

Université de Montréal

**Étude de l'activité anti-cancéreuse du PCK3145, un peptide dérivé de PSP-94, sur
les cancers hématologiques**

Par
Mireille Guérin

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise (M.Sc.) en sciences biomédicales

Août, 2008

©Mireille Guérin, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'activité anti-cancéreuse du PCK3145, un peptide dérivé de PSP-94, sur
les cancers hématologiques**

présenté par :

Mireille Guérin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Lambert Busque

président-rapporteur

Dr. Denis Claude Roy

directeur de recherche

Dr. Louis Gaboury

membre du jury

SOMMAIRE

Le PCK3145 est un peptide de 15 acides aminés inhibant la sécrétion de MMP-9 et démontrant une activité anti-tumorale contre le cancer de la prostate. Comme les cancers hématologiques sécrètent MMP-9, nous avons donc évalué l'effet du PCK3145 sur ces cancers. Nous avons démontré que les lignées humaines de lymphome non-Hodgkinien (LNH) SR et de myélome multiple RPMI-8226 ainsi que la lignée murine de mastocytome P815 ont une prolifération réduite suite à une exposition au PCK3145. Ce peptide diminue également la clonogénicité de ces cellules. *In vivo*, le PCK3145 diminue significativement la croissance des tumeurs sous-cutanées P815 comparativement au PBS ($p < 0.001$) et aux peptides contrôles (« scrambled peptide » ($p < 0.05$) et PCK5266 ($p < 0.01$)). De plus, le traitement au PCK3145 diminue le nombre de métastases au niveau du foie par rapports aux contrôles ($p < 0.05$). Les niveaux de MMP-9 dans le sang des souris traitées au PCK3145 sont similaires à ceux dans le sang des souris sans tumeur. Par contre, chez les souris recevant le PBS ou le « scrambled peptide », les niveaux de MMP-9 étaient significativement plus élevés que dans les souris sans tumeur et les souris traitées au PCK3145 ($p < 0.05$). De surcroît, dans un modèle de xénogreffe, le PCK3145 diminue significativement la croissance des lymphomes SR par rapport au PBS ($p < 0.01$) et au « scrambled peptide » ($p < 0.001$). Ces résultats indiquent que le PCK3145 possède une activité anti-tumorale et pourrait représenter un agent intéressant pour le traitement de plusieurs cancers hématologiques.

Mots clés : Lymphome non-Hodgkinien, myélome multiple, mastocytome, leucémie, matrice métalloprotéinase-9 (MMP-9), métastase, angiogénèse, xénogreffe.

ABSTRACT

PCK3145 has been shown to exert anti-tumor activity against prostate cancer cells. In a Phase I clinical study, this peptide demonstrated low toxicity. To determine whether PCK3145 could exert cytotoxic activity against other marrow infiltrating cancers, we tested its activity against hematologic cancers. Interestingly, PCK3145 inhibited the proliferation of human NHL (SR) and myeloma (RPMI-8226) cell lines and murine mastocytoma (P815) cell line *in vitro*. Moreover, PCK3145 reduced the clonogenicity of these cell lines. To explore its activity *in vivo*, DBA/2 mice were injected with P815 cells. PCK3145 treatment significantly decreased P815 tumors growth in comparison to PBS ($p < 0.001$), scrambled peptide ($p < 0.05$) and PCK5266 (amino acids 52-66 of PSP-94) ($p < 0.01$). Intraperitoneal PCK3145 treatment led to a decreased number of liver metastasis compared to PBS ($p < 0.05$) and scrambled peptide ($p < 0.05$). MMP-9 levels, measured by ELISA, in the peripheral blood of treated P815 bearing mice were similar to those obtained with healthy animals (12.83 ± 1.890 (mean \pm SD) ng/ml and 6.48 ± 0.4070 ng/ml, respectively), while MMP-9 levels were elevated in mice treated with PBS and scrambled peptide (35.12 ± 8.559 ng/ml and 22.60 ± 3.944 ng/ml, respectively; $p < 0.05$). In NOD/SCID mice PCK3145 treatment resulted in significant inhibition of human NHL SR growth compared to treatment with PBS ($p < 0.001$) and scrambled peptide ($p < 0.01$). Consequently, treatment with PCK3145 can reduce tumor cell proliferation of murine and human hematologic cancers. In addition, PCK3145 has the potential to inhibit tumor cells dissemination by lowering MMP-9 secretion. Thus, PCK3145 represents a unique peptide demonstrating sequence-specific anti-tumor activity hematologic malignancies.

Key words : Non-hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, mastocytoma, leukemia, matrix metalloproteinase-9 MMP-9, metastasis, angiogenesis, xenograft model.

TABLE DES MATIÈRES

1. Le cancer	2
1.1 <i>Caractéristiques des cellules cancéreuses</i>	2
1.2 <i>Les métalloprotéinases</i>	4
1.2.1 <i>MMP-9 et invasion tumorale</i>	6
2. Les cancers hématologiques	10
2.1 <i>L'hématopoïèse et les cellules hématologiques</i>	10
2.2 <i>Les leucémies</i>	13
2.2.1 <i>Processus d'invasion et d'angiogénèse des leucémies</i>	16
2.2.2 <i>Traitement des leucémies</i>	17
2.3 <i>Les lymphomes non Hodgkiniens (LNH)</i>	22
2.3.1 <i>Processus d'invasion et angiogénèse des lymphomes</i>	23
2.3.2 <i>Traitements des lymphomes</i>	24
2.4 <i>Le myélome multiple</i>	25
2.4.1 <i>Processus d'invasion et angiogénèse</i>	26
2.4.2 <i>Traitement des myélomes multiples</i>	26
3. Le PCK3145	29
3.1 <i>La PSP-94</i>	29
3.1.2 <i>PSP-94 et cancer</i>	29
3.2 <i>PCK3145 et cancer de la prostate</i>	30
3.2.2 <i>Mécanisme d'action du PCK3145</i>	31
3.3 <i>PCK3145 et cancers hématologiques</i>	33
4. Description du projet de recherche	35
4.1 <i>Problématique</i>	35
4.2 <i>Objectifs</i>	35
4.3 <i>Procédure expérimentale</i>	35
4.3.1 <i>Expériences in vitro</i>	35
4.3.2 <i>Expériences in vivo</i>	36
Article	37
5. Discussion	73
5.1 <i>But du projet et résultats obtenus</i>	73
5.2 <i>Effet du PCK3145 sur la prolifération et la capacité clonogénique</i>	75
5.3 <i>Effet du PCK3145 sur la croissance tumorale</i>	76
5.4 <i>Effet du PCK3145 sur le développement des métastases</i>	78
5.5 <i>Effet du PCK3145 sur le lymphome humain</i>	79
5.5.1 <i>L'effet du PCK3145 est indépendant de l'immunité spécifique</i>	80
5.6 <i>La sécrétion de MMP-9 provient des tumeurs</i>	81
5.7 <i>Utilisations potentielles du PCK3145</i>	82
6. Conclusion	84
7. Perspectives	84
8. Bibliographie	86

