experiments, conditioned media (CM) by SCC12 human carcinoma cell promoted both paracrine STAT3 and SMAD2 activation in fibroblasts, whereas SCC13 cell CM activated STAT3 but not SMAD2 phosphorylation (Figure 3A and Table 1). SCC12 and SCC13 cells were further used to investigate the role of TGF- β /SMAD2 and JAK/STAT3 signaling in tumor cell-dependent proinvasive fibroblast activation and expression of α -SMA protein, the latter being a CAF hallmark activated in hDF by the TGF- β signaling (Desmoulière et al., 1993). Both SCC12 and SCC13 CM promoted fibroblasts-dependent collagen gel contraction and collective invasion of SCC12 cells in vitro (Figures 3B, 3Ca–c, 3D, and S3Aa–c) compared with human normal keratinocytes (hNK) CM as negative control (Figures 3Ca, 3D, S3Aa, and S3B). Blockade of paracrine SMAD2 phosphorylation by an anti-TGF- β antibody to SCC12 CM (Figure 3A) had no effect on proinvasive fibroblast activation (Figures 3Cd,e and 3D), whereas addition of either a specific LIF-blocking antibody (Figures 3A, 3Cf and g, and 3D) or the ROCK inhibitor Y27632 (Figures S3Ad and e and S3B) completely abrogated the action of SCC12 and SCC13 CM. Importantly, α -SMA expression, which depends on TGF- β signaling independently of LIF (Figure 3E), was induced by the SCC12 CM (Figures 3A, 3F, and 3G) but not by the SCC13 CM that activated fibroblasts STAT3 only through LIF secretion (Figures 3A, 3F, and 3G). Both SCC12 and SCC13 CM increased MLC2 protein levels and activity, which specifically depended on LIF secretion (Figure S3C). Thus, in hDF, α -SMA upregulation appears to be uncoupled from acquisition of proinvasive capacity, which, on the contrary, is conferred by the “tumoral” LIF that relies on the crosstalk between JAK/STAT and Rho/ROCK/MLC2 signaling pathways. This hypothesis was verified using the CAL33 cell line, whose CM neither contains LIF nor activates hDF proinvasiveness (Figures 3H, 3I, and S3G; Table 1). Indeed, hDF maintained in CM from CAL33 cells engineered to secrete transgenic hLIF (CAL33-LIF; Figure S3D) showed paracrine acti-

vation of matrix remodeling (Figure S3E) and STAT3 phosphorylation (Figure S3F). Also, CAL33-LIF CM induced proinvasive fibroblast conversion that was blocked by addition of either a LIF-specific blocking antibody (Figures S3G and S3H) or the Y27632 ROCK inhibitor (Figures S3I and S3J). Because TGF- β was found to stimulate LIF production in hDF, the capacity of TGF- β -dependent signaling to induce LIF secretion by tumor cells was investigated. Stimulation of CAL33 cells by TGF- β 1 resulted in LIF secretion, which promoted both STAT3 activation and contractility in hDF (Figures 3H and 3I). Moreover, addition of a LIF-specific blocking antibody to CM of TGF- β 1-stimulated CAL33 resulted in complete inhibition of both STAT3 phosphorylation and matrix remodeling (Figures 3H and 3I). We thus concluded that in human tumors, including skin, head and neck, lung, colon, and breast carcinomas as well as melanomas (Table 1), LIF signaling mediates onset of a proinvasive microenvironment by proinvasive fibroblast activation and actomyosin contractility regulation independent of α -SMA expression.

LIF and JAK Kinase Signaling Drive Invasive Tumor Microenvironment in Breast Carcinomas

The role of LIF production by tumor cells during invasive tumor ECM remodeling was then investigated in vivo. LIF secretion was first monitored in a panel of mouse breast carcinoma cell lines spanning from a poorly tumorigenic to a highly invasive phenotype (Aslakson and Miller, 1992; Yang et al., 2004). High in vitro LIF secretion levels were found with 4T07, 410.4, and 4T1 invasive cancer cells, whereas LIF secretion was low in 67NR noninvasive tumor cells (Figure 4A). In vitro, LIF production by mouse tumor cells correlated with potential to induce contractility in mouse fibroblasts (Figure S4A). LIF low-producer (67NR) and LIF high-producer (410.4) mouse breast carcinoma cells were then injected into mammary fat pads of syngeneic BALB/c female mice. Thirty days after implantation, mice were sacrificed, and primary tumors were analyzed by immunohistochemistry. Strong LIF-specific staining was exclusively observed in the primary tumor mass generated by 410.4 cells (Figures 4Ba and b) that correlated with sustained STAT3 activation in 410.4 but not in 67NR tumors both in vivo (Figures 4Bc and d) and in vitro (Figure 4C), which identify in LIF secreted by the tumor cells the major cytokine driving STAT3 activation in fibroblasts. In vitro stimulation of mouse dermal fibroblasts by CM of 410.4 cells resulted in SMAD2 activation and α -SMA

(B) Quantification of gel contraction by hDF cells cultured in the presence of SCC12 or SCC13 CM in control (black histograms) depleted for either TGF- β 1, -2, -3 (α TGF- β ; gray histograms) or for LIF (α LIF; white histogram) at 10 μ g/ml of blocking antibodies. (n = 3 in triplicates; mean \pm SD. ***p < 0.001 and **p < 0.01.)

(C) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cell organotypic invasion assays in the presence of hDF cells cultured in CM. hNK (a), SCC12 (b), and SCC13 (c) depleted for either TGF- β 1, -2, -3 (α TGF- β ; d and e) or LIF (α LIF; f and g). Scale bar, 100 μ m.

(D) Quantification of SCC12 cell invasion index from (C) (n = 3; mean \pm SD; ***p < 0.001).

(E) Immunoblot of α -SMA protein expression in hDF stimulated by either TGF- β 1 or LIF in presence or absence of P6 inhibitor and LIF blocking antibody after 7 days. Tubulin shown as control.

(F) Histograms represent quantification of α -SMA-positive hDF 5 days after stimulation by tumor cell conditioned media (n = 3; mean \pm SD; ***p < 0.001).

(G) Representative confocal merged images of α -SMA and DAPI staining in hDF stimulated by SCC12 and SCC13 CM in presence or absence of P6 and SB431542 inhibitors. Scale bar, 50 μ m.

(H) Immunoblotting of p-STAT3 and p-SMAD2 in hDF after short-term stimulation by control (veh.) or CAL33 CM in absence or presence of LIF or TGF- β blocking antibodies. CAL33 were stimulated by TGF- β 1 during 48 hr, and conditioned media was collected 24 hr after multiple washes in 0.5% serum DMEM. Immunoblotting of total STAT3, SMAD2, and tubulin shown as controls.

(I) Quantification of gel contraction by hDF grown in the presence of control (veh.) or TGF- β 1-stimulated CAL33 conditioned media (CM) in control (black histograms) depleted for LIF (α LIF; gray) or TGF- β 1, -2, -3 (α TGF- β 1, -2, -3; white) at 10 μ g/ml of blocking antibodies (n = 3 in triplicates; mean \pm SD. ***p < 0.001).

Table 1. LIF Production by Carcinoma Cells from Different Origins Mediates Proinvasive Fibroblast Activation

Cancer Cell Lines	STAT3-Y705 in Fibroblasts ^a	SMAD2-S465/467 in Fibroblasts ^a	Fibroblasts Contractile and Proinvasive Phenotype ^b						LIF ELISA (pg/ml) ^c	
			Veh	SB 431542	P6	Ruxo	α L6 (10 μ g/ml)	α LIF (10 μ g/ml) ^d		α TGF- β (10 μ g/ml)
Human OSCC										
hPK	–	–	–	–	–	–	–	–	–	UD
SCC12	++	++	+	+	–	–	+	–	+	129.05 \pm 12.4
SCC13	++	–	+	+	–	–	+	–	+	276.64 \pm 18.6
SCC25	+	++	+	+	–	–	+	–	+	48.11 \pm 3.05
CAL27	++	++	+	+	–	–	+	– (50)	+	400.06 \pm 22.12
CAL33	–	–	–	–	–	–	–	–	–	UD
CAL60	++	+	+	+	–	–	+	–	+	77.33 \pm 4.24
CAL166	++	+	+	+	–	–	+	–	+	84.14 \pm 6.32
Detroit562	+	++	+	+	–	–	+	–	+	102.97 \pm 8.43
Human Colon Carcinoma										
LS174	++	+	+	+	–	–	+	–	+	185.29 \pm 9.87
Human Lung Carcinoma										
A549	++	+	+	+	–	–	+	–	+	95.11 \pm 6.49
Human Breast Carcinoma										
MDA-MB-231	+++	++	+	+	–	–	+/-	+/-	+	216.79 \pm 15.32
MDA-MB-468	++	++	+	+	–	–	+	+	+	64.34 \pm 4.54
Human Melanoma										
A375P	++	+	+	+	–	–	+	–	+	276.69 \pm 18.12
A375M2	+++	++	+	+	–	–	+	– (50)	+	545.38 \pm 32.87
Mel501	–	–	–	–	–	–	–	–	–	UD
Sbcl2	–	–	–	–	–	–	ND	–	ND	6.78 \pm 2.32
WM35	++	–	+	+	–	–	ND	–	ND	403 \pm 30.32
WM278	+	+	+	+	–	–	ND	–	ND	98.07 \pm 7.3
WM793	+	+	+	+	–	–	ND	–	ND	251.13 \pm 13
Mel1205	++	ND	+	+	–	–	ND	–	ND	198.46 \pm 65
Human Engineered Cell Line										
CAL33_mock	–	–	–	–	–	–	–	–	–	UD
CAL33_LIF	+++	–	+	+	–	–	+	+(50)	+	1,176.03 \pm 86.5
Murine Breast Carcinoma										
67NR	–	–	–	ND	–	–	ND	–	ND	14.5 \pm 20.51
4T07	++	+/-	+	ND	–	–	ND	–	ND	603.09 \pm 49.54
410.4	++	++	+	ND	–	–	ND	–	ND	927.35 \pm 17.00
4T1	++	+	+	ND	–	–	ND	–	ND	1,523.25 \pm 162.8

Veh, vehicle; Ruxo, Ruxolitinib; ND, not determined.

^aActivation of STAT3 and SMAD2 transcription factors induced in fibroblasts by tumor cell CM was assessed by western blot. Detectable (+) or undetectable (–) phosphorylation.

^bContractility and proinvasive activities induced in fibroblasts by tumor cell CM were determined using three-dimensional collagen lattices and organotypic invasion assays. Induction (+); no induction (–).

^cLIF was detected by ELISA.

^dLIF and TGF- β blocking antibodies were used either at 10 μ g/ml or as stated.

expression (Figure 4C), whereas 67NR CM failed to activate SMAD2 and STAT3 and to induce α -SMA expression (Figure 4C). In vivo, α -SMA expression was detected within the tumor mass of 410.4 tumor microenvironment but not within 67NR tumor, suggesting a strong correlation between the in vitro and in vivo situations (Figures 4Be and f). In tumors, collagen fibers are indicative of a dense ECM and correlate

with the invasive potential of tumor cells (Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005; Samuel et al., 2011). Assessment of collagen production (Figures 4Bg and h) and collagen fibers assembly (Figures 4Bi–j) in xenograft tumors by Sirius Red staining disclosed enhanced decoration in 410.4 tumors compared with 67NR tumors, with formation of polarized collagen fibers (Figures 4Bi and j and 4D).

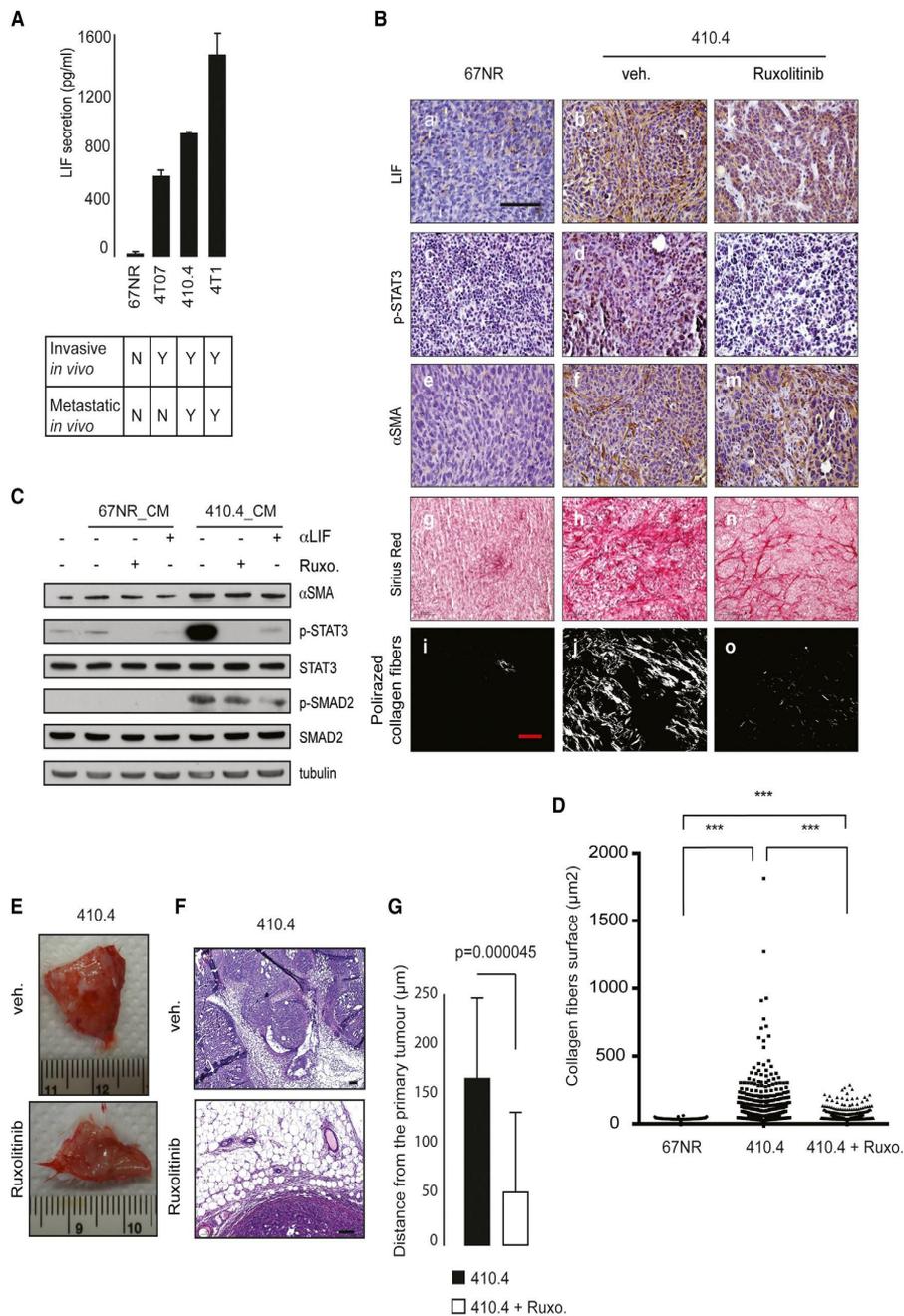


Figure 4. LIF and JAK Signaling Mediate Malignant Tumor Microenvironment In Vivo

(A) ELISA quantification of LIF secreted in mouse breast cancer cells culture media. (UD, undetectable; n = 3 in duplicates). Bottom panel shows the cell invasion and metastatic capacities (Y, yes; N, no).

(B) Immunohistological staining of LIF, p-STAT3, α -SMA, Sirius Red (scale bar, 100 μ m), and polarized collagen fibers (scale bar, 50 μ m) in orthotopic 67NR and 410.4 mouse breast cancer models 30 days after injection.

(legend continued on next page)

To disclose the fundamental role of JAK kinase activity in fibroblasts-mediated proinvasive ECM remodeling, we further assessed the effect of the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib on tumor microenvironment development *in vivo* by 21 day oral gavage of mice implanted with 410.4 cells. The drug inhibited STAT3 phosphorylation both within the tumor microenvironment *in vivo* (Figure 4B) and *in vitro* (Figure 4C), without influencing LIF production (Figure 4Bk) or α -SMA staining (Figure 4Bm). JAK signaling inhibition reduced Sirius Red staining (Figure 4Bn) and formation of collagen bundles (Figures 4Bo and 4D), which underscores the role of JAK in collagen fibers assembly within the tumor microenvironment *in vivo*, with no detectable incidence of Ruxolitinib treatment on tumor size *in vivo* (Figure 4E) and 410.4 cells proliferation *in vitro* (Figure S4B). Consistent with the fact that matrix stiffness promotes tumor cell invasion *in vitro* and *in vivo* (Goetz et al., 2011; Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005; Provenzano et al., 2008), we disclosed that in mice treated with Ruxolitinib the tumor cells displayed a significant reduced rates of invasion (Figures 4F and 4G).

We next unveiled the collaborative role of both TGF- β and JAK/ROCK signaling during ECM remodeling *in vitro*. In hDF, and opposite to LIF stimulation (Figure S4Ca-d), fibronectin expression pattern was upregulated by TGF- β 1 stimulation (Figures S4Ce and f) and slightly reduced after addition of P6 inhibitor (Figures S4Cg and h). Moreover, TGF- β 1-stimulated hDF exhibited an enhanced fibronectin secretion and deposition into the matrix compared to LIF-stimulated and control hDF (Figure S4D). Further, JAK inhibition was ineffective on fibronectin secretion but dramatically reduced its assembly into the matrix (Figure S4D), whereas forced ROCK activation, in absence of JAK activity, rescued proper fibronectin assembly (Figure S4E). Taken together, these data disclose a collaborative role of TGF- β 1 and JAK/ROCK signaling in fibroblast-dependent ECM remodeling and matrix protein assembly. We also demonstrated that TGF- β 1-stimulated mouse dermal fibroblasts secrete LIF in the culture media (Figure S4F), which leads to collagen gel contraction *in vitro* (Figure S4G) and in autocrine activation of STAT3 phosphorylation (Figure S4H). Blockade of JAK kinase activity, by either addition of Ruxolitinib or LIF sequestration using a specific blocking antibody, resulted in both complete abrogation of STAT3 phosphorylation (Figure S4H) and matrix remodeling (Figure S4G). Thus, the mice xenograft breast cancer model demonstrated that LIF, independently of α -SMA expression, supports tumor stroma remodeling and that Ruxolitinib by inhibiting JAK, abrogates the proinvasive crosstalk between tumor and stroma cells both *in vitro* and *in vivo*.

LIF Is Overexpressed in Human Carcinomas, which Correlates with Invasive Tumor Microenvironment Formation and Poor Clinical Outcome

Randomized analysis of 117 biopsies from human carcinomas, including skin (n = 17), head and neck (n = 50), and lung (n = 50) carcinomas (Table S2), detected strong diffused LIF staining compared to control immunoglobulin (Ig) G or to skin control tissues where LIF expression is confined to basal keratinocytes (Figures 5A and 5B). Subsequent investigation of tumor-stroma remodeling by Sirius Red staining, and observation under polarized light, disclosed collagen fiber organization in human tumors expressing both high and low LIF levels. Thus LIF upregulation clearly correlated with marked assembly of collagen bundles (Figures 5C, 5D, S5A, and S5B) and significantly poor clinical outcome for patients with head and neck and lung carcinomas (Figures 5E and 5F). Further, correlation between LIF detection, Sirius Red staining and presence of invasion nodules was observed in 100 carcinomas (Figure S5C and S5D). Taken together, these data validate our *in vitro* evidence linking LIF expression to fibroblast-dependent proinvasive ECM remodeling in cancer.

Ruxolitinib Is a Potent Inhibitor of Proinvasive Tumor Microenvironment Remodeling

To confirm the results obtained with mice, the inhibitory effect of Ruxolitinib on collective carcinoma cell invasion was assessed *in vitro*. The drug (5–10 μ M) prevented track formation and SCC12 cell invasion promoted by hCAF (Figures 6A–6C) by inhibiting the CAF endogenous STAT3 activity (Figure 6D). Moreover, Ruxolitinib completely inhibited both TGF- β 1- and LIF-dependent activation of hDF contractility in collagen-rich lattices (Figure S6A) and also abrogated proinvasive hDF activation induced upon TGF- β 1 and LIF stimulation (Figures S6B and S6C) by repressing STAT3 phosphorylation in TGF- β 1- or LIF-stimulated fibroblasts with no effect on SMAD2 (Figure S6D). Because part of the Cyt387 JAK inhibitor effects (Figure S1D) may be due to direct ROCK2 inhibition (Pardani et al., 2009), we specifically assessed whether effects of Ruxolitinib could be mediated by inhibition of ROCK activity. Forced expression of an active form of ROCK (ROCK-ER) (Croft and Olson, 2006) following 4-hydroxytamoxifen (4OHT) treatment induced MLC2 phosphorylation (Figure S6E) and SCC12 cells invasion (Figure S6F) regardless of Ruxolitinib treatment. However, specific ROCK inhibitors treatment following 4OHT abrogated both SCC12 cell invasion (Figure S6F) and MLC2 phosphorylation (data not shown), therefore, excluding the possibility of nonspecific activity of Ruxolitinib on ROCK activity. Therefore, use of the

(C) Immunoblotting of α -SMA, p-STAT3, and p-SMAD2 in mouse dermal fibroblast long-term stimulated (7 days) using 67NR and 410.4 CM in the absence or presence of LIF blocking antibody and Ruxolitinib inhibitor at 10 μ g/ml or 10 μ M final concentration, respectively. Immunoblotting of total STAT3, SMAD2, and tubulin as controls.

(D) Quantification of collagen bundles surface (thickness \times length in μ m²) shown in Bi, j, and o (each dot represents one fibers). Total quantified fibers: 67NR = 96, 410.4 = 680, and 410.4 + Ruxo = 390.

(E) Representative images of 410.4 orthotopic tumors following Ruxolitinib treatment showing tumor within the mammary fat pad.

(F) H&E coloration of paraffin-embedded sections of 410.4 orthotopic tumors following Ruxolitinib treatment showing tumor cells invasion within the mammary fat pad adjacent the tumor mass. Scale bar, 125 μ m.

(G) Quantification of tumor invasion shown in (E). Distance was calculated using ImageJ software by the mean of five measurements from 18 pictures for each condition (mean \pm SD; p = 0.00045).

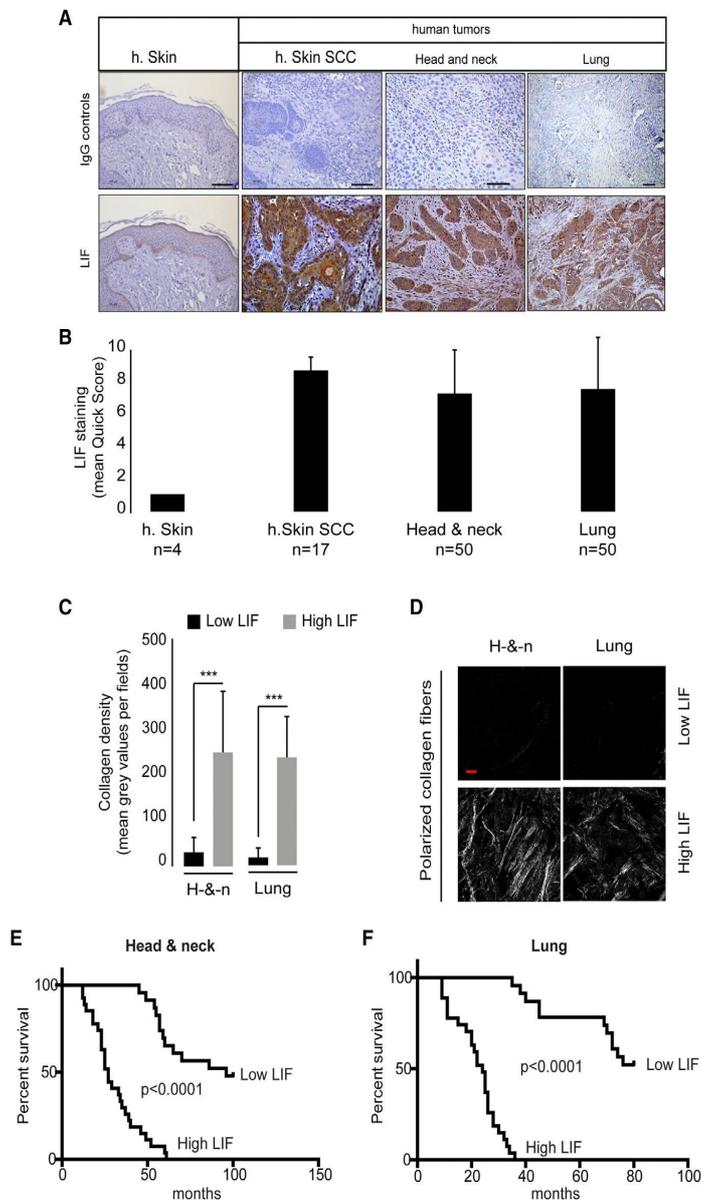


Figure 5. LIF Overexpression in Human Skin SCC Tumors Correlates with Assembled Collagen Fiber Organization

(A) LIF immunohistological staining in human normal skin (h. Skin) and carcinomas from multiple origins (h. Skin SCC tumor n = 17; head and neck carcinomas n = 50 and lung carcinomas n = 50). IgG staining as control. Scale bar, 100 μ m.

(B) Quantification of mean Quick Score from tumors shown in (A).

(C) Quantification of collagen fibers density in tumors expressing low and high LIF levels in head and neck and lung carcinomas (mean \pm SD of three pictures from ten independent tumors per condition, ***p < 0.001).

(D) Sirius Red collagen bundles observed under polarized light in tumors expressing low and high LIF levels quantified in (C). Scale bar, 100 μ m.

(E) Kaplan-Meier survival over time of patients with head and neck carcinomas expressing low (n = 23) and high (n = 27) LIF levels.

(F) Kaplan-Meier survival over time of patients with lung carcinomas expressing low (n = 23) and high (n = 27) LIF levels.

DISCUSSION

We identify LIF, a member of the IL-6 proinflammatory cytokine family, as the main driver of proinvasive TGF- β -dependent evolution of the tumor microenvironment. LIF mediates autocrine TGF- β 1-dependent proinvasive activation in fibroblasts, whereas, in a paracrine manner, tumor-secreted LIF promotes and sustains proinvasive conversion of fibroblast independent of α -SMA expression. LIF is overexpressed in a variety of solid tumors including skin cancers (García-Tuñón et al., 2008; Wysocki et al., 2007) and LIF production by tumor cells correlates with their invasive potential (Aslakson and Miller, 1992; Clark et al., 2000). However, downregulation of *LIFr* recently reported in cancer cells (Chen et al., 2012) prompted the idea that tumor cell-derived LIF may exert paracrine effect in

tumorigenesis. Here, we propose that paracrine activities of LIF are related to stromal fibroblast proinvasive activation. CAFs are key players of cancer-associated inflammatory processes (Erez et al., 2010; Orimo et al., 2005). Secretion of IL-11 upon TGF- β stimulation of CAFs was shown to induce GP130-IL6ST/STAT3 signaling in colorectal cancer, which confers a survival advantage to metastatic cells and leads to increased efficiency of organ colonization (Calon et al., 2012). Our results, showing that TGF- β 1-mediated LIF secretion both in tumor cells and fibroblasts, emphasize the action of TGF- β 1 as a driver of

JAK1/2 kinase inhibitor Ruxolitinib may pave the way to therapeutic approaches aiming at thwarting not only cancer invasion, but also stroma activation during the early steps of aggressive carcinoma development. To this respect, collagen bundle formation by hDF was verified in vitro using 3D-organotypic cultures. hDF stimulated by either TGF- β 1 or LIF showed an enhanced capacity to assembly polarized collagen fibers, which was inhibited by Ruxolitinib (Figures 6E and 6F), which provides further evidence for the role of fibroblast JAK kinase in tumor ECM remodeling.

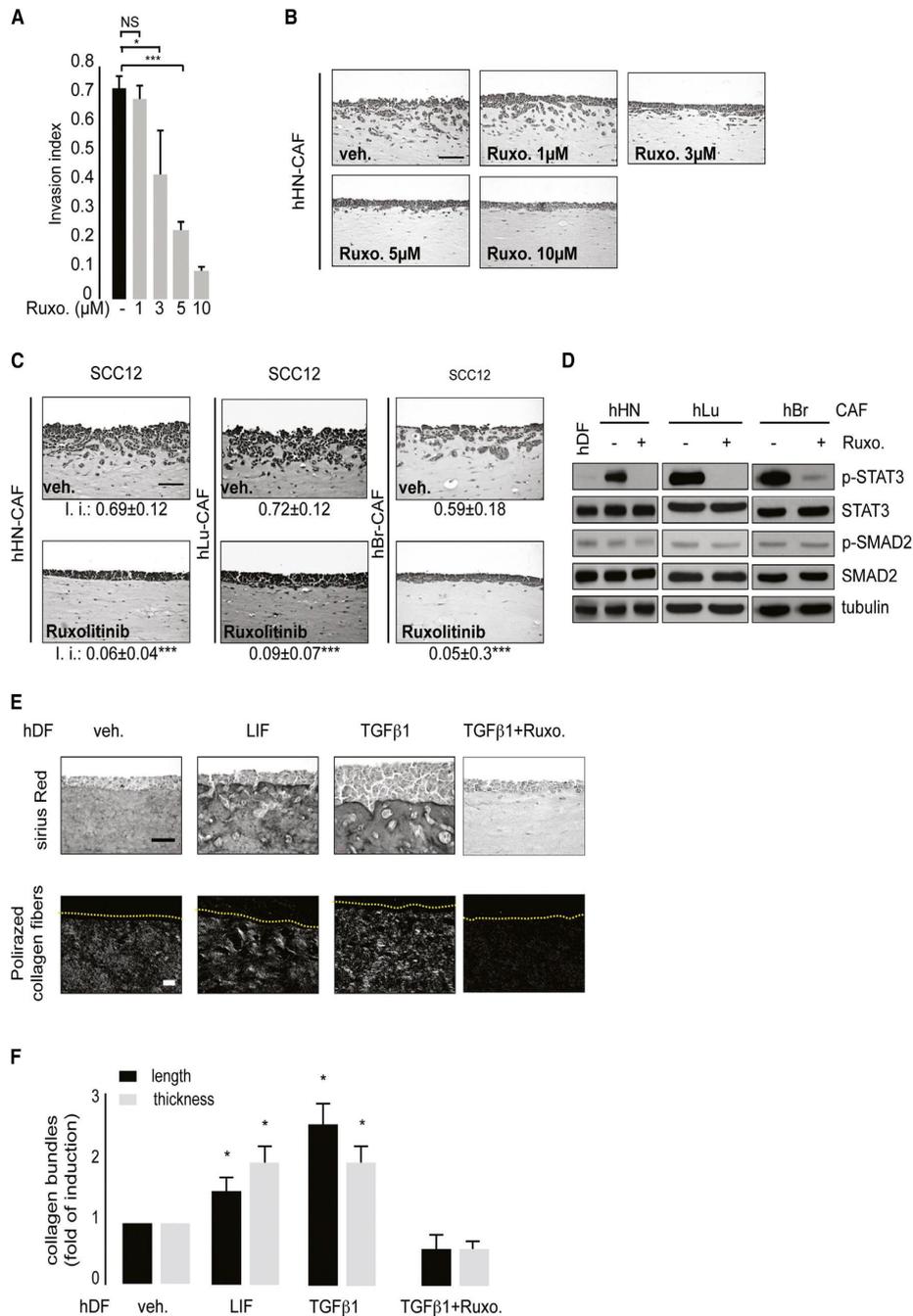


Figure 6. Ruxolitinib Prevents hCAF-Dependent Proinvasive Matrix Remodeling In Vitro

(A) Quantification of SCC12 cells invasion induced by hHN-CAF in presence of Ruxolitinib inhibitor at a stated range concentrations.

(B) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cells quantified in (A). Scale bar, 100 μm .

(C) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cells in response to three hCAF (HN, Lu, and Br) in presence or absence (veh.) of 10 μM Ruxolitinib. (I.I., invasion index; n = 3; mean \pm SD; ***p < 0.001.) Scale bar, 100 μm .

(legend continued on next page)

tumor-associated inflammation, which is a key step for stromal fibroblast proinvasive activation. LIF transcription regulation by TGF- β 1 was recently implicated in glioblastoma tumor-initiating cell renewal (Peñuelas et al., 2009), which suggests a general regulation of LIF by TGF- β 1 in cancer.

α -SMA expression, which is hallmark of CAFs (Kalluri and Zeisberg, 2006), is regulated by TGF- β -dependent signaling (Desmoulière et al., 1993), regulates fibroblasts contractility (Hinz et al., 2001), and correlates with poor clinical outcome in human tumors (Yamashita et al., 2012). Here, we provide evidence that LIF-stimulated dermal fibroblasts, independent of α -SMA expression, promote collagen gel contractility in vitro and that blockade of JAK activity in vivo results in inhibition of tumor-associated collagen network. LIF-activated dermal fibroblasts acquire a contractile phenotype via a crosstalk between the JAK1/STAT3 and RhoA/ROCK/MLC2 signaling pathways, suggesting that α -SMA and Rho-dependent contractility may be regulated by two distinct mechanisms both resulting in cell contractility and ECM remodeling. Within the tumor microenvironment, hCAF are highly heterogeneous, and α -SMA is not expressed by all hCAF cells (Sugimoto et al., 2006). Moreover, PDGFR α has been proposed to be a robust marker for CAFs in a mice model of skin cancer (Erez et al., 2010). Similarly, we noted an increased expression of PDGFR α after LIF stimulation in hPDF (data not shown). In light of our results, we propose that LIF generates subpopulations of CAF cells prone to malignancy independently of α -SMA expression. This may imply that monitoring α -SMA expression is not a criterion sufficient to disclose presence of all the proinvasive fibroblasts within the tumor stroma, which thus may lead to biased favorable prognosis for patients. In contrast, high expression of LIF cytokine in patients with both head and neck or lung carcinomas better correlates with poor clinical prognosis (Figures 5E and 5F).

Actomyosin contractility is crucial for CAF-dependent proinvasive matrix remodeling (Gaggioli et al., 2007). We now provide direct evidence that LIF supports TGF- β 1-dependent actomyosin contractility in hPDF. Accordingly, formation of collagen fibers in tumors is indicative of ECM densification and correlates with acquisition of invasive potential by tumor cells (Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005; Samuel et al., 2011). Similar to human SCC tumors overexpressing LIF, in vivo orthotopic mouse breast cancer model and hDF in vitro cell cultures disclose that LIF and JAK drive TGF- β 1-induced dense collagen fibers remodeling in vivo and in vitro through RhoA and MLC2 overexpression in hDF, which results in increased MLC2 phosphorylation and actomyosin contractility. Actomyosin contractility induces matrix stiffening (Samuel et al., 2011) and, conversely, stiff matrix activates YAP/TAZ and RhoA/ROCK-dependent signaling pathways in CAFs (Calvo et al., 2013) and favors tumor cell invasion (Calvo et al., 2013; Goetz et al., 2011; Levental et al., 2009; Paszek et al., 2005; Provenzano

et al., 2008). We now show that forced expression of a constitutively activated ROCK protein is sufficient to induce proinvasive fibroblasts activity in vitro. This loop may constitute a mechanism by which hPDF is also activated during tumorigenesis (Calvo et al., 2013). In this context, TGF- β signaling drives fibronectin extracellular matrix protein expression, whereas JAK1 kinase activity, by regulating actomyosin contractility, is responsible for protein assembly into the matrix, which suggests a collaborative role for both TGF- β and JAK signaling pathways in tumor fibrosis. This finding is in agreement with the fact that JAK2 drives the profibrotic effect of TGF- β signaling in systemic sclerosis and cutaneous fibrosis (Canady et al., 2013; Dees et al., 2012), a process also implying STAT3 in lung fibrosis (O'Donoghue et al., 2012). Because fibrosis is known to be mediated by excessive ECM remodeling and collagen fiber assembly (Wynn and Ramalingam, 2012), it is conceivable that the JAK1/STAT3 signaling route supports the hCAF profibrotic activity in cancer, which results in a matrix prone to collective cancer cell invasion. In light of our data, we propose that, via still undefined mechanisms, constitutive activation of STAT3 may occur in hCAF, which influences invasiveness of human cancers. Accordingly, blockade of JAK activity by the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib counteracts the TGF- β - and LIF-mediated fibroblast-dependent collective carcinoma cell invasion in vitro and in vivo. Ruxolitinib has been approved by the Food and Drug Administration for treatment of patients with intermediate or high-risk myelofibrosis (Mascarenhas and Hoffman, 2012), and this drug is also in a phase II clinical trial for patients with breast or pancreatic cancer in which STAT3 is frequently constitutively activated (Berishaj et al., 2007; Scholz et al., 2003). Therefore, clinical use of the JAK1/2 Ruxolitinib inhibitor may be a promising approach in combination with chemotherapies for patients suffering from aggressive cancers through the targeting of stromal fibroblasts and ECM-associated remodeling events.

In conclusion, our work reveals a novel role of LIF in malignancy. LIF signaling in fibroblasts results in proinvasive tumor microenvironment promotion and mediates TGF- β -dependent fibrosis in cancer. We speculate that blockade of JAK kinase activity within the tumor mass may constitute a promising therapeutic approach to counteract the CAF-dependent protumorigenic ECM remodeling.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Organotypic Invasion Assays

hDF or CAFs cultured during 1 week in serum-free medium (with either vehicle or cytokines) or CM were embedded in matrix gel. Fibroblasts (5×10^5) were embedded in a 1 ml mixture of collagen I and Matrigel (Gaggioli et al., 2007).

Invasion assay was defined by measuring the total areas of SCC cells versus noninvading SCC cells using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The value of invasion index is the average $1 - (\text{noninvading area}/\text{total area})$ of at least ten fields from three or more independent experiments.

(D) Immunoblotting of p-STAT3 and p-SMAD2 in three hCAF (HN, Lu and Br) cells compared to hDF in presence of 10 μ M Ruxolitinib. Immunoblots of STAT3, SMAD2, and tubulin shown as controls.

(E) Sirius Red staining of SCC12 cell organotypic invasion assays in presence of hDF control (Veh.) or stimulated by LIF and TGF- β 1 in presence or absence of Ruxolitinib. Top and bottom panels show Sirius Red staining under normal and polarized light respectively. Scale bar, 100 μ m.

(F) Quantification of thickness and length of collagen bundles shown in (E).

Matrix Remodeling Assay

Fibroblasts (2.5×10^4) were embedded in 100 μ l of matrix gel (Hooper et al., 2010). After 1 hr at 37°C, matrices were overlaid with 100 μ l serum-free medium (with vehicle or cytokines and/or inhibitors) or CM. Every 2 days, medium was changed, and at day 6 gels were photographed and the respective diameters of the well and gel were measured using ImageJ. The contraction was calculated using the formula $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter})/\text{well diameter}$.

Orthotopic Tumors in BALB/c Mice

Six- to 8-week-old female BALB/c mice were anesthetized using ketamine and xylazine by peritoneal injection. Skin was incised and 5×10^3 67NR or 410.4 cells were injected into the right and left fourth mammary fat pad in 10 μ l of PBS for each mouse. 67NR group consisted of two mice (four primary tumors), 410.4 group of seven mice (14 tumors), and 410.4 with additional treatment of Ruxolitinib (30 mg/kg/day) group of five mice (ten tumors). Mice were sacrificed 30 days postinjection, and Ruxolitinib treatment started 7 days after injection; primary tumors were removed and fixed in PBS containing 3.7% formalin for 8 hr, followed by PBS and transfer to 70% ethanol, and then embedded in paraffin and sectioned and stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry detection using anti-LIF, anti-p-STAT3, and anti- α -SMA antibodies was performed on paraffin sections following manufacturer's instructions. The protocol was approved by the local ethic committee of the IRCAN institute.

LIF Immunohistological Staining

Formalin-fixed tissues (3.7% in PBS) were transferred to 70% ethanol, embedded in paraffin wax, and sectioned at 7 μ m. After deparaffination, microwave antigen retrieval was performed in Na-citrate buffer (10 mM [pH 6] 5 min at 900 W and 25 min at 150 W), and sections were washed in PBS. Endogenous peroxidase activity was then blocked in 1% H₂O₂ in water for 10 min and sections were washed. After incubation in blocking buffer for 2 hr (10% rabbit serum [S-5000, Vector Laboratories]; 0.3% Triton X-100 in PBS), sections were incubated with LIF primary antibody (#sc-1336, Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:50 in blocking buffer overnight at 4°C. For negative controls, rabbit IgG replaced the primary antibody. After three washes in PBS, sections were incubated with biotinylated anti-goat IgG (#BA-5000, Vector Labs) diluted 1:400 in PBS for 30 min and washed in PBS. Samples were processed using Vectastain ABC kit (#PK4001, Vector Labs) and DAB peroxidase substrate kit (#SK4100, Vector Labs) according to manufacturer's instructions. Sections were counterstained with hematoxylin for 5 s, rinsed in water, blued 10 s in 0.08% ammonia water, dehydrated, cleared, and mounted with cover clips.

LIF Staining, Fibrosis, and Tumor Invasion Quantification Method

The protocol was approved by the local ethic committee of the Nice University Hospital. All patients signed an informed consent for inclusion into a research project. All the observations on tumor samples were performed by independent double-blind examiners. The Quick Score (QS) with a 0–16 point scale was used to score the LIF cytokine status within the tumor cells. The QS takes into account both the percentage of positive cells (P, with a 0–4 point scale) and the corresponding staining intensity (I, with a 0–4 point scale) using the formula: $QS = P \times I$. Sirius red staining observed under polarized light was used to score fibrosis within the samples with a 0–4 point scale (0 = no staining; 4 = very strong staining). Fibrosis was quantified on low and high fibrotic samples as determined before by measuring the mean gray value with ImageJ software. Invasion of cancer cells was scored using a 0- to 4-point scale (from 0 = no invasion, to 4 = strong invasion of tumor cells). The number of invasive collective strands and sheets within the stroma was used to score the samples.

Statistical Analysis

Student's t test was performed for quantifications of invasion assay, matrix remodeling assay, ELISA test, and quantitative PCR results (**p < 0.001; *p < 0.01; *p < 0.05).

Kaplan-Meier survival curves were obtained using the PRISM software by comparing two groups of high and low LIF-expressing tumors; p values were obtained using Gehan-Breslow-Wilcoxon test.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, six figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.036>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.A. and C.G. designed and performed most of the experiments and analyzed data; I.B. and C.P. performed experiments; V.B. and P.H. provided human carcinomas samples; S.T.-D. provided data for Table 1; C.C.F. designed experiments, performed surgery experiment, and analyzed data from Figure 4; J.A., G.M., and C.G. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the IRCAN Core Facility for technical assistance in mice, immunohistological, microscopy, and genomic analyses. We thank Mr. E. Selva (Hospital-Integrated Tumor Biobank, Pasteur Hospital, Nice, France) for helping to select the tumor samples. We thank Dr. M. Olson (Beatson Institute, Glasgow, UK), Pr. G. Milano (Centre Antoine Lacassagne, Nice, France), and Dr. T. Maginaldo (IRCAN) for reagents. We thank Drs. E. Sahai, V. Sanz-Moreno, and S. Estrach for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from ARC (RAC12001AAA) and FRM (RAD12004AAA). J.A. is a recipient of an MRT fellowship.