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Hématopoïèse et cellules sanguines

Figure 2 : Modèle intégré du mécanisme d'action du PCK3145

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

- 67LR** : “67 kDa laminine receptor”
- $\alpha3\beta1$** : Intégrine $\alpha3\beta1$
- ABL** : Gène Abelson
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNm** : ARN messenger
- Bcl-2** : “B-cell lymphoma protein 2”
- BCR** : “Breaking cluster region”
- CD20** : “Cell differentiation antigen CD20”
- CD40** : “Cell differentiation antigen CD40”
- CD44** : “Cell differentiation antigen CD44 ”
- ERK** : “Extracellular signal-regulated kinase”
- FSH** : Folliculo-stimulating hormone
- ICAM-1** : “Intercellular adhesion molecule 1”
- IL-2R α** : Récepteur α de l’interleukine 2
- IL-6** : Interleukine 6
- LLA** : Leucémie lymphoblastique aiguë
- LMA** : Leucémie myéloïde aiguë
- LLC** : Leucémie lymphoïde chronique
- LMC** : Leucémie myéloïde chronique
- LNH** : Lymphome Non-Hodgkinien
- MAP** : “Mitogen-activated protein”
- MM** : Myélome multiple
- MMP** : Matrice métalloprotéinase
- MT-MMP** : “Membrane type matrix metalloproteinase”
- NF- κ B** : “Nuclear Factor κ B”
- NK** : “Natural Killer”
- NOD/SCID**: Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency disorder
- PI3K/Akt** : Phosphatidylinositol 3 kinase/Akt protein kinase
- PAP** : Phosphatase acide prostatique

PSA : “Prostate specific antigen”

PSP-94 : Protéine sécrétée par la prostate de 94 acides aminés

RhoA : “Ras homologue gene family member A”

TIMP: “Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases”

VEGF : “Vascular endothelial growth factor”

VEGFR: “Vascular endothelial growth factor receptor”

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le Dr Denis Claude Roy, pour m'avoir permis de poursuivre mes études de maîtrise dans son laboratoire et de m'avoir octroyé ce projet intéressant et prometteur. Je le remercie aussi pour son soutien et sa collaboration qui ont contribué à la réussite de mes travaux.

Je veux également remercier Gorazd Krosi pour son aide au cours du développement des expérimentations ainsi que pour sa contribution à la réalisation des présentations et à la rédaction de l'article. De plus, je tiens à remercier Cynthia Thérien pour sa collaboration, sa participation à plusieurs expériences et pour ses judicieux conseils. Je remercie également mes collègues Marie-Josée Morin, Sabrina Vinet et Jean-Philippe Bastien qui ont été présents pour moi tout au long de ma maîtrise et tous les membres du laboratoire pour leur aide ainsi que pour m'avoir permis de travailler dans un environnement stimulant et dynamique.

Je tiens à souligner la contribution de la compagnie Ambrilia Biopharma Inc. qui nous a gracieusement prodigué le peptide et qui a permis l'étude de l'effet du PCK3145 sur les cancers hématologiques.

Finalement, je veux remercier mon conjoint Marc-André Leblond, ma famille et mes amis qui m'ont grandement encouragée et soutenue pendant mes études.

INTRODUCTION

1. Le cancer

Selon les statistiques prévues pour l'année 2008, 40 % des femmes et 45 % des hommes seront atteints d'un cancer au cours de leur vie au Canada.¹ Le cancer est devenu la cause première de mortalité au Canada, entraînant désormais plus de décès que les maladies cardiovasculaires.² Les cancers se caractérisent par une prolifération anormale et très rapide des cellules qui envahissent leur tissu d'origine et peuvent même envahir d'autres organes.³ Un cancer est initié quand une mutation survient dans un gène qui a le potentiel de contribuer à la formation d'un cancer et qui devient alors un oncogène. L'activation d'un oncogène entraîne des modifications qui peuvent conduire à une capacité de prolifération accrue des cellules. Les cellules peuvent également se transformer en cellules malignes quand une mutation survient dans un gène suppresseur de tumeur qui devient alors inactif et qui ne peut plus effectuer son rôle protecteur dans la cellule.^{4,5} Les cellules subissent alors une succession de changements génétiques qui leur confèrent des avantages de croissance et qui mènent progressivement à la conversion de cellules normales en cellules malignes.^{6,7}

1.1 Caractéristiques des cellules cancéreuses

Toutes les cellules de mammifère possèdent une machinerie similaire qui régule leur prolifération, leur différenciation et leur mort. Chez les cellules cancéreuses, les mutations modifient le fonctionnement de cette machinerie ce qui leur confère des propriétés qui les différencient des cellules saines de l'organisme.

D'abord, les cellules deviennent indépendantes des signaux de croissance c'est-à-dire qu'elles peuvent croître spontanément sans en recevoir le message. Elles deviennent également insensibles aux signaux inhibiteurs de croissance ce qui favorise leur prolifération. Ainsi, les cellules transformées perdent la capacité de communiquer avec leurs cellules voisines et leurs activités sont indépendantes des besoins physiologiques de leur organe d'origine.⁸

Les cellules cancéreuses possèdent également un potentiel de division sans limites. Cette dernière capacité est possible puisque les cellules cancéreuses deviennent résistantes à la mort programmée des cellules ; l'apoptose.⁸ Les cellules qui sont sénescents ou qui comportent des anomalies génétiques et qui sont nuisibles au fonctionnement de l'organisme sont normalement éliminées par ce procédé qui assure l'équilibre au sein des tissus.⁹ L'apoptose est régulée par deux types de facteurs ; des facteurs qui détectent les conditions intracellulaires et extracellulaires où la mort cellulaire est requise et des facteurs qui exécutent et induisent l'apoptose.⁸ Les cellules cancéreuses acquièrent leur résistance par des mutations dans les gènes régulateurs de l'apoptose (p53), par l'activation de signaux de survie (PI3K/AKT) et par l'élévation de l'expression de facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2) ce qui rend très difficile leur élimination.¹⁰⁻¹²

De plus, les cellules malignes ont la capacité d'induire l'angiogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux qui sont préexistants.⁸ L'angiogénèse permet l'apport des nutriments et de l'oxygène vers les tumeurs.¹³

Puisque les cellules prolifèrent de manière incontrôlée, elles s'accumulent et forment une masse appelée tumeur qui envahit peu à peu son tissu d'origine. Par la suite, les cellules malignes peuvent également quitter la tumeur primaire et ainsi former des métastases qui sont des foyers cancéreux secondaires dans d'autres organes.⁸ Pour ce faire, les cellules malignes peuvent se mettre à exprimer des molécules qui favorisent l'invasion tumorale comme des molécules d'adhésion qui facilitent l'extravasation, c'est-à-dire le passage à travers les vaisseaux sanguins, et la migration vers des organes spécifiques. Elles produisent aussi des enzymes qui dégradent les membranes basales telles les métalloprotéinases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9) qui ont la capacité de faciliter la migration des cellules cancéreuses. De plus, elles sécrètent des molécules favorisant l'angiogénèse telles que le « vascular endothelial growth factor » (VEGF).¹⁴⁻¹⁶

1.2 Les métalloprotéinases

La dégradation de la matrice extracellulaire est essentielle pour plusieurs processus physiologiques pendant le développement, la croissance et la réparation des tissus. Cependant, une protéolyse excessive participe à plusieurs pathologies comme l'arthrite rhumatoïde et l'ostéo-arthrite.^{17,18} Les enzymes protéolytiques sont fortement associés à l'invasion tumorale, à la dissémination des métastases et à l'angiogénèse, car ces processus nécessitent une dégradation contrôlée des membranes basales et des constituants de la matrice extracellulaire. Une augmentation de l'expression des matrices métalloprotéinases (MMPs) a d'ailleurs été observée dans plusieurs cas de cancers.^{19,20} Ces protéases sont considérées comme étant critiques pour le développement de métastases.²¹ L'expression de différents types de MMPs conduit à l'apparition de métastases qui proviennent de sous populations de la tumeur primaire

ayant acquis des altérations génétiques favorables à la dissémination.^{15,22} Ces altérations génétiques se situent principalement au niveau des gènes des enzymes dégradant la matrice extracellulaire, des facteurs de transcription, des gènes codant pour les molécules d'adhésion ou pour des gènes permettant l'expression de récepteurs de surface.²³

La famille des MMPs comprend 17 enzymes qui possèdent un noyau de zinc et qui exercent une activité endopeptidasique, c'est-à-dire qu'elles hydrolysent les protéines. Collectivement, elles sont capables de dégrader tous les composants des matrices extracellulaires.^{18,20} La plupart des MMPs sont d'abord sécrétées sous leur forme de précurseurs (zymogène) et doivent être activées dans l'espace extracellulaire pour qu'elles puissent exercer leur activité enzymatique.

Dépendamment de leur substrat respectif et de leur structure, les membres de la famille des MMPs se classifient en sous-groupes de collagénases, de stromélysines, de gélatinases, de MMPs membranaire et des autres MMPs. Les collagénases MMP-1, MMP-8 et MMP-13 dégradent surtout les protéines de structure comme le collagène. Les stromélysines MMP-3, MMP-10, MMP-7 et MMP-12 participent à la protéolyse des composants de la membrane basale tels que le collagène de type IV, la fibronectine et l'élastine. Les gélatinases MMP-2 et MMP-9 possèdent une grande quantité de substrats tels que la gélatine, la laminine et le nidogène. MMP-2 est également reconnue pour activer MMP-9 et MMP-13 quand elles sont sous forme de zymogène. Les MMPs membranaires comportent quatre types d'enzymes. Elles dégradent les collagènes de

type I, II et III, la gélatine, la fibronectine, la laminine et la vitronectine. De plus, MT1-MMP sert de récepteur membranaire pour la forme non activée de MMP-2 et de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (TIMP-2). MT1-MMP et MT2-MMP activent MMP-2 à la surface cellulaire. Cet enzyme est également impliqué dans le clivage de certaines molécules d'adhésion, dont le CD44, et peut également favoriser la migration cellulaire.²⁴

L'activité des métalloprotéinases dans l'espace extracellulaire est spécifiquement inhibée par des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) qui s'associent au site de liaison de zinc des MMPs activées. Ils peuvent avoir des effets stimulants sur la croissance cellulaire et TIMP-1 et 3 ont des effets anti-angiogéniques.

1.2.1 MMP-9 et invasion tumorale

Parmi les différentes MMPs, plusieurs sont associées à la progression du cancer, à un moins bon pronostic et à la formation de métastases comme les MMP 1, 2, 3, 7, 9, 13 et 14.¹⁵ Pendant les étapes initiales de l'invasion tumorale, des cellules malignes acquièrent des propriétés leur permettant de dégrader activement la matrice extracellulaire entourant la tumeur. Les MMPs, en particulier MMP-9, sont grandement impliquées pendant cette première étape de la cascade métastatique.²⁵

D'abord, dans un modèle de cancer de la prostate, la régulation à la baisse de MMP-9 entraîne une diminution de croissance de la tumeur primaire et même une régression de la tumeur a été observée dans la moitié des animaux traités.²⁶ Puis, dans un modèle de tumeurs cutanées induites chimiquement, les tumeurs bénignes n'expriment pas MMP-9

alors que les tumeurs malignes invasives démontrent une expression élevée de cette métalloprotéinase.²⁷ De plus, l'élévation dans le sang périphérique de MMP-9 est liée à une progression rapide du cancer, à une diminution de la survie et à la présence de métastases chez les patients atteints de mélanomes.²⁸ Par ailleurs, dans un modèle de cancer du sein chez le rat, les niveaux élevés de MMP-9 dans le sérum sont associés au développement de métastases dans les poumons et les ganglions lymphatiques.²⁹ De même, dans un modèle murin de cancer du sein spontané, MMP-9 a été identifiée comme étant la seule métalloprotéinase dont l'expression est corrélée avec la signature métastatique des cellules dérivées de la tumeur primaire.³⁰ Également, un potentiel métastatique élevé a été associé avec une surexpression de MMP-9 dans un modèle d'ostéosarcome chez le rat.³¹ Finalement, dans un modèle de sarcome chez le rat, la destruction de l'ARN messager de MMP-9 entraîne une perte de la capacité métastatique au niveau des poumons.³²

MMP-9 permet non seulement aux cellules invasives de quitter la tumeur primaire, mais aussi de pénétrer les vaisseaux sanguins pour pouvoir circuler dans le sang afin d'atteindre les tissus où elles formeront les métastases.³³ Cependant, les cellules circulantes sont alors vulnérables et peuvent être éliminées par les cellules immunitaires.³⁴ Dans ce cas, MMP-9 joue un rôle protecteur des cellules tumorales en supprimant la prolifération des lymphocytes T par la liaison au récepteur IL-2R α .³⁵ Les cellules stromales peuvent, elles aussi, sécréter MMP-9 et ainsi favoriser la formation spontanée de métastases dans certains organes distants comme les poumons.³⁶ Les

cellules tumorales sécrétant MMP-9 ont, quant à elle, des capacités migratoires accrues.³⁷

De plus, dans des modèles murins de cancer du poumon et de mélanome, il a été démontré que les cellules malignes migrent vers des sites préformés et forment ainsi des métastases. Les cellules de ces niches surexpriment MMP-9 qui dégrade la membrane basale et favorise la libération du VEGF et de kit-ligand soluble qui induit l'inflammation.³⁸ La sécrétion de MMPs contribue à la dissémination des métastases en altérant le microenvironnement qui devient alors plus attirant pour les cellules tumorales circulantes. Suite à leur extravasation, les MMPs soutiennent la survie et la croissance du foyer métastatique.