Received: April 17, 2013

Revised: March 27, 2014

Accepted: April 21, 2014

Published: May 22, 2014

REFERENCES

- Achtyl, B.R., Bader, D.A., Robles, A.I., Wangsa, D., Harris, C.C., Ried, T., and Yang, L. (2013). Inflammation-mediated genetic and epigenetic alterations drive cancer development in the neighboring epithelium upon stromal abrogation of TGF- β signaling. *PLoS Genet.* 9, e1003251.
- Aslakson, C.J., and Miller, F.R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 52, 1399–1405.
- Beacham, D.A., and Cukierman, E. (2005). Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* 15, 329–341.
- Berishaj, M., Gao, S.P., Ahmed, S., Leslie, K., Al-Ahmadie, H., Gerald, W.L., Bommann, W., and Bromberg, J.F. (2007). Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 9, R32.
- Howmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004a). TGF- β signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303, 848–851.
- Howmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004b). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.
- Boyd, N.F., Guo, H., Martin, L.J., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., Jong, R.A., Hislop, G., Chiarelli, A., Minkin, S., and Yaffe, M.J. (2007). Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 356, 227–236.
- Calvo, F., and Sahai, E. (2011). Cell communication networks in cancer invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 621–629.
- Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V., Iglesias, M., Céspedes, M.V., Sevillano, M., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X.H., et al. (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 22, 571–584.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-García, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moendardary, E., Charras, G., and Sahai,

- E. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* *15*, 637–646.
- Canady, J., Amndt, S., Karrer, S., and Bosserhoff, A.K. (2013). Increased KGF Expression Promotes Fibroblast Activation in a Double Paracrine Manner Resulting in Cutaneous Fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 647–657.
- Chen, D., Sun, Y., Wei, Y., Zhang, P., Rezaeian, A.H., Teruya-Feldstein, J., Gupta, S., Liang, H., Lin, H.K., Hung, M.C., and Ma, L. (2012). LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nat. Med.* *18*, 1511–1517.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S., and Hynes, R.O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* *406*, 532–535.
- Connolly, E.C., Freimuth, J., and Akhurst, R.J. (2012). Complexities of TGF- β targeted cancer therapy. *Int. J. Biol. Sci.* *8*, 964–978.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* *420*, 860–867.
- Croft, D.R., and Olson, M.F. (2006). Conditional regulation of a ROCK-estrogen receptor fusion protein. *Methods Enzymol.* *406*, 541–553.
- De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., and Bracke, M. (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer* *123*, 2229–2238.
- Dees, C., Tomcik, M., Palumbo-Zerr, K., Distler, A., Beyer, C., Lang, V., Horn, A., Zerr, P., Zwerina, J., Gelse, K., et al. (2012). JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor β in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* *64*, 3006–3015.
- Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., and Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor- β 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* *122*, 103–111.
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., and Hanahan, D. (2010). Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF- κ B-dependent manner. *Cancer Cell* *17*, 135–147.
- Franco, O.E., Jiang, M., Strand, D.W., Peacock, J., Fernandez, S., Jackson, R.S., 2nd, Revelo, M.P., Bhowmick, N.A., and Hayward, S.W. (2011). Altered TGF- β signaling in a subpopulation of human stromal cells promotes prostatic carcinogenesis. *Cancer Res.* *71*, 1272–1281.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., and Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1392–1400.
- García-Tuñón, I., Ricote, M., Ruiz, A., Fraile, B., Paniagua, R., and Royuela, M. (2008). OSM, LIF, its receptors, and its relationship with the malignance in human breast carcinoma (in situ and in infiltrative). *Cancer Invest.* *26*, 222–229.
- Goetz, J.G., Minguet, S., Navarro-Lérica, I., Lazcano, J.J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A., et al. (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* *146*, 148–163.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G., and Chaponnier, C. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2730–2741.
- Hooper, S., Gaggioli, C., and Sahai, E. (2010). A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *Br. J. Cancer* *102*, 392–402.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 239–252.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 392–401.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., and Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* *86*, 1243–1254.
- Lederle, W., Depner, S., Schnur, S., Obermueller, E., Catone, N., Just, A., Fussenig, N.E., and Mueller, M.M. (2011). IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *Int. J. Cancer* *128*, 2803–2814.
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F., Csiszar, K., Giaccia, A., Wenginger, W., et al. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* *139*, 891–906.
- Lin, X.D., Chen, S.Q., Qi, Y.L., Zhu, J.W., Tang, Y., and Lin, J.Y. (2012). Overexpression of thrombospondin-1 in stromal myofibroblasts is associated with tumor growth and nodal metastasis in gastric carcinoma. *J. Surg. Oncol.* *106*, 94–100.
- Mascarenhas, J., and Hoffman, R. (2012). Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. *Clin. Cancer Res.* *18*, 3008–3014.
- Mordasky Markell, L., Pérez-Lorenzo, R., Masiuk, K.E., Kennett, M.J., and Glick, A.B. (2010). Use of a TGF β type I receptor inhibitor in mouse skin carcinogenesis reveals a dual role for TGF β signaling in tumor promotion and progression. *Carcinogenesis* *31*, 2127–2135.
- Navab, R., Strumpf, D., Bandarchi, B., Zhu, C.Q., Pintilie, M., Ramnarine, V.R., Ibrahimov, E., Radulovich, N., Leung, L., Barczyk, M., et al. (2011). Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 7160–7165.
- O'Donoghue, R.J., Knight, D.A., Richards, C.D., Prêle, C.M., Lau, H.L., Jarnicki, A.G., Jones, J., Bozinovski, S., Vlahos, R., Thiem, S., et al. (2012). Genetic partitioning of interleukin-6 signalling in mice dissociates Stat3 from Smad3-mediated lung fibrosis. *EMBO Mol Med* *4*, 939–951.
- Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., and Cunha, G.R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* *59*, 5002–5011.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* *121*, 335–348.
- Pardanani, A., Lasho, T., Smith, G., Burns, C.J., Fantino, E., and Tefferi, A. (2009). CYT387, a selective JAK1/JAK2 inhibitor: in vitro assessment of kinase selectivity and preclinical studies using cell lines and primary cells from polycythemia vera patients. *Leukemia* *23*, 1441–1445.
- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* *8*, 241–254.
- Peñuelas, S., Anido, J., Prieto-Sánchez, R.M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., García-Dorado, D., Poca, M.A., Sahuquillo, J., Baselga, J., and Seoane, J. (2009). TGF- β increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* *15*, 315–327.
- Phan, S.H. (2008). Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc. Am. Thorac. Soc.* *5*, 334–337.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Knittel, J.G., Yan, L., Rueden, C.T., White, J.G., and Keely, P.J. (2008). Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.* *6*, 11.
- Samuel, M.S., Lopez, J.I., McGhee, E.J., Croft, D.R., Strachan, D., Timpson, P., Munro, J., Schröder, E., Zhou, J., Brunton, V.G., et al. (2011). Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell* *19*, 776–791.
- Sanz-Moreno, V., Gaggioli, C., Yeo, M., Albrengues, J., Wallberg, F., Viros, A., Hooper, S., Mitter, R., Féral, C.C., Cook, M., et al. (2011). ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell* *20*, 229–245.
- Scholz, A., Heinze, S., Detjen, K.M., Peters, M., Welzel, M., Hauff, P., Schirmer, M., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2003). Activated signal transducer and

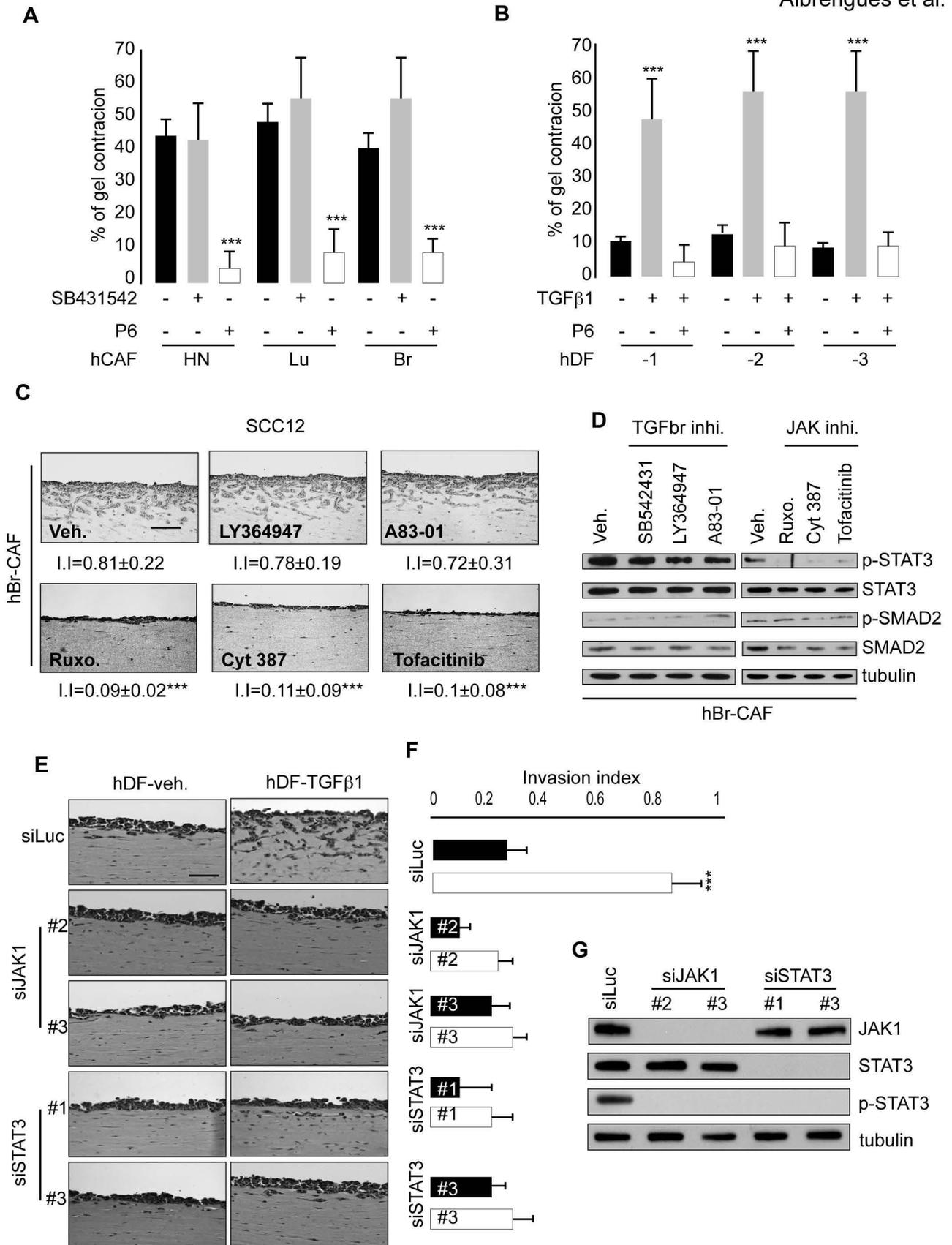
- activator of transcription 3 (STAT3) supports the malignant phenotype of human pancreatic cancer. *Gastroenterology* 125, 891–905.
- Shi, M., Yu, D.H., Chen, Y., Zhao, C.Y., Zhang, J., Liu, Q.H., Ni, C.R., and Zhu, M.H. (2012). Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J. Gastroenterol.* 18, 840–846.
- Sriuranpong, V., Park, J.I., Amornphimoltham, P., Patel, V., Nelkin, B.D., and Gutkind, J.S. (2003). Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res.* 63, 2948–2956.
- Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., and Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1640–1646.
- Szepietowski, J.C., Reich, A., and McKenzie, R.C. (2004). The multifunctional role of leukaemia inhibitory factor in cutaneous biology. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* 13, 125–129.
- Takahashi, Y., Ishii, G., Taira, T., Fujii, S., Yanagi, S., Hishida, T., Yoshida, J., Nishimura, M., Nomori, H., Nagai, K., and Ochiai, A. (2011). Fibrous stroma is associated with poorer prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *J. Thorac. Oncol.* 6, 1460–1467.
- Trimboli, A.J., Cantemir-Stone, C.Z., Li, F., Wallace, J.A., Merchant, A., Creasap, N., Thompson, J.C., Caserta, E., Wang, H., Chong, J.L., et al. (2009). Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* 461, 1084–1091.
- Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* 18, 1028–1040.
- Wysoczynski, M., Miekus, K., Jankowski, K., Wanzeck, J., Bertolone, S., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., and Ratajczak, M.Z. (2007). Leukemia inhibitory factor: a newly identified metastatic factor in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.* 67, 2131–2140.
- Yamashita, M., Ogawa, T., Zhang, X., Hanamura, N., Kashikura, Y., Takamura, M., Yoneda, M., and Shiraiishi, T. (2012). Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer* 19, 170–176.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.

Cell Reports, Volume 7

Supplemental Information

LIF Mediates Proinvasive Activation of Stromal Fibroblasts in Cancer

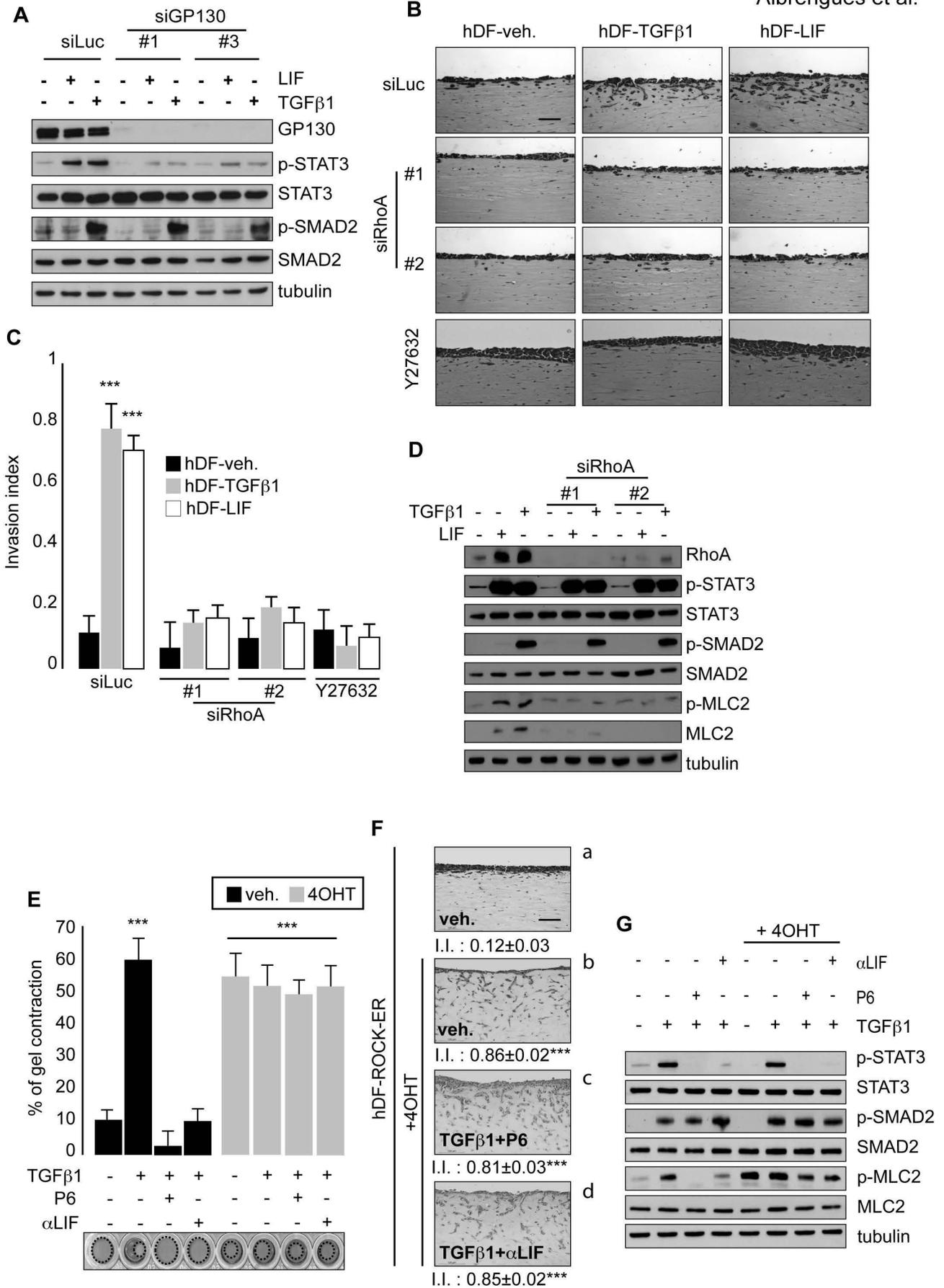
Jean Albregues, Isabelle Bourget, Catherine Pons, Vincent Butet, Paul Hofman,
Sophie Tartare-Deckert, Chloe C. Feral, Guerrino Meneguzzi, and Cedric Gaggioli



Supp. Figure 1

Supplementary Figure S1 related to Figure 1:

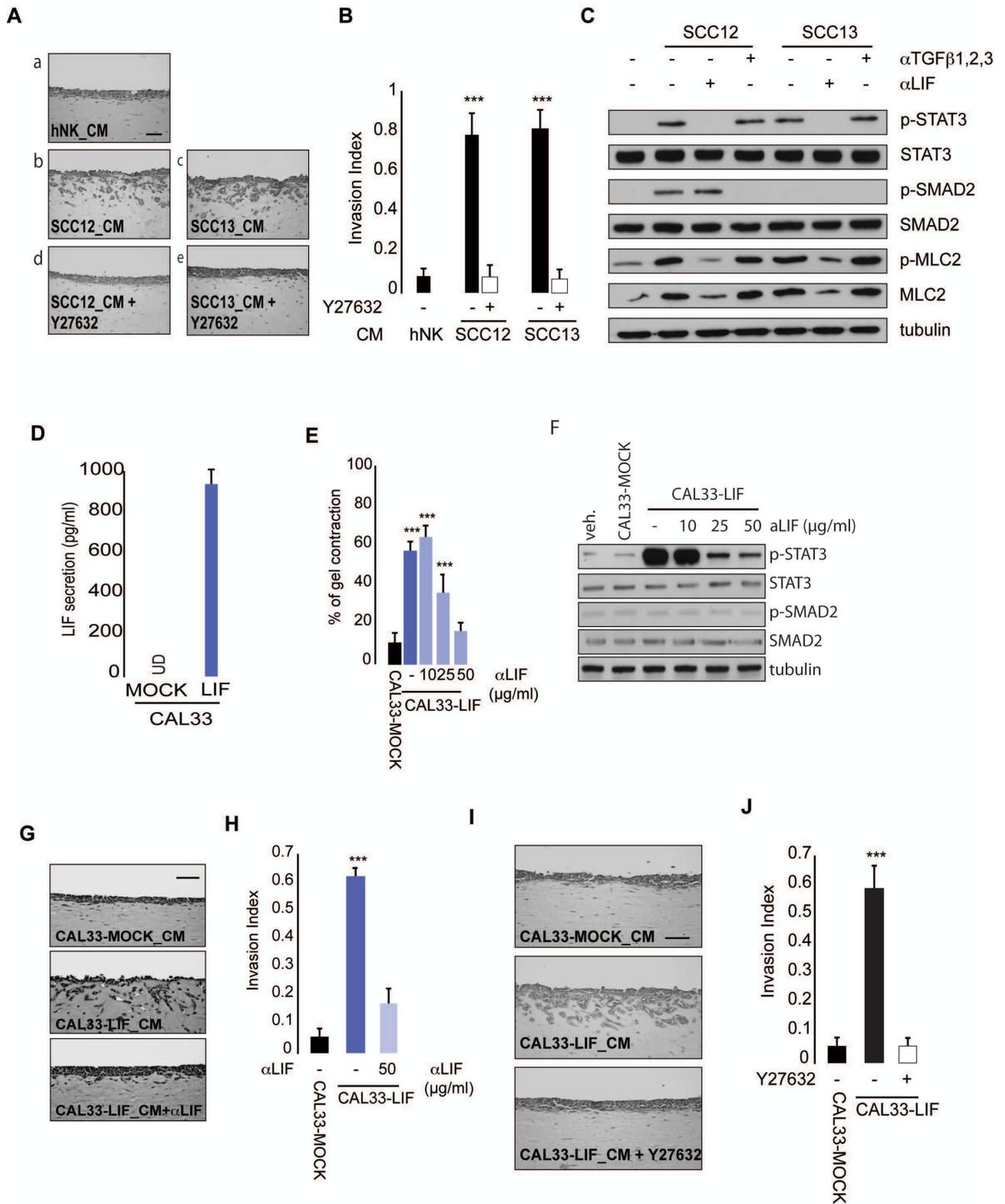
A) Quantification of matrix remodeling by hCAF isolated from head and neck (HN), lung (Lu) and breast (Br) tumors in control (black) and in the presence of SB431542 inhibitor (grey) or P6 (white) (n=3 in triplicates; mean + SD; ***p<0.001). B) Quantification of matrix remodeling by hDF (hDF-1, -2 and -3) in control (black) or stimulated by TGF β 1 (grey) in the presence of P6 (white) (n=3 in triplicates; mean + SD; ***p<0.001). C) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cells in response to hBr-CAF and exposed to TGF β 1 inhibitors LY364497 and A83-01, JAK1 inhibitors Ruxolitinib, Cyt 387 and Tofacinib or control (Veh). (I.I.= Invasion index; n=3; mean \pm SD; ***p<0.001). D) Immunoblotting of p-STAT3 and p-SMAD2 in hBr-CAF following TGF β 1 and JAK1 inhibitory treatment. STAT3, SMAD2 and tubulin immunoblots shown as controls. E) H&E staining of paraffin embedded section of SCC12 cell invasion assays induced by TGF β 1-stimulated hDF following JAK1 and STAT3 protein depletion. siLuc used as RNAi control transfection. Scale bar 100um. F) Quantification of SCC12 cell organotypic invasion assay index from assays shown in C. (n=3; mean + SD; ***p<0.001). G) Immunoblotting of JAK1, STAT3, p-STAT3 and tubulin after RNAi mediated JAK1 and STAT3 depletion. siLuc as control of RNAi transfection.



Supp. Figure 2

Supplementary Figure S2 related to Figure 2:

A) Immunoblot of p-STAT3 and p-SMAD2 induced by TGF β 1 and LIF after RNAi mediated GP130-IL6ST depletion. siLuc was used as RNAi control. Immunoblot of GP130-IL6ST, STAT3, SMAD2 and tubulin shown as controls. B) H&E coloration of paraffin embedded section of SCC12 cell invasion assays induced by LIF and TGF β 1-stimulated hDF following RhoA protein depletion (siRhoA) or ROCK (Y27632) inhibitor treatment. siLuc was used as RNAi control transfection. Scale bar 100um. C) Quantification of SCC12 cell invasion index from assays in B. siLuc was used as RNAi control transfection. (n=3; mean + SD; ***p<0.001). D) Immunoblot of total RhoA, p-STAT3, p-SMAD2, p-MLC2 and total MLC2 induced by TGF β 1 and LIF following RhoA depletion after 5 days. siLuc is used as RNAi control transfection. Immunoblot of STAT3, SMAD2 and tubulin as control. E) Quantification of matrix remodeling by hDF and hDF-ROCKER an active form of ROCK stimulated by 4-Hydroxytamoxifen (+4OHT) treatment stimulated by TGF β 1 in the presence or absence of P6 inhibitor and LIF (α LIF) blocking antibody. (n=3 in triplicates; mean + SD; ***p<0.001). Bottom panel shows scanned images of the contracted gel. F) H&E coloration of paraffin embedded section of SCC12 cell invasion assays induced by hDF and hDF-ROCKER (\pm 4OHT) stimulated by TGF β 1 in the presence or absence of P6 inhibitor and LIF (α LIF) blocking antibody. (I.I.= Invasion index; n=3; mean \pm SD; ***p<0.001). Scale bar 100um. G) Immunoblot of p-STAT3, p-SMAD2, p-MLC2 and total MLC2 induced by TGF β 1 and LIF in hDF-ROCKER following 4OHT treatment for 24 hours. Immunoblot of STAT3, SMAD2 and tubulin shown as control.

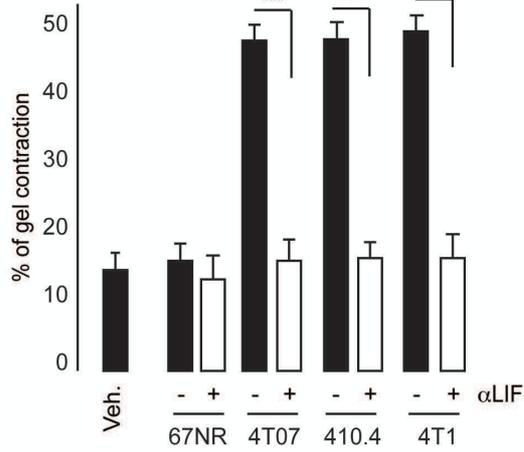


Supp. Figure 3

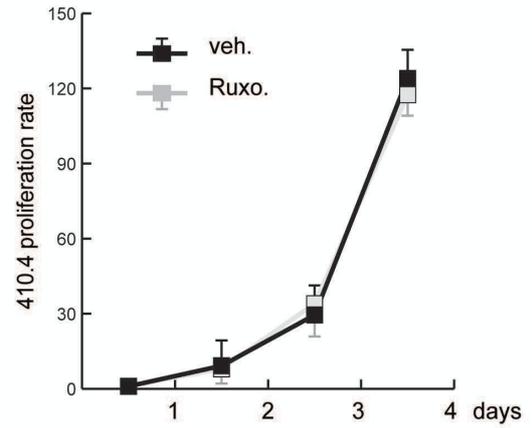
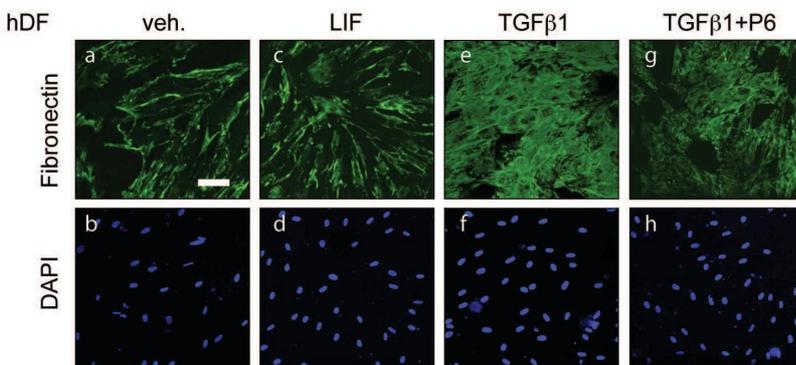
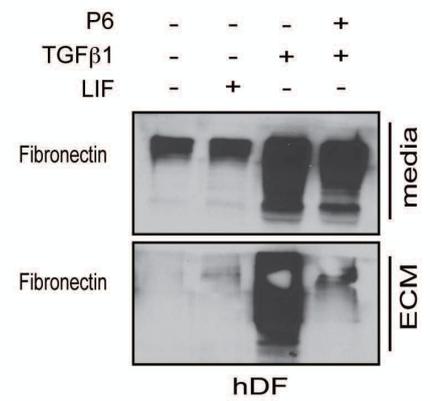
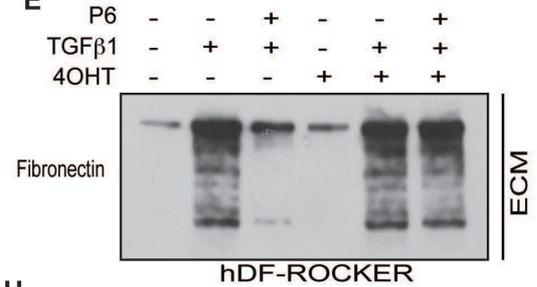
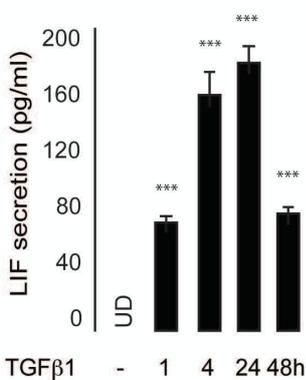
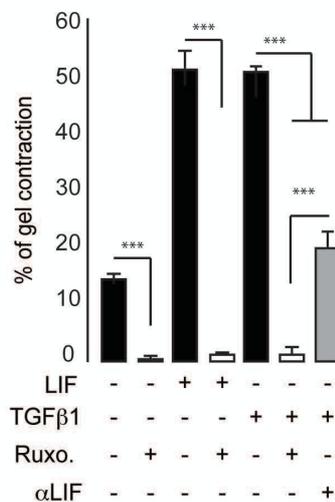
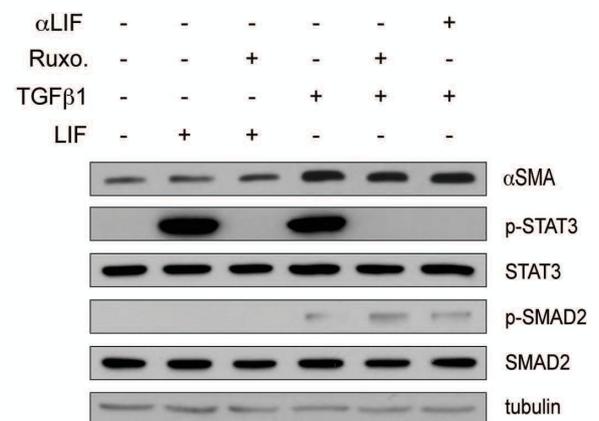
Supplementary Figure S3 related to Figure 3:

A) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cell organotypic invasion assays in the presence of hDF cells cultured in CM by hNK (a), SCC12 (b) and SCC13 (c) in presence of Y27632 ROCK inhibitor (d,e). Scale bar 100 μ m. B) Quantification of SCC12 cell invasion index from A. (n=3; mean +SD; ***p<0.001). C) Immunoblotting of p-STAT3, p-SMAD2 and p-MLC2 in hDF long-term stimulated (5 days) using SCC12 and SCC13 CM in the absence or presence of LIF and TGF β 1, 2, 3 blocking antibodies. Immunoblottings of total STAT3, SMAD2, MLC2 and tubulin as control. D) Quantification of LIF secreted by control (MOCK) and hLIF cDNA transfected human CAL33 tumor cells (CAL33-LIF). UD= Undetected. (n=3 in duplicates + SD). E) Quantification of gels contracted by hDF grown in the presence of control (MOCK; black) and hLIF cDNA-transfected CAL33 tumor cell conditioned media (CAL33-LIF; blue) in the presence of LIF blocking antibody (α LIF; light blue) at 10, 25 and 50 μ g/ml final concentration. (n=3 in triplicates + SD. ***p<0.001). F) Immunoblottings of p-STAT3 and p-SMAD2 in hDF after short-term stimulation by control (veh.) transfected (MOCK) and engineered CAL33-LIF cell spent media in the absence or presence of increasing concentration (10, 25 and 50 μ g.ml⁻¹) of LIF blocking antibody. Immunoblottings of total STAT3, SMAD2 and tubulin shown as controls. G) Representative images of H&E staining of paraffin-embedded sections of SCC12 cell organotypic invasion assays in the presence of hDF cells cultured in CAL33-mock transfected conditioned media or CAL33-LIF transfected conditioned media in the presence of LIF blocking antibody at 50 μ g.ml⁻¹. Scale bar 100 μ m. H). Quantification of SCC12 cell invasion index from assays shown in G. (n=3; mean + SD; ***p<0.001). I) H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 cell organotypic invasion assays in the presence of hDF cells cultured in CAL33-mock

transfected CM or CAL33-LIF transfected CM in the presence of the Y27632 ROCK inhibitor. Scale bar 100 μ m. J) Quantification of SCC12 cells invasion index from assays shown in D. (n=3; mean + SD; ***p<0.001).

A**B**

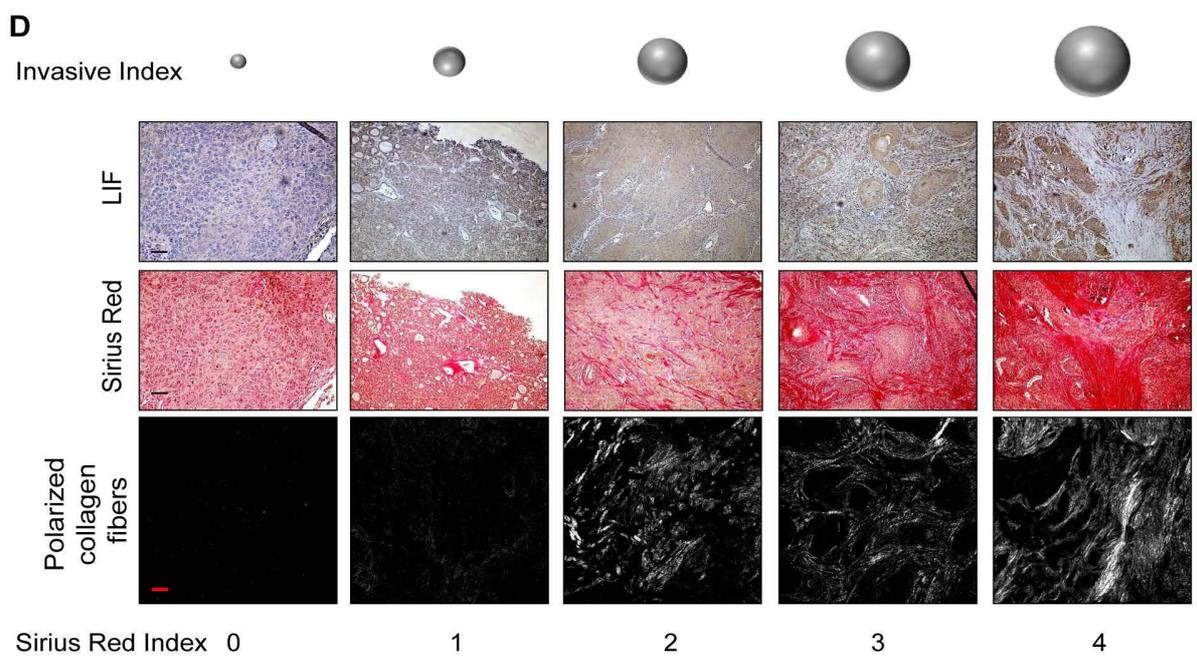
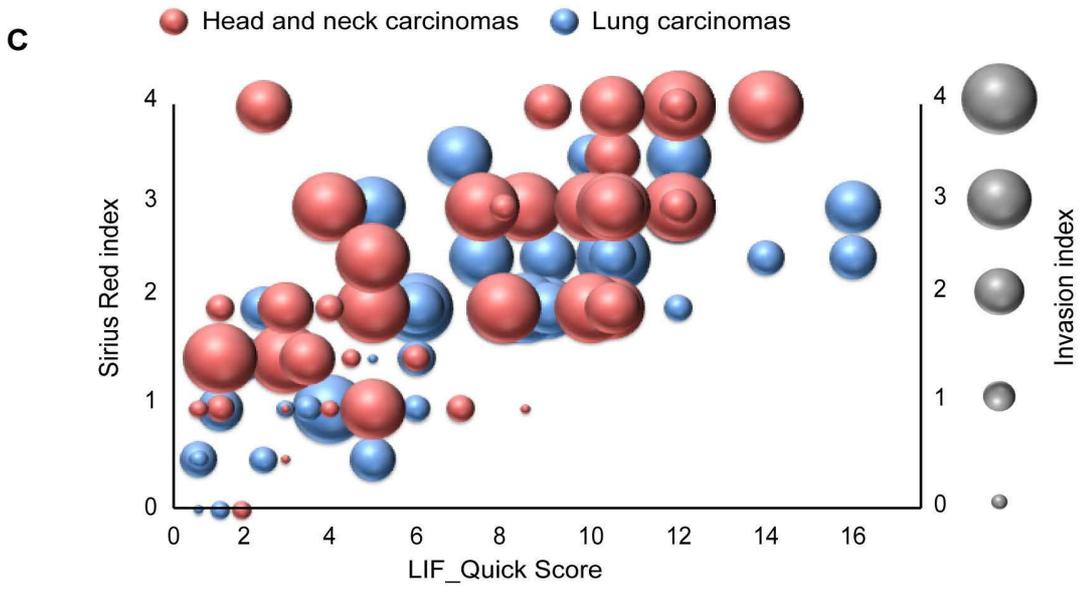
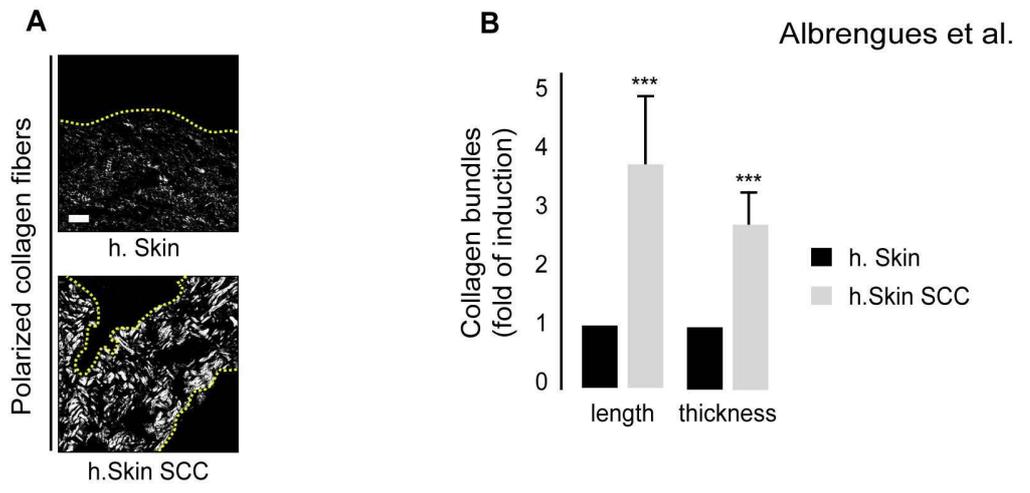
Albregues et al.

**C****D****E****F****G****H**

Supp. Figure 4

Supplementary Figure S4 related to Figure 4:

A) Quantification of gels contracted by mouse dermal fibroblasts grown in the presence of control (veh.) or 67NR, 4T07, 410.4 and 4T1 cell CM in the absence or presence of LIF blocking antibody at 10 μ g/ml final concentration. (n=3 in triplicates + SD. ***p<0.001). B) Quantification of mouse 410.4 cell proliferation in presence or absence of Ruxolitinib (10 μ M) for 4 days (n=3 in triplicates \pm SD). C) Confocal images of fibronectin staining (green) in hDF stimulated by TGF β 1 and LIF in presence or absence of P6. DAPI (blue) staining as control. Scale bar 50 μ m. D) Immunoblot of fibronectin secretion (top panel; media) and assembly (bottom panel; ECM) from hDF stimulated by TGF β 1 or LIF in presence or absence of P6. E) Immunoblot of fibronectin assembly from hDF-ROCKER (\pm 4OHT) stimulated by TGF β 1 in the presence or absence of P6. F) ELISA quantification of LIF secreted in TGF β 1-stimulated murine dermal fibroblasts culture media. (UD= Undetectable; n=3 in duplicates; mean + SD; ***p<0.001). G) Quantification of matrix remodeling by mouse dermal fibroblasts stimulated by TGF β 1 or LIF in the presence or absence of Ruxolitinib (10 μ M) or LIF (α LIF) blocking antibody. (n=3 in triplicates; mean + SD; ***p<0.001). H) Immunoblotting of α -SMA, p-STAT3 and p-SMAD2 in mouse dermal fibroblasts long-term stimulated (7 days) using LIF and TGF β 1 cytokines in the presence or absence of Ruxolitinib (10 μ M) or LIF (α LIF) blocking antibody. Immunoblottings of total STAT3, SMAD2 and tubulin shown as controls.



Supp. Figure 5

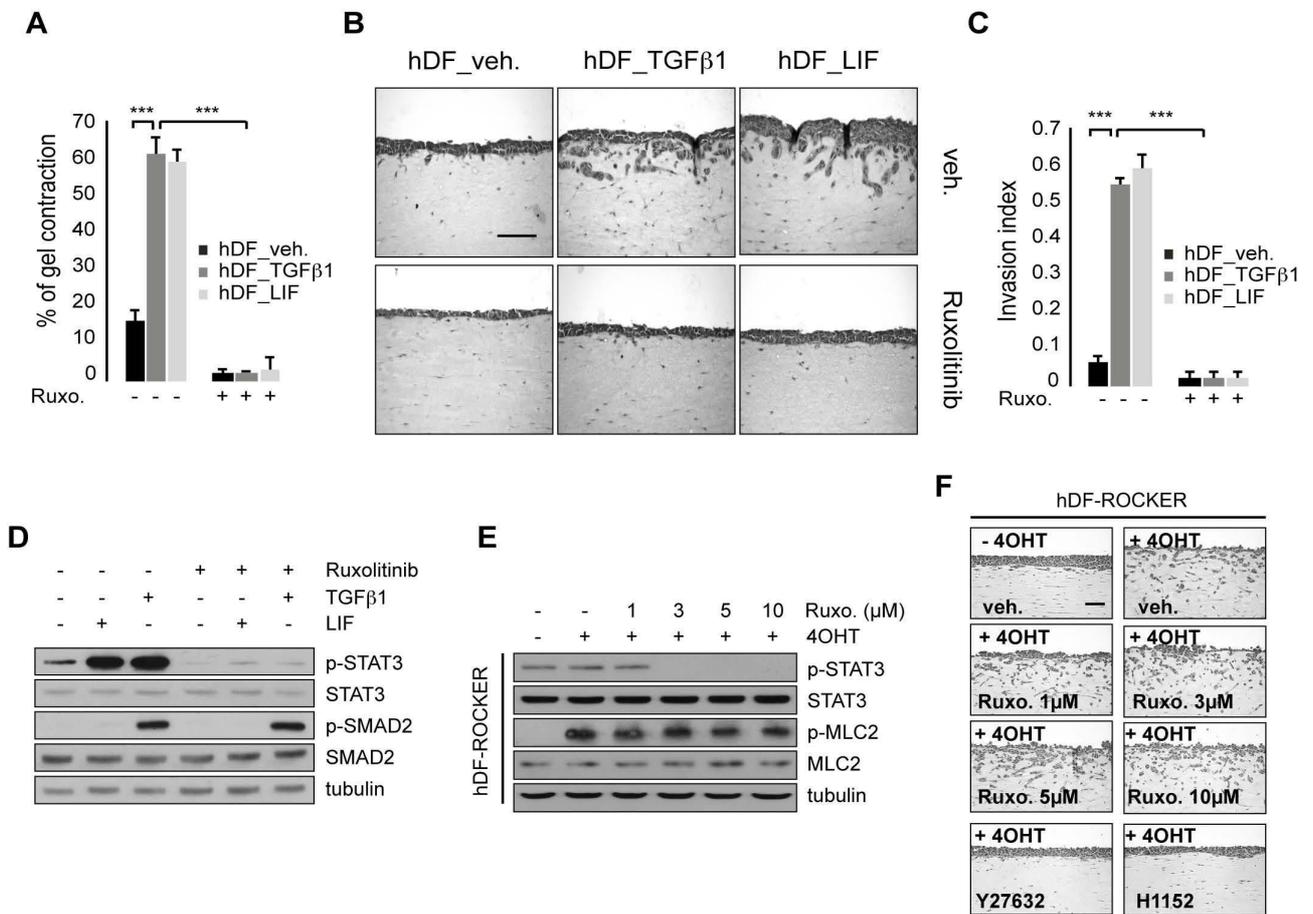
Supplementary Figure S5 related to figure 5:

A) Sirius Red stained collagen bundles observed under polarized light in normal human skin and SCC. Dotted yellow line shows tissue perimeters. Scale bar 100 μ m.

B) Quantification of thickness and length of collagen bundles shown in panel C: human normal skin (n=4) and grade 1 and 2 SCC (n=17) + SD. **p<0.01.

C) Three-parameter graphs showing the relative Sirius Red index, LIF quick score and relative invasion index, which are proportional to the diameter of spheres each corresponding to a human biopsy specimen of lung (n=50) and head and neck carcinomas (n=50).

D) IHC pictures used to define LIF quick score, Sirius Red index and invasion index. Top panels (left to right) show LIF IHC staining ranging from no to high expression level (right), middle and bottom panels show the corresponding Sirius Red staining and Sirius Red staining under polarized light, respectively. Invasion index is indicated by the sphere diameters corresponding to no invasion (left) to highly invasive tumor (right).



Supp. Figure 6

Supplementary Figure S6 related to Figure 6:

A) Quantification of matrix remodeling by hDF in control (black) or stimulated by TGF β 1-stimulated (grey) or LIF-stimulated (white) hDFs in the presence of Ruxolitinib (n=3 in triplicates; mean + SD; ***p<0.001). B) H&E coloration of paraffin embedded section of SCC12 cell invasion assays induced by TGF β 1- or LIF-stimulated hDF in presence or absence of 10 μ M Ruxolitinib. Scale bar 100 μ m. C) Quantification of SCC12 cell organotypic invasion assay index from assays shown in B. (n=3; mean + SD; ***p<0.001). D) Immunoblotting of p-STAT3 and p-SMAD2 in hDF stimulated by either LIF or TGF β 1 in the presence or absence of 10 μ M Ruxolitinib. Immunoblot of STAT3, SMAD2 and tubulin shown as controls. E) Immunoblotting of p-STAT3 and p-MLC2 in hDF-ROCKER stimulated or not by 4OHT in the presence of range concentration of Ruxolitinib. Immunoblots of STAT3, SMAD2 and tubulin shown as controls. F) H&E coloration of paraffin embedded section of SCC12 cell invasion assays induced by hDF-ROCKER (\pm 4OHT) in the presence or absence of range concentration of Ruxolitinib inhibitor. (n=3; mean + SD; ***p<0.001). Scale bar 100 μ m.