D'autre part, la progression du cancer et les métalloprotéinases sont associées de près avec l'inflammation. En effet, le rôle des cellules inflammatoires qui incluent les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T est bien établi dans l'initiation du cancer et dans sa progression.³⁴ Les cellules tumorales sécrètent plusieurs facteurs pro-inflammatoires et des métalloprotéinases qui attirent les cellules inflammatoires vers le site de développement de la tumeur primaire et de l'angiogénèse.³⁹

L'implication des MMPs dans le processus d'angiogénèse est bien documentée. L'angiogénèse est reconnue comme étant importante pour soutenir la croissance des tumeurs primaires jusqu'à ce qu'elles atteignent une grosseur favorisant l'invasion et est

impliquée dans le développement des métastases.⁴⁰ Parmi les mécanismes qui induisent l'angiogénèse, MMP-9 est un facteur crucial qui entraîne l'activation des vaisseaux sanguins quiescents.⁴¹ La capacité de MMP-9 à recruter des cellules inflammatoires favorise également l'angiogénèse puisqu'elle permet le recouvrement des vaisseaux sanguins nouvellement formés par des péricytes. Ces dernières cellules stabilisent les nouveaux capillaires, modulent la perméabilité vasculaire et régulent plusieurs fonctions des cellules endothéliales. Une déficience en MMP-9 entraîne une réduction du recouvrement des nouveaux vaisseaux sanguins par les péricytes, une diminution de la quantité de cellules inflammatoires recrutées et une angiogénèse altérée.⁴²⁻⁴⁴ MMP-9 peut également contribuer à l'angiogénèse en mobilisant le VEGF et en favorisant sa liaison avec ses récepteurs (VEGFR-1 et VEGFR-2) ce qui renforce la signalisation intracellulaire.^{41,45,46} Les MMP-9 participent donc à l'invasion tumorale en favorisant les processus de migration, de dégradation des membranes basales, de recrutement de cellules inflammatoires et d'angiogénèse.¹⁵

2. Les cancers hématologiques

Le cancer peut prendre naissance dans tous les organes de l'organisme, mais certains cancers sont plus fréquents tels que le cancer du poumon, du côlon, de la prostate et du sein.¹ Parmi les cancers les plus fréquents, on retrouve les cancers hématologiques qui comprennent les leucémies, les lymphomes non Hodgkiniens (LNH) et les myélomes multiples (MM). Effectivement, l'incidence de ces cancers est grande puisque les leucémies se retrouvent au 6^e rang des cancers les plus fréquents chez les hommes et au 9^e rang chez les femmes au Canada alors que les lymphomes non Hodgkiniens se situent au 5^e et 6^e rang pour les hommes et les femmes, respectivement. De plus, les lymphomes non Hodgkiniens et les leucémies sont au 5^e et 6^e rang parmi les cancers entraînant le plus de décès annuellement.¹ Le myélome multiple, quant à lui, est toujours incurable et cause de nombreuses pertes de vies humaines.⁴⁷ Les cancers hématologiques ont pour origine les cellules du système hématopoïétique matures ou immatures dont les voies de signalisation intracellulaires sont modifiées ce qui induit des changements au niveau de la prolifération et de la différenciation.⁴⁸

2.1. L'hématopoïèse et les cellules hématologiques

L'hématopoïèse est le processus par lequel toutes les cellules du sang sont produites à partir de cellules souches hématopoïétiques qui elles, ont la capacité de s'autorenouveler et de se différencier (Figure 1).⁴⁹ D'abord, elles donnent naissance à des progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes très peu différenciés qui possèdent plusieurs caractéristiques de cellules souches.

La différenciation dans une des deux lignées principales dépend des cytokines et des facteurs de croissance qui dirigent la prolifération et la maturation des cellules progénitrices. Ainsi, au fur et à mesure qu'ils s'engagent dans une lignée spécifique, les cellules deviennent de plus en plus matures et elles deviennent sensibles à des facteurs spécifiques pour leur propre fonctionnement.⁵⁰

La lignée myéloïde donne naissance aux cellules matures suivantes : les globules rouges, les plaquettes sanguines, les cellules immunitaires comprenant les monocytes-macrophages, les granulocytes, les cellules dendritiques et les ostéoclastes.^{50,51} Ces cellules ont des fonctions essentielles ; les globules rouges transportent l'oxygène et le gaz carbonique,⁵² les plaquettes sont nécessaires à la coagulation du sang, les granulocytes et les monocytes/macrophages sont des cellules de l'immunité non spécifique qui défendent l'organisme contre les agents infectieux, entre autres par la phagocytose, et les cellules dendritiques ont pour fonction de présenter les antigènes microbiens et cancéreux aux cellules de l'immunité spécifique. Les antigènes sont des fragments de substances étrangères qui se lient spécifiquement aux récepteurs des lymphocytes T et aux anticorps (immunoglobulines) produits par les lymphocytes B et qui permettent de monter une réponse immunitaire contre les cellules ou les agents infectieux auxquels ils appartiennent. Les lymphocytes proviennent de la lignée lymphoïde de même que les cellules « natural killer (NK) ». Les lymphocytes T auxiliaires sont responsables d'organiser la réaction immunitaire spécifique en sécrétant des cytokines et par des contacts cellulaires qui permettent de recruter, d'activer et de diriger les autres cellules immunitaires tandis que les lymphocytes T cytotoxiques tuent

les cellules atteintes de virus ou de cancers de manière spécifique parce qu'elles reconnaissent les antigènes exprimés à leur surface.⁵⁰ Puisque les cellules hématologiques ont des rôles si importants pour le fonctionnement de l'organisme, une défaillance de l'hématopoïèse conduit à de très graves problèmes de santé comme de l'anémie, des hémorragies et des infections.⁵³

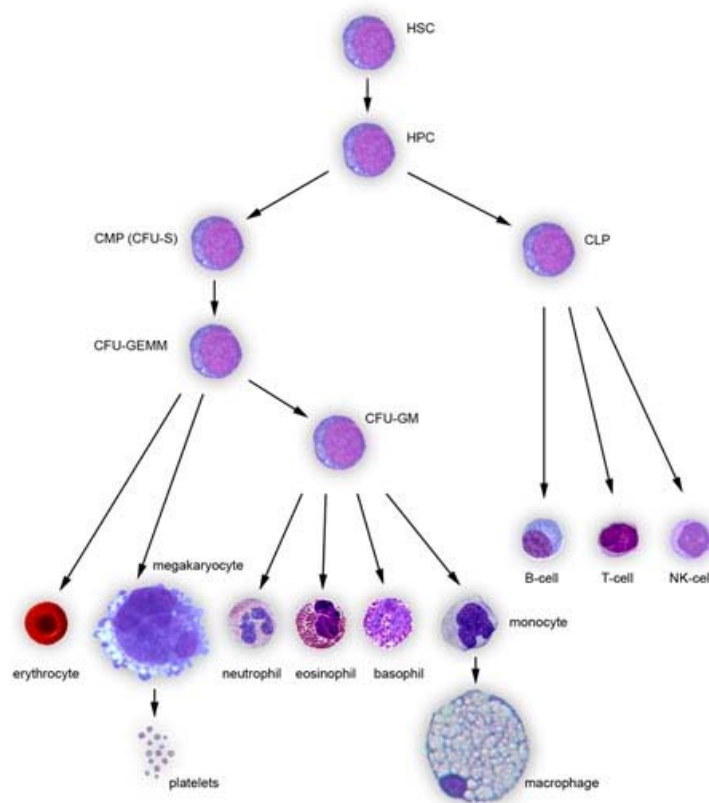


Figure 1 : Hématopoïèse et cellules sanguines⁵⁴

2.2 Les leucémies

Les leucémies correspondent à une prolifération néoplasique des cellules immatures du système hématopoïétique. Ces cellules hématologiques sont transformées par une différenciation anormale ou interrompue prématurément. Les cellules leucémiques se divisent rapidement et s'accumulent dans la moelle osseuse où elles remplacent progressivement les cellules hématopoïétiques normales ce qui entraîne les symptômes de la maladie. Les conséquences d'une déficience de la moelle osseuse peuvent affecter les trois lignées majeures de différenciation et ainsi causer l'anémie, des hémorragies et des infections puisque la moelle ne produit plus de globules rouges, de plaquettes et de cellules immunitaires. Les leucémies se classifient selon leur forme aiguë ou chronique puis se subdivisent selon qu'elles atteignent la lignée myéloïde ou lymphoïde.⁵³ Les leucémies aiguës surviennent quand des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes (leucémie myéloïde aiguë ou LMA) ou lymphoïdes (leucémie lymphoblastique aiguë ou LLA) très immatures acquièrent des lésions génétiques.^{53,55} Après une accumulation dans la moelle osseuse, les cellules leucémiques (blastés) peuvent quitter celle-ci, se retrouver dans le sang périphérique, la rate, les ganglions lymphatiques ou le foie et ainsi constituer des métastases.⁵⁵

Dans le cas des leucémies myéloïdes aiguës (LMA), des cellules indifférenciées prolifèrent de manière clonale et accumulent ainsi plusieurs mutations génétiques. Des cellules souches peuvent être transformées en cellules leucémiques par des oncogènes activés. De plus, des cellules progénitrices plus matures peuvent aussi être transformées par des translocations chromosomiques en cellules malignes et acquérir une capacité de

renouvellement infinie, et ce, sans avoir la capacité de se différencier ce qui crée une accumulation de blastes dans la moelle.⁵⁶

Les leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA) sont causées lorsque des lésions génétiques majeures surviennent dans des progéniteurs lymphoïdes qui sont engagés dans le processus de différenciation en lymphocytes T ou B.⁵⁷ Certaines mutations induisent une capacité infinie d'autorenouvellement et d'autres entraînent un arrêt du processus de différenciation à un stade précis de développement des lymphocytes.⁵⁸ Les cellules leucémiques peuvent avoir subi des réarrangements clonaux au niveau des gènes des immunoglobulines ou au niveau du récepteur des cellules T. De plus, des oncogènes majeurs des cellules leucémiques lymphoblastiques sont formés par des translocations chromosomiques. Les protéines de fusion activent alors des facteurs de transcription qui contrôlent la différenciation cellulaire ce qui induit un blocage dans la maturation.^{57,58}

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est associée à une translocation chromosomique impliquant les chromosomes 9 et 22 (t(9;22) qui est appelée chromosome de Philadelphie et qui est observée dans 95 % des LMC.⁵⁹ Par cette translocation, le proto-oncogène ABL se fusionne avec le « major breaking point cluster region » (BCR). L'hybride BCR-ABL permet l'expression d'une protéine de fusion qui augmente l'activité tyrosine kinase impliquée dans plusieurs voies de signalisation cellulaire.⁶⁰ La leucémie myéloïde chronique est caractérisée par un remplacement progressif des éléments normaux de la moelle osseuse par des cellules myéloïdes

matures qui ne répondent plus aux mécanismes qui gouvernent la prolifération des cellules myéloïdes normales, ce qui entraîne un ratio toujours plus élevé de cellules leucémiques par rapport aux cellules normales. La pathophysiologie de la LMC peut être subdivisée en trois phases : chronique, accélérée et blastique. L'acquisition d'aberrations chromosomiques supplémentaires diminue la capacité de maturation des cellules et conduit à une crise blastique qui est atteinte quand il y a plus de 30 % de blastes dans la moelle. À ce stade, tous les organes sont infiltrés par les blastes et les patients décèdent suite à des saignements, des infections ou des thromboses dans des organes comme les poumons et le cerveau.⁵³

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus commune en Europe et en Amérique du Nord et est caractérisée par une prolifération monoclonale de petits lymphocytes B dans 95 % des cas ou de lymphocytes T dans 5 % des cas.⁵³ Un des signes distinctifs de cette maladie est que les lymphocytes B matures échappent à l'apoptose et subissent un arrêt du cycle cellulaire en phase G0 et G1.⁶¹ Ces cellules ont une faible activité proliférative, mais l'inefficacité de l'apoptose et la dérégulation du cycle cellulaire créent une accumulation de ces cellules dans le sang, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate ce qui occasionne un grossissement de ces organes et une diminution de l'efficacité de la moelle pour produire les cellules sanguines normales.^{53,62}

2.2.1 Processus d'invasion et d'angiogénèse des leucémies

La circulation des cellules leucémiques implique la dégradation des membranes basales par le biais d'enzymes catalytiques telles que les métalloprotéinases.⁶³ Les blastes de leucémie myéloïde aiguë peuvent se disséminer et former des métastases puisque les cellules leucémiques sont capables de traverser les matrices extracellulaires et de pénétrer les vaisseaux sanguins.⁶⁴

Les gélatinases MMP-2 et MMP-9 fortement impliquées dans les processus d'invasion tumorale sont exprimées par certaines cellules myéloïdes comme les macrophages.^{65,66} Ainsi, quand un blocage survient dans la différenciation de la lignée myéloïde, les cellules ont un important potentiel pour exprimer cette enzyme. De ce fait, MMP-9 est exprimée par plusieurs lignées cellulaires de leucémie myéloïde aiguë dont HL-60 (leucémie monocytique aiguë) et des taux élevés de MMP-9 ont été observés dans le sang périphérique de nombreux patients atteints de LMA.^{63,67} De plus, les cellules malignes lymphoïdes T et B peuvent, elles aussi, dégrader la matrice extracellulaire afin d'envahir d'autres organes en exprimant les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9.⁶⁸ Au moment du diagnostic, les patients atteints de LLC de type B présentent un taux plus élevé de la métalloprotéinase MMP-9 dans le sang et la migration des cellules tumorales s'en trouve favorisée.⁶⁹