Supp Table 1

Cancer cell lines	Designation
Human fibroblasts	
hPDF1 & 2	Human primary dermal fibroblasts, isolated from foreskins biopsies
hPDF3	Human primary dermal fibroblasts, isolated from breast reduction surgery
hHN-CAF	Human immortalized head and neck carcinoma associated fibroblasts (gaggioli et al. 2007))
hLu-CAF	Human primary lung carcinoma associated fibroblasts (PC 60163A1; Asterand)
hBr1-CAF	Human primary breast carcinoma associated fibroblasts (PC 87332A1; Asterand)
Human Primary Keratinocytes	
hNK	Human primary keratinocytes, isolated from foreskins biopsies
Human Squamous Cell Carcinoma cell lines	
SCC12	Human epidermoid carcinoma (gift from E. Sahai)
SCC13	Human epidermoid carcinoma (gift from T. Magnaldo)
SCC25	Human carcinoma from tongue (ATCC number CRL-1628)
CAL27	Human carcinoma from tongue (ATCC number CRL-2095)
CAL33	Human head and neck SCC (gift from G. Milano)
CAL60	Human head and neck SCC (gift from G. milano)
CAL166	Human head and neck SCC (gift from G. Milano)
Detroit 562	Human carcinoma from pharynx (ATCC number CCL-138)
Colon Carcinoma cell line	
LS174	human adenocarcinoma (ATCC number CL-188)
Lung Carcinoma cell line	
A549	Human carcinoma from lung (ATCC number CCL-185)
Breast Carcinomas	
MDA-MD-231	Human mammary adenocarcinoma (ATCC number HTB-26)
MDA-MD-468	Human mammary adenocarcinoma (ATCC number HTB-130)
Melanoma cell lines	
A375P	Human melanoma (parental) (gift from C. Marshall)
A375M2	Human melanoma (highly metastatic derived from A375P) (gift from C. Marshall)
Mel501	Human melanoma (gift from S. Tartare-Deckert)

Supp. Table 1 related to supplementary experimental procedures

Primary cell cultures and cell lines used in the study.

Supp. Table 2 related to Figure 5

Human carcinomas used in the study and quantification of the respective LIF immunohistological staining signal, Sirius Red index and invasion index.

Values determined by pathologists after double-blind examination of each tumor specimens. For immunohistochemical staining of LIF: **I score** = Intensity of staining (0-negative; 1-weak; 2-moderate; 3-strong; 4-very strong); **P score** = Percentage of positive staining: 0<10% of positive signal; 10%<1<25%; 26%<2<50%; 51%<3<75%; 76%<4<100%. **Total score** = P x I. For Sirius Red index: 0-negative; 1-weak; 2-moderate; 3-strong; 4-very strong. For Invasion index: 0-negative; 1-weak; 2-moderate; 3-strong; 4-very strong.

Experimental procedures

Cell Culture.

Human Primary Dermal Fibroblasts (hDF-1, -2 and -3) were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. CAFs were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and insulin-transferrin-selenium (#41400-045; Invitrogen, Carlsbad, CA). Oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines (SCC12, SCC13, CAL25, CAL27, CAL33, CAL60, CAL166, Detroit 562) were cultured in FAD media (Gaggioli et al., 2007). Melanoma (Mel501, A375P, A375M2, Sccl2, WM35, WM278, WM793 and Mel1205) breast (MDA-MB-231, MDA-MB-468) lung (A549), and colon (LS174) cancer cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. Human Normal Keratinocytes (hNK) isolated from healthy neonatal foreskins were cultured on a feeder layer of lethally irradiated 3T3-J2 fibroblasts in FAD medium, as described before (Rheinwald and Green, 1975). Mouse dermal fibroblasts and carcinoma cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. Primary fibroblasts and primary CAFs were used at passages 3 to 8 for each *in vitro* experiment. All cells used in this study are listed in Supplementary Table 1.

SiRNA Transfections.

Fibroblasts were transfected using Dharmafect 3 (#T-2002-02; Dharmacon, inc., Lafayette, CO). Briefly, cells were plated at 60% confluence and subjected to transfection the following day using 100nM final concentration of siRNA. SiRNA was purchased from Dharmacon and sequences are listed below. For Organotypic invasion assays, fibroblasts were transfected once at day 0 before being cultured in serum-free medium for one week with vehicle or cytokines, and a second time at day 7, the day before embedding in matrix gel.

JAK1 #2 - GACAUGAUUUGAGAACGA
JAK1 #3 - UUACAAGGAUGACGAAGGA
STAT3 #1 - GAGAUUGACCAGCAGUAUA
STAT3 #3 - CCAACAAUCCCAAGAAUGU
GP130-IL6ST #1 - CUAUUACAUUGUCUGGAA
GP130-IL6ST #2 - CUAAGGAGCAAUAUACUAU
RhoA#1 - GAACUAUGUGGCAGAUUCUU

RhoA#2 - GAAAGACAUGCUUGCUCAUUU
TGFβr1#1 – GAGAAGAACGUUCGUGGUU
TGFβr1#2 - UGCGAGAACUAUUGUGUUA
TGFβr1#1 - GACCACAGACAAAGUUUAU
TGFβr1#1 - CGAGAUAGGCCGUUUGUAU

Cytokines

rhTGFβ1 (#100-21, Peprotech, Rocky Hill, NJ) was used at 2ng.ml⁻¹. rhLIF (#LIF1005, Millipore, Billerica, MA), was used at 1ng.ml⁻¹.

Antibody and inhibitors.

For western blot analysis, antibodies against STAT3 (#9134), pY705-STAT3 (#9145), SMAD2 (#3122), pSer465/467-SMAD2 (#3108), pY1022/1023-JAK1 (#3331), MLC2 (#3672), pThr18/19-MLC2 (#3674) were purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Beverly MA), α-tubulin from sigma (T4026, Sigma, Saint Louis, MO); JAK1 from Biologend (#604402, Biologend, San Diego, CA), GP-130 (#sc-655) and RhoA (#sc-418) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and alpha-smooth muscle actin from Abcam (#Ab5694, Abcam, Cambridge, MA). For immunofluorescence staining, antibodies against alpha-smooth muscle actin and fibronectin were purchased from Sigma (#A2547 and F3648 respectively, Sigma, Saint Louis, MO).

Chemical inhibitors used : Pyridone 6 (#42009, Calbiochem, Los Angeles, CA) was used at 5 μM, Ruxolitinib (#1598, Axon Medchem, Groningen, The Netherlands) at 10μM, Tofacinib (#S2789, Selleckchem, Huston, TX) at 10μM, Cyt 387 (#S2219, Selleckchem, Huston, TX) at 5μM, SB431542 (#1614, Tocris bioscience, Ellisville, MO) at 10μM, LY 36497 (#2718, Tocris bioscience, Ellisville, MO) at 10μM, A83-01 (#2939, Tocris bioscience, Ellisville, MO) at 10μM, Y27632 (#1254, Tocris bioscience, Ellisville, MO), and Actinomycin D (#856258, Sigma, Saint Louis, USA) at 5 μg/ml.

ELISA.

For the quantitative determination of LIF protein levels secreted to the media, we used the human LIF ELISA Kit (#ELH-LIF-001, Raybiotech Inc, Norcross, GA) following manufacturer's specifications.

Neutralizing antibody methods.

Neutralizing antibody against LIF (AB-250-NA, R&D, Minneapolis, MN), IL-6 R (AB-227-NA, R&D) or TGF β -1,2,3 (MAB1835, R&D) were used at 10 μ g/ml otherwise stated. Neutralizing antibody were incubated one hour with CM before being used for matrix remodeling assay and fibroblasts stimulation to neutralize the biological activity of selected cytokines.

ROCK-ER fibroblasts.

pBABE puro ROCK-ER plasmid (Croft and Olson, 2006) was transfected into Phoenix retroviral packaging cells using calcium phosphate transfection method. After 8 hours, cells were rinsed with PBS and medium was changed. The following day, medium was replaced with 10% inactivated FCS supplemented medium and cells were cultured for 24 hours at 32°C with 5% CO₂. Supernatant was next collected and centrifuged at 1500 rpm for 5 min and filtered through a 0,45 micron filter. Exponentially growing fibroblasts were infected with undiluted retroviral supernatant mixed with 5 μ g/ml Polybrene and selected with 5 μ g/ml puromycin to establish stable cell culture.

Western blot.

For immunoblotting analysis, cells were lysed on ice in lysis buffer (25 mM Tris (pH 6,8), 2% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% glycerol, 1% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue). Equal amounts of protein from each sample were loaded on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, separated, and transferred onto nitrocellulose. The immunoblots were blocked by incubation in 5% bovine serum albumin, 10mM Tris-HCl (pH7,5), 500mM NaCl, 0,1% Tween 20 for 30min at room temperature, probed with specific antibodies and then with secondary antibodies using common classical methods. Immunodetection was performed using chemiluminescent HRP substrate (#WBKLS0500, Millipore, Billerica, MA).

RT-qPCR Analysis

RNA was isolated from total cell lysates using RNeasy Mini kit (#217004, Qiagen, Turnberry Ln Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. Reverse Transcription was performed using 500ng cytoplasmic RNA using Superscript II reverse transcriptase (#18064-014, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Real time PCR was performed using Fast SYBR Green Master Mix (#18064-014; Applied Biosystems, Foster City, CA) in duplicates according to the recommendations of the manufacturer on a ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Primers sequences are listed as follows,

LIF: sense, 5'-ATACGCCACCCATGTCCACAA-3' and antisense, 5'-CCCTGGGCTGTGTAATAGAGAA-3';

IL6: sense, 5'-GAAGATTCCAAAGATGTAGCCGC-3' and antisense, 5'-AGGTTGTTTTCTGCCAGTGCC-3';

OSM : sense, 5'-ACAGAGGACGCTGCTCAGTCT-3' and antisense, 5'-AGGAGTCTGCTGGTGCCT-3';

GCSF: sense, 5'-GCTTGAGCCAACTCCATAGC-3' and antisense, 5'-AAATGCAGGGAAGGACACAG-3';

CNTF: sense, 5'-ATGGCTTTCACAGAGCATTCA-3' and antisense, 5'-GGATTCCGTAAGAGCAGTCAGG3';

CT1: sense, 5'-AGACCCCCAGACTGATTCCTC-3', and antisense, 5'-AGCTGCACATATTCCTGGGAGC-3';

GAPDH: sense, 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3', and antisense, 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-3'.

Relative expression of the respective gene was determined after normalization to GAPDH and calculated with the following formula: relative expression level = $2^{-\Delta\Delta CT}$

Conditioned Media Preparation.

Cancer Cells were grown to confluence, washed twice with PBS and then incubated in serum-free medium at 37°C. After 48 hours, CM was collected, centrifuged at 5000g for 5 min to remove cell debris and the supernatant stored at -80°C. For immunoblotting analysis, fibroblasts were stimulated with cancer cells CM for 5 min,

otherwise stated, and lysed as described in the immunblotting section. To analyze LIF secretion upon TGF β -1 stimulation, fibroblasts were stimulated with 2ng/ml TGF β 1 for 1, 4, 24 or 48h in serum-free medium and CM was prepared as below for ELISA analysis.

Immunofluorescence staining

Cells were grown on glass coverslips, fixed in 3% paraformaldehyde for 20min at room temperature, rinsed twice in PBS and in 50mM NH₄Cl for 10 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5min. Cells were next blocked in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 30 min and incubated with anti-alpha smooth muscle actin (1/400), or anti-fibronectin (1/400) antibodies in blocking buffer overnight at 4°C. After two washes in PBS, cells were incubated in the presence of a secondary antibody conjugated to Alexa 488 (1/400) for 40 min, rinsed twice in PBS, stained with DAPI (2 μ g/ml) for 5min, rinsed in water and the coverslips mounted onto glass slides using mounting media.

Collagen Sirius Red staining.

After embedding in paraffin, tissue sections were prepared on slides using standard methods. Collagen assembly was evaluated by Sirius Red staining. Briefly, sections were first incubated with Weigert's iron haematoxylin (#CO231, Diapath, Martinengo, Italy) for 8 min and washed in distilled water for 10 min. Sections were next incubated with 1% Sirius Red in saturated picric acid for 1h. The slides were then washed twice with 0,5% acetic acid in distilled H₂O, dehydrated and mounted using classical procedures. Sections were analyzed using polarized light imaging and confocal laser microscopy with a LSM 5 EXCITER confocal microscope (Carl Zeiss, Germany). Collagen thickness and length were quantified using ImageJ software.

Supplemental References

Croft, D. R., and Olson, M. F. (2006). Conditional regulation of a ROCK-estrogen receptor fusion protein. *Methods Enzymol* 406, 541-553.

Rheinwald, J. G., and Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343.

II) 2ème article : Epigenetic-dependent loss of Shp1 expression governs constitutive activation of pro-invasive stromal fibroblasts.

Résumé

Le phénotype propre aux fibroblastes activés (FACs) isolés à partir de tumeurs primaires est conservées après leur mise en culture (Kalluri & Zeisberg, 2006). La présence chez les FACs de mutations génomiques responsable de leur activation demeure un sujet controversée (Qiu et al., 2008; Polyak, Haviv, & Campbell, 2009), en revanche, que des modifications épigénétiques soient à l'origine de leur activation constitutive est une hypothèse qui prend corps (Jiang et al., 2008; Hu et al., 2005).

Après avoir identifié la cytokine LIF comme étant responsable de l'étape d'initiation de l'activation pro-invasive des fibroblastes résidents au cours de la carcinogenèse (Albregues et al., 2014), je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires de l'activation constitutive de l'activité pro-invasive des fibroblastes activés par cette dernière. En effet, j'ai observé que les fibroblastes humain dermique (hDF) activés par cette cytokine pendant une semaine (hDF_LIF) maintiennent une activité pro-invasive constitutive, après 60 jours de culture en l'absence de sérum et de ligand, comme c'est le cas pour FACs. De plus, dans les hDF_LIF et les FACs, cette activité pro-invasive constitutive corrèle avec l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3, cela indépendamment de toute boucle autocrine de signalisation faisant intervenir la sécrétion de facteurs diffusibles. Ces résultats suggèrent que des modifications épigénétiques pourraient être à l'origine des propriétés pro-carcinogénique des fibroblastes tumoraux induites par LIF.

Afin de valider cette hypothèse, en utilisant mon modèle d'essais *in vitro* de remodelage matriciel en 3 dimensions, j'ai exploité une banque de 46 molécules pharmacologiques ciblant les principaux acteurs des modifications épigénétiques. Les résultats obtenus ont mis en évidence le rôle des HDACs (Histone Deacetylase) de classe 1, et plus particulièrement de HDAC3 et de la HAT (Histone Acetylase) p300 dans la régulation de l'activité contractile des FACs et hDF_LIF. J'ai pu démontrer que ces deux protéines sont des régulateurs de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 via la

régulation de son acétylation sur la lysine 685 qui est essentielle à l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3 et des capacités pro-invasives des FACs et des hDF_LIF.

Les résultats du criblage montrent également que l'inhibition des ADN méthyltransférases (DNMT), notamment par ajout de 5'-Azacytidine au milieu de culture, bloque la contractilité des fibroblastes activés. En accord avec ces données, je montre que la stimulation des fibroblastes dermiques par LIF entraîne une augmentation de l'activité catalytiques des DNMTs, ainsi que l'augmentation transcriptionnelle et protéique de l'ADN méthyltransférase DNMT3b. L'étude du rôle des DNMTs, au cours de cette activation des fibroblastes dermiques dépendante de l'acétylation de STAT3, m'a permis de démontrer que celle-ci entraîne l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène *SHP1*, phosphatase de la kinase JAK1 et du facteur de transcription STAT3, et la répression de son expression. Chez les FACs et hDF_LIF, l'inhibition de l'expression de la phosphatase SHP1 est donc responsable de l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3 et des propriétés pro-invasives des fibroblastes tumoraux.

La liaison de la forme acétylée de STAT3 avec la protéine DNMT3b entraîne la méthylation des îlots riche en CpG du promoteur de SHP1, et par la suite, à chaque division cellulaire, DNMT1 phénocopie le profil de méthylation lors de la réplication chromosomique. Ainsi, la répression épigénétique de la phosphatase SHP1 par les ADN méthyltransférase *de novo* (par DNMT3b) et de maintien (par DNMT1) induit l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3 et des caractéristiques pro-invasives des fibroblastes tumoraux et hDF_LIF qui y sont associées. L'analyse immunohistologique de 50 biopsies de patients atteints de cancer ORL (Oto-Rhyno-Laryngée) et de 50 biopsies de patients atteints de cancer du poumon montre que l'acétylation de STAT3 dans le stroma corrèle négativement avec l'expression de la phosphatase SHP1 (coefficient de corrélation de -0.72). Les résultats d'une analyse bioinformatique de ces données me permettent de proposer un modèle prédictif de l'expression de SHP1 dans les cancers en fonction du statut d'acétylation du facteur de transcription STAT3.

Ces résultats suggèrent fortement que la présence de la cytokine LIF dans le stroma tumoral des patients entraîne des modifications épigénétiques à l'origine de la fibrose observée dans le stroma des carcinomes.

Etant donné le caractère réversible des modifications épigénétiques induites par la méthylation des îlots CpG, j'ai émis l'hypothèse que le traitement des FACs ou hDF_LIF

par la 5'-azacytidine pourrait modifier constitutivement le phénotype pro-invasif des ces cellules. De manière surprenante, cette partie du travail à permis de montrer que l'inhibition des DNMT renforcée par l'inhibition des kinases JAK à l'aide d'inhibiteurs pharmacologique entraine la reprogrammation moléculaire et phénotypique des FACs et FHN_LIF aboutissant à un phénotype caractéristique des fibroblastes sains et défini par une contractilité réduite, l'expression de la phosphatase SHP1 et une activité de la kinase JAK1 et du facteur de transcription STAT3 comparable à celle des fibroblastes primaires humains dermiques.

En conclusion, au cours de la carcinogenèse, chez les fibroblastes peritumoraux LIF régule l'activité de plusieurs acteurs des modifications épigénétiques que sont les HAT, les HDAC et les DNMT. Cela aboutit à la méthylation du promoteur de la phosphatase SHP1 et donc à la répression transcriptionnelle du gène correspondant. A la lumière de mes résultats, je propose que dans les fibroblastes tumoraux, la perte d'expression de SHP1 soit responsable des modifications profondes du stroma tumoral permissif à l'invasion des cellules de carcinomes. L'ensemble de ces régulations place la cytokine pro-inflammatoire LIF au centre de l'activation et du maintien des fibroblastes tumoraux lors de la carcinogenèse.

Epigenetic-dependent loss of Shp1 expression governs constitutive activation of pro-invasive stromal fibroblasts.

Jean Albregues¹, Isabelle Bourget¹, Maiel Majdi M¹, Claude Philippe¹, Cecilia Herraiz Serrano², Samia Benamar³, Olivier Croce³, Victoria Sanz-Moreno², Gael Cristofari¹, Guerrino Meneguzzi¹ and Cedric Gaggioli^{1*}

1. INSERM, U1081, CNRS, UMR7284, Institute for Research on Cancer and Aging in Nice (IRCAN), University of Nice Sophia Antipolis, Medical School, 28 Avenue Valombrose, F-06107, Nice, France.

2. Tumour Plasticity Laboratory, Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, New Hunt's House, Guy's Campus, King's College London, London SE1UL, UK.

3. Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, CNRS - UMR 7278, IFR48, Faculté de Médecine, Aix-Marseille Université, Marseille, France.

*Corresponding author

Tel: + 33 (0) 4 93 37 77 53

Fax: +33 (0) 4 93 37 76 76

gaggioli@unice.fr

Running title: Epigenetic-dependent constitutive fibroblast pro-invasiveness.

Key words: LIF, JAK/STAT, DNMT, Shp1, fibroblast, tumour microenvironment, collective invasion, epithelial cancers.

Abstract

We recently demonstrated that LIF mediates pro-invasive fibroblast activation. Here we disclose that LIF initiates an epigenetic-dependent constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway, which is responsible for the sustained pro-invasive activity of the Carcinoma Associated Fibroblasts (CAF). Fibroblast activation is initiated by LIF/P300HAT-mediated regulation of STAT3 acetylation and expression of the *de novo* DNA methyltransferase enzyme DNMT3b. DNMT3b binding to acetylated STAT3 specifically methylates the CpG islands of the Shp1 phosphatase which inhibits Shp1 expression and results in constitutive phosphorylation of JAK1. Further, maintenance of JAK1/STAT3 constitutive signaling is sustained by DNMT1-mediated methylation of Shp1 promoter along with DNA replication and cell division. In vitro results were confirmed by histological analysis of human lung and head and neck carcinomas, which demonstrated a strong correlation between both STAT3 acetylation and phosphorylation with downregulation of Shp1 expression. Combined treatment of activated fibroblasts and CAF with 5'Azacytidine and Ruxolitinib, which inhibits the DNA methyltransferase activity and JAK signaling respectively, results in long-term reversions of the pro-invasive activity and restores a phenotypically normal fibroblast phenotype.

Introduction

Carcinoma associated fibroblast (CAF) are key components of solid tumor ecosystems, including breast, skin, head and neck, prostate and lung cancers (Calvo & Sahai, 2011; Kalluri & Zeisberg, 2006; Quail & Joyce, 2013). CAF cells play an active role in tumor development and their presence within the tumoral stroma is associated with poor clinical outcome (Boyd et al., 2007; Hendrix et al., 2011; Navab et al., 2011; Shi et al., 2012; Takahashi et al., 2011). In addition to promoting primary tumors, CAF remodel the extracellular matrix (ECM), which contributes to generate tensile forces within the tumor microenvironment that promote favorable cues for tumor invasion (Gaggioli et al., 2007; Goetz et al., 2011; Levental et al., 2009; Scott et al., 2010). CAF-dependent excessive ECM remodeling leads to tumor fibrosis, which is associated with tumor cell dissemination and metastasis (Cox & Ertler, 2011; Wynn & Ramalingam, 2012). CAF-dependent pro-fibrotic activity is governed by constitutive activation of the Janus Kinase 1 (JAK1), which leads to constitutive phosphorylation of its downstream target the STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) transcription factor (Sanz-Moreno et al., 2011). We have demonstrated that the pro-inflammatory LIF (Leukemia Inhibitory Factor) cytokine initiates the pro-invasive stromal fibroblast phenotype in cancers (Albregues et al., 2014). Similarly to CAF, long-term LIF-activated human primary dermal fibroblasts (hDF_LIF) sustain contractile and pro-invasive phenotypes in vitro, which correlate with constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway. However, how the activated status of CAF cells is sustained remains to be elucidated.

STAT3 belongs to a large family of transcription factors, and its constitutive activation has been observed in 70% of solid and hematological tumors (Frank, 1999). STAT3-dependent transcriptional activity is mediated by phosphorylation on tyrosines 705 and 727 by the JAK family kinases in response to cytokines-mediated signaling (Rawlings et al., 2004).

Activated STAT3 translocates to the nucleus and binds to the promoter DNA sequences to regulate targeted gene transcription. STAT3 activity is enhanced by acetylation on lysine 685 by histone acetyltransferases (HAT), a post-transcriptional modification reversed by histone deacetylases (HDACs) (Wieczorek, Ginter, Brand, Heinzl, & Kramer, 2012; Yuan, Guan, Chatterjee, & Chin, 2005). Acetylated STAT3 binds to the DNA methyltransferase DNMT1, which mediates targeted gene silencing by methylation of promoter DNA sequences (Lee et al., 2012). DNA methylation plays critical roles in control of sustained and constitutive activation of signaling pathways (Gopalakrishnan et al., 2008). Overall, both tumor and stromal cell DNA is hypomethylated; however, hypermethylation of CpG islands in gene promoter is known to silence tumor suppressor gene expression (Counts & Goodman, 1995; Das & Singal, 2004; Feinberg et al., 2004; Jiang et al., 2008; Quante et al., 2011). Among the major DNA methyltransferases (DNMTs), DNMT1 maintains the pre-existing DNA methylation patterns along with DNA replication and cell division; DNMT3a and DNMT3b target unmethylated CpGs and introduce de novo methylations (Robertson, 2005; Smith & Meissner, 2013). Epigenetic modifications, currently observed in a variety of conditions including fibrosis and cancer, are thought to play a relevant role in biological processes. Indeed, DNA hypermethylation is thought to perpetuate fibroblasts' activation in kidney fibrosis (Bechtel et al., 2010).

Here, we demonstrate that LIF induces constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway by post-translational regulation of STAT3 acetylation. Acetylated STAT3 leads to an epigenetic-dependent loss of expression of Shp1 phosphatase, which sustains constitutive phosphorylation of JAK1 kinase and STAT3 transcription factor that maintain the contractile and pro-invasive fibroblasts abilities. Blockade of both JAK signaling and DNA methyltransferase activity results in long-term pro-invasive phenotypic reversion of CAF.

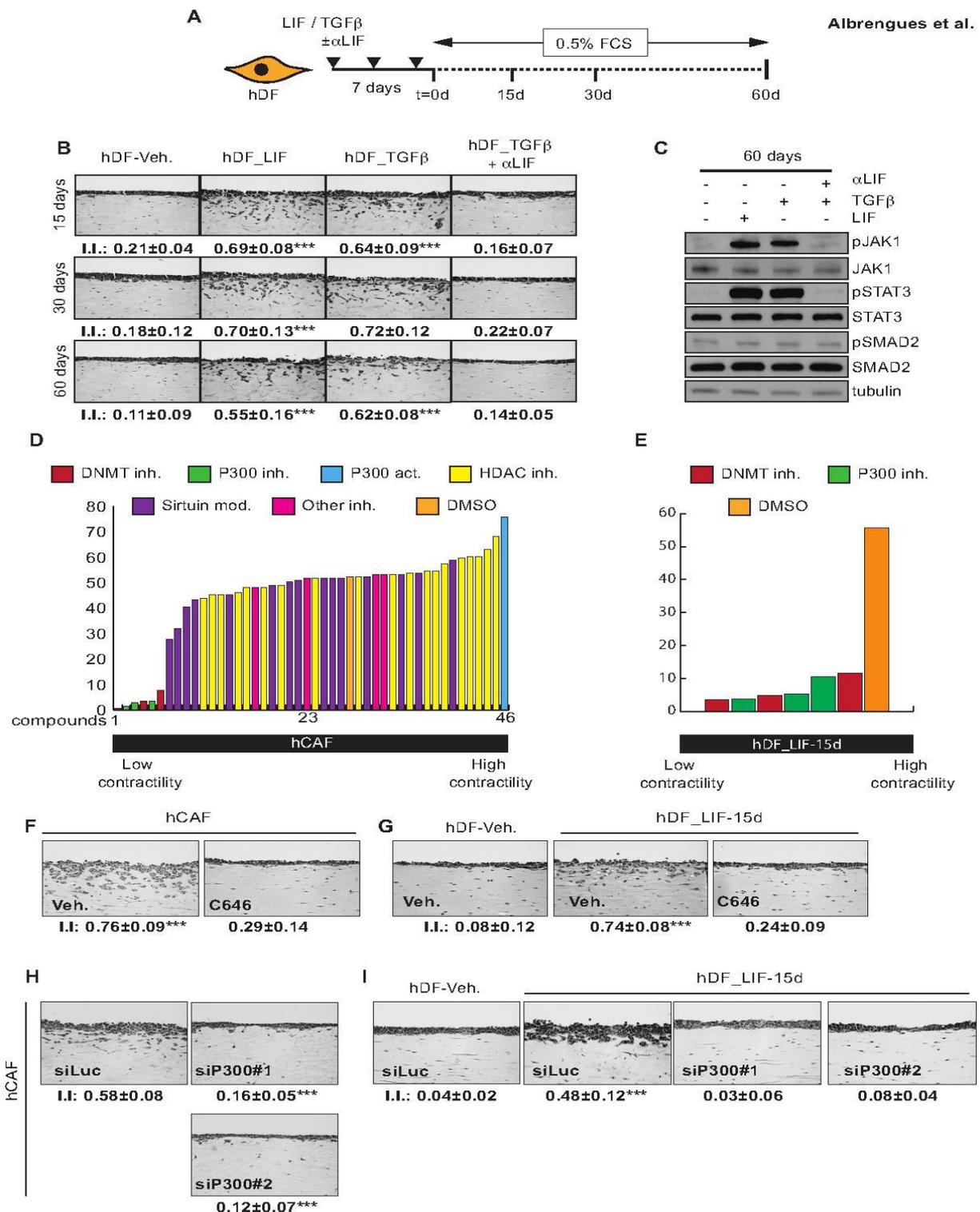


Figure 1

LIF-mediated constitutive activation of JAK1/STAT3 signaling pathway drives long-term pro-invasive CAF property. A) Schematic representation of experimental conditions for long-term maintenance of pro-invasive property of hDF_LIF. B) Representative images of hematoxylin and eosin (H&E) coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control hDF (Veh.) or seven days LIF- and TGFβ1-activated hDF in presence or absence of LIF blocking antibody (αLIF) after 15, 30 and 60 days of culture in 0.5% SVF media. Scale bar 100μm. I.I. for Invasion Index (n=3; mean ± SD; ***p<0.001). C) Immunoblot of p-JAK1, p-STAT3 and p-Smad2 of 7 days LIF and TGFβ1-activated hDF followed by long-term (60 days) cultured in low serum. Immunoblot of JAK1, STAT3, Smad2 and tubulin as control. D) Quantification of matrix remodeling by CAF in presence of small molecules inhibitors for 6 days. (n=2 in triplicates). E) Quantification of matrix remodeling by hDF-LIF in presence of small molecules inhibitors for 6 days. (n=2 in triplicates). F) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control hDF (Veh.) or C646 inhibitor. Scale bar 100μm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001). G) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control hDF-Veh or hDF-LIF in presence or absence of C646 inhibitor. Scale bar 100μm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001). H) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF transfected with control siRNA (siLuc) or P300 (siP300). Scale bar 100μm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001). I) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to control hDF-Veh or hDF-LIF transfected with control siRNA (siLuc) or P300 (siP300). Scale bar 100μm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001).

Results

LIF-dependent constitutive pro-invasive fibroblast activation requires STAT3 acetylation by p300 HAT.

Human dermal fibroblasts (hDF) were stimulated for seven days in culture (long-term activation) by either LIF or TGF β in the presence and absence of LIF blocking antibody (hDF_LIF and hDF_TGF β). After 15- 30- and 60-day culture, in the presence of low serum concentration (Figure 1A), the hDF pro-invasive ability was assessed using a three-dimensional SCC12 cell organotypic invasion assay (Albregues, Meneguzzi, & Gaggioli, 2013). Not only the LIF-activated hDF (hDF_LIF) permanently sustained pro-invasive and constitutive JAK1/STAT3, but also the TGF β -activated hDF (hDF_TGF β) relied on LIF for their constitutive pro-invasive activation (Figures 1B). These results indicate that a seven-day LIF stimulation is sufficient to confer long-term pro-invasive ability to the hDF cells, which, likewise the CAF phenotype, is associated with constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway (Figures 1C and S1A). Because CAF cells secrete pro-carcinogenic factors, including IL6-family cytokines (Erez, Truitt, Olson, Arron, & Hanahan, 2010; Sun et al., 2014; Togo, Polanska, Horimoto, & Orimo, 2013), that sustain constitutive activation of JAK1 kinase via an autocrine regulatory loop, we investigated whether hCAF, hDF_LIF and hDF_TGF β cells conditioned media (CM) activate JAK1/STAT3 signaling in hDF fibroblasts. In hDF, stimulation by long-term LIF- and TGF β -activated hDF CM failed to promote JAK1/STAT3 phosphorylation (Supp. Figure S1B) and collagen gel contraction (Supp. Figure S1C), while short-term TGF β -activated CM (hDF-TGF β -6h), in which LIF is detectable (Albregues et al., 2014), promoted both STAT3 phosphorylation and gel contraction (Supp. Figures S1B and S1C). Taken together, these data demonstrate that LIF governs permanent pro-invasive conversion of hDF independently of autocrine signaling regulatory loops. We thus speculated that epigenetic modifications might be

involved in the constitutive activation of hCAF and hDF_LIF cells. To test this hypothesis, CAF-dependent three-dimensional matrix gel contraction assays were performed in the presence of 45 small molecules inhibitors targeting the epigenetic and DNA modifier cell machinery (Figures 1D and 1E and Supp. Table 1). The screen was performed at optimized concentrations for each molecule (Supp. Table 1) and DMSO as control. Among the six classes of inhibitors, three histone acetyltransferase (HAT) P300 inhibitors (Garcinol, Anacardic acid and C646) and three DNA Methyltransferase inhibitors (5-Aza-2'-deoxycytidine, Zebularine and Decitabine) blocked hCAF contractile capacity (Figure 1D). Accordingly the P300 HAT activator CTPB (N-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-2-ethoxybenzamide) significantly increased hCAF cell contractility (Figure 1D). Next, in hDF_LIF fibroblasts, inhibition of matrix remodeling by both P300 and DNMT inhibitors was confirmed (Figure 1E). In light of these results, the role of P300 HAT in CAF-dependent matrix gel remodeling was further investigated. Using the C646 small molecule inhibitor, the crucial role of P300 activity in both hCAF and hDF_LIF was established in matrix contraction (Figure S1D), pro-invasive activity (Figures 1F and 1G) and JAK1/STAT3 signaling pathway activity (Sup Figures S1E and S1F). SiRNA-mediated silencing of P300 HAT further confirmed that P300 is a crucial regulator of fibroblasts-dependent pro-invasive activity. Indeed, in hCAF and in hDF_LIF, silencing of P300 resulted in blockade of both pro-invasive property and JAK1/STAT3 constitutive signaling activity (Figures 1H and 1I and Supp. Figures S1G and S1H). Notably, blockade of P300 HAT activity in hCAF cells resulted in ablation of both STAT3 phosphorylation and acetylation, which are crucial for STAT3 transcriptional activity (Yuan et al., 2005) (Supp. Figures S1E-S1H), independently of JAK1 regulation (Supp. Figures S1E and S1G). Moreover, in hDF cells, blockade of P300 activity prior to LIF stimulation counteracted LIF-dependent constitutive phosphorylation and acetylation of STAT3 (Supp Figures S1F and S1H). Furthermore, the

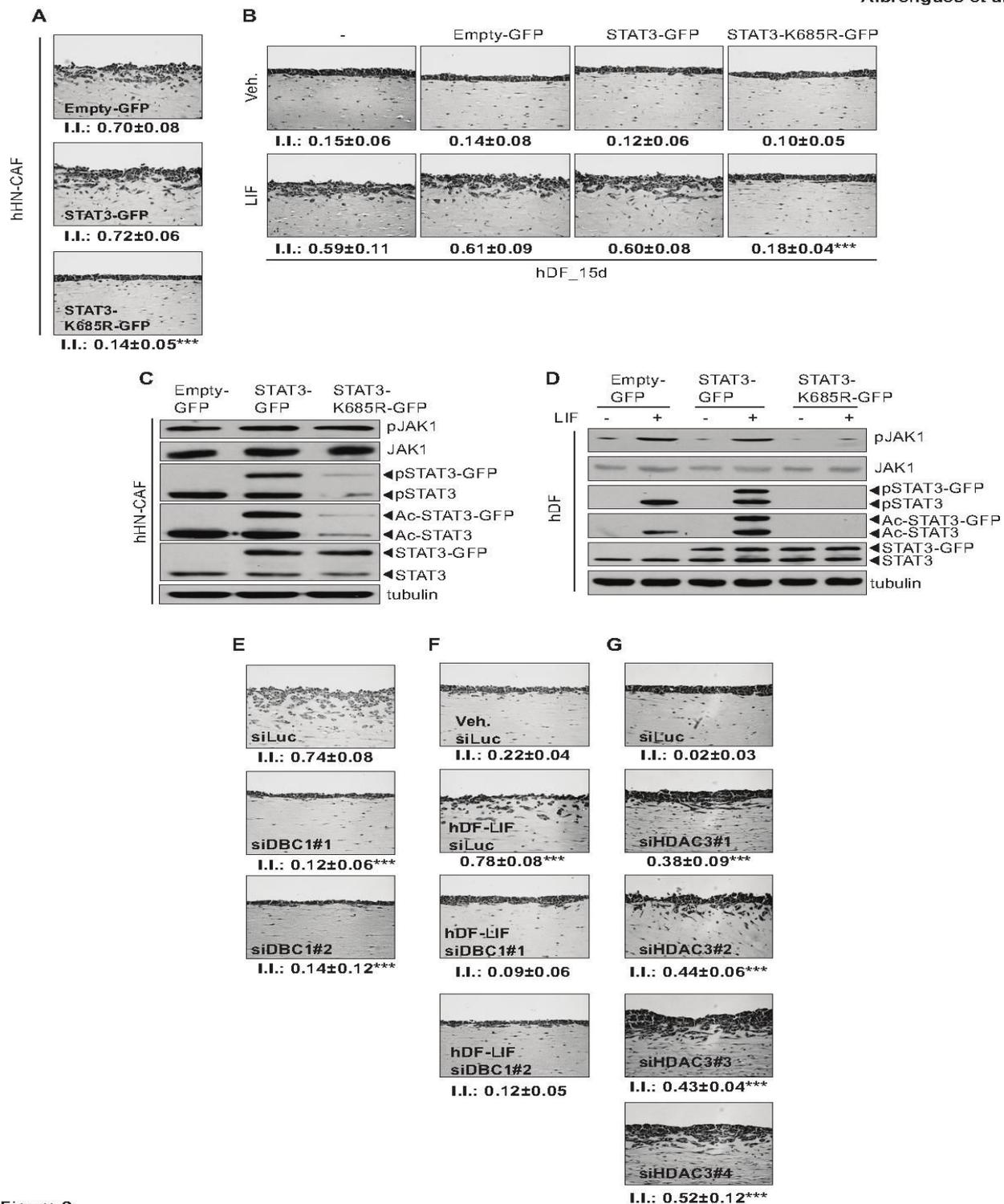


Figure 2

STAT3 acetylation is required for pro-invasive CAF activity Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response CAF control (empty-GFP) or overexpressing a wild type STAT3 (STAT3-GFP) or acetylation-deficient STAT3 mutant (STAT3-K685R-GFP). Scale bar 100µm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001). B) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to non-activated hDF (veh.) and hDF-LIF overexpressing a control (empty-GFP) or a wild type STAT3 (STAT3-GFP) or acetylation-deficient STAT3 mutant (STAT3-K685R-GFP). Scale bar 100µm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001). C) immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and ac-STAT3 in CAF overexpressing a control vector (empty-GFP), a WT STAT3 (STAT3-GFP) or acetylation-deficient STAT3 mutant (STAT3-K685R-GFP). Immunoblot of JAK1, STAT3, Smad2 and tubulin as control. D) immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and ac-STAT3 in hDF overexpressing a control vector (empty-GFP), a WT STAT3 (STAT3-GFP) or acetylation-deficient STAT3 mutant (STAT3-K685R-GFP) in response to LIF stimulation. Immunoblot of JAK1, STAT3, Smad2 and tubulin as control. E) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF transfected with control siRNA (siLuc) or DBC1 (siDBC1). Scale bar 100µm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001). F) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to hDF control (veh.) and LIF0activated (hDF_LIF) transfected with control siRNA (siLuc) or DBC1 (siDBC1). Scale bar 100µm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001). G) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF transfected with control siRNA (siLuc) or HDAC3 (siHDAC3). Scale bar 100µm (n=3; mean ±SD; ***p<0.001).

P300 HAT small molecule activator CTBP is sufficient to increase hCAF contractility (Figure 1D; blue bar), promote hDF cell-dependent matrix remodeling (Supp. Figure S1I), induces STAT3-K685 acetylation and phosphorylation on tyrosine 705 (Supp. Figure S1J) and pro-invasive cell capacity (Supp. Figure S1K). Finally, in hDF cells, P300 specifically interacted with STAT3 in response to LIF stimulation, which further suggests that p300 HAT is responsible for STAT3 acetylation upon LIF-dependent activation (Supp. Figure S1L). Taken together, these data demonstrate that P300 HAT activity is crucial for the pro-invasive CAF activity and for LIF-dependent pro-invasive fibroblast activation *in vitro*, and further suggest that STAT3 acetylation is fundamental in this process. Therefore, the role of STAT3-K685 acetylation in fibroblasts pro-invasive activity was next assessed. hCAF cells, stably expressing either GFP (Empty-GFP), or the wild-type form of STAT3 (STAT3-GFP) or a non-acetylated STAT3 mutant fused to GFP (STAT3-K685R-GFP), were considered for their pro-invasive capacity using organotypic invasion assays. hCAF cells overexpressing either the control or the WT-STAT3 vector were found to retain their pro-invasive properties, that were abrogated in cells expressing a non-acetylated form of STAT3 (Figure 2A). Interestingly, LIF-dependent pro-invasive fibroblasts activation was not observed with mutant hDF-STAT3-K685R (Figure 2B). Furthermore, molecular analysis of the JAK1/STAT3 signaling pathway in hCAF cells expressing the mutant STAT3-K685R cDNA, revealed that STAT3 acetylation is compulsory for phosphorylation of the STAT3 residue Y705 (Figures 2C), and that LIF-dependent JAK1/STAT3 constitutive phosphorylation requires STAT3 acetylation (Figure 2D). P300-mediated STAT3 acetylation is reversible and governed by type I histone deacetylases (HDACs) (Wieczorek et al., 2012) and their negative regulator p30 DBC (or DBC1, deleted in breast cancer 1) (Chini, Escande, Nin, & Chini, 2010). The potential benefit of reversible STAT3 acetylation on the pro-invasive property of CAF was then investigated. Small interference RNA-

mediating p30 DBC silencing, resulted sufficient to abrogate matrix remodeling (Supp. Figures S2A and S2B), SCC12 cells invasion (Figures 2E and 2F) and JAK1/STAT3 signaling activity *in vitro* in both hCAF and hDF_LIF cells, (Supp. Figures S2C and S2D). Accordingly, treatment of hDF cells by the histone deacetylase small molecule inhibitors Trichostatin A (TSA) or Vorinostat (also know as SAHA), promoted JAK1/STAT3 activity (Supp. Figure S2E), contractility and pro-invasive properties (Supp. Figures S2F and S2G) independently from LIF cytokine stimulation. Moreover, HDAC3 has been shown to regulate STAT3 acetylation (Gupta, Han, Stenson, Wellik, & Witzig, 2012; Yuan et al., 2005), therefore, we investigated the potential role of HDAC3 in pro-invasive fibroblasts activation. SiRNA-mediated knock-down of HDAC3 expression specifically induced JAK1/STAT3 activation and STAT3-K685 acetylation (Supp. Figure S2H), collagen lattice contraction (Supp. Figure S2I) and pro-invasive activation of hDF cells (Figure 2G) independently of LIF stimulation. Taken together, these data clearly demonstrate that LIF stimulates STAT3 acetylation through P300, which is necessary for constitutive pro-invasive CAF activity. They also reveal that inhibition of HDAC is sufficient to prompt fibroblast activation and HDAC3 specifically regulates STAT3 acetylation in dermal fibroblasts.

Constitutive JAK1/STAT3 signaling is governed by cooperation between acetylated STAT3 and DNMT for epigenetic silencing of Shp1 phosphatase.