Dans un autre ordre d'idées, la densité des vaisseaux sanguins dans la moelle osseuse est anormalement élevée dans les cas de LMA, de LLA et de LLC.^{70,71} Plusieurs études ont démontré que les patients atteints de leucémie ont un taux sanguin plus élevé de VEGF.^{69,72}

Ce dernier stimule les cellules endothéliales de manière paracrine (stimulation de cellules adjacentes) et entraîne ainsi la formation des vaisseaux qui apportent nutriments et oxygène aux cellules cancéreuses.^{71,73} Il a été démontré que les cellules de leucémie myéloïde aiguë,^{74,75} de leucémie lymphoblastique aiguë⁷¹ et de leucémie lymphoïde chronique⁷⁶⁻⁷⁸ peuvent sécréter le VEGF tout en possédant le récepteur VEGFR-2 à leur surface, ce qui crée une boucle de stimulation autocrine qui augmente la survie des cellules en stimulant l'expression de protéines anti-apoptotiques.⁷⁸ D'ailleurs, une expression plus élevée de VEGFR-2 est corrélée avec une survie moins grande chez les patients adultes qui ont une LLA. Les facteurs de croissance et leurs récepteurs qui sont sécrétés suite à l'angiogénèse favorisent la survie, la croissance et l'invasion des cellules leucémiques autant dans les cas de LLA de l'adulte et de l'enfant.⁷⁹ L'angiogénèse est donc un élément essentiel à la survie et à la prolifération des cellules leucémiques qui peut être ciblée pour le développement de nouvelles thérapies.

2.2.2 Traitement des leucémies

Le but de la thérapie des leucémies aiguës est d'éradiquer les cellules leucémiques et de restaurer l'hématopoïèse normale. Ce but est réalisé en utilisant des traitements de chimiothérapie myéloablatrice qui rapidement diminuent le nombre de cellules leucémiques et induisent une période d'aplasie au sein de la moelle osseuse. Cette période d'aplasie permet une compétition entre les cellules hématopoïétiques normales et les cellules clonales leucémiques pour reconstituer la population de cellules de la moelle osseuse. Les cellules hématopoïétiques normales ont des avantages de croissance et peuvent alors reconstituer l'hématopoïèse polyclonale et produire des cellules sanguines fonctionnelles.

Idéalement, les cellules leucémiques devraient être complètement remplacées par les cellules normales, mais le nombre de cellules leucémiques est parfois si élevé lors du diagnostic qu'il est souvent impossible de les éradiquer entièrement malgré plusieurs cycles de chimiothérapie. Les cellules leucémiques résiduelles peuvent donc se remettre à proliférer entraînant une rechute. Pour parler de rémission complète, le niveau des cellules leucémiques doit se situer en deçà des niveaux cliniquement détectables.⁵³ Dans le traitement de la leucémie myéloïde aiguë, le taux de réponse des patients à la chimiothérapie se situe entre 50 et 75 %⁸⁰, mais seulement 20-30 % des patients demeurent en rémission cinq ans après le diagnostic.⁸¹

Les effets secondaires de ces traitements de chimiothérapie myéloablatrice sont très graves et requièrent une hospitalisation durant la période de cytopénie (pénurie de cellules matures dans le sang). En effet, les patients développent souvent d'importants problèmes d'hémorragie et d'infection après leur traitement puisque cette période peut durer de 2 à 5 semaines.⁸² Une infection non traitée peut être fatale en absence de cellules immunitaires fonctionnelles. Ainsi, les patients doivent recevoir des traitements antibiotiques préventifs. De plus, les patients nécessitent plusieurs transfusions sanguines pour maintenir le niveau d'hémoglobine et de plaquettes nécessaires au transport de l'oxygène et à la coagulation.^{53,82} Comme la lyse d'une grande quantité de cellules leucémiques libère une quantité élevée d'acide urique, la goutte et même une insuffisance rénale peuvent parfois survenir. Pire, les patients peuvent également présenter une élévation du taux de potassium sanguin ce qui peut entraîner des

arythmies malignes cardiaques. Ces effets potentiellement dangereux demandent une surveillance médicale constante et une hydratation plus élevée.⁵³

Les greffes de cellules souches hématopoïétiques sont efficaces pour traiter les leucémies aiguës, mais leur utilisation en cas de première rémission est critiquée, car elles présentent des effets toxiques et ne sont pas nécessairement plus efficaces que les traitements de chimiothérapie courants.⁵³ Les greffes allogéniques sont considérées comme étant plus efficaces que les greffes autologues puisque l'effet immunologique peut se traduire en activité antileucémique ce qui provoque un niveau inférieur de rechute chez ces patients.⁸³ Cependant, 30 % des patients jeunes ne trouvent pas de donneur compatible, ce qui les empêche de recevoir une greffe allogénique.⁵³ Une autre complication possible des greffes allogéniques est la maladie du greffon contre l'hôte dans laquelle les cellules immunitaires du donneur reconnaissent les cellules du receveur comme étant étrangères et tentent de les détruire. Plusieurs organes cibles comme la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal sont touchés conduisant parfois à la mort du patient.⁸⁴ Ainsi, les patients recevant des greffes allogéniques doivent recevoir des traitements immunosuppresseurs qui les rendent très vulnérables aux infections qui deviennent alors potentiellement fatales.⁸⁵ Malgré les progrès de la recherche, le traitement des leucémies myéloïdes aiguës s'accompagne d'effets secondaires graves et 70 % des patients rechutent ou décèdent des suites de leur leucémie.⁵⁶

Dans les cas de leucémies lymphoblastiques aiguës, les adultes ne répondent pas aussi bien que les enfants aux traitements de chimiothérapie. Chez les adultes, le taux de survie à cinq ans est de 20 à 30 % comparativement à 70 % chez les enfants.

La leucémie myéloïde chronique peut être guérie par de la chimiothérapie myéloablative et des greffes de moelle allogéniques si ces traitements sont administrés pendant la phase chronique. Les greffes peuvent guérir 50 % des leucémies surtout si elles ont lieu pendant la première année suivant le diagnostic et sont recommandées si le traitement de chimiothérapie ne réussit pas à éliminer les cellules malignes.⁸⁶

D'autres traitements ont été développés tels que l'interféron alpha 2b qui possède une activité contre la LMC en éradiquant les clones possédant le chromosome de Philadelphie.⁸⁷ Les patients traités aux interférons qui obtiennent une réponse cytogénétique ont un taux de survie augmenté. Ce type de traitement cause cependant des effets secondaires importants qui ressemblent à des symptômes d'infection virale comme les douleurs musculaires, la dépression et la fatigue intense. Ces effets sont dépendants de la dose administrée.⁸⁸ Parmi les traitements plus récents, on retrouve l'imatinib mesylate qui est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase induite par la protéine de fusion BCR-ABL et qui ainsi supprime la prolifération des clones possédant cette protéine.^{89,90} Ce dernier traitement démontre une activité contre la LMC à toutes les phases de la maladie.⁹¹ Le développement de myélosuppression est très fréquent chez les patients recevant l'imatinib. En particulier, on retrouve la neutropénie (nombre insuffisant de neutrophiles) chez 35 % des patients et la thrombocytopenie (déficience en plaquettes) chez 22 % des patients.⁹²

Contrairement aux leucémies aiguës et à la leucémie myéloïde chronique, la LLC est considérée comme étant incurable. Néanmoins, elle peut suivre un développement indolent et être contrôlée pendant plusieurs années. Habituellement, les traitements ne sont pas administrés pendant les premiers stades asymptomatiques de la maladie puisque l'évolution de cette pathologie est très variable et qu'entreprendre les traitements plus tôt ne semble pas influencer la survie du patient.^{53,62} En effet, certains patients ne nécessitent aucun traitement et ont une survie prolongée, d'autres ont une phase initiale indolente suivie d'une progression rapide. Le tiers restant présente une maladie agressive au diagnostic et nécessite un traitement immédiat.⁹³

Quand l'évolution de la maladie requiert un traitement, les patients reçoivent de la chimiothérapie.⁵³ Les analogues des purines lorsqu'elles sont utilisées induisent une profonde immunosuppression des cellules T⁹⁴ et peuvent entraîner de l'auto-immunité ce qui limite leur utilisation.⁹⁵ Le Rituximab (un anticorps anti-CD20 ; le CD20 est une molécule caractéristique des lymphocytes B) est seulement modérément actif en tant que traitement de première ligne avec un niveau de rémission complète de seulement 4%.⁹⁶ Utilisé en combinaison avec de la chimiothérapie, il est plus efficace avec un taux de réponse de 95 % et un taux de rémission complète de 70%.⁹⁷ Ce traitement est par contre plus toxique. Finalement, les traitements actuels induisent une rémission complète, mais presque tous les patients finissent par rechuter.⁶²

2.3 Les lymphomes non Hodgkiniens (LNH)

Les lymphomes sont des cancers qui se développent d'abord dans les ganglions lymphatiques à partir des cellules B dans 80 % des cas ou plus rarement à partir des cellules T.⁹⁸ Une des particularités des lymphomes est que contrairement aux tumeurs solides, le génome des cellules malignes est plutôt stable.⁹⁹ Des facteurs génétiques et environnementaux qui influencent la survie et la croissance des cellules B pourraient être impliqués dans la formation des lymphomes en plus de l'activation d'oncogènes et de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.^{99,100} De plus, une ou plusieurs translocations peuvent influencer le développement d'une prolifération clonale ayant un réarrangement des gènes des immunoglobulines ou du récepteur des cellules T.¹⁰¹⁻¹⁰³ En général, les translocations entraînent la juxtaposition d'un promoteur et d'un oncogène, ce qui induit une surexpression des protéines oncogéniques qui normalement sont exprimées en faible quantité ou pas du tout dans les cellules lymphoïdes.⁹⁹

Les lymphomes diffus à grandes cellules B, les lymphomes folliculaires et les lymphomes à petits lymphocytes B sont les plus fréquents et correspondent à 75 % de LNH dans les pays industrialisés. Les lymphomes diffus à grandes cellules B sont agressifs alors que les lymphomes folliculaires et les lymphomes à petits lymphocytes ont un développement plus indolent.¹⁰⁴

Dans les cas des lymphomes folliculaires, on observe le plus souvent une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Résultat de la translocation chromosomique t(14;18), elle entraîne la survie des cellules tumorales.¹⁰⁵ Le micro-environnement

influence le développement des lymphomes folliculaires par le biais des cellules stromales et immunitaires qui supportent la croissance et envoient des signaux de survie aux cellules malignes.^{106,107} Ainsi, la signalisation de CD40 protège les cellules tumorales B en entraînant l'activation de la voie NF- κ B et l'inhibition de l'apoptose en régulant à la hausse l'expression des protéines anti-apoptotiques.¹⁰⁸

2.3.1 Processus d'invasion et angiogénèse des lymphomes

Certains mécanismes d'invasion peuvent être impliqués dans la progression maligne des lymphomes. Une étude portant sur l'expression des métalloprotéinases et de leurs inhibiteurs dans les lymphomes non Hodgkiniens a révélé que les patients ayant des lymphomes plus agressifs ont un taux plasmatique de MMP-9 supérieur à celui des patients souffrant de lymphomes indolents. En prenant en compte l'âge du patient, l'élévation de MMP-9 est un indice de mauvais pronostic dans les cas de lymphomes immunoblastiques de haut grade. De plus, l'ARN messager de MMP-9 est détecté dans les cellules malignes de lymphomes à grandes cellules B ce qui indique que les protéases sont sécrétées par les cellules tumorales.¹⁰⁹

Parmi les facteurs pouvant être reliés à MMP-9, ICAM-1, une molécule d'adhésion, est reconnue comme pouvant induire l'expression de MMP-9 par les cellules de LNH. Ainsi, les souris déficientes en ICAM-1 sont naturellement résistantes à la dissémination des lymphomes. L'expression de MMP-9 par les lymphomes semble jouer un rôle important dans la survie, la croissance et la migration des cellules malignes.¹¹⁰ De plus, les lymphomes de haut grade ont la capacité de dégrader les composantes de la matrice extracellulaire *in vitro*.¹¹¹ L'augmentation de la cytokine IL-

6 est corrélée avec l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 et entraîne une augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire induite par MMP-9.¹¹² Dans les cas de LNH et de d'autres types de cancers hématologiques, MMP-9 pourrait également être impliquée dans la régulation immunologique et l'immunosuppression associée au cancer.^{35,113}

Par ailleurs, l'angiogénèse et l'expression de facteurs angiogéniques se trouvent augmentées en présence de lymphomes. Les lymphomes agressifs sécrètent davantage VEGF comparativement aux lymphomes indolents.¹¹⁴ La stimulation paracrine des cellules endothéliales par VEGFR-2 augmente la densité des microvaisseaux sanguins dans les ganglions lymphatiques lymphomateux alors que la stimulation du récepteur VEGFR-1 induit un signal de survie des cellules tumorales.¹¹⁵