Screening using the small-molecule inhibitor library also identified DNA Methyltransferases (DNMT) as the most potent molecules blocking hCAF and hDF_LIF cell matrix remodeling *in vitro* (Figure 1D). Therefore, the role of DNMT proteins family in LIF-dependent constitutive fibroblasts activation was next assessed in three-dimensional *in vitro* assays. Results represented in Figure 1D were first confirmed using three distinct hCAF cell

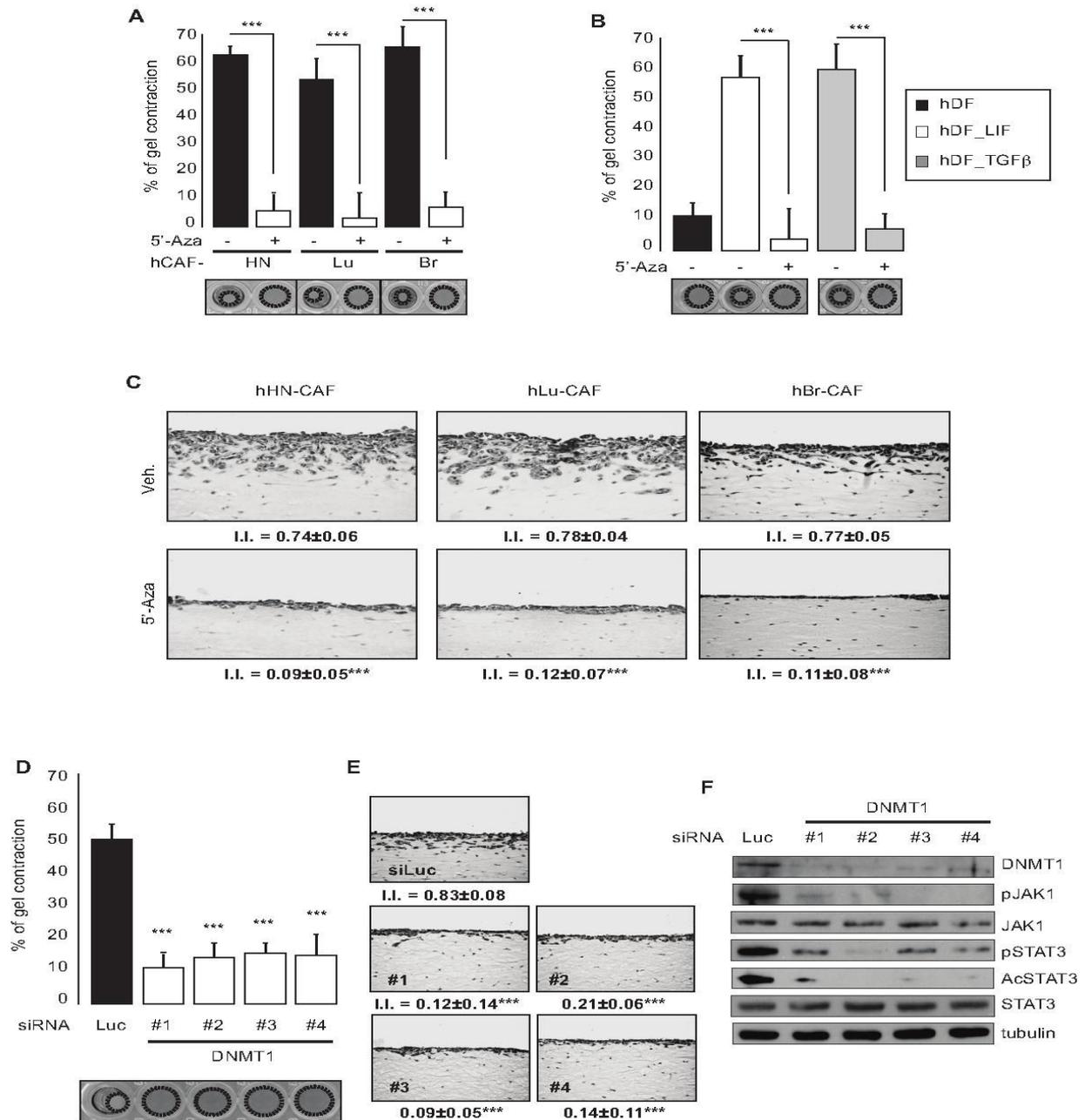


Figure 3

DNMT1 activity regulates JAK1/STAT3 signaling pathway in pro-invasive fibroblasts. A) Percentage of gel contraction by CAF isolated from head and neck (HN), Lung (Lu) or breast (Br) carcinoma following 5'-Azacytidine inhibitor treatment (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). Bottom images show the contracted gels. B) Percentage of gel contraction by hDF (black histogram) hDF_LIF (white) and TGFβ1_hDF (grey) following 5'-Azacytidine inhibitor treatment (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). Bottom images show the contracted gels. C) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to CAF (HN, Lu and Br) in absence (Veh.) or presence of 5'-Azacytidine inhibitor (n=3, I.I. for Invasion Index, mean ± SD, ***p<0.001). D) Percentage of gel contraction by HN-CAF transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT1 (siDNMT1#1, #2, #3, #4) (n=3 in triplicates, mean + SD, ***p<0.001). Bottom images show the contracted gels. E) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to HN-CAF transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT1 (siDNMT1#1, #2, #3, #4) (n=3, mean ± SD, ***p<0.001). F) Immunoblot of DNMT1, p-JAK1, p-STAT3 and Ac-STAT3 in HN-CAF transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT1 (siDNMT1#1, #2, #3, #4). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control.

strains, and further treatment with 5'-azacytidine inhibitor was shown to block contractility in vitro of activated fibroblasts (Figure 3A) and long term LIF-activated or TGF β -activated fibroblast (Figures 3B). Moreover, in three-dimensional organotypic invasion assays, 5'-Azacytidine treatment interfered with hCAF-dependent SCC12 cell collective invasion (Figure 3C) and activated fibroblast constitutive JAK1/STAT3 signaling pathway (Supp. Figures S3A and S3B). The effect of 5'-azacytidine on hCAF cells, was further confirmed by specifically silencing of DNMT1 which demonstrated that DNMT1 expression is required for CAF-dependent matrix remodeling (Figure 3D), SCC12 cells invasion (Figure 3E) and JAK1/STAT3 signaling activity (Figure 3F). Interestingly, in hCAF cells treatment with the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib or the DNMT1 inhibitor 5'-Azacytidine yielded distinct effects on JAK1 phosphorylation. Ruxolitinib treatment resulted in abrogation of STAT3 but not JAK1 phosphorylation, while 5'-azacytidine treatment inhibited both JAK1 and STAT3 phosphorylation, which suggested a different mode of action of these compounds (Supp. Figure S3C).

During cell cycle, DNMT1 copies the DNA methylation profile of the dividing cell, and importantly, our data show that in hCAFs cells DNMT1 governs the maintenance of the contractile and pro-invasive phenotypes. On the other hand, DNMT3 is in charge of DNA hypermethylation imprinting, therefore the potential role for DNMT3 during LIF-dependent fibroblast activation was investigated. Because the mRNA steady state level of DNMT3b but not that of DNMT3a was significantly induced after short-term LIF stimulation of hDF cells (Figure 4A), the potential role for DNMT3b in induction of the constitutive pro-invasive activation by LIF in hDF cells was thus investigated. Specific obliteration of DNMT3b expression resulted in blockade of LIF- and TGF β -dependent activation of contractile (Figure 4B) and pro-invasive (Figures 4C) phenotypes in hDF cells; whereas loss of DNMT3b expression in hCAF and in long-term activated hDF_LIF and hDF_TGF β cells

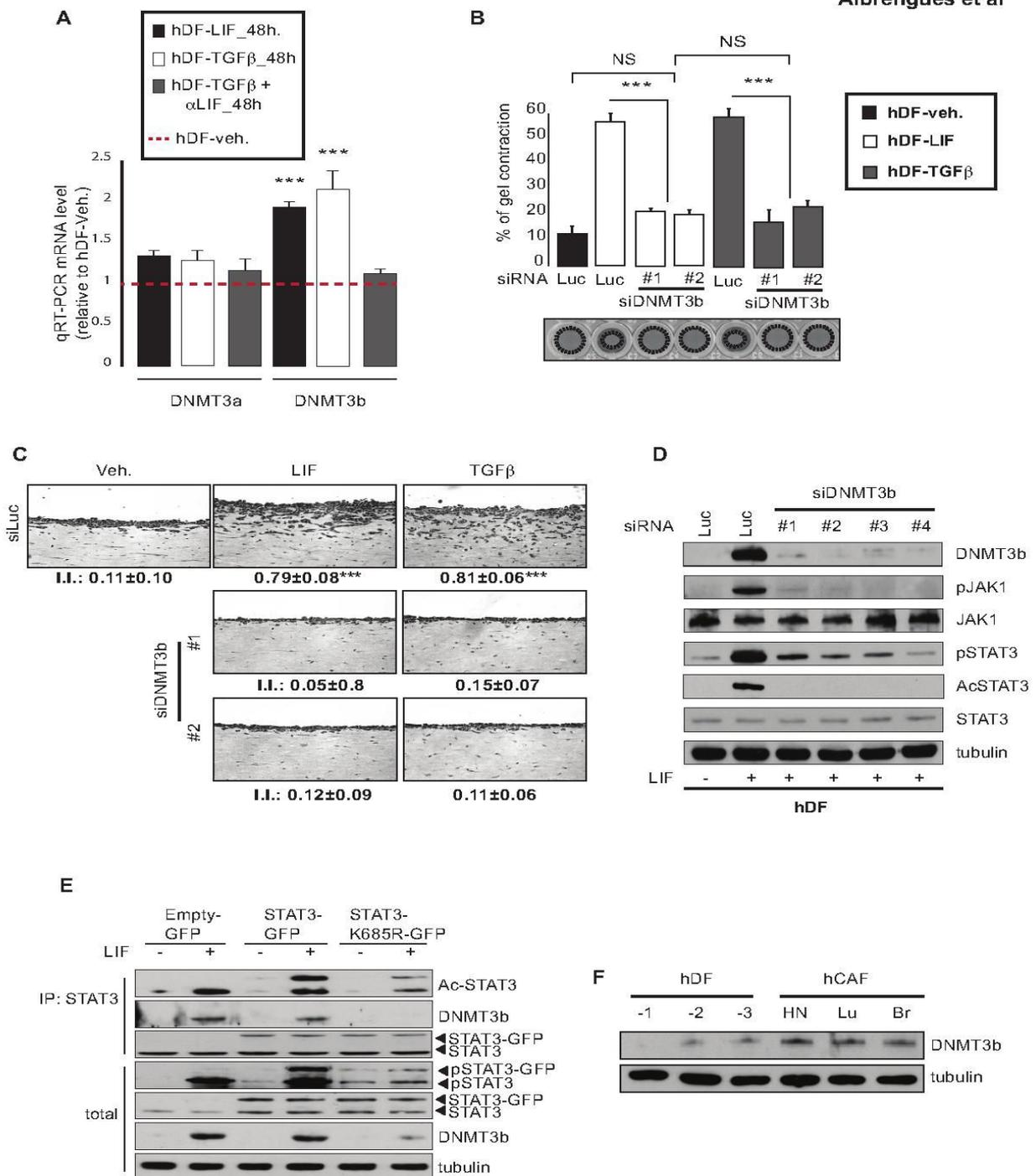


Figure 4

DNMT3b governs initiation of the constitutive JAK1/STAT3 signaling pathway activity in hDF upon LIF stimulation but not maintenance in hCAF cells. A) Quantification of mRNA level of DNMT3a and DNMT3b in hDF cells following 48h stimulation of LIF and TGFβ1 in presence or absence of LIF blocking antibody (αLIF) relative to control hDF (red dotted line) (n=3 in triplicates, mean + SD, ***p<0.001). B) Percentage of gel contraction by control hDF cells (Black), LIF-activated (white) and TGFβ1-activated (grey) hDF cells transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT3b (siDNMT3b#1 and #2) (n=3 in triplicates, mean + SD, ***p<0.001). Bottom images show the contracted gels. C) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to hDF (Veh.) LIF-activated and TGFβ1-activated hDF cells transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT3b (siDNMT3b#1 and #2) (n=3, mean ± SD, ***p<0.001). D) Immunoblot of DNMT3b, p-JAK1, p-STAT3 and Ac-STAT3 in hDF activated or not by LIF transfected with siRNA control (siLuc) or targeting DNMT3b (siDNMT3b#1, #2, #3, #4). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. E) Immunoblot of ac-STAT3 and DNMT3b in hDF cells overexpressing a control vector (empty-GFP), a WT STAT3 (STAT3-GFP) or acetylated-deficient STAT3 mutant (STAT3-K685R-GFP) stimulated or not by LIF following immunoprecipitation of STAT3. Immunoblot of total extract as control. F) Immunoblot of DNMT3b in three independent hDF and three independent hCAF (HN, Lu, Br). Immunoblot of tubulin as control.

had no effect on cell contractility (Supp. Figures S4A-S4C). This demonstrated that DNMT3b is crucial for the initiation step but not for maintenance of the contractile and pro-invasive phenotypes. The crucial role of DNMT3b in initiation of the constitutive activation of pro-invasive fibroblasts was further confirmed by analyzing the molecular activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway. Indeed, in hDF cells, specific obliteration of DNMT3b blocks LIF-dependent constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway (Figure 4D). Interestingly, DNMT3b specifically interacts with Ac-STAT3 upon LIF stimulation (Figure 4E) and its expression is up-regulated in hCAF cells compared to hDF cells (Figure 4F). Overall, DNMT methyltransferase activity is increase upon LIF stimulation (Supp. Figure S4D) and is significantly increased in hCAF compared to hDF cells (Supp. Figure S4E). Inhibition of JAK kinases activity in hCAF cells has no effect on DNMT activity (Supp. Figure S4F), which confirmed the two distinct modes of action of JAK and DNMT regulation of pro-invasive hCAF cell phenotype.

So far we have shown that blocking DNMT catalytic activity leads to inhibition of JAK1 phosphorylation on residue tyrosine Y1022 (Supp. Figure S3A), which reflect its kinase activity (Rane & Reddy, 2000). JAK1 tyrosine Y1022 phosphorylation is governed by the balance between JAK kinase transactivation and dephosphorylation through phosphatases activity (Shuai & Liu, 2003; Starr & Hilton, 1999). To address the functional role of 5'-Azacytidine in the JAK1/STAT3 signaling pathway activity and therefore in hCAF pro-invasiveness, we hypothesized a potential regulation of a JAK1 phosphatase expression via DNMT-dependent epigenetic silencing. To verify this hypothesis, hCAF and hDF_LIF cells were treated with orthovanadate, a broad phosphatases inhibitor, after exposure to 5'-Azacytidine. JAK1 and STAT3 phosphorylation were both rescued by orthovanadate (Supp. Figure S5A), which validated the work hypothesis. Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 (PTPN6), also known as Shp1 (Src homology region 2 domain-

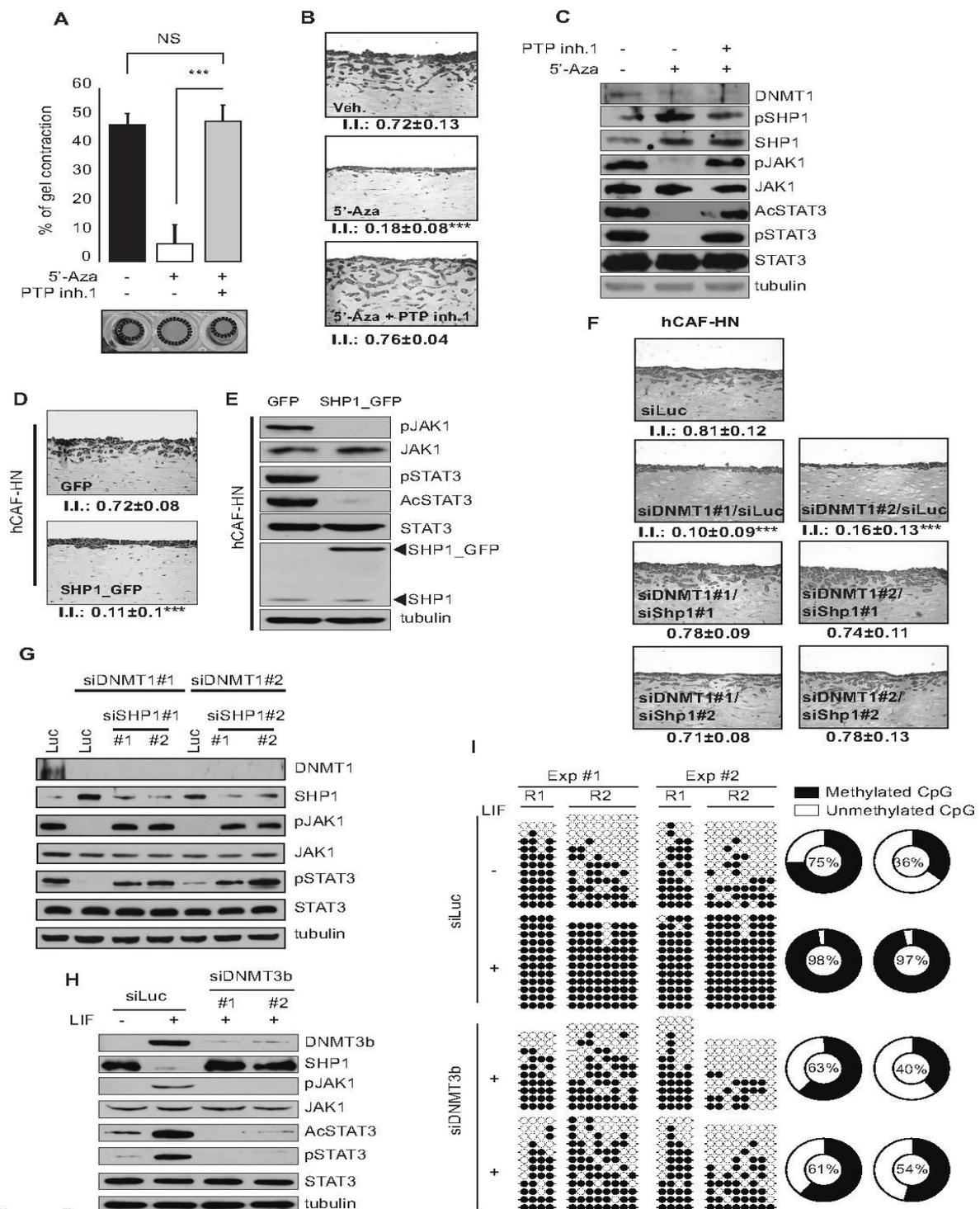


Figure 5

LIF induces constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway in hDF cells through DNMT3b-dependent epigenetic silencing of Shp1. A) Percentage of gel contraction by HN-CAF cells following 5'-Azacytidine inhibitor alone or in combination with PTP inhibitor 1. (n=3 in triplicates, mean ± SD, ***p<0.001). Bottom images show the contracted gels. B) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to HN-CAF following 5'-Azacytidine inhibitor alone or in combination with PTP inhibitor 1 (n=3, mean ± SD, ***p<0.001). C) Immunoblot of DNMT1, pShp1, Shp1, pJAK1, pSTAT3 and Ac-STAT3 in HN-CAF cells following 5'-Azacytidine inhibitor alone or in combination with PTP inhibitor 1. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. D) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to HN-CAF overexpressing control vector (GFP) or Shp1 gene (Shp1-GFP) (n=3, mean ± SD, ***p<0.001). E) Immunoblot of Shp1, pJAK1, pSTAT3 and Ac-STAT3 in HN-CAF overexpressing control vector (GFP) or Shp1 gene (Shp1-GFP). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. F) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to HN-CAF transfected with siRNA control (siLuc) or with siRNA targeting DNMT1 alone (siDNMT1#1, #2) or in combination with siRNA targeting Shp1 (siShp1#1, #2) (n=3, mean ± SD, ***p<0.001). G) Immunoblot of DNMT1, Shp1, pJAK1, pSTAT3 and Ac-STAT3 in HN-CAF transfected with siRNA control (siLuc) or with siRNA targeting DNMT1 alone (siDNMT1#1, #2) or in combination with siRNA targeting Shp1 (siShp1#1, #2). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. H) Immunoblot of DNMT3b, Shp1, pJAK1, pSTAT3 and Ac-STAT3 in hDF cells activate or not by LIF transfected with siRNA control (siLuc) or siRNA targeting DNMT3b (siDNMT3b#1, #2). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. I) Bisulfite sequencing results in two regions of the PTPN6 promoter (R1 and R2) in hDF and long-term LIF-activated fibroblasts transfected with control RNAi (siLuc) and RNAi targeting DNMT3b (siDNMT3b#1 and #2). Each line represents an individual sequence. Open and closed circles denote unmethylated and methylated CpG dinucleotides, respectively. Donut charts summarize the global proportion of methylated CpG with percentage in the center (n=2, p<0.0001, two-tailed Fisher's exact test).

containing phosphatase-1), has been described to dephosphorylate a number of tyrosine kinases including JAK1 (Alicea-Velazquez, Jakoncic, & Boggon, 2013; Xu & Qu, 2008). Specific inhibition of Shp1 phosphatase, using PTP inhibitor 1 (PTP inh. 1), restored contractility of collagen gel in both hCAF and LIF-activated hDF (Figures 5A and S5B) and also their pro-invasive capacity in three-dimensional organotypic cultures (Figures 5B). In addition, compared to hDF and likewise LIF-activated fibroblasts (Supp. Figure S5C), hCAF cells present a decreased level of Shp1 expression: their treatment with 5'-Azacytidine increased Shp1 expression, which correlated with a decrease of JAK1 and STAT3 phosphorylation (Figure 5C). Moreover, transgenic expression of Shp1 in hCAF was sufficient to block the pro-invasive capacity (Figure 5D) and to inhibit JAK1/STAT3 signaling pathway constitutive activity (Figure 5E). Furthermore, both in hCAF and hDF_LIF, inhibition of pro-invasive capacity (Figure 5F and S5D) and JAK1/STAT3 signaling (Figures 5G and S5E), induce by loss of DNMT expression consequent to RNAi treatment was rescued by specific targeting of Shp1 expression by small interference RNAs. Taken together, these data demonstrate that LIF mediates long-term activation of pro-invasive fibroblast activity by constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway through DNMT1-dependent down-regulation of Shp1 phosphatase expression. We also demonstrated that LIF-stimulated hDF harbor an increased expression of DNMT3b, loss of Shp1 expression, which correlates with constitutive JAK1/STAT3 signaling pathway activity. Blockade of DNMT3b expression, prior to LIF stimulation, leads to inhibition of JAK1/STAT3 phosphorylation and rescue of Shp1 protein expression (Figure 5H). We next investigated the influence of LIF and its target gene, DNMT3b, on CpG island methylation within the Ship1 promoter in hDF cells. *In silico* analysis of *Ship1* promoter reveals two CpGs clusters composed of 4 and 8 islands, respectively (Supp. Figures S5F). Methylation-specific PCR analysis demonstrated a substantial increase in DNA

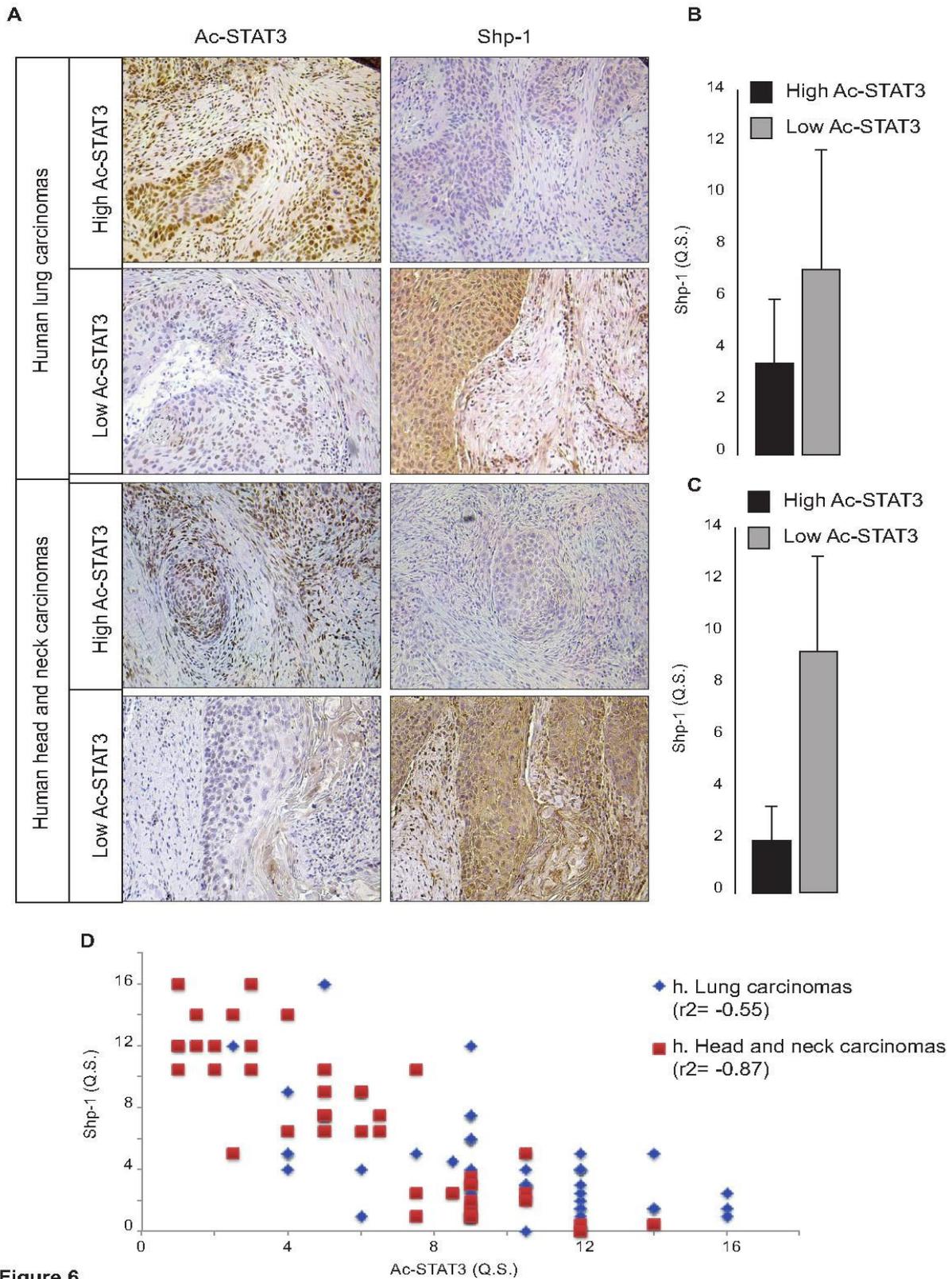


Figure 6

Acetylated STAT3 in human SCC tumors negatively correlated with Shp1 expression. A) Acetylated STAT3 (Ac-STAT3) and Shp1 immunohistological staining in human head and neck (n=50) and lung (n=50) carcinomas. Scale bar 100 μ m. B) Quantification of mean Quick Score for Shp1 in head and neck carcinomas decorated with high and low acetylated STAT3 shown in (A). C) Quantification of mean Quick Score for Shp1 in lung carcinomas decorated with high and low acetylated STAT3 tumors shown in (A). D) Plot of mean Q.S. form Ac-STAT3 (x axis) and Shp1 (y axis) showing a negative correlation between Acetylated STAT3 and Shp1 detection in lung (bleu) and head and neck (red) carcinomas.

methylation frequency in long-term hDF_LIF compared with control hDF. Also specific Shp1 promoter DNA methylation was found to occur through a LIF-dependent DNMT3b regulation; indeed, in hDF cells, obliteration of DNMT3b expression during LIF stimulation (Figure 5H) abolished Shp1 promoter methylation (Figures 5I and 5J and Supp. Figure S5G). These results establish that DNMT3b governs the initial step of JAK1/STAT3 constitutive activation by LIF through an epigenetic dependent Shp1 loss of expression, which maintain hCAF pro-invasive matrix remodeling property. After occurrence of such activation step, targeting DNMT3b has no effect, while targeting DNMT1 blocks the pro-invasive phenotype of hCAF cells.

Activated STAT3 negatively correlates with Shp1 expression in human carcinomas.

To confirm the *in vitro* findings with *in vivo* observations, an immunohistological analysis of STAT3 phosphorylation and acetylation together with Shp1 expression was performed in 100 human carcinoma samples from head and neck (n=50) and lung (n=50) cancers (Figures 6A and S6A). The levels of ac-STAT3 detected in lung (Figure 6B) and head and neck (Figure 6C) was consistent with inversely proportional detection of Shp1 expression, which established a strong negative correlation between STAT3-K685 acetylation and Shp1 expression ($r^2 = -0.55$ for head and neck; $r^2 = -0.87$ for Lung carcinomas) (Figure 6D). Thus the *in vivo* data confirmed the *in vitro* evidence revealing that in stromal fibroblasts STAT3 acetylation leads to Shp1 down-regulation. No significant difference between phosphorylation and acetylation of STAT3 in the tumor stroma of both head and neck and lung tumors biopsies was observed, which corroborates with our *in vitro* evidence that STAT3 acetylation is compulsory for its phosphorylation on Y705 (Supp. Figures S6A-S6C). We next performed three predicative models using linear multivariate logistic regressions achieved on the cleaned set (n=74). We also made a scatter-plot and

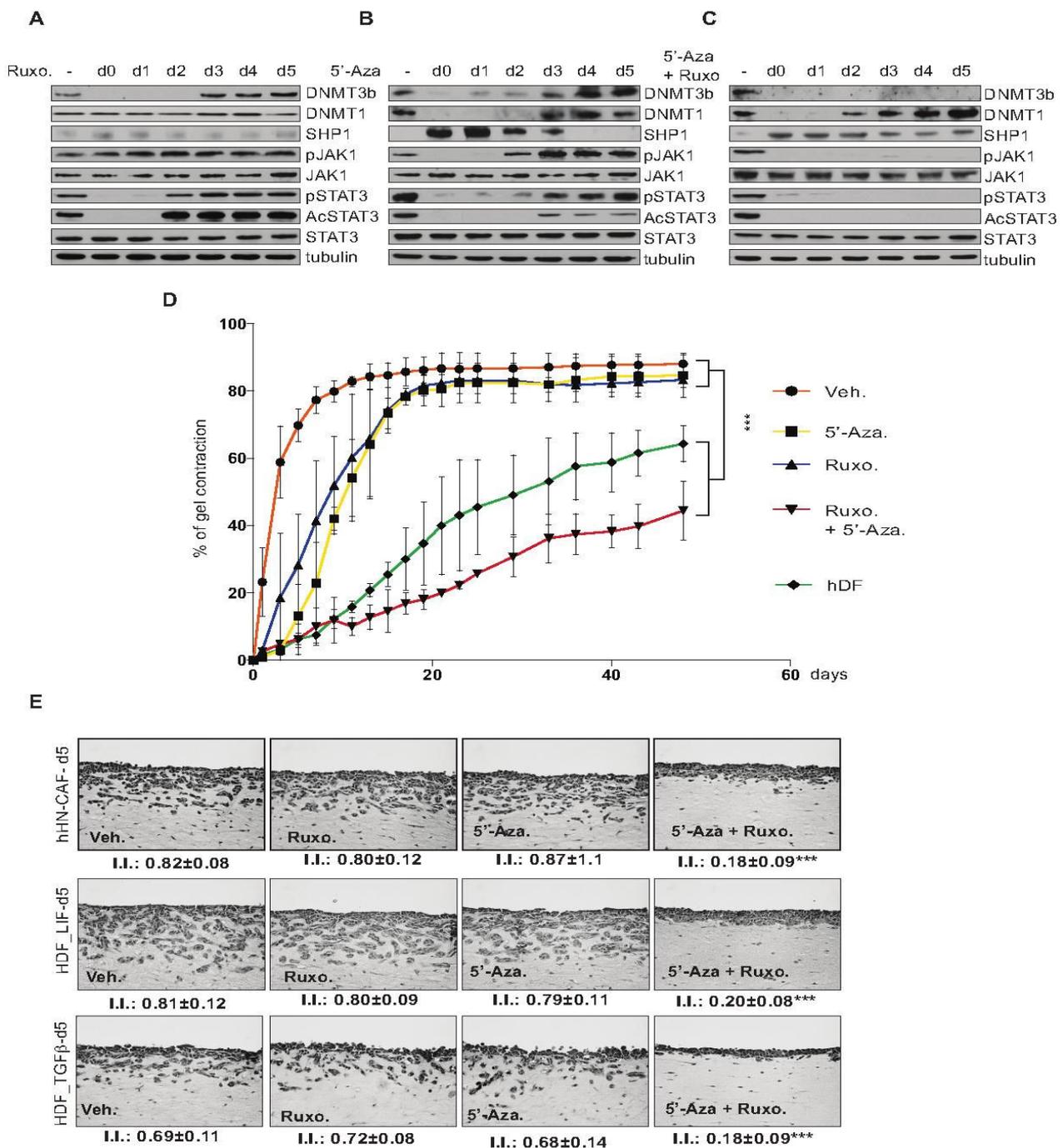


Figure 7

Phenotypic and molecular long-term reversion of CAF pro-invasive activity by dual inhibitor pre-treatment. A) Immunoblot of DNMT3b, DNMT1, Shp1, pJAK1, pSTAT3, and Ac-STAT3 in CAF cells for 5 days following Ruxolitinib inhibitor treatment. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. B) Immunoblot of DNMT3b, DNMT1, Shp1, pJAK1, pSTAT3, and Ac-STAT3 in CAF cells for 5 days following 5'-Azacytidine inhibitor treatment. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. C) Immunoblot of DNMT3b, DNMT1, Shp1, pJAK1, pSTAT3, and Ac-STAT3 in CAF cells for 5 days following Ruxolitinib and 5'-Azacytidine inhibitors treatment. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. D) Percentage of gel contraction of hDF and CAF cells for a period of 50 days following seven days of Ruxolitinib, 5'-Azacytidine or both inhibitors treatment. E) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to HN-CAF 5 days after a period of seven days of Ruxolitinib, 5'-Azacytidine or both inhibitors treatment.

calculated the correlation matrix for each couple of variables, for both the complete and the clean set of measurements (Supp. Table 2A). Correlation coefficients are widely acceptable, especially for the clean set, suggesting the possibility to define a reliable predicative model. We obtained 3 predicative models using linear multivariate logistic regressions (Supp. Table 2B). In silico values generated from these models are highly correlated with ex vivo values. Furthermore, “ac-STAT ~ SHP1 + p-STAT” model was shown to be the most the relevant and could predict with a high level of confidence the Shp1 level by scoring STAT3 phosphorylation and acetylation only (Supp. Figure S6D).

Phenotypic and molecular constitutive reversion of hCAF cells by dual inhibition of JAK1 and DNMT1 activities.

Regular administration of Ruxolitinib, a FDA approved JAK1/2 pharmacological inhibitor, could be used to target pro-invasive tumor microenvironment modifications in patients with solid cancers (Albregues et al., 2014). Here, we demonstrated that DNMT1 mediates LIF-dependent constitutive JAK1/STAT3 activation and pro-invasive activity of hCAF cells, therefore, we hypothesized that treatment of activated fibroblasts with 5'-Azacytidine could constitutively revert their activated phenotype. To test such an idea, activated-fibroblasts were cultured for 7 days in presence of either Ruxolitinib (or P6 data not shown) or 5'-Azacytidine alone or in combination. After removal of the inhibitors, the molecular activity of the JAK1/STAT3 signaling pathway was measured for 5 days, and the contractile activity in collagen gel of the treated cells was monitored for additional 45 days (Supp. Figure S7A). hCAF cells treated with Ruxolitinib (or P6 data not shown) restored STAT3 phosphorylation two days after drug removal and Shp1 expression was not affected (Figures 7A and S7B). 5'-Azacytidine treatment resulted in a temporary three-day decrease of STAT3 phosphorylation, Shp1 expression was first induced upon DNMT1 inhibition, but restoration of STAT3 activity correlated with loss of protein Shp1 (Figure 7B and S7B).

Taken together, these data indicate that both in hCAF and hDF_LIF cells, the effects of both Ruxolitinib and 5'-Azacytidine are transient. Because both drugs act at different signaling levels to regulate JAK1/STAT3 signaling pathway, possible synergistic action of the two compounds was explored. Combined seven-day Ruxolitinib (or P6 data not shown) and 5'-Azacytidine treatment of activated fibroblasts resulted in long-term abrogation of the JAK1/STAT3 phosphorylation and rescue Shp1 protein expression at the molecular level (Figures 7C and S7B). To assess whether the combined treatment could revert activated fibroblasts into a permanent low contractile and non pro-invasive hDF phenotype, hCAF and LIF_hDF cells were embedded in collagen lattice. While hCAF and LIF_hDF cells treated with one inhibitor initially showed significant reduction of contractile capacity, however, at 15 days no significant difference was observed with respect to the untreated counterparts (Figures 7D and S7C). On the contrary, combined treatment of activated fibroblasts resulted in full loss of the contractile capacity in collagen lattices that lasted all along the duration of the experiments (50 days) and made these cells indistinguishable from the hDF counterparts (Figures 7D and S7C). Similarly, the combined Ruxolitinib and 5'-Azacytidine treatment induced a complete abrogation of activated fibroblasts pro-invasive phenotype after removal of the two combined inhibitors, while the effect was reversible five days after drug removal in cells exposed to one single inhibitor (Figure 7E). Taken together these data demonstrate that in hDF cells LIF induces an epigenetic-dependent constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway that governs the pro-invasive hCAF cell ability. Such activation can be abrogated on the long-term by combination of JAK1 and DNMT inhibitors treatment.

Discussion

We have previously demonstrated that the LIF pro-inflammatory cytokine drives pro-invasive fibroblasts activation in multiple carcinomas from different origin (Albregues et al., 2014). CAF cells are described to remain activated even when isolated from tumors and cultured *in vitro* (Calvo & Sahai, 2011; Erez et al., 2010; Kalluri & Zeisberg, 2006; Kojima et al., 2010). Here, we show that LIF mediates a constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway, which confers the constitutive pro-invasive activated status of CAF cells described by many (Costea et al., 2013; Gaggioli et al., 2007; Hinz et al., 2001; Satoyoshi et al., 2014; Scott et al., 2010). Constitutive activation of the JAK1/STAT3 signaling pathway is a common process, largely described in tumor cells (Bowman, Garcia, Turkson, & Jove, 2000; Yu, Pardoll, & Jove, 2009), involving activated mutations found in GP130-IL6ST receptor (Rebouissou et al., 2009), in JAK2 kinase (Tefferi, 2007) or involving secretion of growth factors and cytokines that mediate autocrine activation of this signaling pathway (Chang et al., 2013; Lee et al., 2010). However, we have excluded possible involvement of secreted factors, both in CAF and LIF_activated fibroblasts (Figures S1B and S1C), and oncogenic mutations in CAF cells are still matter of debate (Hu et al., 2005; Jiang et al., 2008). Epigenetics modifications have been described to be responsible for constitutive activation of fibroblasts in fibrotic kidney (Bechtel et al., 2010). Here, we identified the epigenetic modifier DNMT family as regulator of pro-invasive CAF activity, through regulation of JAK1 and STAT3 constitutive activation. LIF is responsible for an initiation phase, which involves DNMT3b association with ac-STAT3 to promote methylation of the *Shp1* phosphatase promoter. DNMT1-dependent replication of *Shp1* promoter methylation maintains the constitutive phosphorylation of JAK1 (Supp. Figure 7D). Such mechanism of JAK1/STAT3 constitutive activation has been previously suggested in tumor cells (Chim, Fung, Cheung, Liang, & Kwong, 2004; Oka et al., 2002;

Q. Zhang et al., 2005; Lee et al., 2012). Here we demonstrated, for the first time, that in stromal fibroblast, epigenetic down-regulation of Shp1 protein is responsible for sustain pro-invasive activity of stromal fibroblasts. Interestingly, we demonstrated a strong negative correlation between detection of ac-STAT3 and Shp1 expression in human tissues samples form both head and neck and lung tumors suggesting that this mechanism is also observed in human tumors.

Epigenetic regulation of RASAL1 has been demonstrated to be a crucial step in the constitutive fibroblasts activation in mice model of kidney fibrosis. In this fibrotic diseases model, TGF β 1 induced up-regulation of DNMT1, which is responsible for RASAL1 loss of expression (Bechtel et al., 2010). However, in our model of CAF pro-invasive activation, DNMT3b but not DNMT1 is a LIF responsive gene. CAF cells and activated fibroblasts isolated form fibrotic tissues present a global hypomethylated DNA profile but a hypermethylated profile specifically on tumor suppressor genes promoter such as Thy1 or PTEN (Bian et al., 2012; Counts & Goodman, 1995; Kaminski et al., 2000; Komatsu et al., 2012; Quante et al., 2011; Sanders et al., 2008; Takenaka et al., 2009; Zeisberg & Zeisberg, 2013). In light with our results, we propose that *Shp1*, a tumor suppressor gene in leukemia and lymphoma, could be considered as a fibrotic suppressor gene in CAF cells.

DNA epigenetic modification is a reversible process, notably through treatment with the 5'-Azacytidine compound, a DNMT inhibitor (Christman, 2002). Here, we demonstrated that seven days treatment of CAF cells or hDF_LIF cells with both 5'-Azacytidine and Ruxolitinib JAK1/2 inhibitor stably revert pro-invasive properties of activated fibroblasts. Treatment with both compounds is mandatory for long-term reversion of CAF into hDF phenotypic and molecular profiles, while single treatment compound transiently inhibits the CAF-dependent matrix remodeling, SCC12 cells invasion and Shp1 protein expression

(Figure 7). It is conceivable that DNMT-induced passive DNA demethylation (Chen & Riggs, 2011) is not sufficient to stably revert CAF phenotype, whereas, active genomic demethylation, through replacement of modified cytosine without cell division (Bhutani, Burns, & Blau, 2011; H. Zhang & Zhu, 2012) could mediate this combined inhibitor treatment observed here. Indeed, BMP7-induced inhibition of kidney fibrosis is mediated by a Tet3-dependent active *Rasa1* promoter demethylation (Tampe et al., 2014). Accordingly, we observed a specific increased at mRNA level of APOBEC3A and TDG, two enzymes involved in cytosine replacement, in CAF with combined inhibitor treatment only (data not shown). Moreover, re-expression of tumor suppressor genes following treatment with 5'-Azacytidine or Decitabine for patients with myelodysplastic syndrome is transient and resistance is observed together with similar methylation profiles (Joeckel & Lubbert, 2012; Kagey, Kapoor-Vazirani, McCabe, Powell, & Vertino, 2010; Prebet et al., 2011; Wong et al., 2011). Hesson et al., suggested that nucleosome reassembly is a crucial step and dictates the transient efficacy of DNMT inhibitors (Hesson et al., 2013), therefore, we hypothesized that inhibition of DNMT activity, together with JAK inhibition may lead to histones modification, such as acetylation and methylation, and inhibition of nucleosomes reassembly within *Shp1* promoter.

In CAF cells, JAK1 is constitutively phosphorylated on residues tyrosine Y1022/1023 even with long-term Ruxolitinib treatment (Supp. Figure 3). *Shp1* loss of expression in CAF cells could not be sufficient to explain this observation. Indeed, as JAK kinases are activated through trans-phosphorylation, inhibition of JAK kinases activity obtained by Ruxolitinib compound should lead, after long-term treatment, to loss of Y1022/1023 phosphorylation. Mechanotransduction-induced intracellular signaling could be responsible for the constitutive phosphorylation of JAK1. Src has been described for mediating outside-in signaling to JAK1/STAT3 specifically in v-Src transformed fibroblasts (Campbell, Yu, Jove,

& Carter-Su, 1997; Y. Zhang et al., 2000). Accordingly, we noted constitutive activation of Src kinases in CAF cells, and inhibition of Src activity, by SU6656, leads to inhibition of CAF-dependent matrix remodeling and SCC12 cells invasion (Calvo et al., 2013; data not shown). Moreover, integrin $\alpha 5$ regulates Src activity (Arpaia et al., 2012; Guo & Giancotti, 2004; Mitra & Schlaepfer, 2006) and CAF-dependent matrix remodeling (Gaggioli et al., 2007), suggesting that in CAF cells, Src is responsible for constitutive phosphorylation of JAK1, while in hDF cells, Shp1 control this mechanism.

In conclusion, our work reveals a two-step mechanism for long-term CAF activation upon LIF stimulation. In hDF cells, LIF mediates an initiation phase induced through STAT3 acetylation and DNMT3b-dependent *Shp1* promoter methylation, followed by a maintenance phase mediated by DNMT1 and JAK1 constitutive activity due to the loss of Shp1 phosphatase expression in CAF. In light with our results, we propose that combined inhibitors treatment of 5'-Azacytidine together with Ruxolitinb, both approved by the food and drug administration, could phenotypically and molecularly revert activated fibroblasts into "normal" fibroblasts-like cells.

Materials and methods

Cell Culture.

Human primary Dermal Fibroblasts (hDF) and human HEK293 Phoenix cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS (fetal calf serum). Carcinoma associated fibroblasts (CAFs) isolated from patient with head and neck, lung, and breast cancer were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and insulin-transferrin-selenium (#41400-045; Invitrogen, Carlsbad, CA). SCC12 cells were cultured in FAD media, as described in Gaggioli et al (Gaggioli et al., 2007).

Long-term LIF and TGF β 1-activated fibroblasts (hDF_LIF and hDF_TGF β 1) have been performed in DMEM supplemented with 0.5% FCS containing 2ng/ml final concentration of human recombinant proteins for seven days. Next, activated-hDF cells are cultured for 15 days (otherwise stated) in 0.5% FCS media prior to experiments (as described in Supp. Figure S1A).

Cytokines, Neutralizing antibodies and inhibitors.

TGF β -1 was purchased from Peprotech (#100-21, Peprotech, Rocky Hill, NJ) and was used at 2 ng/ml, recombinant human LIF was purchased from Millipore (#LIF1005, Millipore, Billerica, MA), and was used at a concentration of 2 ng/ml. LIF neutralizing antibody (AB-250-NA, R&D, Minneapolis, MN) was used at 10 μ g/ml as described in Albregues et al (Albregues et al., 2014). The following inhibitors were used in this study: Pyridone 6 (#42009, Calbiochem, Los Angeles, CA) was used at 5 μ M, Ruxolitinib (#1598, Axon medchem, Groningen, The Netherlands) at 10 μ M, 5'-Azacytidine (#A2385, Sigma, Saint Louis, USA) was used daily at 2.5 μ M, PTP inh 1 (#540200, Millipore, Billerica, MA) at 10 μ M, Sodium Orthovanadate (#567540, Millipore, Billerica, MA) at 1 mM, C646 (#SML002, Sigma, Saint Louis, USA) and CTPB (#sc-202558, Santa

Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 25 μ M, Saha (#10009929, Cayman chemical, Ann Arbor, MI), and TSA (#T8552, Sigma, Saint Louis, USA) were used at the indicated concentration. A list of the concentration used for the inhibitors/activators in Fig 1D and 1E is provided in table S1.

RNAi Transfections.

Cells were plated at 60% confluence and subjected to transfection the following day using Dharmafect 3 (#T-2002-02; Dharmacon, inc., Lafayette, CO) at 100nM final concentration of RNAi. For long term activation studies, fibroblasts were transfected once at day 0, stimulated with recombinant cytokines from day 1 to day 7, retransfected at day 8, and maintained in 0,5% medium until day 15 for extracellular matrix remodeling, organotypic invasion assays and protein extraction. RNAi sequences are listed below:

p300 #1 – GGACUACCCUAUCAAGUAA

p300 #2 – GACAAGGGAUAAUGCCUAA

HDAC3 #1 – AACCAAGAUCUGUGAUUAUUG

HDAC3 #2 – GGAAUGCGUUGAAUAUGUC

HDAC3 #3 – GCACCCGCAUCGAGAAUCA

HDAC3 #4 – AAAGCGAUGUGGAGAUUUA

p30/DBC1 #1 - CAGCGGGUCUUCACUGGUAUU

p30/DBC1 #2 - CCAUCUGUGACUUCCUAGAACUCCA

DNMT1 #1 – GCACCUCAUUUGCCGAAUA

DNMT1 #2 – AUAAAUGAAUGGUGGAUCA

DNMT1 #3 – CCUGAGCCCUACCGAAUUG

DNMT1 #4 – CGACGACCCUGACCUCAAA

DNMT3b #1 – ACGCACAGCUGACGACUCA

DNMT3b #2 – UUUACCACCGCUGAAUUA

DNMT3b #3 – CGAAAUACAACAGUGUCU

DNMT3b #4 - GCUCUUACCUUACCAUCGA

Organotypic invasion assays and Matrix remodeling assay.

Organotypic Invasion assays have been performed as previously described in Albregues et al. (Albregues et al., 2014). For gel contraction assay, $25 \cdot 10^3$ cells were embedded in 100 μ l of matrix gel (see Hooper et al. (Hooper et al., 2010)) and seeded in triplicate into 96 well plate. After 1h at 37°C, matrix gel were overlaid with 100 μ l of 0,5% FCS medium (with indicated cytokines or inhibitors) and changed every two days. At day 6 the relative diameter of the well and the gel were measured using ImageJ. The percentage of gel contraction was calculated using the formula $100 * (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$.

Antibody.

Antibodies against STAT3 (#9139), pY705-STAT3 (#9145), ac-K685 STAT3 (#2523), SMAD2 (#3122), pSer465/467-SMAD2 (#3108), pY1022/1023-JAK1 (#3331), JAK1 (#3332), MLC2 (#3672), pThr18/19-MLC2 (#3674) were purchased from Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Beverly MA), α -tubulin from sigma (T4026, Sigma, Saint Louis, MO); Shp1 (#sc-7289, for western blot analysis), DNMT1 (#sc-20701), DNMT3b (#sc-130740) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), HDAC3 (#ab16047) and Shp1 (#ab2020 for immunohistochemical staining) from abcam (#ab2020, Abcam, Cambridge, UK) and p30/DBC1 (#A300-432A) from Bethyl laboratories (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA).

Western blot and coimmunoprecipitation analysis.

Western blot analysis was performed as previously described (Albregues et al., 2014). For coimmunoprecipitation analysis, cells were lysed on ice in modified ripa buffer (50mM Tris pH 7.4 150 mM NaCl, 1%NP-40, 0,1% SDS, 0,5% SD Dexoxycholate, 5mM NaF, 2,5 mM Nappi, and protease inhibitor (#04693159001, Roche)) for 30 minutes and isolated by centrifugation (30 min, 10000g, 4°C). Supernatants were precleared with Magna CHIP protein G bead (#16-662, Millipore) and the cleared lysate incubated with primary antibody overnight at 4°C. Immune complexes were captured by adding 35µl of protein G magnetic beads, rotated for 1h at 4°C and washed three times with lysis buffer (without SDS, SD deoxycholate and protease inhibitors). Immunoprecipitation products were separated by SDS-PAGE.

RT-qPCR Analysis

RNA isolation was performed using RNeasy Mini kit (#217004, Qiagen, Turnberry Ln Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. Reverse Transcription of 500ng RNA by Superscript II reverse transcriptase (#18064-014, Invitrogen, Carlsbad, CA) was followed by Real time PCR using Fast SYBR Green Master Mix (#18064-014; Applied Biosystems, Foster City, CA) and performed on a Step One Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Primers sequences are listed as follows,

DNMT1: sense, 5'-CCAAAGCCCGAGAGAGTGCCTCAG-3' and antisense, 5'-CCTTAGCAGCTTCCTCCTCCTT-3';

DNMT2: sense, 5'-AAGCTGTAAGCCAGCCCATATA-3' and antisense, 5'-TCAGCAGTGAACAGAACCTACATG-3';

DNMT3a : sense, 5'-CTGAAGGACTTGGGCATTCAG-3' and antisense, 5'-CACCATGCCCACCGTGA-3';

DNMT3b: sense, 5'-TACACAGACGTGTCCAACATGGGC-3' and antisense, 5'-GGA-TGC-CTTCAGGAATCACACCTC-3';

GAPDH: sense, 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3', and antisense, 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-3'.

Relative expression of the respective gene was determined after normalization to GAPDH and calculated with the following formula: relative expression level = $2^{-\Delta\Delta CT}$

Statistical analysis.

Student's t test was performed for statistical analysis of invasion assay, gel contraction assay, and qPCR results. *** indicates $p < 0,001$, ** indicates $p < 0,01$, * indicates $p < 0,05$. Error bars are + standard deviation (+ SD). Pearson's correlation coefficient was used to assess the relationship between pSTAT3, AcSTAT3 and SHP1 quick score within human samples.

In silico linear multivariate logistic regression

Quick score experimental values from 100 carcinomas were considered to design a model allowing predicative values depending of 2 others. A principal component analysis (PCA) was done to highlight dispersed measurements and build a clean set (n=74) suitable for building the model. Correlations between the variables were checked and a linear multivariate logistic regressions achieving to determine the model. Statistical analysis were performed using R software (Dean & Nielsen, 2007)

Immunohistochemical staining and quantification methods.

50 head and neck and 50 lung tumor biopsies were fixed (3,7% formaldehyde in PBS) for 4 h and transferred to 70% ethanol (24 h), embedded in paraffin wax and sectioned at 7 μ m. After deparaffination, microwave antigen retrieval was performed in Na-citrate buffer (10mM, pH6; 5min at 900W, 10min at 150W and 30 min at room temperature) for SHP1 staining, and in EDTA buffer (1mM, PH8, 5 min at 900W and 25 min at 150W) for pSTAT3 and acSTAT3 staining. Sections were washed three times in PBS (5min per wash) before endogenous peroxidase activity was blocked in 1% H₂O₂ for 10 min and washed 3 times in PBS. After incubation in blocking buffer for two hours (10% serum (S-5000, S-1000; Vector, Burlingame, CA); 0,3% Triton X100 in PBS), sections were incubated with primary antibody diluted 1:50 in blocking buffer overnight at 4°C. After three washes in PBS, sections were incubated with biotinylated secondary antibody (#BA-1000 Vector, Burlingame, CA) diluted 1:400 in PBS for 30 min and washed 3 times in PBS. Samples were then processed using Vectastain ABC kit (#PK4001, Vector, Burlingame, CA) and DAB peroxidase substrate kit (#SK4100, Vector, Burlingame, CA) according to manufacturer's instructions. Sections were next counterstained with hematoxylin for 5 sec, rinsed in water, blued 10 sec in 0,08% ammonia water, dehydrated, cleared, and mounted with cover clips. Two authors, blinded to each other's assessment, scored the slides using the Quick Score method (as described in Albregues et al. (Albregues et al., 2014)) to determine pSTAT3, acSTAT3, and SHP1 status within the tumor stroma.

DNMT activity assay.

Episeeker DNMT activity quantification kit (#ab113467, Abcam, Cambridge, UK) was used to assess DNMT activity on 10 μ g of nuclear proteins (nuclear extracts were prepared

using the EpiSeeker Nuclear Extraction Kit (#ab113474, Abcam, Cambridge, UK) following manufacturer's specifications.

Constructs

pcDNA5-mSTAT3-K685R (in which K685 is mutated from AAG (K) to AGG (R)) was derived from the wild type pCDNA5-mSTAT3-GFP-FRT expression vector (which was a gift from the laboratory of Dr. Müller-Newen) using the Quick Change II site-directed mutagenesis Kit (*Agilent* Technologies, Santa Clara, CA, USA). The sequence of the oligonucleotide primers used are: STAT3-K685R-Forward: 5'-GAGGAGGCATTTGGAAGGTACTGTAGGCCCGAG-3'; and STAT3 K685R-Reverse: 5'-CTCGGGCCTACAGTACCTTCCAATGCCTCCTC-3' and constructs were then coupled to GFP. Following constructs verification by nucleotide sequencing, the STAT3 (wild type and K685R) fragments were excised from pcDNA5 by Pme1 and BamH1 digestion and directionally cloned into pBabe retroviruses expression vectors (containing the puromycin resistance gene as a selectable marker) digested with NaeI and BamH1.

SHP1 cDNA was isolated from hPF by RT-PCR and subcloned into a pBabe retrovirus expression vector.

Production of recombinant retroviruses.

Phoenix cells were transiently transfected with 1µg of the previously described vectors using calcium phosphate mediated transfection using classical procedures. 6 hours after transfection, cells were washed with PBS and complete media was added. The day after, media was replaced by a heat-inactivated serum medium and cells were moved to 32°C

for 24 hours. 48 hours post transfection clarified supernatants (retroviral particles) were collected and used to infect either hPF or CAFs. Retrovirus infection was performed in the presence of 5ug/ml polybrene. Stably transduced cells were selected with 5ug/ml puromycin.

Bisulfite sequencing

Genomic DNA was extracted with the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Bisulfite sequencing was conducted with the EZ DNA Methylation Start-up kit (Zymo Research). Briefly, 200 ng of genomic DNA in CT Conversion Reagent buffer was denatured for 8 min at 98°C and incubated for 3.5 h at 64°C. After on-column desulfonation, DNA was eluted in 10 µL elution buffer, and subjected to 40 cycles of PCR amplification (95 °C/30 s, 59 °C/30 s, 72 °C/1 min) following an initial denaturation step at 95 °C for 10 min. Primers in the Shp1 (PTPN6) promoter (LOU1398, LOU1399, LOU1400 and LOU1401) were designed using the MethPrimer online software (www.urogene.org/methprimer/index1.html). Their specificity for bisulfite converted DNA was verified by PCR amplification of bisulfite-treated and untreated genomic DNA. PCR products were gel-purified and cloned into pGEM-T (pGEM-T Easy Vector System, Promega). Transformants containing recombinant plasmids were selected by blue/white colony screening and randomly picked up for Sanger sequencing. Analysis was performed using the QUMA online software (Kumaki, Oda, & Okano, 2008) with the default conditions (exclusion of sequences with a bisulfite conversion rate below 95% or with an identity to the reference sequence lower than 90%). Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6 software.

Oligos:

- Region 1, fwd: LOU1398

GGTTTGTATAGGGGGTATTTTTTTT

- Region 1, rev: LOU1399

CACCTAAAACCTCCACCTAAAACCTCA

- Region 2, fwd: LOU1400

AGTTTTAGGTGGAGTTTTAGGTGGT

- Region 2, rev: LOU1401

CAAAAACAAACCCTAAAACCTAATAATCTC

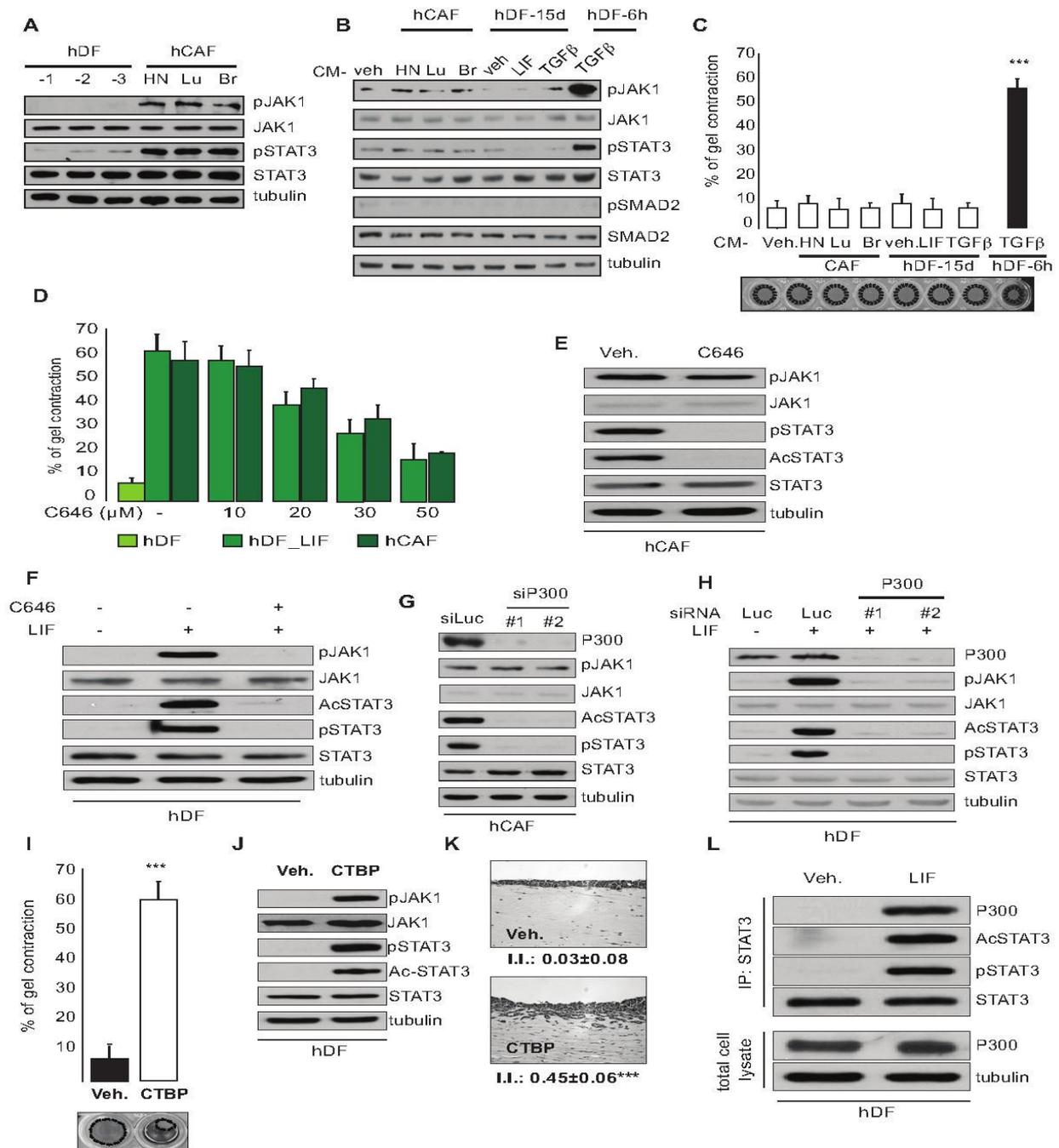
References

- Albregues, J., Bourget, I., Pons, C., Butet, V., Hofman, P., Tartare-Deckert, S., . . . Gaggioli, C. (2014). LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep*, 7(5), 1664-1678. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.036
- Albregues, J., Meneguzzi, G., & Gaggioli, C. (2013). Analysis of collective invasion of carcinoma cells in a 3D organotypic model. *Methods Mol Biol*, 961, 243-252. doi: 10.1007/978-1-62703-227-8_15
- Alicea-Velazquez, N. L., Jakoncic, J., & Boggon, T. J. (2013). Structure-guided studies of the SHP-1/JAK1 interaction provide new insights into phosphatase catalytic domain substrate recognition. *J Struct Biol*, 181(3), 243-251. doi: 10.1016/j.jsb.2012.12.009
- Arpaia, E., Blaser, H., Quintela-Fandino, M., Duncan, G., Leong, H. S., Ablack, A., . . . Mak, T. W. (2012). The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene*, 31(7), 884-896. doi: 10.1038/onc.2011.288
- Banville, D., Stocco, R., & Shen, S. H. (1995). Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics*, 27(1), 165-173. doi: 10.1006/geno.1995.1020
- Bechtel, W., McGoohan, S., Zeisberg, E. M., Muller, G. A., Kalbacher, H., Salant, D. J., . . . Zeisberg, M. (2010). Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*, 16(5), 544-550. doi: 10.1038/nm.2135
- Bhutani, N., Burns, D. M., & Blau, H. M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell*, 146(6), 866-872. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.042
- Bian, E. B., Huang, C., Ma, T. T., Tao, H., Zhang, H., Cheng, C., . . . Li, J. (2012). DNMT1-mediated PTEN hypermethylation confers hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 264(1), 13-22. doi: 10.1016/j.taap.2012.06.022
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., & Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19(21), 2474-2488. doi: 10.1038/sj.onc.1203527
- Boyd, N. F., Guo, H., Martin, L. J., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., . . . Yaffe, M. J. (2007). Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*, 356(3), 227-236. doi: 10.1056/NEJMoa062790
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R. P., Chaudhry, S. I., . . . Sahai, E. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 15(6), 637-646. doi: 10.1038/ncb2756
- Calvo, F., & Sahai, E. (2011). Cell communication networks in cancer invasion. *Curr Opin Cell Biol*, 23(5), 621-629. doi: 10.1016/j.ceb.2011.04.010
- Campbell, G. S., Yu, C. L., Jove, R., & Carter-Su, C. (1997). Constitutive activation of JAK1 in Src-transformed cells. *J Biol Chem*, 272(5), 2591-2594.
- Chang, Q., Bournazou, E., Sansone, P., Berishaj, M., Gao, S. P., Daly, L., . . . Bromberg, J. (2013). The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*, 15(7), 848-862.
- Chen, Z. X., & Riggs, A. D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*, 286(21), 18347-18353. doi: 10.1074/jbc.R110.205286
- Chim, C. S., Fung, T. K., Cheung, W. C., Liang, R., & Kwong, Y. L. (2004). SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood*, 103(12), 4630-4635. doi: 10.1182/blood-2003-06-2007
- Chini, C. C., Escande, C., Nin, V., & Chini, E. N. (2010). HDAC3 is negatively regulated by the nuclear protein DBC1. *J Biol Chem*, 285(52), 40830-40837. doi: 10.1074/jbc.M110.153270
- Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21(35), 5483-5495. doi: 10.1038/sj.onc.1205699
- Costea, D. E., Hills, A., Osman, A. H., Thurlow, J., Kalna, G., Huang, X., . . . Partridge, M. (2013). Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 73(13), 3888-3901. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4150
- Counts, J. L., & Goodman, J. I. (1995). Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*, 83(1), 13-15.
- Cox, T. R., & Erler, J. T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*, 4(2), 165-178. doi: 10.1242/dmm.004077
- Das, P. M., & Singal, R. (2004). DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*, 22(22), 4632-4642. doi: 10.1200/JCO.2004.07.151
- Dean, C. B., & Nielsen, J. D. (2007). Generalized linear mixed models: a review and some extensions. *Lifetime Data Anal*, 13(4), 497-512. doi: 10.1007/s10985-007-9065-x
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T., & Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*, 17(2), 135-147. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.041

- Feinberg, A. P., & Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 143-153. doi: 10.1038/nrc1279
- Frank, D. A. (1999). STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. *Mol Med*, 5(7), 432-456.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., & Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*, 9(12), 1392-1400. doi: 10.1038/ncb1658
- Goetz, J. G., Minguet, S., Navarro-Lerida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., . . . Del Pozo, M. A. (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell*, 146(1), 148-163. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.040
- Gopalakrishnan, S., Van Emburgh, B. O., & Robertson, K. D. (2008). DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res*, 647(1-2), 30-38. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.08.006
- Guo, W., & Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10), 816-826. doi: 10.1038/nrm1490
- Gupta, M., Han, J. J., Stenson, M., Wellik, L., & Witzig, T. E. (2012). Regulation of STAT3 by histone deacetylase-3 in diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapy. *Leukemia*, 26(6), 1356-1364. doi: 10.1038/leu.2011.340
- Hendrix, A., Gespach, C., Bracke, M., & De Wever, O. (2011). The tumor ecosystem regulates the roads for invasion and metastasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 35(11), 714-719. doi: 10.1016/j.clinre.2011.05.003
- Hesson, L. B., Patil, V., Sloane, M. A., Nunez, A. C., Liu, J., Pimanda, J. E., & Ward, R. L. (2013). Reassembly of nucleosomes at the MLH1 promoter initiates resilencing following decitabine exposure. *PLoS Genet*, 9(7), e1003636. doi: 10.1371/journal.pgen.1003636
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G., & Chaponnier, C. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*, 12(9), 2730-2741.
- Hooper, S., Gaggioli, C., & Sahai, E. (2010). A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *Br J Cancer*, 102(2), 392-402. doi: 10.1038/sj.bjc.6605469
- Hu, M., Yao, J., Cai, L., Bachman, K. E., van den Brule, F., Velculescu, V., & Polyak, K. (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*, 37(8), 899-905. doi: 10.1038/ng1596
- Jiang, L., Gonda, T. A., Gamble, M. V., Salas, M., Seshan, V., Tu, S., . . . Tycko, B. (2008). Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Res*, 68(23), 9900-9908. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1319
- Joeckel, T. E., & Lubbert, M. (2012). Clinical results with the DNA hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in patients with myelodysplastic syndromes: an update. *Semin Hematol*, 49(4), 330-341. doi: 10.1053/j.seminhematol.2012.08.001
- Kagey, J. D., Kapoor-Vazirani, P., McCabe, M. T., Powell, D. R., & Vertino, P. M. (2010). Long-term stability of demethylation after transient exposure to 5-aza-2'-deoxycytidine correlates with sustained RNA polymerase II occupancy. *Mol Cancer Res*, 8(7), 1048-1059. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0189
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(5), 392-401. doi: 10.1038/nrc1877
- Kaminski, N., Allard, J. D., Pittet, J. F., Zuo, F., Griffiths, M. J., Morris, D., . . . Heller, R. A. (2000). Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1778-1783.
- Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E. N., Mellody, K. T., Scheel, C., Ben-Porath, I., . . . Orimo, A. (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(46), 20009-20014. doi: 10.1073/pnas.1013805107
- Komatsu, Y., Waku, T., Iwasaki, N., Ono, W., Yamaguchi, C., & Yanagisawa, J. (2012). Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis. *BMC Med Genomics*, 5, 5. doi: 10.1186/1755-8794-5-5
- Kumaki, Y., Oda, M., & Okano, M. (2008). QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), W170-175. doi: 10.1093/nar/gkn294
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M., Yang, C., Liu, Y., Herrmann, A., . . . Yu, H. (2010). STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat Med*, 16(12), 1421-1428. doi: 10.1038/nm.2250
- Lee, H., Zhang, P., Herrmann, A., Yang, C., Xin, H., Wang, Z., . . . Yu, H. (2012). Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(20), 7765-7769. doi: 10.1073/pnas.1205132109
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., . . . Weaver, V. M. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), 891-906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027
- Mitra, S. K., & Schlaepfer, D. D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5), 516-523. doi: 10.1016/j.ceb.2006.08.011
- Navab, R., Strumpf, D., Bandarchi, B., Zhu, C. Q., Pintilie, M., Ramnarine, V. R., . . . Tsao, M. S. (2011). Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(17), 7160-7165. doi: 10.1073/pnas.1014506108

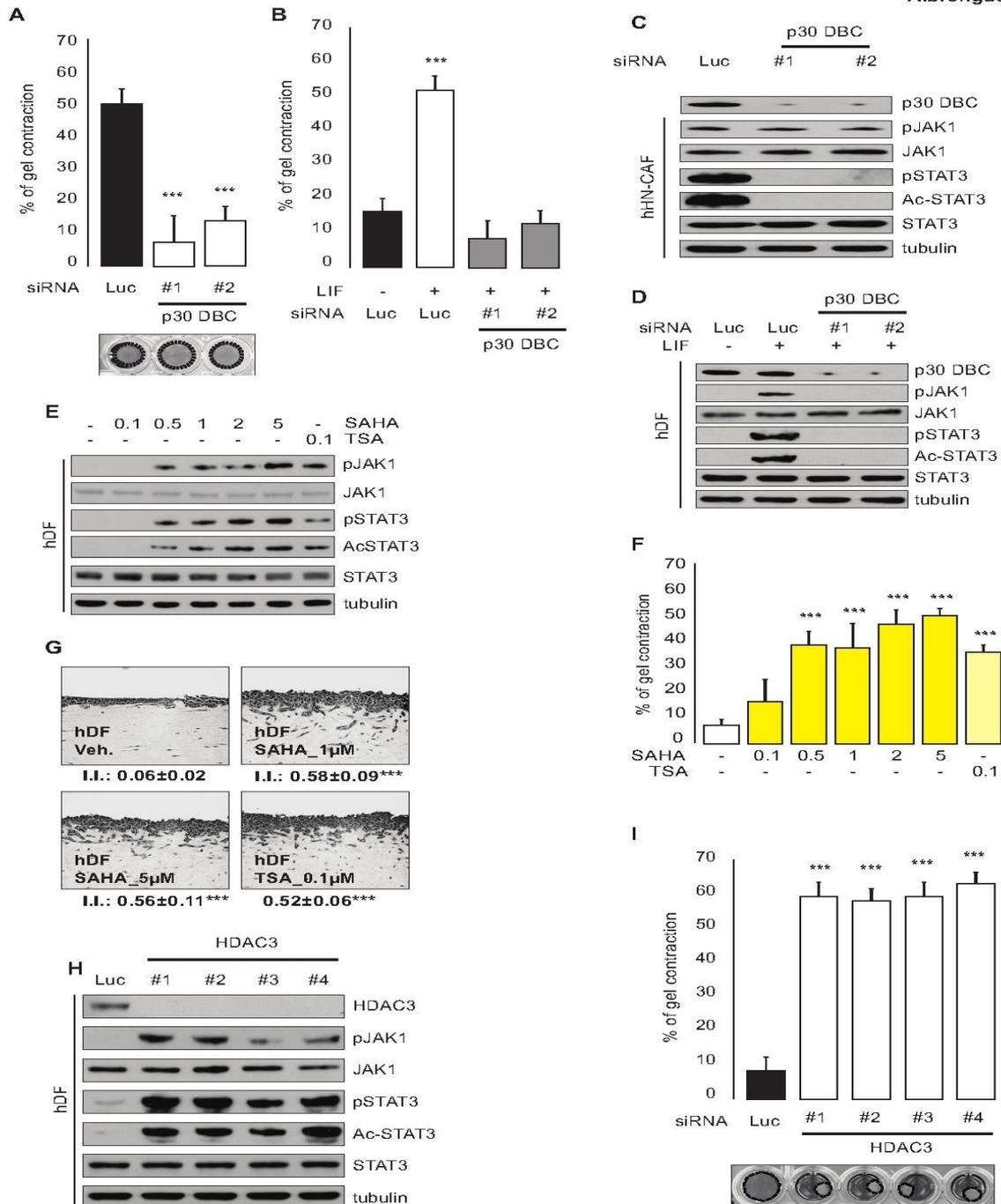
- Oka, T., Ouchida, M., Koyama, M., Ogama, Y., Takada, S., Nakatani, Y., . . . Akagi, T. (2002). Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res*, *62*(22), 6390-6394.
- Prebet, T., Gore, S. D., Esterni, B., Gardin, C., Itzykson, R., Thepot, S., . . . Vey, N. (2011). Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *J Clin Oncol*, *29*(24), 3322-3327. doi: 10.1200/JCO.2011.35.8135
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, *19*(11), 1423-1437. doi: 10.1038/nm.3394
- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., . . . Wang, T. C. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, *19*(2), 257-272. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.020
- Rane, S. G., & Reddy, E. P. (2000). Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*, *19*(49), 5662-5679. doi: 10.1038/sj.onc.1203925
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M., & Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, *117*(Pt 8), 1281-1283. doi: 10.1242/jcs.00963
- Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., . . . Zucman-Rossi, J. (2009). Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*, *457*(7226), 200-204. doi: 10.1038/nature07475
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, *6*(8), 597-610. doi: 10.1038/nrg1655
- Sanders, Y. Y., Pardo, A., Selman, M., Nuovo, G. J., Tollefsbol, T. O., Siegal, G. P., & Hagood, J. S. (2008). Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *39*(5), 610-618. doi: 10.1165/rcmb.2007-0322OC
- Sanz-Moreno, V., Gaggioli, C., Yeo, M., Albrengues, J., Wallberg, F., Viros, A., . . . Marshall, C. J. (2011). ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell*, *20*(2), 229-245. doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.018
- Satoyoshi, R., Kuriyama, S., Aiba, N., Yashiro, M., & Tanaka, M. (2014). Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2013.584
- Scott, R. W., Hooper, S., Crighton, D., Li, A., Konig, I., Munro, J., . . . Olson, M. F. (2010). LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *J Cell Biol*, *191*(1), 169-185. doi: 10.1083/jcb.201002041
- Shi, M., Yu, D. H., Chen, Y., Zhao, C. Y., Zhang, J., Liu, Q. H., . . . Zhu, M. H. (2012). Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol*, *18*(8), 840-846. doi: 10.3748/wjg.v18.i8.840
- Shuai, K., & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, *3*(11), 900-911. doi: 10.1038/nri1226
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, *14*(3), 204-220. doi: 10.1038/nrg3354
- Starr, R., & Hilton, D. J. (1999). Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays*, *21*(1), 47-52. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199901)21:1<47::AID-BIES6>3.0.CO;2-N
- Sun, X., Mao, Y., Wang, J., Zu, L., Hao, M., Cheng, G., . . . Wang, J. (2014). IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts induces tamoxifen resistance in luminal breast cancer. *Oncogene*, *0*. doi: 10.1038/onc.2014.158
- Takahashi, Y., Ishii, G., Taira, T., Fujii, S., Yanagi, S., Hishida, T., . . . Ochiai, A. (2011). Fibrous stroma is associated with poorer prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *J Thorac Oncol*, *6*(9), 1460-1467. doi: 10.1097/JTO.0b013e318229189d
- Takenaka, K., Gemma, A., Yoshimura, A., Hosoya, Y., Nara, M., Hosomi, Y., . . . Kudoh, S. (2009). Reduced transcription of the Smad4 gene during pulmonary carcinogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Med Rep*, *2*(1), 73-80. doi: 10.3892/mmr_00000064
- Tampe, B., Tampe, D., Muller, C. A., Sugimoto, H., LeBleu, V., Xu, X., . . . Zeisberg, M. (2014). Tet3-mediated hydroxymethylation of epigenetically silenced genes contributes to bone morphogenic protein 7-induced reversal of kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, *25*(5), 905-912. doi: 10.1681/ASN.2013070723
- Tefferi, A. (2007). JAK2 mutations and clinical practice in myeloproliferative neoplasms. *Cancer J*, *13*(6), 366-371. doi: 10.1097/PPO.0b013e318159467b
- Togo, S., Polanska, U. M., Horimoto, Y., & Orimo, A. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers (Basel)*, *5*(1), 149-169. doi: 10.3390/cancers5010149
- Wieczorek, M., Ginter, T., Brand, P., Heinzl, T., & Kramer, O. H. (2012). Acetylation modulates the STAT signaling code. *Cytokine Growth Factor Rev*, *23*(6), 293-305. doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.06.005
- Wong, C. M., Wong, C. C., Ng, Y. L., Au, S. L., Ko, F. C., & Ng, I. O. (2011). Transcriptional repressive H3K9 and H3K27 methylations contribute to DNMT1-mediated DNA methylation recovery. *PLoS One*, *6*(2), e16702. doi: 10.1371/journal.pone.0016702

- Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*, 18(7), 1028-1040. doi: 10.1038/nm.2807
- Xu, D., & Qu, C. K. (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci*, 13, 4925-4932.
- Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, 9(11), 798-809. doi: 10.1038/nrc2734
- Yuan, Z. L., Guan, Y. J., Chatterjee, D., & Chin, Y. E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*, 307(5707), 269-273. doi: 10.1126/science.1105166
- Zeisberg, E. M., & Zeisberg, M. (2013). The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol*, 229(2), 264-273. doi: 10.1002/path.4120
- Zhang, H., & Zhu, J. K. (2012). Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 77, 161-173. doi: 10.1101/sqb.2012.77.014936
- Zhang, Q., Wang, H. Y., Marzec, M., Raghunath, P. N., Nagasawa, T., & Wasik, M. A. (2005). STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(19), 6948-6953. doi: 10.1073/pnas.0501959102
- Zhang, Y., Turkson, J., Carter-Su, C., Smithgall, T., Levitzki, A., Kraker, A., . . . Jove, R. (2000). Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. *J Biol Chem*, 275(32), 24935-24944. doi: 10.1074/jbc.M002383200



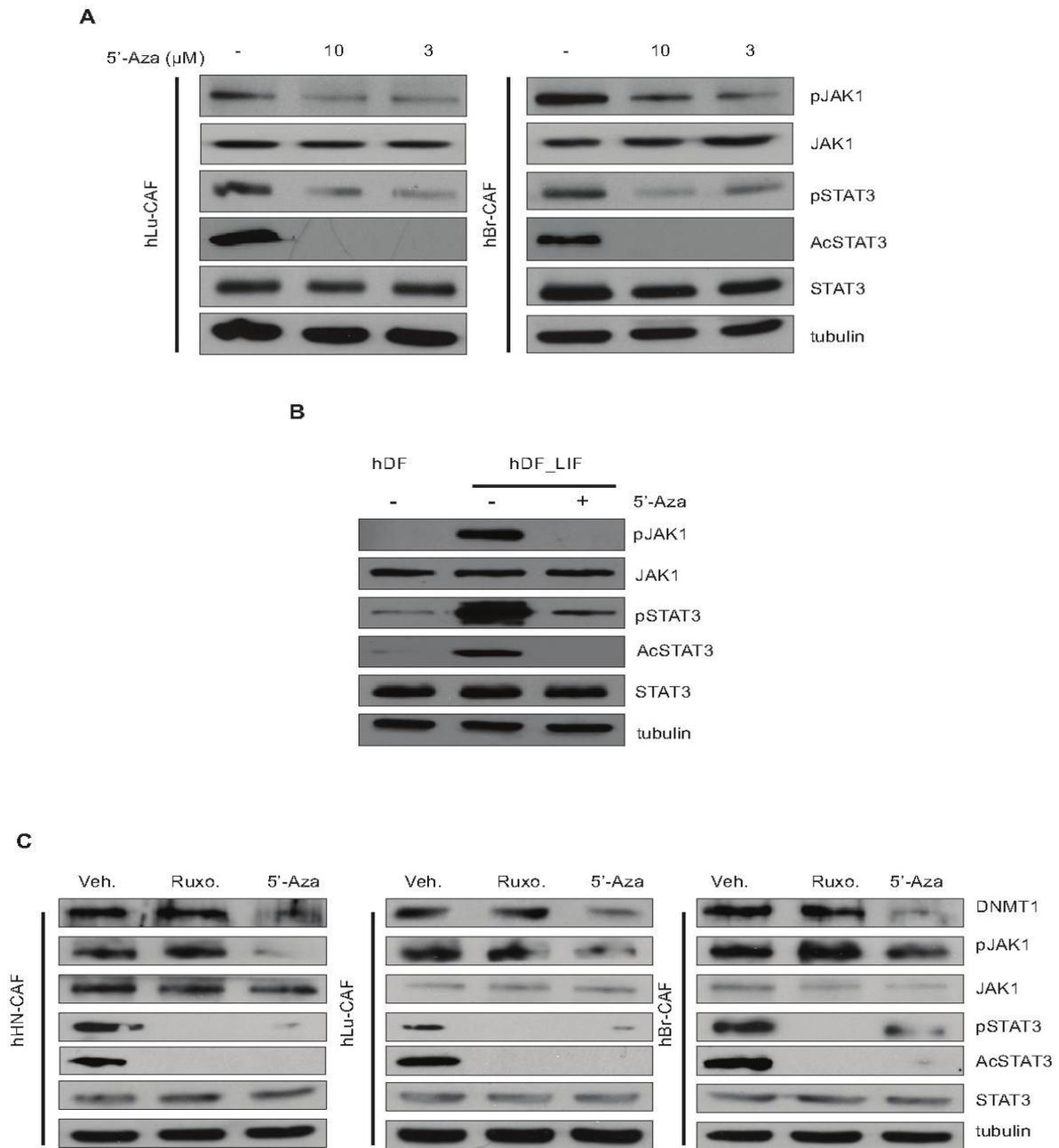
Supp. Figure 1

A) Immunoblot of pJAK1 and pSTAT3 in three hDF (-1, -2 and -3) isolated from normal skin and three hCAF (HN, Lu and Br) cells. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. B) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and pSMAD2 in hDF cells stimulated by three hCAF-CM, long-term LIF and TGFβ1-activated hDF-CM and short-term TGFβ-activated hDF-CM. Immunoblot of JAK1, STAT3, SMAD2 and tubulin as control. C) Percentage of gel contraction by hDF cells stimulated by three hCAF-CM, long-term LIF and TGFβ1-activated hDF-CM and short-term TGFβ-activated hDF-CM (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). D) Percentage of gel contraction of hDF, hDF_LIF and hDF_TGFβ in presence or absence of increase concentration of C646 inhibitor (n=3 in triplicate, mean + SD). E) Immunoblot of pJAK1, AcSTAT3 and pSTAT3 in hCAF in presence or absence of C646 inhibitor. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. F) Immunoblot of pJAK1, AcSTAT3 and pSTAT3 in hDF_LIF in presence or absence of C646 inhibitor. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. G) Immunoblot of P300, pJAK1, AcSTAT3 and pSTAT3 in hCAF transfected with RNAi control (siLuc) or targeting P300 (siP300#1 and #2). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. H) Immunoblot of P300, pJAK1, AcSTAT3 and pSTAT3 in hDF stimulated by LIF and subsequently transfected with RNAi control (siLuc) or targeting P300 (siP300#1 and #2). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. I) Percentage of gel contraction by hDF cells in absence (Veh.) or presence of CTBP small molecule activator (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). J) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and acSTAT3 in hDF cells in absence (Veh.) or presence of CTBP. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. K) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to hDF cells in absence (Veh.) or presence of CTBP small molecule activator (n=3, mean ± SD, ***p<0.001). L) Immunoblot of P300, AcSTAT3, pSTAT3 and STAT3 in hDF cells following immunoprecipitation of STAT3 upon LIF stimulation. Immunoblot of P300 and tubulin in total lysate as control.



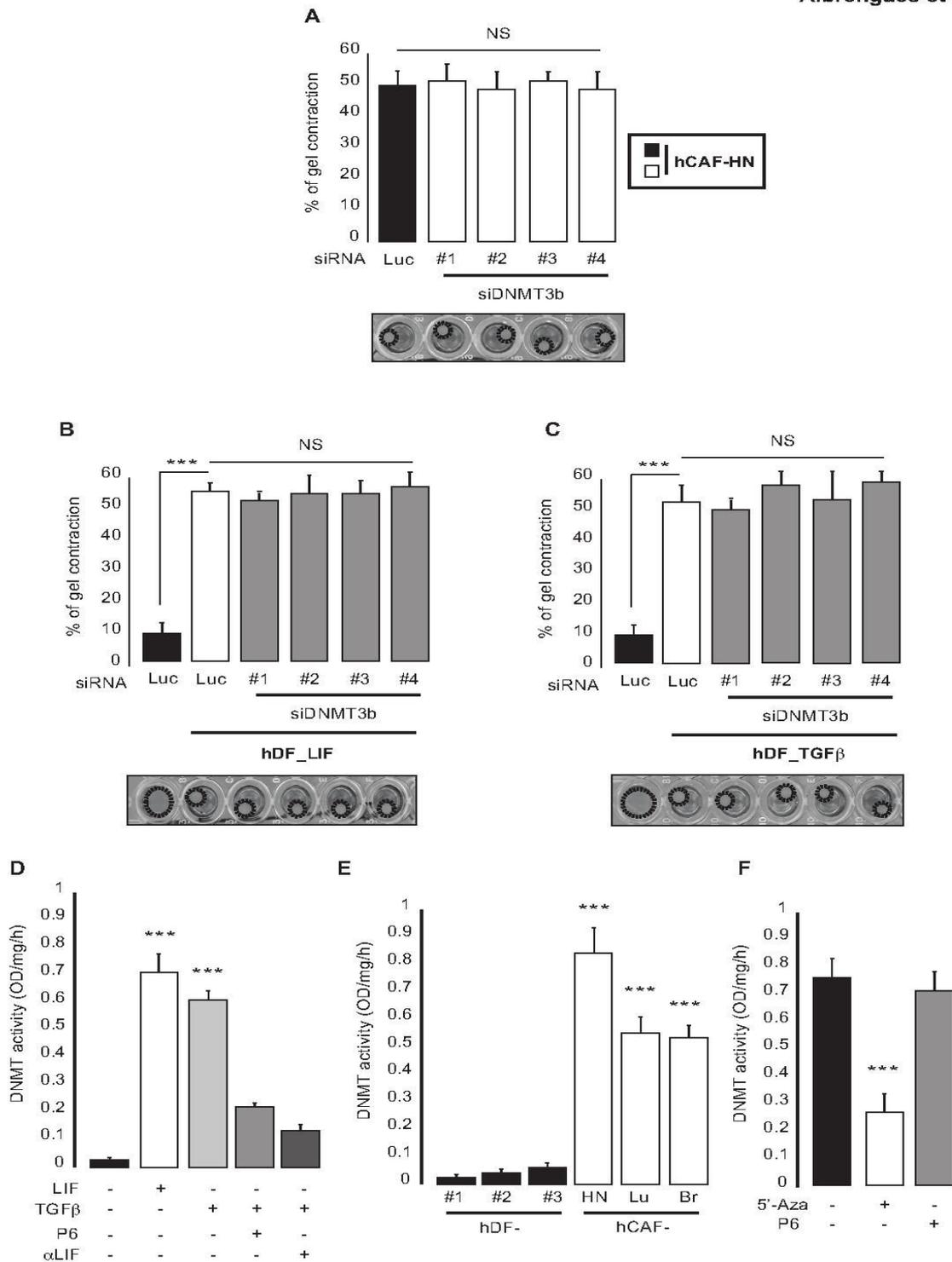
Supp. Figure 2

A) Percentage of gel contraction by hCAF cells transfected with RNAi control (siLuc) or targeting P300 (siP300#1 and #2) (n=3 in triplicate, mean \pm SD, ***p<0.001). B) Percentage of gel contraction by hDF cells transfected with RNAi control (siLuc) or targeting P300 (siP300#1 and #2) and subsequently stimulated or not by hrLIF (n=3 in triplicate, mean \pm SD, ***p<0.001). C) Immunoblot of p30DBC, pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hCAF cells transfected with RNAi control (siLuc) or targeting p30 DBC (siP30DBC#1 and #2). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. D) Immunoblot of p30DBC, pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hDF cells transfected with RNAi control (siLuc) or targeting p30 DBC (siP30DBC#1 and #2) and subsequently stimulated or not by hrLIF. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. E) Immunoblot of HDAC3, pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hDF cells transfected with RNAi control (siLuc) or targeting HDAC3 (siHDAC3#1, #2, #3 and #4). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. F) Percentage of gel contraction by hDF cells transfected with RNAi control (siLuc) or targeting HDAC3 (siHDAC3#1, #2, #3 and #4) (n=3 in triplicate, mean \pm SD, ***p<0.001). G) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hDF cells in presence or absence of SAHA and TSA (concentration as stated). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. H) Percentage of gel contraction by hDF cells in presence or absence of SAHA and TSA inhibitors (concentration as stated) (n=3 in triplicate, mean \pm SD, ***p<0.001). I) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to hDF cells in absence (Veh.) or presence of SAHA or TSA small molecules inhibitors (n=3, mean \pm SD, ***p<0.001).



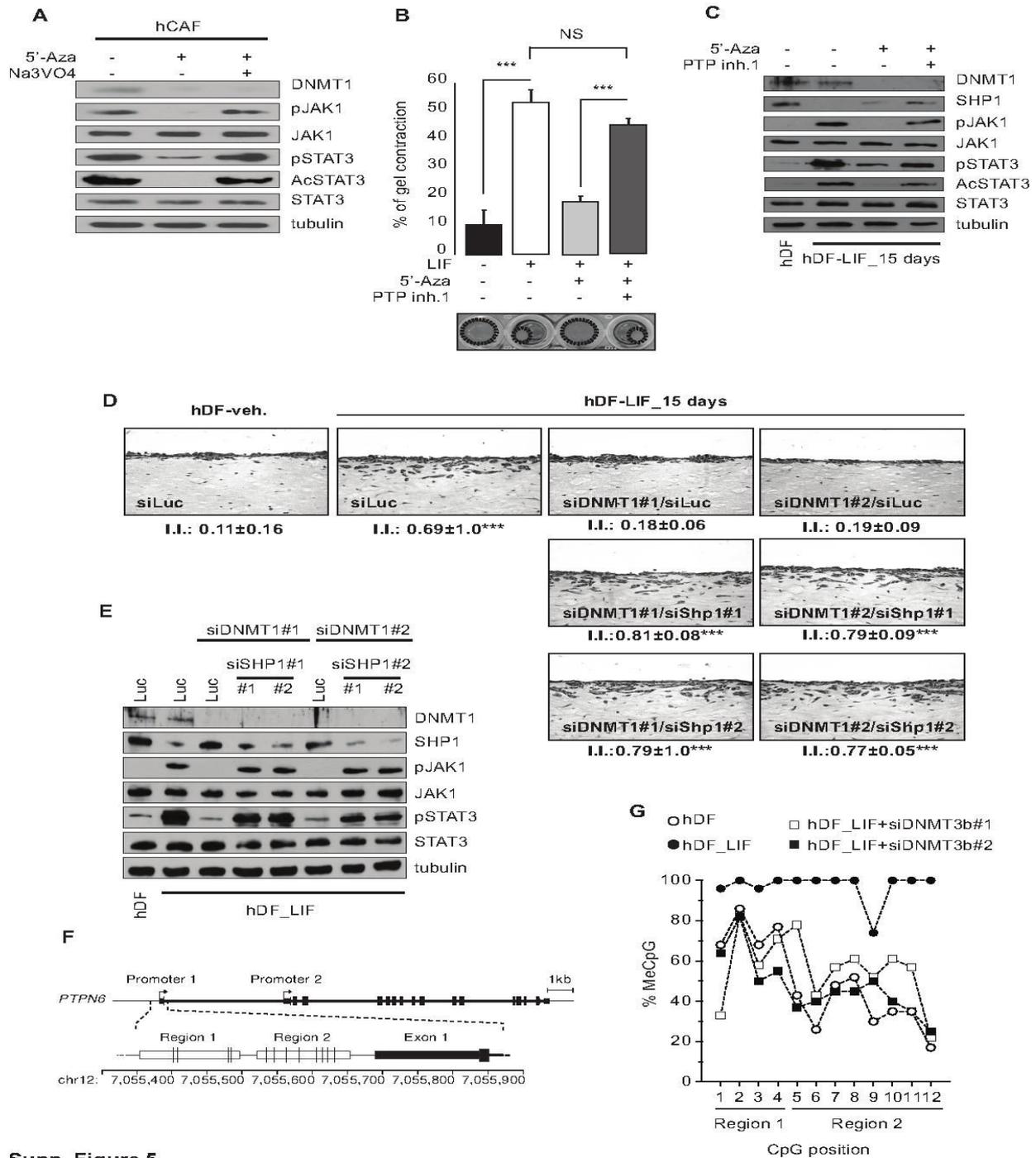
Supp. Figure 3

Supp. Figure 3A) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hCAF isolated from lung (Lu) or breast (Br) carcinomas in presence or absence of 5'-Azacytidine inhibitor at 10 and 3 μM final concentration for seven days. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. B) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in control (hDF) and long-term LIF-activated hDF (hDF_LIF) in absence or presence of 5'-Azacytidine inhibitor at 10 μM for seven days. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. C) Immunoblot of pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hCAF isolated from lung (Lu), breast (Br) or head and neck (HN) carcinomas in absence or presence of Ruxolitinib or 5'-Azacytidine for seven days. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control.



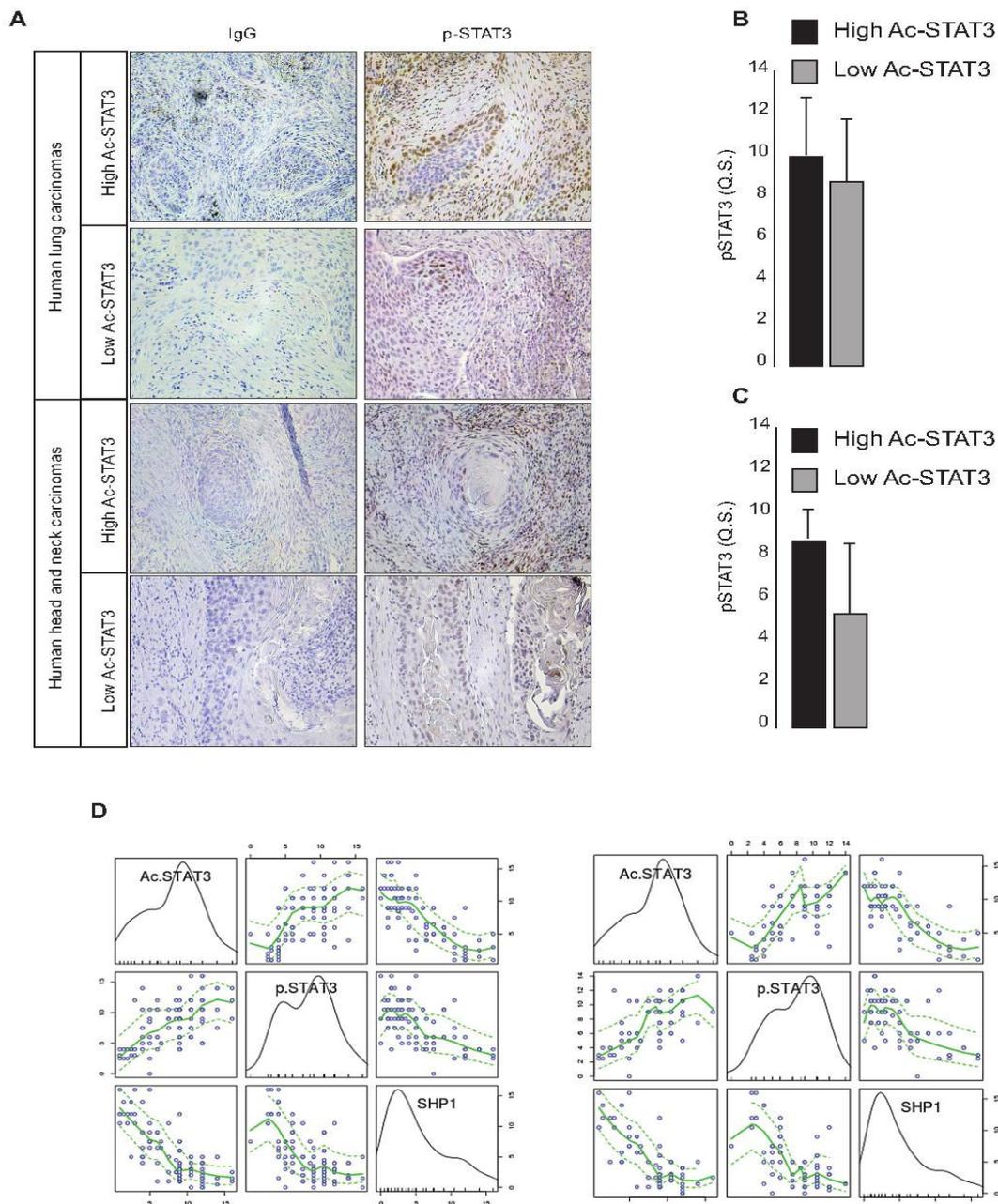
Supp. Figure 4

A) Percentage of gel contraction by hCAF cells transfected by RNAi control (siLuc) or targeting DNMT3b (siDNMT3b#1, #2, #3 and #4). Bottom panel show image of the contracted gel (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). B) Percentage of gel contraction by control hDF and long-term LIF-activated hDF cells transfected by RNAi control (siLuc) or targeting DNMT3b (siDNMT3b#1, #2, #3 and #4). Bottom panel show image of the contracted gel (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). C) Percentage of gel contraction by control hDF and long-term TGFβ1-activated hDF cells transfected by RNAi control (siLuc) or targeting DNMT3b (siDNMT3b#1, #2, #3 and #4). Bottom panel show image of the contracted gel (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). D) Quantification of DNMT activity in hDF cells control (black) and stimulated by LIF or TGFβ1 in presence or absence of P6 and LIF blocking antibody (αLIF) (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). E) Quantification of DNMT activity in three hDF cells (#1, #2 and #3) compared to three hCAF cells (HN, Lu and Br) (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). F) Quantification of DNMT activity in hCAF cells in absence or presence of 5'-Azacytidine or P6 inhibitors (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001).



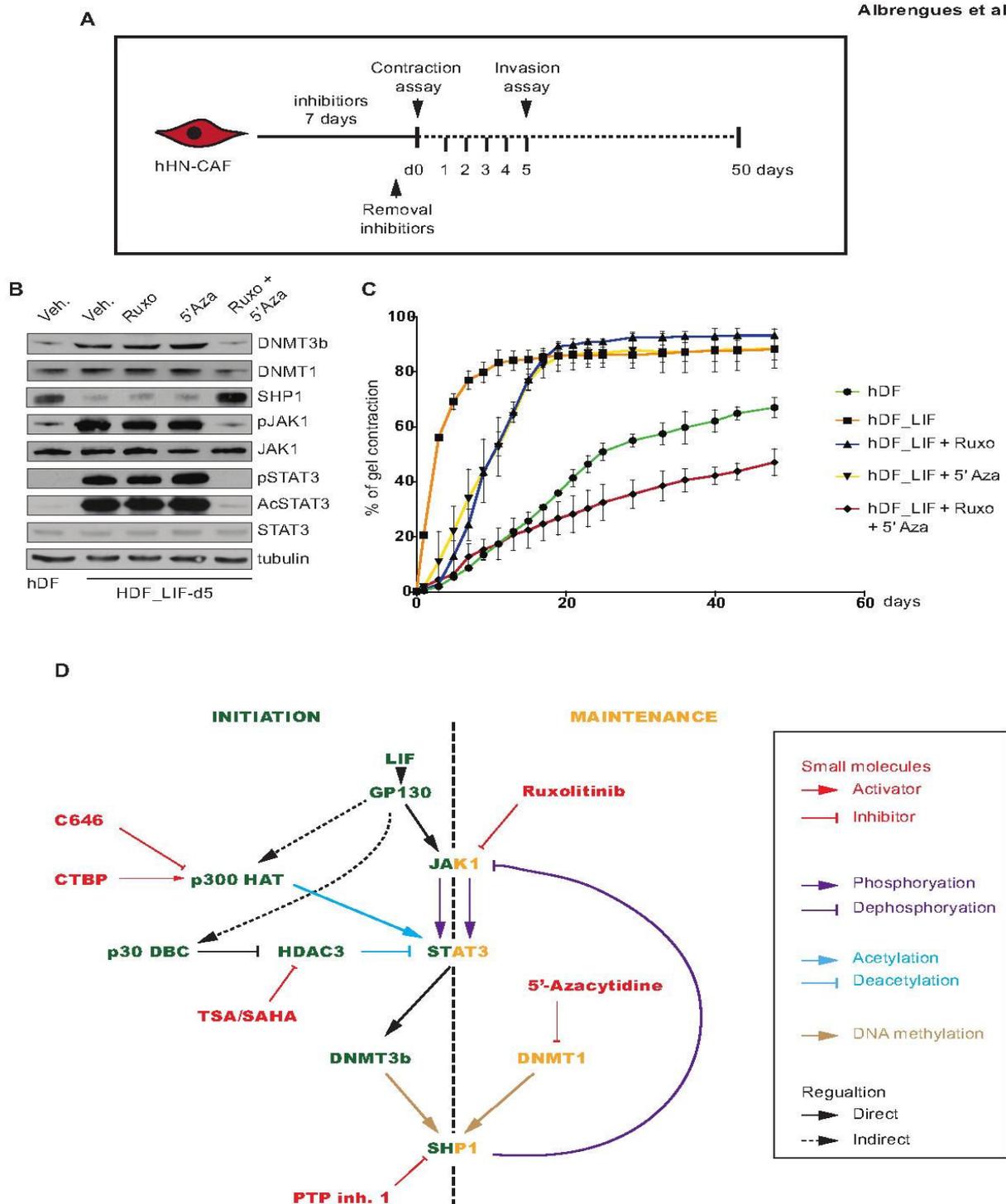
Supp. Figure 5

A) Immunoblot of DNMT1, pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hCAF cells in absence or presence of 5'-Azacytidine and Orthovanadate (Na3Vo4) inhibitors. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. B) Percentage of gel contraction by hDF or long-term LIF-activated hDF cells in presence or absence of 5'-Azacytidine and PTP inhibitor 1 inhibitors. Bottom panel show image of contracted gel (n=3 in triplicate, mean + SD, ***p<0.001). C) Immunoblot of DNMT1, Shp1, pJAK1, pSTAT3 and AcSTAT3 in hDF or long-term LIF-activated hDF cells in presence or absence of 5'-Azacytidine and PTP inhibitor 1 inhibitors. Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. D) Representative images of H&E coloration of paraffin-embedded sections of SCC12 in response to hDF (Veh.) and long-term LIF-activated hDF transfected with siRNA control (siLUC) or with siRNA targeting DNMT1 alone (siDNMT1#1, #2) or in combination with siRNA targeting Shp1 (siShp1#1, #2) (n=3, mean ± SD, ***p<0.001). E) Immunoblot of DNMT1, Shp1, pJAK1, pSTAT3 and Ac-STAT3 in hDF (Veh.) and long-term LIF-activated hDF transfected with siRNA control (siLUC) or with siRNA targeting DNMT1 alone (siDNMT1#1, #2) or in combination with siRNA targeting Shp1 (siShp1#1, #2). Immunoblot of JAK1, STAT3 and tubulin as control. F) Schematic illustrating the PTPN6 gene structure and the regions analyzed by bisulfite sequencing. The PTPN6 gene has two alternative promoters. We restricted our analysis to Promoter 1 since Promoter 2 is mostly active in the hematopoietic lineage (Banville, Stocco, & Shen, 1995). Vertical lines in Region 1 and Region 2 indicate the position of the CpG dinucleotides. G) Global PTPN6 promoter methylation analysis in hDF treated with LIF and siRNA against DNMT3b. The graph shows the percentage of methylation for each of the 20 distinct CpG dinucleotides in Region 1 and 2 (numbered from 1 to 20).



Supp. Figure 6

A) phosphorylated STAT3 (p-STAT3) and IgG control immunohistological staining in human head and neck (n=50) and lung (n=50) carcinomas. Scale bar 100 μ m. B) Quantification of mean Quick Score of pSTAT3 in head and neck carcinomas decorated with high and low acetylated STAT3 shown in (A). C) Quantification mean Quick Score for pSTAT3 in lung carcinomas decorated with high and low acetylated STAT3 tumors shown in (A). D) Scatter-plot matrix comparing experimental measurements and computed values from predictive models. Left figure shows all measurements as blue circles. Right plotted only values from the clean set of measurements. The regression models were represented as green curves, with dashed lines for uncertainties (based on P-value). Black curves were added to show the distribution of experimental measurements.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES.

L'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'activation pro-invasive des fibroblastes tumoraux nous a permis d'identifier la cytokine LIF, une cytokine pro-inflammatoire de la famille de l'IL-6, comme acteur principal de la mise en place d'un microenvironnement favorable à l'invasion des cellules tumorales. La cytokine LIF, produite et sécrétée par les fibroblastes du stroma et les cellules de carcinomes en réponse à une stimulation par le TGF β entraîne le remodelage pro-invasif du microenvironnement tumoral en activant les propriétés contractiles des fibroblastes adjacent la tumeur. Par immunohistochimie, nous montrons que LIF est surexprimé dans des coupes de biopsies de différentes tumeurs épithéliales (peau, poumons, orl), que sa production par les cellules tumorales corrèle avec les propriétés invasives de ces dernières, et que sa surexpression corrèle avec un mauvais pronostic clinique. Une étude récente, montre une diminution d'expression du récepteur de LIF (LIFr) chez les cellules de carcinome du sein, suggérant des effets à action paracrine de la surexpression de cette cytokine par les cellules tumorales (D. Chen et al., 2012). De plus, contrairement aux carcinomes spinocellulaire qui sont hautement invasif et métastasant, les carcinomes basocellulaire, peu ou pas invasifs, ne présentent aucune augmentation significative de l'expression de LIF par rapport à la peau normale (McKenzie & Szepietowski, 2004). Par conséquent, nous proposons, que la production élevée de LIF dans les tumeurs d'origines épithéliales est un des facteurs à l'origine de l'activation des fibroblastes résidents en fibroblastes pro-invasifs. Cela pourrait expliquer le caractère agressif des tumeurs exprimant LIF.

Au sein des tumeurs, les FACs constituent une population hétérogène de fibroblastes activés d'origines cellulaire diverse. Il serait donc intéressant d'explorer les effets de la cytokine LIF sur le recrutement, la différenciation et l'activation des types cellulaires qui génèrent des FACs, et notamment des cellules souches mésenchymateuse, qui, après les fibroblastes résidents du microenvironnement tumoral, représenteraient la deuxième source de FACs. En effet, la littérature mentionne différents effets de la cytokine LIF dans les processus de différenciation cellulaire. Cette cytokine est utilisée pour maintenir à l'état pluripotent des cellules souches embryonnaires murine (CSE) et préserver leur capacité d'auto-renouvellement. En effet, une fois privé de ce facteur, les CSE de souris en culture se différencient spontanément en cellules exprimant des marqueurs neuro-épithéliaux (Keller, 2005). Au cours du développement, le LIF empêche la différenciation des cellules

souches, alors que, à l'inverse, au cours de la tumorigenèse, la cytokine induit la différenciation des monocytes en macrophages associés aux tumeurs (Duluc et al., 2007). Ainsi, en fonction du contexte physiologique et cellulaire, le LIF semble jouer un rôle distinct entre maintien et différenciation.

Les FACs participent activement à l'inflammation tumorale, notamment en sécrétant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Erez et al., 2010). La production de TGF β par les cellules de carcinomes colorectaux entraîne la sécrétion de l'IL-11 par les FACs, une autre cytokine de la famille de l'IL-6. En retour, l'IL-11 active la voie de signalisation gp130/JAK/STAT dans les cellules tumorales et confère à ces dernières un avantage de survie aux sites métastatiques (Calon et al., 2012). Nos résultats, montrent que la production de LIF en réponse au TGF β est un mécanisme utilisé à la fois par les cellules stromales et les cellules tumorales, ce qui place les cytokines de la famille du TGF β et de l'IL-6, au centre de l'activation d'un microenvironnement tumorale inflammatoire aboutissant à l'activation chez les fibroblastes d'un phénotype pro-invasif. La régulation de LIF par le TGF β est également impliquée dans l'homéostasie des tissus osseux (Ruan, et al., 2010; Ota et al., 2013) et le renouvellement de cellules souches de glioblastome (Penuelas et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc que la régulation des cytokines de la famille de l'IL-6 par le TGF β est une voie de régulation activée par des processus très proches que sont le développement et la progression tumorale et épousent l'idée, assez répandue, que des mécanismes utilisés lors du développement (notamment lors de l'embryogenèse) sont réutilisés par les cellules tumorales lors de la tumorigenèse (Hanahan & Weinberg, 2011).

L'expression de α -SMA, le principal marqueur des FACs utilisés par l'ensemble de la communauté scientifique pour détecter la présence de FACs *in vitro* et *in vivo*, est régulée par la signalisation du TGF β (Desmoulière et al., 1993). A ce jour, l'expression de cette protéine est connue pour corrélérer avec la contractilité des fibroblastes activés (Hinz, et al., 2001; J. Chen et al., 2007), et notamment lors des processus de cicatrisation où les fibroblastes activés sont responsables de la fermeture de la blessure par des processus de contraction de la MEC. Son expression dans les tumeurs humaines est associée à un mauvais pronostic clinique (Parikh, Kulkarni, & Johns, 2014; Chuaysri et al., 2009). Dans nos études, nous montrons que les capacités contractiles des fibroblastes peuvent être découplées de l'expression de l' α -SMA. En effet, la stimulation des fibroblastes primaires

humains par LIF entraîne *in vitro* la contraction par ces cellules des gels de collagènes, et ceci indépendamment de l'expression de l' α -SMA. De même, l'inhibition des kinases JAKs par des inhibiteurs pharmacologiques, ainsi que par la méthode d'interférence à l'ARN, ou bien la séquestration de LIF par un anticorps bloquant entraîne dans des fibroblastes activés au TGF β une inhibition de la contractilité et des capacités pro-invasives sans affecter la surexpression de α -SMA. *In vivo*, l'inhibition des kinases JAKs par le Ruxolitinib bloque le remodelage matriciel dans les tumeurs sans affecter la surexpression de l' α -SMA chez les cellules stromales. Ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* démontrent clairement la dissociation entre la surexpression du marqueur α -SMA et la fibrose tumorale.

En effet, la régulation de α -SMA par la signalisation du TGF β est indépendante de la régulation de LIF, ce qui permet de dissocier l'expression de ce marqueur communément utilisé pour identifier les FACs et l'activité contractile des fibroblastes tumoraux, et aussi d'affirmer que l'expression de α -SMA dans les tumeurs n'est pas le bon marqueur permettant de déceler la présence de toutes les cellules stromales pro-invasives. Les FACs constituent une population hétérogène de cellules stromales présentant et au sein d'une même tumeur ou après mise en culture des niveaux d'expression d' α -SMA très hétérogènes d'une cellule à l'autre. En effet, des études montrent que les fibroblastes normaux expriment également de l' α -SMA (Hawinkels et al., 2014), et parfois même plus fortement que les FACs (Berdiel-Acer et al., 2014; Madar et al., 2009). Récemment, l'expression du PDGFR α a été proposée comme étant un meilleur marqueur des FACs dans des modèles murins de carcinogenèse (Erez et al., 2010). De manière intéressante, nous avons noté une surexpression du PDGFR α après stimulation des fibroblastes normaux par la cytokine LIF. L'ensemble de nos données suggère que: -i) la cytokine LIF permet l'éclosion d'une sous population de FACs, spécialisée dans le remodelage de la MEC et l'invasion tumorale et – ii) l'utilisation de l'expression de α -SMA comme critère d'identification de la présence de fibroblastes pro-invasifs dans le microenvironnement tumoral n'est pas une méthode fiable et elle pourrait biaiser les pronostics concernant les patients atteints de carcinome. En revanche, nous montrons que la surexpression de LIF chez les patients atteints de cancers de la tête et du cou, et de cancers du poumon corrèle de manière significative avec un pronostic clinique défavorable.

Nous montrons aussi que les fibroblastes du derme acquièrent un phénotype contractile et pro-invasif par un échange entre les voies de signalisations JAK1/STAT3 et

RhoA/ROCK/MLC2. Ces résultats suggèrent l'existence de deux mécanismes distincts à l'origine de la contractilité cellulaire et du remodelage de la MEC: un reposant sur l'expression de α -SMA, l'autre utilisant la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine dépendant de la petite GTPase RhoA. La régulation du cytosquelette d'acto-myosine est en effet cruciale pour le remodelage pro-invasif de la MEC par les FACs (Gaggioli et al., 2007; Sanz-Moreno et al., 2011). Nous montrons que LIF permet la régulation de la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine, et ainsi le remodelage pro-invasif de la MEC par activation des fibroblastes normaux. En effet, LIF permet d'augmenter: -i) l'activité de la chaîne légère de la myosine 2 (MLC2) par phosphorylation et -ii) les niveaux d'expression protéiques de la petite GTPase RhoA et de MLC2. L'augmentation de contractilité du cytosquelette d'acto-myosine qui en découle permet ainsi d'assembler les protéines de la MEC et d'augmenter la rigidité de cette dernière. En retour, la rigidité de la matrice stimule la contractilité cellulaire (créant ainsi une boucle de régulation positive), par un mécanisme appelé méchanotransduction, faisant intervenir les voies de signalisation YAP/TAZ et RhoA/ROCK. En effet, la rigidité de la matrice entraîne la translocation nucléaire du facteur de transcription YAP, qui régule l'expression des protéines du cytosquelette d'actine comme MLC2 et augmente ainsi la contractilité de la cellule (Calvo et al., 2013). En accord avec ces résultats, l'expression d'une forme active de la kinase ROCK dans les fibroblastes humains normaux est suffisante pour les activer en fibroblastes hautement contractile et pro-invasif. Cette boucle d'activation, pourrait également être à l'origine de l'activation et/ou du maintien des fibroblastes pro-invasifs lors de la tumorigénèse. De manière intéressante, l'auto-renouvellement des CSE par la cytokine LIF est dépendant de l'activation de YAP (Tamm, Bower, & Anneren, 2011). De même, nous montrons que la présence de LIF dans le milieu de culture des fibroblastes humains normaux entraîne la translocation nucléaire de YAP et peut ainsi expliquer les étapes précoces de la rigidification de la MEC, avant la mise en place de la boucle : rigidité – YAP – Rho/ROCK/MLC2 (Calvo et al., 2013).

Mes travaux de thèse mettent en évidence une coopération entre la voie de signalisation TGF β /SMAD et la voie de signalisation JAK/STAT dans la déposition et l'assemblage des protéines de la MEC, étape essentielle de la fibrose tumorale. Alors que la signalisation du TGF β augmente l'expression de protéines de la MEC comme la fibronectine, la kinase JAK1, par la régulation de la kinase ROCK, elle est responsable de l'assemblage de la

fibronectine dans la MEC. En accord avec nos résultats, il a été montré que la kinase JAK2 traduit les effets du TGF β dans des modèles de sclérose systémique et de fibrose cutanée (Dees et al., 2012). De même, nous montrons que la stimulation au TGF β des fibroblastes normaux permet l'acquisition du phénotype "FAC", alors que la stimulation par LIF entraîne une sous population de fibroblastes pro-invasifs. Nos résultats, dont certains ne sont pas inclus dans ce manuscrit, montrent que la signalisation du TGF β confère aux fibroblastes normaux plusieurs caractéristiques des FACs. Ces derniers sont alors i-capable de stimuler la prolifération et la clonogénicité des cellules tumorales via la sécrétion de facteurs que nous n'avons pas identifiés ii-capable de déposer et d'assembler des protéines de la MEC en coopération avec les kinases JAK et, iii-capable de rigidifier la MEC et favoriser l'invasion collective des cellules de carcinomes. De plus, sur gel de zymographie, les fibroblastes activés par le TGF β , à l'inverse des fibroblastes activés par LIF, présentent une activité protéolytique élevée, notamment de MMP2 et MMP9, et présentent des capacités accrues d'adhérence au support de culture. Alors que la signalisation du TGF β peut être responsable de l'activation d'un microenvironnement pro-invasif, nous montrons que les fibroblastes une fois activés par cette cytokine maintiennent l'activité pro-invasive indépendamment de l'activation de la voie de signalisation TGF β /SMAD, mais totalement dépendamment de l'activité de la voie de signalisation JAK1/STAT3. Ces derniers résultats pourraient expliquer les échecs des thérapies dirigées contre la voie du TGF β dans le traitement des fibroses chez les patients atteints de cancer (Massague, 2008; Connolly, Freimuth, & Akhurst, 2012).

L'assemblage accru des protéines de la MEC, comme le collagène, est un indicateur de la fibrose tumorale. Ce remodelage (ou cet assemblage) matriciel corrèle avec l'accroissement du caractère invasif des cellules tumorales (Provenzano et al., 2006; Levental et al., 2009; Yu, Mouw, & Weaver, 2011). De manière intéressante, la surexpression de LIF dans les séries de carcinomes humains que nous avons étudié corrèle avec une augmentation du remodelage matriciel et notamment une augmentation de la longueur et de l'épaisseur des fibres de collagènes assemblés. Nous montrons également que cette fibrose tumorale corrèle de manière significative avec la présence de nodules invasifs dans le stroma tumorale. Des observations identiques, quantifiables *in vivo*, ont été faites grâce à un modèle murin orthotopique et syngénique de carcinogénèse mammaire. En effet la surexpression de LIF dans les cellules 410.4 implantées dans des

souris Balb/C corrèle avec une augmentation du remodelage matriciel et de l'invasion des cellules tumorales dans la glande mammaire. Dans ce même modèle, l'inhibition des kinases JAK1/2 par le Ruxolitinib réduit l'assemblage des fibres de collagène et l'invasion tumorale de manière significative indépendamment de la surexpression inaltérée de l' α -SMA. Le Ruxolitinib, initialement autorisé par la FDA pour le traitement de patients atteints de myélofibrose primitive, est actuellement en essai clinique de phase II pour le traitement de patients atteints de cancer du sein et du pancréas, des cancers souvent associés à une activation constitutive du facteur de transcription STAT3. Mes résultats suggèrent donc que, en compléments de thérapies classiques visant la tumeur, l'utilisation du Ruxolitinib pourrait être une approche intéressante pour cibler les cellules stromales responsables de la fibrose tumorale et de l'invasion tumorale. La fibrose tumorale est en effet un facteur crucial de la carcinogenèse puisqu'elle est impliquée dans toutes les étapes qui lui sont associés. L'augmentation de rigidité de la MEC est suffisante pour induire une hyperplasie (Samuel et al., 2011), et peut faciliter et accélérer la transformation oncogénique (Levental et al., 2009). Une altération de la déposition et de l'assemblage de la MEC par les fibroblastes pourrait également permettre la préservation de phénotype "cellule souche cancéreuses" (Lu, Weaver, & Werb, 2012; Malanchi et al., 2012; Oskarsson & Massague, 2012; O'Connell et al., 2011; Oskarsson et al., 2011), puisque certaines MEC régulent finement l'homéostasie des cellules souche (Lu et al., 2012) ainsi que leur différenciation (Swift et al., 2013). L'augmentation de la rigidité des tissus tumoraux contribue à les rendre résistants aux traitements chimiothérapeutiques en rendant difficile l'accès des molécules actives au cœur de la tumeur (Netti, Berk, Swartz, Grodzinsky, & Jain, 2000; Loeffler, Kruger, Niethammer, & Reisfeld, 2006) et entraînant une résistance des cellules tumorales (Wiseman & Werb, 2002; Meads, Gatenby, & Dalton, 2009). Enfin, la formation d'un microenvironnement permissif à la croissance tumorale dans les sites métastatiques dépend, entre autre, de la production par les FACs de protéines de la MEC, comme les collagènes (Cox et al., 2013), la periostine (Wang & Ouyang, 2012), ou la tenascine C (O'Connell et al., 2011). L'utilisation de petites molécules inhibitrices des kinases JAK comme le Ruxolitinib pourrait donc bloquer les différentes étapes de la carcinogenèse et être ainsi bénéfique pour les patients.

L'ensemble de mes résultats démontre que la voie de signalisation JAK1/STAT3 régule la contractilité des fibroblastes normaux, puisque dans des gels de collagènes *in vitro*, l'inhibition des kinases JAK dans des fibroblastes non activés inhibe leur activité

contractile endogène. A la lumière de ces résultats, il semblerait important d'étudier le rôle des kinases de la famille JAK dans le maintien et l'homéostasie des tissus conjonctifs, comme le derme, riches en fibroblastes et pourvus d'une MEC abondante, mais également dans d'autres processus physiologiques impliquant les fibroblastes, comme la cicatrisation cutanée. Nous avançons donc l'hypothèse que dans les processus de réparation tissulaire la fermeture de la blessure par les myofibroblastes soit dépendante de l'activité des kinases JAKs. Il est intéressant de souligner que parmi toutes les cytokines de la famille de l'IL6, seulement la cytokine LIF est produite par les kératinocytes après induction d'une blessure *in vitro* du tapis cellulaire (Fitsialos et al., 2007). Suite à la fermeture de la blessure, on observe une diminution du nombre de myofibroblastes dans le tissu conjonctif, cependant une mauvaise régulation de ce processus, semble être à l'origine de certaines fibroses, comme par exemple lors de la cicatrisation hypertrophique et chéloïdienne (Moulin et al., 2004). Il serait donc intéressant d'analyser le rôle des kinases JAK et les niveaux de la cytokine LIF dans ces pathologies fibrotiques, la fibrose pouvant augmenter le risque de développement de cancers (Desmouliere, Guyot, & Gabbiani, 2004; Radisky, Kenny, & Bissell, 2007). La vérification du rôle des kinases JAKs et de la cytokine LIF lors de la cicatrisation, des pathologies fibrotiques et de la carcinogenèse pourrait être facilité par la génération de souris transgénique, dans laquelle la kinase JAK1 serait spécifiquement déletée chez les fibroblastes; la délétion non conditionnelle du gène JAK1 chez la souris induisant une létalité périnatale. Cependant les souris JAK1 flox/flox n'ont pas encore été publiées, et à la vue de nos résultats, qui implique la kinase JAK1 comme un acteur principal dans l'homéostasie et le maintien du tissu conjonctif, nous pensons qu'une telle souris ne serait pas viable. Pour contourner ces problèmes, la construction d'une souris, conditionnel et inductible, délaité pour le gène JAK1 spécifiquement dans les fibroblastes semble nécessaire. Cette souris pourrait ainsi être utilisé pour des études de cicatrisation cutanée, croisé avec des modèles murins de carcinogenèse (MMTV-PyMT), utilisés dans des modèles murins d'inflammation tumorale (cancer colorectal associé aux colites induits chimiquement par un traitement DSS, génération de tumeurs cutanés par traitement DMBA et TPA), ou encore utilisés dans des modèles de fibroses (fibrose hépatique induite par administration chronique de tétrachlorure de carbone (CCL4), fibrose cutanée induite par administration de bleomycine).

La première partie de mon travail révèle donc un tout nouveau rôle de la cytokine LIF lors de la carcinogenèse. Cette cytokine participe à la mise en place d'un microenvironnement permissif à l'invasion ces cellules tumorales. De plus, nous démontrons, pour la première fois, que les effets pro-fibrotiques de la signalisation au TGF β sont dépendants de la production de la cytokine LIF et de l'activation de la voie de signalisation JAK1/STAT3.

Dans les FACs la voie de signalisation JAK1/STAT3 est constitutivement activée, ce qui permet à ces cellules de garder leurs propriétés fibrotique et de remodelage matriciel lors des passages en culture. L'analyse du potentiel pro-invasif des fibroblastes dermiques (hDF_LIF) activés à long terme par LIF montre que, comme les FACs, ces cellules préservent *in vitro* un potentiel de remodelage matriciel accru, ainsi que leur propriété pro-invasive et la phosphorylation constitutive de la kinase JAK1 et du facteur de transcription STAT3. Une activation constitutive du facteur de transcription STAT3 est souvent retrouvé dans les cellules tumorales, ce dernier étant considéré comme un oncogène (Bromberg et al., 1999). Son activation induit la transcription d'un panel de cytokines inflammatoires, comme celles de la famille de l'IL-6, engendrant ainsi une activation autocrine et constitutive de la voie de signalisation JAK/STAT (Chang et al., 2013; Lee et al., 2010). Comme les FACs, le sécrétôme des hDF_LIF ne peut expliquer l'activité permanente de cette voie de signalisation et permet d'exclure une boucle de régulation autocrine de cette voie de signalisation par la sécrétion de molécules circulantes capables d'activer les kinases JAK dans les fibroblastes. Dans les cellules tumorales, des mutations dans les différents régulateurs de la voie de signalisation JAK/STAT peuvent activer constitutivement le facteur de transcription STAT3. Cependant, la présence de mutations dans le génome des FACs reste controversée, alors que des modifications épigénétiques sembleraient être à l'origine des caractéristiques pro-tumorales de ces cellules (Jiang et al., 2008; Hu et al., 2005). Ainsi, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires de l'activation constitutive des propriétés pro-invasive des fibroblastes tumoraux, et j'ai émis l'hypothèse que des modifications épigénétiques, induites par la cytokine LIF, sont responsables de l'activation de la voie de signalisation JAK1/STAT3 dans les FACs. Ainsi, l'utilisation d'une banque d'inhibiteur pharmacologique ciblant les principaux acteurs des modifications épigénétique m'a permis d'identifier le rôle crucial de l'acétylation sur lysine 685 du facteur de transcription STAT3 dans l'établissement du phénotype pro-invasif des fibroblastes tumoraux. L'acétylation de STAT3, induit par LIF, est sous le contrôle d'une balance entre l'activité de la HAT P300 et des HDAC de classe I qui participent à la mise

en place et au maintien d'un nouveau profil épigénétique à l'origine des fibroblastes pro-invasifs.

Par la suite, je démontre que l'acétylation de STAT3, dans les fibroblastes, est cruciale pour sa liaison avec l'ADN méthyltransférase *de novo* DNMT3b dont l'expression est stimulée par la cytokine LIF. L'étude du rôle des DNMTs dans l'établissement de l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3 induit par LIF a débouché sur l'identification de la régulation transcriptionnelle de la phosphatase SHP-1, phosphatase connue pour déphosphoryler, entre autres, la kinase JAK1 (Xu & Qu, 2008; Alicea-Velazquez et al., 2013). Je démontre que DNMT3b se lie à la forme acétylé de STAT3 en réponse à LIF et ce complexe induit la méthylation des îlots CpG du promoteur de SHP-1 entraînant la perte de son expression dans les fibroblastes. Cependant, une fois le profil de méthylation mis en place, comme c'est le cas dans les FHN_LIF et les FACs, le maintien de la répression transcriptionnelle de SHP1 par DNMT1 n'est pas dépendant de l'activité du facteur de transcription STAT3. Ainsi, la mise en place de ces modifications épigénétique est ainsi responsable de la répression transcriptionnelle de SHP-1, de l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3 et du maintien des propriétés pro-invasives des fibroblastes. De tels mécanismes de régulation de la voie de signalisation JAK/STAT ont déjà été proposés dans des études menés sur des cellules tumorales leucémiques et lymphoïdes (Oka et al., 2002; Chim et al., 2004; Q. Zhang et al., 2005) et des cellules de mélanomes (Lee et al., 2012), mais n'ont jamais été associés aux cellules du microenvironnement tumoral. Ces études montrent que DNMT1, cible directe du facteur de transcription STAT3 (Q. Zhang et al., 2005), s'associe avec la forme acétylé de STAT3 afin de méthyler le promoteur de la phosphatase SHP1 et ainsi empêcher la machinerie transcriptionnelle de s'y fixer (Lee et al., 2012). Cependant, nous observons une différence majeure dans notre système: en effet, la voie de signalisation JAK/STAT ne régule pas l'expression de DNMT1, mais seulement l'expression de DNMT3b.

Alors que la régulation positive de DNMT3b par LIF permet la mise en place des modifications épigénétique responsables de l'activation soutenue des fibroblastes, le maintien de ces modifications est pris en charge par l'ADN méthyltransférase de maintien DNMT1. Ces résultats confirment une étude menée sur les fibroblastes isolés de tissus fibrotiques, qui partagent de nombreuses caractéristiques avec les FACs (Wynn & Ramalingam, 2012). En effet, les auteurs montrent que l'hyperméthylation de RASAL1, un

inhibiteur de l'oncogène Ras par DNMT1 est associée avec l'activation constitutive des fibroblastes *in vitro* et aussi *in vivo*, dans un modèle de fibrose rénale chez la souris (Bechtel et al., 2010). Nos résultats identifient le même type de régulation par DNMT1 sur l'expression de la phosphatase SHP-1 et le maintien du phénotype contractile et pro-invasif des FACs une fois isolés et mis en culture. Cependant, dans cette étude, les auteurs montrent que la mise en place des modifications épigénétique dans les fibroblastes rénaux est régulée par la surexpression de DNMT1 par la voie de signalisation du TGF β 1, mécanismes que nous ne retrouvons pas dans les fibroblastes dermiques utilisés au laboratoire.

L'étude du méthylome des cellules tumorales a dévoilé à la fois une hypométhylation génomique globale accompagnée d'une hyperméthylation locale, notamment dans les régions promotrices des gènes suppresseurs de tumeurs (Counts & Goodman, 1995; Feinberg & Tycko, 2004). Une modification analogue du méthylome semble aujourd'hui être aussi propre aux FACs et aux populations cellulaires issues de tissus fibrotiques, riche en fibroblastes activés (Quante et al., 2011; Kaminski et al., 2000; Komatsu et al., 2012). Nos résultats sont en accord avec l'augmentation de l'expression de DNMT1, DNMT3a et 3b observée dans les tissus fibrotiques (Sanders et al., 2012; Bechtel et al., 2010), et une hyperméthylation locale de certains gènes, appelés « gènes suppresseurs de fibrose », comme Thy1 et PTEN (Sanders et al., 2008; Takenaka et al., 2009; Bian et al., 2012). A vue de nos résultats, je propose que la phosphatase SHP-1, déjà considéré comme un gène suppresseur de tumeurs dans les lymphomes et leucémie, soit considérée comme gène «suppresseurs de fibrose tumorale»

De manière intéressante, une augmentation d'expression brève et transitoire de LIF a été observée après blessure des kératinocytes normaux *in vitro* (Fitsialos et al., 2007) et elle pourrait être à l'origine des capacités contractiles des myofibroblastes observés lors de la réparation tissulaire. Cependant, au cours de la cicatrisation dans un contexte physiologique, l'activation des myofibroblastes est transitoire, alors que dans un contexte pathologique comme l'environnement d'un carcinome, les fibroblastes recrutés par la tumeur sont exposé à des stimulations chroniques par de nombreux facteurs de croissance, chimiokines et cytokines, dont les cytokines TGF β 1 et LIF. Quand au devenir des myofibroblastes lors de la fermeture de la blessure, deux hypothèses ont été avancées: soit ces cellules sont éliminés par des phénomènes d'apoptose (Darby &

Hewitson, 2007; Desmouliere et al., 1995; Grinnell et al., 1999), soit ils sont déprogrammés grâce à un mécanisme encore inconnu leur permettant un retour métabolique et physiologique à un état basal (Tomasek et al., 2002). Dans l'activation des fibroblastes par le TGF β lors de la fibrose rénale, l'équipe du docteur Zeisberg a montré l'existence de deux niveaux de régulation: une phase à court terme, réversible, indépendante de DNMT1, et une phase à long terme, irréversible, impliquant l'hyperméthylation du promoteur de Rasal1 par DNMT1 (Bechtel et al., 2010). Ces résultats semblent indiquer que la durée d'exposition des fibroblastes aux cytokines pro-inflammatoires serait à l'origine du devenir pathologique des fibroblastes. En accord avec cette hypothèse, une régulation anormale de la cicatrisation, souvent associée à un niveau élevé d'inflammation, peut déboucher sur des fibroses sévères caractérisés par le maintien des capacités contractiles des myofibroblastes (Wynn, 2008; Stramer, Mori, & Martin, 2007). De même, la mise en place d'un nouveau profil de méthylation de l'ADN nécessite plusieurs cycles de réplication: cela pourrait indiquer qu'une stimulation chronique des fibroblastes est à l'origine de l'activation constitutive des fibroblastes pro-invasifs. En accord avec cette hypothèse, je montre que sept jours de stimulation sont nécessaires pour entraîner l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3 et des capacités pro-invasives des fibroblastes. Cependant, la concentration de la cytokine LIF dans le microenvironnement cicatriciel ou tumoral pourrait également influencer l'activation épigénétique des fibroblastes. Comparer la concentration de LIF dans le surnageant de cultures blessées de kératinocytes et celui de cultures de cellules tumorales pourrait aider à la vérification de cette hypothèse.

L'analyse immunohistologique de biopsies de carcinomes humains à l'aide d'anticorps dirigés contre les formes phosphorylées et acétylées du facteur de transcription STAT3 montre un fort marquage des cellules fibroblastiques. Ce statut d'activation corrèle avec mes résultats obtenus *in vitro*, et reflète la perte d'expression de la phosphatase SHP-1. De même, l'analyse comparative du statut d'activation de STAT3 et de l'expression de SHP-1 dans les fibroblastes dermiques primaires et les FACs isolés à partir de tumeurs épithéliales montre que dans les FACs la phosphorylation et l'acétylation de STAT3 sont associées à une perte d'expression de la protéine SHP-1. Il serait cependant opportun d'analyser le profil de méthylation des îlots CpG du promoteur de SHP-1 dans les FACs; pour ce faire, il me semble nécessaire de pouvoir collecter les fibroblastes dermiques

sains de contrôle chez les patients à partir desquels les fibroblastes tumoraux ont été isolés.

Les modifications épigénétiques de l'ADN sont des processus réversibles, notamment par l'action de petites molécules pharmacologiques tels que le 5'-Azacytidine, un inhibiteur des DNMTs (Christman, 2002). Ainsi, ayant démontré que l'inhibition spécifique de DNMT1, dans les FACs, entraîne le retour de l'expression de SHP-1, j'ai émis l'hypothèse selon laquelle le traitement des FACs à la 5'-azacytidine pendant une période de sept jours, pourrait inverser constitutivement le phénotype pro-invasif des FACs *in vitro*. DNMT1 permet la duplication du profil de méthylation sur le brin d'ADN néo-répliqué, et nous avons émis l'hypothèse qu'inhiber ce mécanisme pourrait inverser l'hyperméthylation du promoteur de SHP-1 et donc reprogrammer les FACs ou les hDF_LIF vers un phénotype « fibroblaste normal ». Cependant, mes résultats montrent que l'ajout de 5'-Azacytidine dans le milieu de culture contrecarre transitoirement l'activité contractile des fibroblastes activés, qui trois jours après l'arrêt du traitement retrouvent l'activité contractile et la perte d'expression de SHP-1. En revanche, le traitement par le 5'-Azacytidine et le Ruxolitinib, visant à inhiber à la fois les DNMT et les kinases JAK, bloque sur le long terme l'activité contractile des fibroblastes activés. Ceux-ci ré-expriment constitutivement SHP-1 tout en perdant l'activation constitutive de la voie de signalisation JAK1/STAT3, et ils recouvrent un phénotype contractile et pro-invasif, comparables à ceux observés chez les fibroblastes dermiques isolés à partir de peau saine.

Bien que les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents cette reprogrammation ne sont pas encore clairs, à la lumière de récentes études plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Si la déméthylation passive du génome des FACs par perte de groupement méthyles au cours des divisions cellulaires suite à l'inhibition pharmacologique des DNMT, (Chen & Riggs, 2011) est insuffisante pour reprogrammer constitutivement les fibroblastes activés, la déméthylation active du génome, obtenue par remplacement des cytosines méthylés indépendamment de la division cellulaire (H. Zhang & Zhu, 2012) pourrait expliquer la reprogrammation due à la double inhibition des DNMT et des kinases JAK. Trois familles d'enzymes participent à la déméthylation active des cytosines: -i) les TET (Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase) qui hydroxylient les méthylcytosines ; -ii) les AID/APOBEC (activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) responsable de la désamination des cytosines ; -iii) les protéines impliquées dans la réparation de

l'ADN par excision de base (dont TDG :Thymidine DNA Glycosylase et SMUG1 : Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase) qui remplacent ces intermédiaires (Kohli & Zhang, 2013; Bhutani, Burns, & Blau, 2011). La coopération de ces trois familles d'enzymes entraîne le remplacement de la cytosine méthylée par une cytosine vierge et on parle communément de déméthylation active. Nos résultats préliminaires obtenus par PCR quantitative montrent que l'inhibition combinée des kinases JAK et des DNMT entraîne dans les FACs une augmentation des transcrits de APOBEC3A et TDG, Ainsi, la réexpression de SHP-1 consécutive à cette inhibition combinée pourrait donc être régulé par ces mécanismes de déméthylation active. Ces résultats seraient en accord avec le fait que l'inhibition de la fibrose rénale par BMP7 (*Bone morphogenetic protein 7*) induit la déméthylation du promoteur de Rasal1 par hydroxyméthylation de ces cytosine opérée par la protéine Tet3 (Tampe et al., 2014).

Des agents hypométhylants, tels que le 5'-Azacytidine et le décitabine, sont actuellement utilisés en clinique dans le traitement de patients atteints de syndrome myélodysplasique dans le but de réactiver les gènes suppresseurs de tumeurs (Joeckel & Lubbert, 2012). Cependant, les effets de ces traitements sont transitoires, et des résistances sont inévitablement développées et associées à la re-méthylation et donc un retour de l'inhibition de ces gènes (Prebet et al., 2011; Kagey et al., 2010; Wong et al., 2011). Hesson et al. montre ainsi, qu'après un effet transitoire du traitement au décitabine, induisant la réexpression du gène suppresseur de tumeur MLH1 (MutL Homolog 1), on retrouve une perte d'expression de ce gène qui dépend deux phases: i-une première phase faisant intervenir le réassemblage des nucléosome dans le promoteur du gène, bloquant ainsi sa transcription indépendamment de sa méthylation et ii-cette phase étant suivi d'un retour de la méthylation du promoteur et donc la perte d'expression stable de MLH1 (Hesson et al., 2013). Le retour transitoire d'expression de la phosphatase SHP1, dans les FACs, après un traitement au 5'-Azacytidine pourrait être due, comme décrit pour la décitabine, à l'assemblage des nucléosomes et aux modifications des histones (telles que leur méthylation et acétylation) dans le promoteur de SHP1. Une autre hypothèse serait que l'inhibition simultanée des kinases JAKs et des DNMT pourrait empêcher le réassemblage des nucléosomes dans le promoteur de SHP1, condition qui semble indispensable au retour de la methylation des gènes suppresseurs de tumeur après un traitement au décitabine (Hesson et al., 2013).

Chez les FACs, les mécanismes moléculaires permettant la phosphorylation constitutive sur les résidus tyrosines 1022/1023 de la kinase JAK1 malgré l'inhibition de son activité kinase pendant plusieurs jours ne sont pas élucidés. Cependant, plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce processus dans un contexte de transphosphorylation des kinases JAKs. Ayant démontré que la sécrétion de facteurs à action autocrine n'est pas impliquée dans la phosphorylation constitutive de JAK1, je propose que la perte d'expression de SHP-1, phosphatase responsable de la déphosphorylation de JAK1 dans les FACs, n'est pas suffisante pour expliquer la phosphorylation constitutive de JAK1. Puisque les kinases JAK1, connues pour s'autophosphoryler, ont un temps de demi-vie de 3,2 heures (Siewert et al., 1999), j'émetts l'hypothèse selon laquelle un autre acteur est impliqué dans l'activation constitutive de JAK1.

Ainsi, une des hypothèses serait que les forces exercées par méchanotransduction sur les intégrines et les complexes d'adhérence de la cellule du fait de la rigidité de la matrice (ou du support utilisé en culture cellulaire) pourraient être à l'origine de la phosphorylation de JAK1 dans les FACs. En effet, les cellules sont sensibles à la rigidité du support, ce qui entraîne, le cas échéant, l'activation et le regroupement des récepteurs intégriniques ainsi qu'une signalisation intracellulaire faisant intervenir les kinases FAK et Src. Par cette cascade de signalisation, une boucle d'activation régulant les capacités contractiles et pro-invasives des FACs se met en place (Calvo et al., 2013). Les résultats non publiés obtenus au laboratoire montrent que la kinase Src régule la contractilité et les capacités pro-invasives des FACs ainsi que la phosphorylation de la kinase JAK1 et du facteur de transcription STAT3. A cet égard, il a été décrit que les fibroblastes transformés par v-Src présentent une activation constitutive de la kinase JAK1 (Campbell et al., 1997), responsable de l'activation de STAT3 (Y. Zhang et al., 2000). De plus, nous avons observé que dans les FACs la kinase Src est constitutivement activée. L'hypothèse du rôle de la kinase Src dans la phosphorylation sur tyrosine 1022/1023 de la kinase JAK1 est en accord avec les résultats montrant que le recyclage et la signalisation de l'intégrine alpha 5 régule l'activité des kinases Src (Mitra & Schlaepfer, 2006; Guo & Giancotti, 2004; Arpaia et al., 2012) et la contractilité des FACs (Hooper et al., 2010). La rigidité matricielle et cellulaire pourrait donc être à l'origine de la phosphorylation de la kinase JAK1 via l'activation soutenue de la kinase Src. Toutefois, chez les fibroblastes normaux, ces signaux seraient contrecarrés par l'activité de la phosphatase SHP-1.

Nos résultats mettent donc en évidence le rôle crucial de la voie de signalisation LIF/JAK1/STAT3 dans la mise en place d'un « switch » épigénétique faisant évoluer les fibroblastes vers un phénotype contractile et pro-invasif. Je propose que cette voie de signalisation soit utilisée comme un mécanisme majeur d'activation des fibroblastes, par régulation de la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine et du maintien du phénotype pro-invasif par la régulation des différents facteurs impliqués dans les modifications épigénétiques de la cellule. Les données expérimentales accumulées au cours de ma thèse placent la cytokine pro-inflammatoire LIF au cœur du mécanisme moléculaire et cellulaire mettant en place un microenvironnement permissif à l'invasion des cellules cancéreuses. A vue de mes résultats expérimentaux, je propose que le ciblage pharmacologique des kinases JAK, chez les patients atteints de carcinomes invasifs, pourrait constituer une thérapie complémentaire efficace aux traitements anti tumoraux actuels car elle permettrait de cibler aussi le microenvironnement tumoral, dont l'importance dans l'évolution maligne de la maladie n'est plus à démontrer.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R., & Metz, C. N. (2001). Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*, *166*(12), 7556-7562.
- Achyut, B. R., Bader, D. A., Robles, A. I., Wangsa, D., Harris, C. C., Ried, T., & Yang, L. (2013). Inflammation-mediated genetic and epigenetic alterations drive cancer development in the neighboring epithelium upon stromal abrogation of TGF-beta signaling. *PLoS Genet*, *9*(2), e1003251. doi: 10.1371/journal.pgen.1003251
- Akhurst, R. J., & Hata, A. (2012). Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*, *11*(10), 790-811. doi: 10.1038/nrd3810
- Albregues, J., Bourget, I., Pons, C., Butet, V., Hofman, P., Tartare-Deckert, S., . . . Gaggioli, C. (2014). LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep*, *7*(5), 1664-1678. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.036
- Albregues, J., Meneguzzi, G., & Gaggioli, C. (2013). Analysis of collective invasion of carcinoma cells in a 3D organotypic model. *Methods Mol Biol*, *961*, 243-252. doi: 10.1007/978-1-62703-227-8_15
- Alderton, G. K. (2014). Microenvironment: An exercise in restraint. *Nat Rev Cancer*, *14*(7), 449. doi: 10.1038/nrc3769
- Alexander, W. S. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*, *2*(6), 410-416. doi: 10.1038/nri818
- Alicea-Velazquez, N. L., Jakoncic, J., & Boggon, T. J. (2013). Structure-guided studies of the SHP-1/JAK1 interaction provide new insights into phosphatase catalytic domain substrate recognition. *J Struct Biol*, *181*(3), 243-251. doi: 10.1016/j.jusb.2012.12.009
- Allen, A. (2007). Epigenetic alterations and cancer: new targets for therapy. *IDrugs*, *10*(10), 709-712.
- Allinen, M., Beroukhi, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., . . . Polyak, K. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, *6*(1), 17-32. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.010
- Amakye, D., Jagani, Z., & Dorsch, M. (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med*, *19*(11), 1410-1422. doi: 10.1038/nm.3389
- Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Betsholtz, C., Li, X., . . . Pietras, K. (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res*, *69*(1), 369-378. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2724
- Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, *22*(10), 1276-1312. doi: 10.1101/gad.1653708
- Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*, *116*(Pt 2), 217-224.
- Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., . . . Shuai, K. (2003). PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem*, *278*(24), 21327-21330. doi: 10.1074/jbc.C300119200
- Arpaia, E., Blaser, H., Quintela-Fandino, M., Duncan, G., Leong, H. S., Ablack, A., . . . Mak, T. W. (2012). The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene*, *31*(7), 884-896. doi: 10.1038/onc.2011.288
- Aslakson, C. J., & Miller, F. R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res*, *52*(6), 1399-1405.
- Atorrasagasti, C., Peixoto, E., Aquino, J. B., Kippes, N., Malvicini, M., Alaniz, L., . . . Mazzolini, G. (2013). Lack of the matricellular protein SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) attenuates liver fibrogenesis in mice. *PLoS One*, *8*(2), e54962. doi: 10.1371/journal.pone.0054962
- Bailey, J. M., Mohr, A. M., & Hollingsworth, M. A. (2009). Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*, *28*(40), 3513-3525. doi: 10.1038/onc.2009.220
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*, *125*(Pt 23), 5591-5596. doi: 10.1242/jcs.116392
- Bandaranayake, R. M., Ungureanu, D., Shan, Y., Shaw, D. E., Silvennoinen, O., & Hubbard, S. R. (2012). Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol*, *19*(8), 754-759. doi: 10.1038/nsmb.2348
- Barker, H. E., Bird, D., Lang, G., & Erler, J. T. (2013). Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Mol Cancer Res*, *11*(11), 1425-1436. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0033-T
- Barker, H. E., Cox, T. R., & Erler, J. T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer*, *12*(8), 540-552. doi: 10.1038/nrc3319
- Baum, J., & Duffy, H. S. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*, *57*(4), 376-379. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182116e39
- Bechtel, W., McGoohan, S., Zeisberg, E. M., Muller, G. A., Kalbacher, H., Salant, D. J., . . . Zeisberg, M. (2010). Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*, *16*(5), 544-550. doi: 10.1038/nm.2135

- Beck, B., & Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer*, *13*(10), 727-738. doi: 10.1038/nrc3597
- Bengsch, F., Buck, A., Gunther, S. C., Seiz, J. R., Tacke, M., Pfeifer, D., . . . Reinheckel, T. (2013). Cell type-dependent pathogenic functions of overexpressed human cathepsin B in murine breast cancer progression. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2013.395
- Berdiel-Acer, M., Sanz-Pamplona, R., Calon, A., Cuadras, D., Berenguer, A., Sanjuan, X., . . . Mollevi, D. G. (2014). Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol*. doi: 10.1016/j.molonc.2014.04.006
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., . . . Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, *2*(10), 737-744. doi: 10.1038/35036374
- Berking, C., Takemoto, R., Schaidler, H., Showe, L., Satyamoorthy, K., Robbins, P., & Herlyn, M. (2001). Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res*, *61*(22), 8306-8316.
- Bhowmick, N. A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A. E., Dumont, N., Shappell, S., . . . Moses, H. L. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*, *303*(5659), 848-851. doi: 10.1126/science.1090922
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, *432*(7015), 332-337. doi: 10.1038/nature03096
- Bhutani, N., Burns, D. M., & Blau, H. M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell*, *146*(6), 866-872. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.042
- Bian, E. B., Huang, C., Ma, T. T., Tao, H., Zhang, H., Cheng, C., . . . Li, J. (2012). DNMT1-mediated PTEN hypermethylation confers hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, *264*(1), 13-22. doi: 10.1016/j.taap.2012.06.022
- Bierie, B., & Moses, H. L. (2010). Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, *21*(1), 49-59. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.008
- Biname, F., Pawlak, G., Roux, P., & Hibner, U. (2010). What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Mol Biosyst*, *6*(4), 648-661. doi: 10.1039/b915591k
- Bissell, M. J., & Hines, W. C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med*, *17*(3), 320-329. doi: 10.1038/nm.2328
- Bochet, L., Lehuède, C., Dauvillier, S., Wang, Y. Y., Dirat, B., Laurent, V., . . . Muller, C. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res*, *73*(18), 5657-5668. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0530
- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., & Kuliopulos, A. (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, *120*(3), 303-313. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.018
- Bollrath, J., Pesse, T. J., von Burstin, V. A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., . . . Greten, F. R. (2009). gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*, *15*(2), 91-102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.002
- Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., . . . Jove, R. (2001). Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(13), 7319-7324. doi: 10.1073/pnas.131568898
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., & Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, *19*(21), 2474-2488. doi: 10.1038/sj.onc.1203527
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. A., . . . Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(18), 10356-10361. doi: 10.1073/pnas.171610498
- Brady, C. A., & Attardi, L. D. (2010). p53 at a glance. *J Cell Sci*, *123*(Pt 15), 2527-2532. doi: 10.1242/jcs.064501
- Bragulla, H. H., & Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, *214*(4), 516-559. doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x
- Bremnes, R. M., Donnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., . . . Busund, L. T. (2011). The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, *6*(1), 209-217. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., & Darnell, J. E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell*, *98*(3), 295-303.
- Bronisz, A., Godlewski, J., Wallace, J. A., Merchant, A. S., Nowicki, M. O., Mathysaraja, H., . . . Ostrowski, M. C. (2012). Reprogramming of the tumour microenvironment by stromal PTEN-regulated miR-320. *Nat Cell Biol*, *14*(2), 159-167. doi: 10.1038/ncb2396

- Bronte-Tinkew, D. M., Terebiznik, M., Franco, A., Ang, M., Ahn, D., Mimuro, H., . . . Jones, N. L. (2009). Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 69(2), 632-639. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1191
- Bronzert, D. A., Pantazis, P., Antoniadis, H. N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R. B., & Lippman, M. E. (1987). Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(16), 5763-5767.
- Bryant, D. M., & Mostov, K. E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(11), 887-901. doi: 10.1038/nrm2523
- Butcher, D. T., Alliston, T., & Weaver, V. M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 9(2), 108-122. doi: 10.1038/nrc2544
- Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D. V., Iglesias, M., Cespedes, M. V., . . . Batlle, E. (2012). Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*, 22(5), 571-584. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R. P., Chaudhry, S. I., . . . Sahai, E. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 15(6), 637-646. doi: 10.1038/ncb2756
- Calvo, F., & Sahai, E. (2011). Cell communication networks in cancer invasion. *Curr Opin Cell Biol*, 23(5), 621-629. doi: 10.1016/j.ceb.2011.04.010
- Campbell, G. S., Yu, C. L., Jove, R., & Carter-Su, C. (1997). Constitutive activation of JAK1 in Src-transformed cells. *J Biol Chem*, 272(5), 2591-2594.
- Carlesso, N., Frank, D. A., & Griffin, J. D. (1996). Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med*, 183(3), 811-820.
- Carragher, N. O., Walker, S. M., Scott Carragher, L. A., Harris, F., Sawyer, T. K., Brunton, V. G., . . . Frame, M. C. (2006). Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene*, 25(42), 5726-5740. doi: 10.1038/sj.onc.1209582
- Cavey, M., & Lecuit, T. (2009). Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(5), a002998. doi: 10.1101/cshperspect.a002998
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 563-572. doi: 10.1038/nrc865
- Chang, H. Y., Chi, J. T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., & Brown, P. O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 12877-12882. doi: 10.1073/pnas.162488599
- Chang, Q., Bournazou, E., Sansone, P., Berishaj, M., Gao, S. P., Daly, L., . . . Bromberg, J. (2013). The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*, 15(7), 848-862.
- Chaudhry, S. I., Hooper, S., Nye, E., Williamson, P., Harrington, K., & Sahai, E. (2013). Autocrine IL-1beta-TRAF6 signalling promotes squamous cell carcinoma invasion through paracrine TNFalpha signalling to carcinoma-associated fibroblasts. *Oncogene*, 32(6), 747-758. doi: 10.1038/onc.2012.91
- Chen, D., Sun, Y., Wei, Y., Zhang, P., Rezaeian, A. H., Teruya-Feldstein, J., . . . Ma, L. (2012). LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nat Med*, 18(10), 1511-1517. doi: 10.1038/nm.2940
- Chen, J., Li, H., SundarRaj, N., & Wang, J. H. (2007). Alpha-smooth muscle actin expression enhances cell traction force. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64(4), 248-257. doi: 10.1002/cm.20178
- Chen, M., Cheng, A., Candotti, F., Zhou, Y. J., Hymel, A., Fasth, A., . . . O'Shea, J. J. (2000). Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains. *Mol Cell Biol*, 20(3), 947-956.
- Chen, Z. X., & Riggs, A. D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*, 286(21), 18347-18353. doi: 10.1074/jbc.R110.205286
- Cheng, E., Souza, R. F., & Spechler, S. J. (2012). Tissue remodeling in eosinophilic esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303(11), G1175-1187. doi: 10.1152/ajpgi.00313.2012
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2007). Enhanced hepatocyte growth factor signaling by type II transforming growth factor-beta receptor knockout fibroblasts promotes mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, 67(10), 4869-4877. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3381
- Cheung, K. J., Gabrielson, E., Werb, Z., & Ewald, A. J. (2013). Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*, 155(7), 1639-1651. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.029
- Chim, C. S., Fung, T. K., Cheung, W. C., Liang, R., & Kwong, Y. L. (2004). SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood*, 103(12), 4630-4635. doi: 10.1182/blood-2003-06-2007

- Chothia, C., & Jones, E. Y. (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem*, *66*, 823-862. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.823
- Choudhari, S. R., Khan, M. A., Harris, G., Picker, D., Jacob, G. S., Block, T., & Shailubhai, K. (2007). Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent, Atiprimod. *Mol Cancer Ther*, *6*(1), 112-121. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0561
- Christiansen, J. J., & Rajasekaran, A. K. (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, *66*(17), 8319-8326. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410
- Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, *21*(35), 5483-5495. doi: 10.1038/sj.onc.1205699
- Chuaysri, C., Thuwajit, P., Paupairoj, A., Chau-In, S., Suthiphongchai, T., & Thuwajit, C. (2009). Alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts promote biliary cell proliferation and correlate with poor survival in cholangiocarcinoma. *Oncol Rep*, *21*(4), 957-969.
- Cirri, P., & Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res*, *1*(4), 482-497.
- Cirri, P., & Chiarugi, P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, *31*(1-2), 195-208. doi: 10.1007/s10555-011-9340-x
- Classon, M., & Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*, *2*(12), 910-917. doi: 10.1038/nrc950
- Clevenger, C. V. (2004). Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol*, *165*(5), 1449-1460. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63403-7
- Conklin, M. W., Eickhoff, J. C., Riching, K. M., Pehlke, C. A., Eliceiri, K. W., Provenzano, P. P., . . . Keely, P. J. (2011). Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol*, *178*(3), 1221-1232. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.076
- Connolly, E. C., Freimuth, J., & Akhurst, R. J. (2012). Complexities of TGF-beta targeted cancer therapy. *Int J Biol Sci*, *8*(7), 964-978. doi: 10.7150/ijbs.4564
- Contard, P., Bartel, R. L., Jacobs, L., 2nd, Perlish, J. S., MacDonald, E. D., 2nd, Handler, L., . . . Fleischmajer, R. (1993). Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *J Invest Dermatol*, *100*(1), 35-39.
- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., . . . Piccolo, S. (2011). The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*, *147*(4), 759-772. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.048
- Costa, A., Scholer-Dahirel, A., & Mechta-Grigoriou, F. (2014). The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin Cancer Biol*, *25*, 23-32. doi: 10.1016/j.semcan.2013.12.007
- Counts, J. L., & Goodman, J. I. (1995). Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*, *83*(1), 13-15.
- Cowan, D. S., & Tannock, I. F. (2001). Factors that influence the penetration of methotrexate through solid tissue. *Int J Cancer*, *91*(1), 120-125.
- Cox, T. R., Bird, D., Baker, A. M., Barker, H. E., Ho, M. W., Lang, G., & Erler, J. T. (2013). LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res*, *73*(6), 1721-1732. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2233
- Cox, T. R., & Erler, J. T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*, *4*(2), 165-178. doi: 10.1242/dmm.004077
- Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., . . . Ferrara, N. (2009). PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*, *15*(1), 21-34. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.004
- Crider, B. J., Risinger, G. M., Jr., Haaksma, C. J., Howard, E. W., & Tomasek, J. J. (2011). Myocardin-related transcription factors A and B are key regulators of TGF-beta1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation. *J Invest Dermatol*, *131*(12), 2378-2385. doi: 10.1038/jid.2011.219
- Crichton, D., & Olson, M. F. (2011). Trailblazing LIM kinases take the lead in collective tumor cell invasion. *Bioarchitecture*, *1*(1), 5-8. doi: 10.4161/bioa.1.1.14628
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., . . . Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 301-313. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003
- Dagouassat, M., Suffee, N., Hlawaty, H., Haddad, O., Charni, F., Laguillier, C., . . . Charnaux, N. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. *Int J Cancer*, *126*(5), 1095-1108. doi: 10.1002/ijc.24800
- Daly, A. J., McIlreavey, L., & Irwin, C. R. (2008). Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts--implications for invasion of oral cancer. *Oral Oncol*, *44*(7), 646-651. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.08.012

- D'Angelo, M., Billings, P. C., Pacifici, M., Leboy, P. S., & Kirsch, T. (2001). Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases (MMP). a role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, *276*(14), 11347-11353. doi: 10.1074/jbc.M009725200
- Darby, I. A., & Hewitson, T. D. (2007). Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol*, *257*, 143-179. doi: 10.1016/S0074-7696(07)57004-X
- Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science*, *277*(5332), 1630-1635.
- Das, P. M., & Singal, R. (2004). DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*, *22*(22), 4632-4642. doi: 10.1200/JCO.2004.07.151
- Davis, J., Burr, A. R., Davis, G. F., Birnbaumer, L., & Molkenstin, J. D. (2012). A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Dev Cell*, *23*(4), 705-715. doi: 10.1016/j.devcel.2012.08.017
- De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., & Bracke, M. (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*, *123*(10), 2229-2238. doi: 10.1002/ijc.23925
- De Wever, O., Nguyen, Q. D., Van Hoorde, L., Bracke, M., Bruyneel, E., Gespach, C., & Mareel, M. (2004). Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J*, *18*(9), 1016-1018. doi: 10.1096/fj.03-1110fje
- Dees, C., Tomcik, M., Palumbo-Zerr, K., Distler, A., Beyer, C., Lang, V., . . . Distler, J. H. (2012). JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor beta in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, *64*(9), 3006-3015. doi: 10.1002/art.34500
- Deng, J., Liu, Y., Lee, H., Herrmann, A., Zhang, W., Zhang, C., . . . Yu, H. (2012). S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell*, *21*(5), 642-654. doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.039
- Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, *425*(6958), 577-584. doi: 10.1038/nature02006
- Desmouliere, A. (1995). Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int*, *19*(5), 471-476. doi: 10.1006/cbir.1995.1090
- Desmouliere, A., Chaponnier, C., & Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*, *13*(1), 7-12. doi: 10.1111/j.1067-1927.2005.130102.x
- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., & Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, *122*(1), 103-111.
- Desmouliere, A., Guyot, C., & Gabbiani, G. (2004). The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol*, *48*(5-6), 509-517. doi: 10.1387/ijdb.041802ad
- Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., & Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, *146*(1), 56-66.
- Direkze, N. C., & Alison, M. R. (2006). Bone marrow and tumour stroma: an intimate relationship. *Hematol Oncol*, *24*(4), 189-195. doi: 10.1002/hon.788
- Direkze, N. C., Hodivala-Dilke, K., Jeffery, R., Hunt, T., Poulosom, R., Oukrif, D., . . . Wright, N. A. (2004). Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res*, *64*(23), 8492-8495. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1708
- Dona, E., Barry, J. D., Valentin, G., Quirin, C., Khmelinskii, A., Kunze, A., . . . Gilmour, D. (2013). Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature*, *503*(7475), 285-289. doi: 10.1038/nature12635
- Duda, D. G., Duyverman, A. M., Kohno, M., Snuderl, M., Steller, E. J., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2010). Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(50), 21677-21682. doi: 10.1073/pnas.1016234107
- Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M. P., Grimaud, L., Lenoir, J., . . . Jeannin, P. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*, *110*(13), 4319-4330. doi: 10.1182/blood-2007-02-072587
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., . . . Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, *474*(7350), 179-183. doi: 10.1038/nature10137
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, *315*(26), 1650-1659. doi: 10.1056/NEJM198612253152606
- Eager, R. M., Cunningham, C. C., Senzer, N., Richards, D. A., Raju, R. N., Jones, B., . . . Nemunaitis, J. (2009). Phase II trial of talabostat and docetaxel in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, *21*(6), 464-472. doi: 10.1016/j.clon.2009.04.007
- Eckes, B., Kessler, D., Aumailley, M., & Krieg, T. (1999). Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Semin Immunopathol*, *21*(4), 415-429.
- Eckfeldt, C. E., Mendenhall, E. M., & Verfaillie, C. M. (2005). The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(9), 726-737. doi: 10.1038/nrm1713
- Edovitsky, E., Elkin, M., Zcharia, E., Peretz, T., & Vlodavsky, I. (2004). Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *J Natl Cancer Inst*, *96*(16), 1219-1230. doi: 10.1093/jnci/djh230

- Egeblad, M., Littlepage, L. E., & Werb, Z. (2005). The fibroblastic coconspirator in cancer progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *70*, 383-388. doi: 10.1101/sqb.2005.70.007
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, *2*(3), 161-174. doi: 10.1038/nrc745
- Erez, N., Glanz, S., Raz, Y., Avivi, C., & Barshack, I. (2013). Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, *437*(3), 397-402. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.089
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T., & Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*, *17*(2), 135-147. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.041
- Ewald, A. J., Brenot, A., Duong, M., Chan, B. S., & Werb, Z. (2008). Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Dev Cell*, *14*(4), 570-581. doi: 10.1016/j.devcel.2008.03.003
- Fan, Y., Mao, R., & Yang, J. (2013). NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*, *4*(3), 176-185. doi: 10.1007/s13238-013-2084-3
- Feinberg, A. P., & Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, *4*(2), 143-153. doi: 10.1038/nrc1279
- Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, *301*(5895), 89-92.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, *3*(6), 453-458. doi: 10.1038/nrc1098
- Fiegl, H., Millinger, S., Goebel, G., Muller-Holzner, E., Marth, C., Laird, P. W., & Widschwendter, M. (2006). Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. *Cancer Res*, *66*(1), 29-33. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2508
- Fitsialos, G., Chassot, A. A., Turchi, L., Dayem, M. A., LeBrigand, K., Moreilhon, C., . . . Ponzio, G. (2007). Transcriptional signature of epidermal keratinocytes subjected to in vitro scratch wounding reveals selective roles for ERK1/2, p38, and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem*, *282*(20), 15090-15102. doi: 10.1074/jbc.M606094200
- Fodde, R., & Brabletz, T. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*, *19*(2), 150-158. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.007
- Forsberg, K., Valyi-Nagy, I., Heldin, C. H., Herlyn, M., & Westermark, B. (1993). Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(2), 393-397.
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, *123*(Pt 24), 4195-4200. doi: 10.1242/jcs.023820
- Friedl, P. (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, *16*(1), 14-23. doi: 10.1016/j.ceb.2003.11.001
- Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., & Zanker, K. S. (1998). CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol*, *28*(8), 2331-2343. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199808)28:08<#60;2331::AID-IMMU2331>#62;3.0.CO;2-C
- Friedl, P., & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(7), 445-457. doi: 10.1038/nrm2720
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y., & Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol*, *48*(5-6), 441-449. doi: 10.1387/ijdb.041821
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., & Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*, *14*(8), 777-783. doi: 10.1038/ncb2548
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, *3*(5), 362-374. doi: 10.1038/nrc1075
- Friedl, P., & Wolf, K. (2008). Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res*, *68*(18), 7247-7249. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0784
- Friedl, P., & Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev*, *28*(1-2), 129-135. doi: 10.1007/s10555-008-9174-3
- Friedl, P., & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, *188*(1), 11-19. doi: 10.1083/jcb.200909003
- Fukino, K., Shen, L., Patocs, A., Mutter, G. L., & Eng, C. (2007). Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. *JAMA*, *297*(19), 2103-2111. doi: 10.1001/jama.297.19.2103
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*, *200*(4), 500-503. doi: 10.1002/path.1427

- Gaggioli, C. (2008). Collective invasion of carcinoma cells: when the fibroblasts take the lead. *Cell Adh Migr*, 2(1), 45-47.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., & Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*, 9(12), 1392-1400. doi: 10.1038/ncb1658
- Garcia, R., Yu, C. L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K. L., Smithgall, T., . . . Jove, R. (1997). Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ*, 8(12), 1267-1276.
- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196(2), 261-282.
- Gerber, P. A., Hippe, A., Buhren, B. A., Muller, A., & Homey, B. (2009). Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biol Chem*, 390(12), 1213-1223. doi: 10.1515/BC.2009.144
- Germain, L., Jean, A., Auger, F. A., & Garrel, D. R. (1994). Human wound healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts. *J Surg Res*, 57(2), 268-273. doi: 10.1006/jsre.1994.1143
- Gerweck, L. E., & Seetharaman, K. (1996). Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res*, 56(6), 1194-1198.
- Giannoni, E., Bianchini, F., Calorini, L., & Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts exploit reactive oxygen species through a proinflammatory signature leading to epithelial mesenchymal transition and stemness. *Antioxid Redox Signal*, 14(12), 2361-2371. doi: 10.1089/ars.2010.3727
- Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., & Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res*, 70(17), 6945-6956. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0785
- Giordanetto, F., & Kroemer, R. T. (2002). Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng*, 15(9), 727-737.
- Gocheva, V., Wang, H. W., Gadea, B. B., Shree, T., Hunter, K. E., Garfall, A. L., . . . Joyce, J. A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev*, 24(3), 241-255. doi: 10.1101/gad.1874010
- Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., . . . Joyce, J. A. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev*, 20(5), 543-556. doi: 10.1101/gad.1407406
- Goelz, S. E., Vogelstein, B., Hamilton, S. R., & Feinberg, A. P. (1985). Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, 228(4696), 187-190.
- Goetz, J. G., Minguet, S., Navarro-Lerida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., . . . Del Pozo, M. A. (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell*, 146(1), 148-163. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.040
- Gore, J., & Korc, M. (2014). Pancreatic cancer stroma: friend or foe? *Cancer Cell*, 25(6), 711-712. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.026
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2(1), 48-58. doi: 10.1038/nrc706
- Greenhalgh, C. J., & Hilton, D. J. (2001). Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*, 70(3), 348-356.
- Grinnell, F. (2003). Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*, 13(5), 264-269.
- Grinnell, F. (2008). Fibroblast mechanics in three-dimensional collagen matrices. *J Bodyw Mov Ther*, 12(3), 191-193. doi: 10.1016/j.jbmt.2008.03.005
- Grinnell, F., Zhu, M., Carlson, M. A., & Abrams, J. M. (1999). Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp Cell Res*, 248(2), 608-619. doi: 10.1006/excr.1999.4440
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., . . . Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 15(2), 103-113. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.001
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025
- Grivennikov, S. I., & Karin, M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(1), 11-19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.005
- Grugan, K. D., Miller, C. G., Yao, Y., Michaylira, C. Z., Ohashi, S., Klein-Szanto, A. J., . . . Rustgi, A. K. (2010). Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(24), 11026-11031. doi: 10.1073/pnas.0914295107
- Gu, J., Qian, H., Shen, L., Zhang, X., Zhu, W., Huang, L., . . . Xu, W. (2012). Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF-beta/Smad pathway. *PLoS One*, 7(12), e52465. doi: 10.1371/journal.pone.0052465
- Guilluy, C., Swaminathan, V., Garcia-Mata, R., O'Brien, E. T., Superfine, R., & Burridge, K. (2011). The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol*, 13(6), 722-727. doi: 10.1038/ncb2254

- Guo, W., & Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10), 816-826. doi: 10.1038/nrm1490
- Haan, C., Kreis, S., Margue, C., & Behrmann, I. (2006). Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol*, 72(11), 1538-1546. doi: 10.1016/j.bcp.2006.04.013
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanson, J. A., Gillespie, J. W., Grover, A., Tangrea, M. A., Chuaqui, R. F., Emmert-Buck, M. R., . . . Woodson, K. G. (2006). Gene promoter methylation in prostate tumor-associated stromal cells. *J Natl Cancer Inst*, 98(4), 255-261. doi: 10.1093/jnci/djj051
- Harburger, D. S., & Calderwood, D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 2), 159-163. doi: 10.1242/jcs.018093
- Harless, W. W. (2009). Revisiting perioperative chemotherapy: the critical importance of targeting residual cancer prior to wound healing. *BMC Cancer*, 9, 118. doi: 10.1186/1471-2407-9-118
- Harrison, C., Kiladjian, J. J., Al-Ali, H. K., Gisslinger, H., Waltzman, R., Stalbovskaya, V., . . . Barosi, G. (2012). JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med*, 366(9), 787-798. doi: 10.1056/NEJMoa1110556
- Harrison, L., & Blackwell, K. (2004). Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist*, 9 Suppl 5, 31-40. doi: 10.1634/theoncologist.9-90005-31
- Haubeiss, S., Schmid, J. O., Murdter, T. E., Sonnenberg, M., Friedel, G., van der Kuip, H., & Aulitzky, W. E. (2010). Dasatinib reverses cancer-associated fibroblasts (CAFs) from primary lung carcinomas to a phenotype comparable to that of normal fibroblasts. *Mol Cancer*, 9, 168. doi: 10.1186/1476-4598-9-168
- Hawinkels, L. J., Paauwe, M., Verspaget, H. W., Wiercinska, E., van der Zon, J. M., van der Ploeg, K., . . . Sier, C. F. (2014). Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF-beta signaling in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*, 33(1), 97-107. doi: 10.1038/onc.2012.536
- Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J., & Duschl, A. (2006). Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(3), 173-188. doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.01.004
- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Bocker, E. B., & Friedl, P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res*, 62(7), 2125-2130.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(Pt 1), 1-20. doi: 10.1042/BJ20030407
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2), 297-314.
- Heldin, C. H., Rubin, K., Pietras, K., & Ostman, A. (2004). High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 806-813. doi: 10.1038/nrc1456
- Hesson, L. B., Patil, V., Sloane, M. A., Nunez, A. C., Liu, J., Pimanda, J. E., & Ward, R. L. (2013). Reassembly of nucleosomes at the MLH1 promoter initiates resilencing following decitabine exposure. *PLoS Genet*, 9(7), e1003636. doi: 10.1371/journal.pgen.1003636
- Hilkens, C. M., Is'harc, H., Lillemeier, B. F., Strobl, B., Bates, P. A., Behrmann, I., & Kerr, I. M. (2001). A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett*, 505(1), 87-91.
- Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, 127(3), 526-537. doi: 10.1038/sj.jid.5700613
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G., & Chaponnier, C. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*, 12(9), 2730-2741.
- Hinz, B., Dugina, V., Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., & Chaponnier, C. (2003). Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell*, 14(6), 2508-2519. doi: 10.1091/mbc.E02-11-0729
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L., & Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 170(6), 1807-1816. doi: 10.2353/ajpath.2007.070112
- Hirata, E., Park, D., & Sahai, E. (2014). Retrograde flow of cadherins in collective cell migration. *Nat Cell Biol*, 16(7), 621-623. doi: 10.1038/ncb2995
- Hofheinz, R. D., al-Batran, S. E., Hartmann, F., Hartung, G., Jager, D., Renner, C., . . . Stehle, G. (2003). Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie*, 26(1), 44-48. doi: 10.1159/000069863
- Hollander, M. C., Blumenthal, G. M., & Dennis, P. A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*, 11(4), 289-301. doi: 10.1038/nrc3037

- Hood, J. D., & Cheresh, D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2(2), 91-100. doi: 10.1038/nrc727
- Hooper, S., Gaggioli, C., & Sahai, E. (2010). A chemical biology screen reveals a role for Rab21-mediated control of actomyosin contractility in fibroblast-driven cancer invasion. *Br J Cancer*, 102(2), 392-402. doi: 10.1038/sj.bjc.6605469
- Horvath, C. M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*, 25(10), 496-502.
- Hosein, A. N., Wu, M., Arcand, S. L., Lavallee, S., Hebert, J., Tonin, P. N., & Basik, M. (2010). Breast carcinoma-associated fibroblasts rarely contain p53 mutations or chromosomal aberrations. *Cancer Res*, 70(14), 5770-5777. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0673
- Hu, M., Peluffo, G., Chen, H., Gelman, R., Schnitt, S., & Polyak, K. (2009). Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(9), 3372-3377. doi: 10.1073/pnas.0813306106
- Hu, M., Yao, J., Cai, L., Bachman, K. E., van den Brule, F., Velculescu, V., & Polyak, K. (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*, 37(8), 899-905. doi: 10.1038/ng1596
- Huang, M., Li, Y., Zhang, H., & Nan, F. (2010). Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44+CD24-cells through SDF-1/CXCR4 interaction. *J Exp Clin Cancer Res*, 29, 80. doi: 10.1186/1756-9966-29-80
- Huang, S., Fang, R., Xu, J., Qiu, S., Zhang, H., Du, J., & Cai, S. (2011). Evaluation of the tumor targeting of a FAPalpha-based doxorubicin prodrug. *J Drug Target*, 19(7), 487-496. doi: 10.3109/1061186X.2010.511225
- Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119(Pt 19), 3901-3903. doi: 10.1242/jcs.03098
- Ihle, J. N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377(6550), 591-594. doi: 10.1038/377591a0
- Ihle, J. N. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2), 211-217.
- Iijima, J., Konno, K., & Itano, N. (2011). Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, 3(3), 3189-3205. doi: 10.3390/cancers3033189
- Iliina, O., & Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 18), 3203-3208. doi: 10.1242/jcs.036525
- Iozzo, R. V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 67, 609-652. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609
- Jain, M., Rivera, S., Monclus, E. A., Synenki, L., Zirk, A., Eisenbart, J., . . . Chandel, N. S. (2013). Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, 288(2), 770-777. doi: 10.1074/jbc.M112.431973
- Jain, R. K. (1990). Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 9(3), 253-266.
- Jancik, S., Drabek, J., Radzioch, D., & Hajdich, M. (2010). Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 150960. doi: 10.1155/2010/150960
- Jarnicki, A., Putoczki, T., & Ernst, M. (2010). Stat3: linking inflammation to epithelial cancer - more than a "gut" feeling? *Cell Div*, 5, 14. doi: 10.1186/1747-1028-5-14
- Jedezsko, C., Victor, B. C., Podgorski, I., & Sloane, B. F. (2009). Fibroblast hepatocyte growth factor promotes invasion of human mammary ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*, 69(23), 9148-9155. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1043
- Jiang, L., Gonda, T. A., Gamble, M. V., Salas, M., Seshan, V., Tu, S., . . . Tycko, B. (2008). Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Res*, 68(23), 9900-9908. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1319
- Jinka, R., Kapoor, R., Sistla, P. G., Raj, T. A., & Pande, G. (2012). Alterations in Cell-Extracellular Matrix Interactions during Progression of Cancers. *Int J Cell Biol*, 2012, 219196. doi: 10.1155/2012/219196
- Joeckel, T. E., & Lubbert, M. (2012). Clinical results with the DNA hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in patients with myelodysplastic syndromes: an update. *Semin Hematol*, 49(4), 330-341. doi: 10.1053/j.seminhematol.2012.08.001
- Joyce, J. A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 7(6), 513-520. doi: 10.1016/j.ccr.2005.05.024
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9(4), 239-252. doi: 10.1038/nrc2618
- Kagey, J. D., Kapoor-Vazirani, P., McCabe, M. T., Powell, D. R., & Vertino, P. M. (2010). Long-term stability of demethylation after transient exposure to 5-aza-2'-deoxycytidine correlates with sustained RNA polymerase II occupancy. *Mol Cancer Res*, 8(7), 1048-1059. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0189
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 422-433. doi: 10.1038/nrc1094
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428. doi: 10.1172/JCI39104

- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(5), 392-401. doi: 10.1038/nrc1877
- Kaminski, N., Allard, J. D., Pittet, J. F., Zuo, F., Griffiths, M. J., Morris, D., . . . Heller, R. A. (2000). Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1778-1783.
- Kano, M. R., Bae, Y., Iwata, C., Morishita, Y., Yashiro, M., Oka, M., . . . Miyazono, K. (2007). Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9), 3460-3465. doi: 10.1073/pnas.0611660104
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., . . . Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563. doi: 10.1038/nature06188
- Kay, R. R., Langridge, P., Traynor, D., & Hoeller, O. (2008). Changing directions in the study of chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(6), 455-463. doi: 10.1038/nrm2419
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*, 19(10), 1129-1155. doi: 10.1101/gad.1303605
- Kerker, S. P., & Restifo, N. P. (2012). Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res*, 72(13), 3125-3130. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4094
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., & Shuttleworth, C. A. (2002). Elastic fibres. *J Cell Sci*, 115(Pt 14), 2817-2828.
- Kikuchi, Y., Kashima, T. G., Nishiyama, T., Shimazu, K., Morishita, Y., Shimazaki, M., . . . Fukayama, M. (2008). Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J Histochem Cytochem*, 56(8), 753-764. doi: 10.1369/jhc.2008.951061
- Kim, T. Y., Bang, Y. J., & Robertson, K. D. (2006). Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics*, 1(1), 14-23.
- Kimura, H., & Shiota, K. (2003). Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J Biol Chem*, 278(7), 4806-4812. doi: 10.1074/jbc.M209923200
- Kinney, S. R., & Pradhan, S. (2011). Regulation of expression and activity of DNA (cytosine-5) methyltransferases in mammalian cells. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 101, 311-333. doi: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00009-3
- Kitadai, Y., Sasaki, T., Kuwai, T., Nakamura, T., Bucana, C. D., & Fidler, I. J. (2006). Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *Am J Pathol*, 169(6), 2054-2065. doi: 10.2353/ajpath.2006.060653
- Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol*, 229(2), 298-309. doi: 10.1002/path.4104
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472-479. doi: 10.1038/nature12750
- Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E. N., Mellody, K. T., Scheel, C., Ben-Porath, I., . . . Orimo, A. (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(46), 20009-20014. doi: 10.1073/pnas.1013805107
- Komatsu, Y., Waku, T., Iwasaki, N., Ono, W., Yamaguchi, C., & Yanagisawa, J. (2012). Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis. *BMC Med Genomics*, 5, 5. doi: 10.1186/1755-8794-5-5
- Kong, X., Horiguchi, N., Mori, M., & Gao, B. (2012). Cytokines and STATs in Liver Fibrosis. *Front Physiol*, 3, 69. doi: 10.3389/fphys.2012.00069
- Kong, Y., Cui, H., Ramkumar, C., & Zhang, H. (2011). Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res*, 2011, 963172. doi: 10.4061/2011/963172
- Koontongkaew, S. (2013). The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*, 4(1), 66-83. doi: 10.7150/jca.5112
- Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., . . . Yu, H. (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 11(12), 1314-1321. doi: 10.1038/nm1325
- Kraman, M., Bambrough, P. J., Arnold, J. N., Roberts, E. W., Magiera, L., Jones, J. O., . . . Fearon, D. T. (2010). Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science*, 330(6005), 827-830. doi: 10.1126/science.1195300
- Krohn, A., Song, Y. H., Muehlberg, F., Droll, L., Beckmann, C., & Alt, E. (2009). CXCR4 receptor positive spheroid forming cells are responsible for tumor invasion in vitro. *Cancer Lett*, 280(1), 65-71. doi: 10.1016/j.canlet.2009.02.005
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Adv Genet*, 70, 27-56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2
- Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P. H., Zhou, X. P., & Eng, C. (2002). Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet*, 32(3), 355-357. doi: 10.1038/ng1013

- Lafkas, D., Trimis, G., Papavassiliou, A. G., & Kiaris, H. (2008). P53 mutations in stromal fibroblasts sensitize tumors against chemotherapy. *Int J Cancer*, *123*(4), 967-971. doi: 10.1002/ijc.23546
- Lamar, J. M., Stern, P., Liu, H., Schindler, J. W., Jiang, Z. G., & Hynes, R. O. (2012). The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(37), E2441-2450. doi: 10.1073/pnas.1212021109
- Lammermann, T., & Sixt, M. (2009). Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(5), 636-644. doi: 10.1016/j.ceb.2009.05.003
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(3), 178-196. doi: 10.1038/nrm3758
- Leask, A., & Abraham, D. J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*, *18*(7), 816-827. doi: 10.1096/fj.03-1273rev
- LeBeau, A. M., Brennen, W. N., Aggarwal, S., & Denmeade, S. R. (2009). Targeting the cancer stroma with a fibroblast activation protein-activated promelittin protoxin. *Mol Cancer Ther*, *8*(5), 1378-1386. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1170
- Lecaudey, V., & Gilmour, D. (2006). Organizing moving groups during morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, *18*(1), 102-107. doi: 10.1016/j.ceb.2005.12.001
- Lederle, W., Hartenstein, B., Meides, A., Kunzelmann, H., Werb, Z., Angel, P., & Mueller, M. M. (2010). MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis*, *31*(7), 1175-1184. doi: 10.1093/carcin/bgp248
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M., Yang, C., Liu, Y., Herrmann, A., . . . Yu, H. (2010). STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat Med*, *16*(12), 1421-1428. doi: 10.1038/nm.2250
- Lee, H., Zhang, P., Herrmann, A., Yang, C., Xin, H., Wang, Z., . . . Yu, H. (2012). Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(20), 7765-7769. doi: 10.1073/pnas.1205132109
- Lee, J. J., Perera, R. M., Wang, H., Wu, D. C., Liu, X. S., Han, S., . . . Beachy, P. A. (2014). Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(30), E3091-3100. doi: 10.1073/pnas.1411679111
- Leitinger, B., & Hohenester, E. (2007). Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol*, *26*(3), 146-155. doi: 10.1016/j.matbio.2006.10.007
- Lerner, I., Hermano, E., Zcharia, E., Rodkin, D., Bulvik, R., Doviner, V., . . . Elkin, M. (2011). Heparanase powers a chronic inflammatory circuit that promotes colitis-associated tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*, *121*(5), 1709-1721. doi: 10.1172/JCI43792
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., . . . Weaver, V. M. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, *139*(5), 891-906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027
- Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, *9*(10), 749-758. doi: 10.1038/nrc2723
- Levy, D. E., & Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(9), 651-662. doi: 10.1038/nrm909
- Liao, C. P., Adisetyo, H., Liang, M., & Roy-Burman, P. (2010). Cancer-associated fibroblasts enhance the gland-forming capability of prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, *70*(18), 7294-7303. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3982
- Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., & Reisfeld, R. A. (2009). Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One*, *4*(11), e7965. doi: 10.1371/journal.pone.0007965
- Liggett, W. H., Jr., & Sidransky, D. (1998). Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*, *16*(3), 1197-1206.
- Liu, J., Liao, S., Diop-Frimpong, B., Chen, W., Goel, S., Naxerova, K., . . . Xu, L. (2012). TGF-beta blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(41), 16618-16623. doi: 10.1073/pnas.1117610109
- Liu, Y., Liu, H., Meyer, C., Li, J., Nadalin, S., Konigsrainer, A., . . . ten Dijke, P. (2013). Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-mediated connective tissue growth factor (CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation. *J Biol Chem*, *288*(42), 30708-30719. doi: 10.1074/jbc.M113.478685
- Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., & Bissell, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, *139*(7), 1861-1872.
- Loeffler, M., Kruger, J. A., Niethammer, A. G., & Reisfeld, R. A. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest*, *116*(7), 1955-1962. doi: 10.1172/JCI26532
- Lorusso, G., & Ruegg, C. (2008). The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*, *130*(6), 1091-1103. doi: 10.1007/s00418-008-0530-8

- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, *196*(4), 395-406. doi: 10.1083/jcb.201102147
- Lutzny, G., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Finch, A. J., . . . Ringshausen, I. (2013). Protein kinase c-beta-dependent activation of NF-kappaB in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell*, *23*(1), 77-92. doi: 10.1016/j.ccr.2012.12.003
- Ma, J., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Tan, A. L., & Cao, X. (2003). A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation. *J Biol Chem*, *278*(31), 29252-29260. doi: 10.1074/jbc.M304196200
- Madar, S., Brosh, R., Buganim, Y., Ezra, O., Goldstein, I., Solomon, H., . . . Rotter, V. (2009). Modulated expression of WFDC1 during carcinogenesis and cellular senescence. *Carcinogenesis*, *30*(1), 20-27. doi: 10.1093/carcin/bgn232
- Madsen, C. D., & Sahai, E. (2010). Cancer dissemination--lessons from leukocytes. *Dev Cell*, *19*(1), 13-26. doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.013
- Maeshima, A. M., Niki, T., Maeshima, A., Yamada, T., Kondo, H., & Matsuno, Y. (2002). Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma. *Cancer*, *95*(12), 2546-2554. doi: 10.1002/cncr.11006
- Malanchi, I., & Huelsken, J. (2009). Cancer stem cells: never Wnt away from the niche. *Curr Opin Oncol*, *21*(1), 41-46. doi: 10.1097/CCO.0b013e32831d1faf
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., . . . Huelsken, J. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*, *452*(7187), 650-653. doi: 10.1038/nature06835
- Malanchi, I., Santamaria-Martinez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H. A., Delaloye, J. F., & Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, *481*(7379), 85-89. doi: 10.1038/nature10694
- Mann, J., Oakley, F., Akiboye, F., Elsharkawy, A., Thorne, A. W., & Mann, D. A. (2007). Regulation of myofibroblast transdifferentiation by DNA methylation and MeCP2: implications for wound healing and fibrogenesis. *Cell Death Differ*, *14*(2), 275-285. doi: 10.1038/sj.cdd.4401979
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, *454*(7203), 436-444. doi: 10.1038/nature07205
- Marsh, T., Pietras, K., & McAllister, S. S. (2013). Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, *1832*(7), 1070-1078. doi: 10.1016/j.bbdis.2012.10.013
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, *276*(5309), 75-81.
- Martin-Belmonte, F., & Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer*, *12*(1), 23-38. doi: 10.1038/nrc3169
- Marusyk, A., Almendro, V., & Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer*, *12*(5), 323-334. doi: 10.1038/nrc3261
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*, *134*(2), 215-230. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001
- McKenzie, R. C., & Szepietowski, J. (2004). Cutaneous leukemia inhibitory factor and its potential role in the development of skin tumors. *Dermatol Surg*, *30*(2 Pt 2), 279-290.
- Meads, M. B., Gatenby, R. A., & Dalton, W. S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer*, *9*(9), 665-674. doi: 10.1038/nrc2714
- Medema, J. P., & Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, *474*(7351), 318-326. doi: 10.1038/nature10212
- Meierjohann, S., Hufnagel, A., Wende, E., Kleinschmidt, M. A., Wolf, K., Friedl, P., . . . Scharl, M. (2010). MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation. *Mol Cancer*, *9*, 201. doi: 10.1186/1476-4598-9-201
- Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., Grivennikov, S. I., Paik, Y., Scholten, D., . . . Kisseleva, T. (2012). Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*, *143*(3), 765-776 e761-763. doi: 10.1053/j.gastro.2012.05.049
- Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, *6*(12), 924-935. doi: 10.1038/nrc2013
- Meshel, A. S., Wei, Q., Adelstein, R. S., & Sheetz, M. P. (2005). Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. *Nat Cell Biol*, *7*(2), 157-164. doi: 10.1038/ncb1216
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *15*(2), 117-134. doi: 10.1007/s10911-010-9178-9
- Mitra, S. K., & Schlaepfer, D. D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*, *18*(5), 516-523. doi: 10.1016/j.ceb.2006.08.011
- Mordasky Markell, L., Perez-Lorenzo, R., Masiuk, K. E., Kennett, M. J., & Glick, A. B. (2010). Use of a TGFbeta type I receptor inhibitor in mouse skin carcinogenesis reveals a dual role for TGFbeta signaling in tumor promotion and progression. *Carcinogenesis*, *31*(12), 2127-2135. doi: 10.1093/carcin/bgq191

- Moulin, V., Larochele, S., Langlois, C., Thibault, I., Lopez-Valle, C. A., & Roy, M. (2004). Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inducers. *J Cell Physiol*, *198*(3), 350-358. doi: 10.1002/jcp.10415
- Mouw, J. K., Yui, Y., Damiano, L., Bainer, R. O., Lakins, J. N., Acerbi, I., . . . Weaver, V. M. (2014). Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. *Nat Med*, *20*(4), 360-367. doi: 10.1038/nm.3497
- Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, *4*(11), 839-849. doi: 10.1038/nrc1477
- Muerkoster, S., Wegehenkel, K., Arlt, A., Witt, M., Sipos, B., Kruse, M. L., . . . Schafer, H. (2004). Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res*, *64*(4), 1331-1337.
- Muromoto, R., Ikeda, O., Okabe, K., Togi, S., Kamitani, S., Fujimuro, M., . . . Matsuda, T. (2009). Epstein-Barr virus-derived EBNA2 regulates STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, *378*(3), 439-443. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.053
- Myllyharju, J., & Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*, *20*(1), 33-43. doi: 10.1016/j.tig.2003.11.004
- Naber, H. P., ten Dijke, P., & Pardali, E. (2008). Role of TGF-beta in the tumor stroma. *Curr Cancer Drug Targets*, *8*(6), 466-472.
- Nakashima, Y., Yoshinaga, K., Kitao, H., Ando, K., Kimura, Y., Saeki, H., . . . Maehara, Y. (2013). Podoplanin is expressed at the invasive front of esophageal squamous cell carcinomas and is involved in collective cell invasion. *Cancer Sci*, *104*(12), 1718-1725. doi: 10.1111/cas.12286
- Narra, K., Mullins, S. R., Lee, H. O., Strzemkowski-Brun, B., Magalong, K., Christiansen, V. J., . . . Cheng, J. D. (2007). Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, *6*(11), 1691-1699.
- Netti, P. A., Berk, D. A., Swartz, M. A., Grodzinsky, A. J., & Jain, R. K. (2000). Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res*, *60*(9), 2497-2503.
- Ng, J. M., & Curran, T. (2011). The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(7), 493-501. doi: 10.1038/nrc3079
- Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., & Eaves, C. J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*, *12*(2), 133-143. doi: 10.1038/nrc3184
- O'Connell, J. T., Sugimoto, H., Cooke, V. G., MacDonald, B. A., Mehta, A. I., LeBleu, V. S., . . . Kalluri, R. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(38), 16002-16007. doi: 10.1073/pnas.1109493108
- Oka, T., Ouchida, M., Koyama, M., Ogama, Y., Takada, S., Nakatani, Y., . . . Akagi, T. (2002). Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res*, *62*(22), 6390-6394.
- Olive, K. P., Jacobetz, M. A., Davidson, C. J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., . . . Tuveson, D. A. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, *324*(5933), 1457-1461. doi: 10.1126/science.1171362
- Olumi, A. F., Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Carroll, P. R., Tlsty, T. D., & Cunha, G. R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, *59*(19), 5002-5011.
- Ooi, S. K., O'Donnell, A. H., & Bestor, T. H. (2009). Mammalian cytosine methylation at a glance. *J Cell Sci*, *122*(Pt 16), 2787-2791. doi: 10.1242/jcs.015123
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., . . . Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, *121*(3), 335-348. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034
- Orimo, A., & Weinberg, R. A. (2007). Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer Biol Ther*, *6*(4), 618-619.
- Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X. H., Vanharanta, S., Tavazoie, S. F., Morris, P. G., . . . Massague, J. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med*, *17*(7), 867-874. doi: 10.1038/nm.2379
- Oskarsson, T., & Massague, J. (2012). Extracellular matrix players in metastatic niches. *EMBO J*, *31*(2), 254-256. doi: 10.1038/emboj.2011.469
- Ostermann, E., Garin-Chesa, P., Heider, K. H., Kalat, M., Lamche, H., Puri, C., . . . Adolf, G. R. (2008). Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts. *Clin Cancer Res*, *14*(14), 4584-4592. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5211
- Ostman, A. (2012). The tumor microenvironment controls drug sensitivity. *Nat Med*, *18*(9), 1332-1334. doi: 10.1038/nm.2938
- Ostman, A., & Augsten, M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*, *19*(1), 67-73. doi: 10.1016/j.gde.2009.01.003

- Ostman, A., & Heldin, C. H. (2007). PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv Cancer Res*, 97, 247-274. doi: 10.1016/S0065-230X(06)97011-0
- Ota, K., Quint, P., Weivoda, M. M., Ruan, M., Pederson, L., Westendorf, J. J., . . . Oursler, M. J. (2013). Transforming growth factor beta 1 induces CXCL16 and leukemia inhibitory factor expression in osteoclasts to modulate migration of osteoblast progenitors. *Bone*, 57(1), 68-75. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.023
- Ottaviano, A. J., Sun, L., Ananthanarayanan, V., & Munshi, H. G. (2006). Extracellular matrix-mediated membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression in pancreatic ductal cells is regulated by transforming growth factor-beta1. *Cancer Res*, 66(14), 7032-7040. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4421
- Ozdemir, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J. L., Zheng, X., Wu, C. C., Simpson, T. R., . . . Kalluri, R. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 25(6), 719-734. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.005
- Pankova, K., Rosel, D., Novotny, M., & Brabek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci*, 67(1), 63-71. doi: 10.1007/s00018-009-0132-1
- Pantel, K., & Brakenhoff, R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4(6), 448-456. doi: 10.1038/nrc1370
- Paquet-Fifield, S., Schluter, H., Li, A., Aitken, T., Gangatirkar, P., Blashki, D., . . . Kaur, P. (2009). A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *J Clin Invest*, 119(9), 2795-2806. doi: 10.1172/JCI38535
- Parikh, J. G., Kulkarni, A., & Johns, C. (2014). alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 7(2), 573-575. doi: 10.3892/ol.2013.1720
- Parish, C. R. (2006). The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 6(9), 633-643. doi: 10.1038/nri1918
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., & Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(9), 633-643. doi: 10.1038/nrm2957
- Pasparakis, M. (2009). Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*, 9(11), 778-788. doi: 10.1038/nri2655
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., . . . Weaver, V. M. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3), 241-254. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.010
- Patocs, A., Zhang, L., Xu, Y., Weber, F., Caldes, T., Mutter, G. L., . . . Eng, C. (2007). Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med*, 357(25), 2543-2551. doi: 10.1056/NEJMoa071825
- Paulsson, M. (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 27(1-2), 93-127. doi: 10.3109/10409239209082560
- Peglion, F., Lense, F., & Etienne-Manneville, S. (2014). Adherens junction treadmill during collective migration. *Nat Cell Biol*, 16(7), 639-651. doi: 10.1038/ncb2985
- Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., . . . Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 18(6), 883-891. doi: 10.1038/nm.2753
- Penuelas, S., Anido, J., Prieto-Sanchez, R. M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., . . . Seoane, J. (2009). TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell*, 15(4), 315-327. doi: 10.1016/j.ccr.2009.02.011
- Perez-Losada, J., & Balmain, A. (2003). Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 434-443. doi: 10.1038/nrc1095
- Petersen, O. W., Nielsen, H. L., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Rank, F., Niebuhr, E., . . . Ronnov-Jessen, L. (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol*, 162(2), 391-402. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63834-5
- Pickup, M. W., Laklai, H., Acerbi, I., Owens, P., Gorska, A. E., Chytil, A., . . . Moses, H. L. (2013). Stromally derived lysyl oxidase promotes metastasis of transforming growth factor-beta-deficient mouse mammary carcinomas. *Cancer Res*, 73(17), 5336-5346. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0012
- Pietras, K., & Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*, 316(8), 1324-1331. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.045
- Pietras, K., Ostman, A., Sjoquist, M., Buchdunger, E., Reed, R. K., Heldin, C. H., & Rubin, K. (2001). Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res*, 61(7), 2929-2934.
- Pietras, K., Pahler, J., Bergers, G., & Hanahan, D. (2008). Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med*, 5(1), e19. doi: 10.1371/journal.pmed.0050019
- Pietras, K., Rubin, K., Sjoblom, T., Buchdunger, E., Sjoquist, M., Heldin, C. H., & Ostman, A. (2002). Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res*, 62(19), 5476-5484.
- Pietras, K., Sjoblom, T., Rubin, K., Heldin, C. H., & Ostman, A. (2003). PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell*, 3(5), 439-443.

- Place, A. E., Jin Huh, S., & Polyak, K. (2011). The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res*, *13*(6), 227. doi: 10.1186/bcr2912
- Polyak, K., Haviv, I., & Campbell, I. G. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*, *25*(1), 30-38. doi: 10.1016/j.tig.2008.10.012
- Prebet, T., Gore, S. D., Esterni, B., Gardin, C., Itzykson, R., Thepot, S., . . . Vey, N. (2011). Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *J Clin Oncol*, *29*(24), 3322-3327. doi: 10.1200/JCO.2011.35.8135
- Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., & Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, *21*(3), 418-429. doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.007
- Provenzano, P. P., Eliceiri, K. W., Campbell, J. M., Inman, D. R., White, J. G., & Keely, P. J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med*, *4*(1), 38. doi: 10.1186/1741-7015-4-38
- Psaila, B., & Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*, *9*(4), 285-293. doi: 10.1038/nrc2621
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, *141*(1), 39-51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014
- Qian, L. W., Mizumoto, K., Maehara, N., Ohuchida, K., Inadome, N., Saimura, M., . . . Tanaka, M. (2003). Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production. *Cancer Lett*, *190*(1), 105-112.
- Qiu, W., Hu, M., Sridhar, A., Opeskin, K., Fox, S., Shipitsin, M., . . . Campbell, I. G. (2008). No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat Genet*, *40*(5), 650-655. doi: 10.1038/ng.117
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, *19*(11), 1423-1437. doi: 10.1038/nm.3394
- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., . . . Wang, T. C. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, *19*(2), 257-272. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.020
- Radisky, D. C., Kenny, P. A., & Bissell, M. J. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem*, *101*(4), 830-839. doi: 10.1002/jcb.21186
- Rajkumar, V. S., Howell, K., Csiszar, K., Denton, C. P., Black, C. M., & Abraham, D. J. (2005). Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther*, *7*(5), R1113-1123. doi: 10.1186/ar1790
- Rajkumar, V. S., Shiwen, X., Bostrom, M., Leoni, P., Muddle, J., Ivarsson, M., . . . Abraham, D. J. (2006). Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. *Am J Pathol*, *169*(6), 2254-2265.
- Rane, S. G., & Reddy, E. P. (2000). Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*, *19*(49), 5662-5679. doi: 10.1038/sj.onc.1203925
- Raz, Y., & Erez, N. (2013). An inflammatory vicious cycle: Fibroblasts and immune cell recruitment in cancer. *Exp Cell Res*. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.03.022
- Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., . . . Zucman-Rossi, J. (2009). Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*, *457*(7226), 200-204. doi: 10.1038/nature07475
- Rhee, S., & Grinnell, F. (2007). Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, *59*(13), 1299-1305. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.006
- Rhim, A. D., Oberstein, P. E., Thomas, D. H., Mirek, E. T., Palermo, C. F., Sastra, S. A., . . . Stanger, B. Z. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, *25*(6), 735-747. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.021
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., . . . Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, *302*(5651), 1704-1709. doi: 10.1126/science.1092053
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, *6*(8), 597-610. doi: 10.1038/nrg1655
- Rodemann, H. P., & Muller, G. A. (1991). Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis*, *17*(6), 684-686.
- Rodriguez-Canales, J., Hanson, J. C., Tangrea, M. A., Erickson, H. S., Albert, P. S., Wallis, B. S., . . . Chuaqui, R. F. (2007). Identification of a unique epigenetic sub-microenvironment in prostate cancer. *J Pathol*, *211*(4), 410-419. doi: 10.1002/path.2133

- Rogers, R. S., Horvath, C. M., & Matunis, M. J. (2003). SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem*, *278*(32), 30091-30097. doi: 10.1074/jbc.M301344200
- Ronnov-Jessen, L., & Petersen, O. W. (1993). Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest*, *68*(6), 696-707.
- Rorth, P. (2007). Collective guidance of collective cell migration. *Trends Cell Biol*, *17*(12), 575-579. doi: 10.1016/j.tcb.2007.09.007
- Rorth, P. (2012). Fellow travellers: emergent properties of collective cell migration. *EMBO Rep*, *13*(11), 984-991. doi: 10.1038/embor.2012.149
- Rosenbloom, J., Castro, S. V., & Jimenez, S. A. (2010). Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med*, *152*(3), 159-166. doi: 10.7326/0003-4819-152-3-201002020-00007
- Rosow, D. E., Liss, A. S., Strobel, O., Fritz, S., Bausch, D., Valsangkar, N. P., . . . Thayer, S. P. (2012). Sonic Hedgehog in pancreatic cancer: from bench to bedside, then back to the bench. *Surgery*, *152*(3 Suppl 1), S19-32. doi: 10.1016/j.surg.2012.05.030
- Ruan, M., Pederson, L., Bradley, E. W., Bamberger, A. M., & Oursler, M. J. (2010). Transforming growth factor-beta coordinately induces suppressor of cytokine signaling 3 and leukemia inhibitory factor to suppress osteoclast apoptosis. *Endocrinology*, *151*(4), 1713-1722. doi: 10.1210/en.2009-0813
- Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., . . . Weiss, S. J. (2004). Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol*, *167*(4), 769-781. doi: 10.1083/jcb.200408028
- Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev*, *15*(1), 87-96. doi: 10.1016/j.gde.2004.12.002
- Sahai, E., & Marshall, C. J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*, *5*(8), 711-719. doi: 10.1038/ncb1019
- Saharinen, P., Takaluoma, K., & Silvennoinen, O. (2000). Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol*, *20*(10), 3387-3395.
- Samuel, M. S., Lopez, J. I., McGhee, E. J., Croft, D. R., Strachan, D., Timpson, P., . . . Olson, M. F. (2011). Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and beta-catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell*, *19*(6), 776-791. doi: 10.1016/j.ccr.2011.05.008
- Sanders, Y. Y., Ambalavanan, N., Halloran, B., Zhang, X., Liu, H., Crossman, D. K., . . . Hagood, J. S. (2012). Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, *186*(6), 525-535. doi: 10.1164/rccm.201201-0077OC
- Sanders, Y. Y., Pardo, A., Selman, M., Nuovo, G. J., Tollefsbol, T. O., Siegal, G. P., & Hagood, J. S. (2008). Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *39*(5), 610-618. doi: 10.1165/rcmb.2007-0322OC
- Sandoval, P., Jimenez-Heffernan, J. A., Rynne-Vidal, A., Perez-Lozano, M. L., Gilsanz, A., Ruiz-Carpio, V., . . . Lopez-Cabrera, M. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *J Pathol*, *231*(4), 517-531. doi: 10.1002/path.4281
- Sano, S., Chan, K. S., Kira, M., Kataoka, K., Takagi, S., Tarutani, M., . . . DiGiovanni, J. (2005). Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation. *Cancer Res*, *65*(13), 5720-5729. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4359
- Santos, A. M., Jung, J., Aziz, N., Kissil, J. L., & Pure, E. (2009). Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest*, *119*(12), 3613-3625. doi: 10.1172/JCI38988
- Sanz-Moreno, V., Gaggioli, C., Yeo, M., Albregues, J., Wallberg, F., Viros, A., . . . Marshall, C. J. (2011). ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell*, *20*(2), 229-245. doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.018
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., & Sheetz, M. P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, *127*(5), 1015-1026. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.044
- Schaefer, L., & Schaefer, R. M. (2010). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*, *339*(1), 237-246. doi: 10.1007/s00441-009-0821-y
- Schafer, M., & Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(8), 628-638. doi: 10.1038/nrm2455
- Schafer, M., & Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(8), 628-638. doi: 10.1038/nrm2455
- Schauer, I. G., Sood, A. K., Mok, S., & Liu, J. (2011). Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*, *13*(5), 393-405.

- Schmidt, S., & Friedl, P. (2010). Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res*, 339(1), 83-92. doi: 10.1007/s00441-009-0892-9
- Schmierer, B., & Hill, C. S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(12), 970-982. doi: 10.1038/nrm2297
- Scott, A. M., Wiseman, G., Welt, S., Adjei, A., Lee, F. T., Hopkins, W., . . . Old, L. J. (2003). A Phase I dose-escalation study of sibroutuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin Cancer Res*, 9(5), 1639-1647.
- Scott, R. W., Hooper, S., Crighton, D., Li, A., Konig, I., Munro, J., . . . Olson, M. F. (2010). LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *J Cell Biol*, 191(1), 169-185. doi: 10.1083/jcb.201002041
- Serres, E., Debarbieux, F., Stanchi, F., Maggiorella, L., Grall, D., Turchi, L., . . . Van Obberghen-Schilling, E. (2014). Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene*, 33(26), 3451-3462. doi: 10.1038/onc.2013.305
- Sethi, N., & Kang, Y. (2011). Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer*, 11(10), 735-748. doi: 10.1038/nrc3125
- Shain, K. H., Yarde, D. N., Meads, M. B., Huang, M., Jove, R., Hazlehurst, L. A., & Dalton, W. S. (2009). Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res*, 69(3), 1009-1015. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2419
- Shao, Z. M., Nguyen, M., & Barsky, S. H. (2000). Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene*, 19(38), 4337-4345. doi: 10.1038/sj.onc.1203785
- Shaw, T. J., & Martin, P. (2009). Wound repair at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 18), 3209-3213. doi: 10.1242/jcs.031187
- Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, 19(21), 2638-2644. doi: 10.1038/sj.onc.1203522
- Shuai, K., & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 3(11), 900-911. doi: 10.1038/nri1226
- Siewert, E., Muller-Esterl, W., Starr, R., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (1999). Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *Eur J Biochem*, 265(1), 251-257.
- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., & Bissell, M. J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*, 128(16), 3117-3131.
- Skobe, M., & Fusenig, N. E. (1998). Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3), 1050-1055.
- Small, E. M. (2012). The actin-MRTF-SRF gene regulatory axis and myofibroblast differentiation. *J Cardiovasc Transl Res*, 5(6), 794-804. doi: 10.1007/s12265-012-9397-0
- Smith, H. A., & Kang, Y. (2013). The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med (Berl)*, 91(4), 411-429. doi: 10.1007/s00109-013-1021-5
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 14(3), 204-220. doi: 10.1038/nrg3354
- Sounni, N. E., Dehne, K., van Kempen, L., Egeblad, M., Affara, N. I., Cuevas, I., . . . Coussens, L. M. (2010). Stromal regulation of vessel stability by MMP14 and TGFbeta. *Dis Model Mech*, 3(5-6), 317-332. doi: 10.1242/dmm.003863
- Spano, D., & Zollo, M. (2012). Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin Exp Metastasis*, 29(4), 381-395. doi: 10.1007/s10585-012-9457-5
- Steed, D. L. (1997). The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am*, 77(3), 575-586.
- Stramer, B. M., Mori, R., & Martin, P. (2007). The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol*, 127(5), 1009-1017. doi: 10.1038/sj.jid.5700811
- Strand, M. F., Wilson, S. R., Dembinski, J. L., Holsworth, D. D., Khvat, A., Okun, I., . . . Krauss, S. (2011). A novel synthetic smoothed antagonist transiently inhibits pancreatic adenocarcinoma xenografts in a mouse model. *PLoS One*, 6(6), e19904. doi: 10.1371/journal.pone.0019904
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z. R., Du, J., . . . Golub, T. R. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 487(7408), 500-504. doi: 10.1038/nature11183
- Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W., & Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*, 5(12), 1640-1646.
- Sumida, T., Kitadai, Y., Shinagawa, K., Tanaka, M., Kodama, M., Ohnishi, M., . . . Chayama, K. (2011). Anti-stromal therapy with imatinib inhibits growth and metastasis of gastric carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Int J Cancer*, 128(9), 2050-2062. doi: 10.1002/ijc.25812

- Sun, S., & Steinberg, B. M. (2002). PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. *J Gen Virol*, *83*(Pt 7), 1651-1658.
- Sun, T. T., Eichner, R., Nelson, W. G., Tseng, S. C., Weiss, R. A., Jarvinen, M., & Woodcock-Mitchell, J. (1983). Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol*, *81*(1 Suppl), 109s-115s.
- Sun, Y., Campisi, J., Higano, C., Beer, T. M., Porter, P., Coleman, I., . . . Nelson, P. S. (2012). Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med*, *18*(9), 1359-1368. doi: 10.1038/nm.2890
- Swift, J., Ivanovska, I. L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P. C., Pinter, J., . . . Discher, D. E. (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*, *341*(6149), 1240104. doi: 10.1126/science.1240104
- Takenaka, K., Gemma, A., Yoshimura, A., Hosoya, Y., Nara, M., Hosomi, Y., . . . Kudoh, S. (2009). Reduced transcription of the Smad4 gene during pulmonary carcinogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Med Rep*, *2*(1), 73-80. doi: 10.3892/mmr_00000064
- Tamm, C., Bower, N., & Anneren, C. (2011). Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J Cell Sci*, *124*(Pt 7), 1136-1144. doi: 10.1242/jcs.075796
- Tampe, B., Tampe, D., Muller, C. A., Sugimoto, H., LeBleu, V., Xu, X., . . . Zeisberg, M. (2014). Tet3-mediated hydroxymethylation of epigenetically silenced genes contributes to bone morphogenic protein 7-induced reversal of kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, *25*(5), 905-912. doi: 10.1681/ASN.2013070723
- Tarin, D., & Croft, C. B. (1969). Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. *J Anat*, *105*(Pt 1), 189-190.
- Tejada, M. L., Yu, L., Dong, J., Jung, K., Meng, G., Peale, F. V., . . . Ferrara, N. (2006). Tumor-driven paracrine platelet-derived growth factor receptor alpha signaling is a key determinant of stromal cell recruitment in a model of human lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, *12*(9), 2676-2688. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1770
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., & Mayor, R. (2010). Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev Cell*, *19*(1), 39-53. doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.012
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., & Mayor, R. (2010). Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev Cell*, *19*(1), 39-53. doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.012
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(2), 131-142. doi: 10.1038/nrm1835
- Tian, H., Callahan, C. A., DuPree, K. J., Darbonne, W. C., Ahn, C. P., Scales, S. J., & de Sauvage, F. J. (2009). Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(11), 4254-4259. doi: 10.1073/pnas.0813203106
- Togo, S., Polanska, U. M., Horimoto, Y., & Orimo, A. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers (Basel)*, *5*(1), 149-169. doi: 10.3390/cancers5010149
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(5), 349-363. doi: 10.1038/nrm809
- Toriseva, M., & Kahari, V. M. (2009). Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci*, *66*(2), 203-224. doi: 10.1007/s00018-008-8388-4
- Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D. J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., & Matsumura, F. (2004). Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol*, *164*(3), 427-439. doi: 10.1083/jcb.200306172
- Toullec, A., Gerald, D., Despouy, G., Bourachot, B., Cardon, M., Lefort, S., . . . Mechta-Grigoriou, F. (2010). Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med*, *2*(6), 211-230. doi: 10.1002/emmm.201000073
- Trimboli, A. J., Cantemir-Stone, C. Z., Li, F., Wallace, J. A., Merchant, A., Creasap, N., . . . Leone, G. (2009). Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature*, *461*(7267), 1084-1091. doi: 10.1038/nature08486
- Tsuyada, A., Chow, A., Wu, J., Somlo, G., Chu, P., Loera, S., . . . Wang, S. E. (2012). CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res*, *72*(11), 2768-2779. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3567
- Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R. P., & Jove, R. (1998). Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol*, *18*(5), 2545-2552.
- Tuxhorn, J. A., McAlhany, S. J., Yang, F., Dang, T. D., & Rowley, D. R. (2002). Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res*, *62*(21), 6021-6025.
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, *147*(2), 275-292. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024
- Vermeulen, L., De Sousa, E. M. F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., . . . Medema, J. P. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, *12*(5), 468-476. doi: 10.1038/ncb2048

- Vukovic, V., & Tannock, I. F. (1997). Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *Br J Cancer*, *75*(8), 1167-1172.
- Walter, K., Omura, N., Hong, S. M., Griffith, M., & Goggins, M. (2008). Pancreatic cancer associated fibroblasts display normal allelotypes. *Cancer Biol Ther*, *7*(6), 882-888.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., . . . Yu, H. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, *10*(1), 48-54. doi: 10.1038/nm976
- Wang, W., Li, Q., Yamada, T., Matsumoto, K., Matsumoto, I., Oda, M., . . . Yano, S. (2009). Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*, *15*(21), 6630-6638. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1001
- Wang, Z., & Ouyang, G. (2012). Periostin: a bridge between cancer stem cells and their metastatic niche. *Cell Stem Cell*, *10*(2), 111-112. doi: 10.1016/j.stem.2012.01.002
- Ward, A. C., Touw, I., & Yoshimura, A. (2000). The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, *95*(1), 19-29.
- Wartenberg, M., Ling, F. C., Muschen, M., Klein, F., Acker, H., Gassmann, M., . . . Sauer, H. (2003). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J*, *17*(3), 503-505. doi: 10.1096/fj.02-0358fje
- Webber, J., Steadman, R., Mason, M. D., Tabi, Z., & Clayton, A. (2010). Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res*, *70*(23), 9621-9630. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1722
- Webber, J. P., Spary, L. K., Sanders, A. J., Chowdhury, R., Jiang, W. G., Steadman, R., . . . Clayton, A. (2014). Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2013.560
- Weber, F., Xu, Y., Zhang, L., Patocs, A., Shen, L., Platzer, P., & Eng, C. (2007). Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA*, *297*(2), 187-195. doi: 10.1001/jama.297.2.187
- Weigelt, B., & Bissell, M. J. (2008). Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin Cancer Biol*, *18*(5), 311-321. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.013
- Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, *17*(11), 1359-1370. doi: 10.1038/nm.2537
- Wen, Z., Zhong, Z., & Darnell, J. E., Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, *82*(2), 241-250.
- Werb, Z., Ashkenas, J., MacAuley, A., & Wiesen, J. F. (1996). Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res*, *29*(9), 1087-1097.
- Wicki, A., Lehenbre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., & Christofori, G. (2006). Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*, *9*(4), 261-272. doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.010
- Wilson, T. R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., . . . Settleman, J. (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*, *487*(7408), 505-509. doi: 10.1038/nature11249
- Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J., & Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol*, *179*(6), 1311-1323. doi: 10.1083/jcb.200704042
- Wiseman, B. S., & Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*, *296*(5570), 1046-1049. doi: 10.1126/science.1067431
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., . . . Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, *160*(2), 267-277. doi: 10.1083/jcb.200209006
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., . . . Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, *160*(2), 267-277. doi: 10.1083/jcb.200209006
- Wolf, K., Wu, Y. I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., . . . Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*, *9*(8), 893-904. doi: 10.1038/ncb1616
- Wong, C. M., Wong, C. C., Ng, Y. L., Au, S. L., Ko, F. C., & Ng, I. O. (2011). Transcriptional repressive H3K9 and H3K27 methylations contribute to DNMT1-mediated DNA methylation recovery. *PLoS One*, *6*(2), e16702. doi: 10.1371/journal.pone.0016702
- Worthley, D. L., Giraud, A. S., & Wang, T. C. (2010). Stromal fibroblasts in digestive cancer. *Cancer Microenviron*, *3*(1), 117-125. doi: 10.1007/s12307-009-0033-8
- Wu, M. H., Hong, H. C., Hong, T. M., Chiang, W. F., Jin, Y. T., & Chen, Y. L. (2011). Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. *Clin Cancer Res*, *17*(6), 1306-1316. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1824

- Wu, S., Rhee, K. J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H. R., . . . Sears, C. L. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*, *15*(9), 1016-1022. doi: 10.1038/nm.2015
- Wyckoff, J. B., Pinner, S. E., Gschmeissner, S., Condeelis, J. S., & Sahai, E. (2006). ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol*, *16*(15), 1515-1523. doi: 10.1016/j.cub.2006.05.065
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, *214*(2), 199-210. doi: 10.1002/path.2277
- Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*, *18*(7), 1028-1040. doi: 10.1038/nm.2807
- Xian, X., Gopal, S., & Couchman, J. R. (2010). Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*, *339*(1), 31-46. doi: 10.1007/s00441-009-0829-3
- Xie, T. X., Huang, F. J., Aldape, K. D., Kang, S. H., Liu, M., Gershenwald, J. E., . . . Huang, S. (2006). Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res*, *66*(6), 3188-3196. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2674
- Xouri, G., & Christian, S. (2010). Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Semin Cell Dev Biol*, *21*(1), 40-46. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.11.017
- Xu, D., & Qu, C. K. (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci*, *13*, 4925-4932.
- Xu, X., Sun, Y. L., & Hoey, T. (1996). Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*, *273*(5276), 794-797.
- Yang, E., Henriksen, M. A., Schaefer, O., Zakharova, N., & Darnell, J. E., Jr. (2002). Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. *J Biol Chem*, *277*(16), 13455-13462. doi: 10.1074/jbc.M112038200
- Yang, L., Chang, N., Liu, X., Han, Z., Zhu, T., Li, C., . . . Li, L. (2012). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor-beta1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis. *Am J Pathol*, *181*(1), 85-97. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.014
- Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., . . . de Sauvage, F. J. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, *455*(7211), 406-410. doi: 10.1038/nature07275
- Yeh, T. C., Dondi, E., Uze, G., & Pellegrini, S. (2000). A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(16), 8991-8996. doi: 10.1073/pnas.160130297
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, *28*(1-2), 15-33. doi: 10.1007/s10555-008-9169-0
- Yu, C. L., Meyer, D. J., Campbell, G. S., Larner, A. C., Carter-Su, C., Schwartz, J., & Jove, R. (1995). Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*, *269*(5220), 81-83.
- Yu, H., & Jove, R. (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*, *4*(2), 97-105. doi: 10.1038/nrc1275
- Yu, H., Kortylewski, M., & Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, *7*(1), 41-51. doi: 10.1038/nri1995
- Yu, H., Mouw, J. K., & Weaver, V. M. (2011). Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends Cell Biol*, *21*(1), 47-56. doi: 10.1016/j.tcb.2010.08.015
- Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, *9*(11), 798-809. doi: 10.1038/nrc2734
- Yuan, Z. L., Guan, Y. J., Chatterjee, D., & Chin, Y. E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*, *307*(5707), 269-273. doi: 10.1126/science.1105166
- Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res*, *67*(21), 10123-10128. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127
- Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, *304*(3), C216-225. doi: 10.1152/ajpcell.00328.2012
- Zhang, B. (2008). Targeting the stroma by T cells to limit tumor growth. *Cancer Res*, *68*(23), 9570-9573. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2414
- Zhang, H., & Zhu, J. K. (2012). Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *77*, 161-173. doi: 10.1101/sqb.2012.77.014936
- Zhang, J., & Liu, J. (2013). Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol Ther*, *137*(2), 200-215. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.10.003
- Zhang, Q., Wang, H. Y., Marzec, M., Raghunath, P. N., Nagasawa, T., & Wasik, M. A. (2005). STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(19), 6948-6953. doi: 10.1073/pnas.0501959102

- Zhang, T., Kee, W. H., Seow, K. T., Fung, W., & Cao, X. (2000). The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol Cell Biol*, 20(19), 7132-7139.
- Zhang, W. M., Popova, S. N., Bergman, C., Velling, T., Gullberg, M. K., & Gullberg, D. (2002). Analysis of the human integrin alpha11 gene (ITGA11) and its promoter. *Matrix Biol*, 21(6), 513-523.
- Zhang, Y., Daquinag, A. C., Amaya-Manzanares, F., Sirin, O., Tseng, C., & Kolonin, M. G. (2012). Stromal progenitor cells from endogenous adipose tissue contribute to pericytes and adipocytes that populate the tumor microenvironment. *Cancer Res*, 72(20), 5198-5208. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0294
- Zhang, Y., Turkson, J., Carter-Su, C., Smithgall, T., Levitzki, A., Kraker, A., . . . Jove, R. (2000). Activation of Stat3 in v-Src-transformed fibroblasts requires cooperation of Jak1 kinase activity. *J Biol Chem*, 275(32), 24935-24944. doi: 10.1074/jbc.M002383200