2.3.2 Traitements des lymphomes

La plupart des lymphomes peuvent être guéris par les traitements actuels. Les lymphomes considérés comme étant agressifs sont le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome périphérique à cellules T, le lymphome à grandes cellules anaplastiques et les lymphomes folliculaires de grade III.¹¹⁶ Les LNH à cellules invasives sont traités par de fortes doses de chimiothérapie comportant plusieurs agents dont au moins un est une anthracycline. Ce traitement est très efficace, mais certains patients ne peuvent tolérer les anthracyclines en raison de sa cardiotoxicité. Dans ces cas, on lui substitue d'autres agents de chimiothérapie. La chimiothérapie des LNH est habituellement utilisée en combinaison avec du Rituximab (anticorps anti-CD20 couplé à une toxine) qui cible spécifiquement les cellules B.¹¹⁷

Cependant, seulement la moitié des patients avec des lymphomes diffus de haut grade entrent en rémission complète avec ce type de traitement alors que les patients avec des lymphomes folliculaires répondent rarement. Malgré l'ajout du Rituximab qui permet un traitement plus ciblé, beaucoup de patients rechutent.¹¹⁸ De plus, les traitements actuels présentent des effets secondaires comme la cardiotoxicité, la myélosuppression et l'atteinte du tractus gastro-intestinal.^{117,119,120}

2.4 Le myélome multiple

Le myélome multiple est un cancer hématologique caractérisé par une prolifération clonale de cellules plasmocytaires dans la moelle osseuse. Il s'accompagne parfois d'une gammopathie monoclonale dans le sang et l'urine.¹²¹ Les cellules plasmocytaires sont les cellules qui normalement produisent les anticorps. Quand les lymphocytes B sont stimulés, ils se transforment en plasmocytes et sécrètent de grande quantité d'anticorps.⁵⁰

Le myélome peut demeurer indolent pendant un certain temps avant de devenir un myélome agressif et invasif. Cette transformation implique plusieurs changements des cellules malignes et du micro-environnement ostéo-médullaire.^{47,121} La transformation des plasmocytes normaux en cellules précancéreuses peut être induite par l'activation de gènes tels que les cyclines qui favorisent la prolifération des cellules tumorales et la progression du cycle cellulaire. Près de la moitié des patients présentent des translocations du gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines.^{121,122} Ces translocations sont des facteurs de mauvais pronostic.¹²¹ La progression du myélome

multiple entraîne des lésions aux os en rompant l'équilibre entre la synthèse de tissus osseux et la résorption ostéoclastique. Les cellules de myélome en sécrétant des cytokines favorisent la production d'ostéoclastes. Ces cytokines comprennent entre autres le VEGF qui soutient le développement de l'angiogénèse anormale dans la moelle osseuse.^{123,124} Le VEGF semble aussi accroître la survie des cellules de myélome en agissant par un mécanisme de régulation autocrine et paracrine.

2.4.1 Processus d'invasion et angiogénèse

L'expression de VEGF est corrélée avec l'expression de MMP-9. Les niveaux de cette molécule augmentent avec la progression du myélome.¹²⁵ La sécrétion de MMP-9 pourrait également favoriser la résorption osseuse, aggraver les lésions osseuses et hâter la dissémination du myélome en permettant la migration des cellules tumorales.¹²⁶ Les interactions entre les cellules malignes et les autres cellules de la moelle, les cellules stromales et les cellules souches hématopoïétiques, ainsi qu'avec la matrice extracellulaire activent plusieurs voies de signalisation, ce qui provoque une augmentation de la prolifération et une inhibition de l'apoptose.¹²³

2.4.2 Traitement des myélomes multiples

Bien que les traitements s'améliorent et que la période de survie des patients augmente, le myélome demeure toujours un cancer incurable. Sans traitement, les patients avec un myélome dans sa phase active ont une survie médiane de 6 mois. Cependant, avec la chimiothérapie, la survie atteint trois ans. La thérapie habituelle est un traitement de chimiothérapie à forte dose suivie d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues; ce traitement permet d'augmenter la survie à 5 ans.¹²¹ Malgré la greffe, la majorité des patients présentera une récurrence. Quant à la greffe de cellules allogéniques,

elle représente une modalité expérimentale avec des risques importants de maladie du greffon contre l'hôte.¹²⁷

Les agents alkylants peuvent être utilisés en chimiothérapie pour les patients qui ne sont pas éligibles à une greffe autologue. Ils augmentent le taux de réponse des patients, mais les réponses complètes demeurent rares et n'augmentent pas la survie. Les agents alkylants peuvent aussi causer des leucémies myéloïdes aiguës secondaires et des syndromes myélodysplasiques.¹²¹

La thalidomide est un agent prometteur utilisé en combinaison qui stimule la réponse au traitement. Cependant, elle s'accompagne de toxicité. La combinaison avec la dexaméthasone augmente l'incidence des thromboses veineuses et peut causer des éruptions cutanées, une bradycardie et une neuropathie.¹²⁸

Le bortezomib est un inhibiteur du protéasome 26S et est efficace chez 25 à 30 % des patients qui rechutent.¹²⁹ Il induit une réponse rapide et induit la lyse des cellules tumorales dans le myélome à croissance rapide. Les principaux effets secondaires comprennent la thrombocytopénie, les troubles gastro-intestinaux et la neuropathie périphérique.¹²¹

La lénalinomide peut être utilisée en cas de rechute si la dexaméthasone et le bortezomib n'ont pas été efficaces,¹³⁰ mais elle est associée à des effets secondaires

comme la myélosuppression, les embolies dues à des thromboses, surtout lorsqu'utilisé en combinaison avec la dexaméthasone, et des éruptions cutanées.¹²¹

Des traitements pour soulager les symptômes d'hypercalcémie, d'anémie, d'infection et de douleur doivent parfois être administrés aux patients, en particulier ceux qui ont des lésions osseuses.¹³¹ Pour contrer le déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse, les patients reçoivent aussi des biphosphanates dont l'action pourrait s'étendre au micro-environnement et contribuer au traitement du myélome. En revanche, les biphosphanates peuvent entraîner une toxicité rénale et de la nécrose osseuse.¹³²

Malgré les progrès de la recherche, les traitements actuels demeurent souvent inefficaces et s'accompagne d'effets indésirables. La découverte d'un nouvel agent capable d'agir sur plusieurs mécanismes de l'invasion tumorale et dépourvu d'effets secondaires pourrait avoir un impact considérable. C'est pourquoi nous avons voulu déterminer si le PCK3145 était une molécule intéressante pour le traitement des cancers hématologiques.

3. Le PCK3145

Le PCK3145 correspond aux acides aminés 31 à 45 d'une protéine de 94 acides aminés (PSP-94) sécrétée par la prostate.¹³³

3.1 La PSP-94

Cette protéine constitue l'une des trois principales protéines sécrétées par la prostate avec l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et la phosphatase acide prostatique (PAP).¹³⁴ La PSP-94 a d'abord été découverte comme étant un inhibiteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSH)¹³⁵ qui stimule la spermatogénèse chez l'homme, la maturation des ovocytes et la production d'oestrogènes chez la femme.¹³⁶ Bien que l'expression de la PSP-94 soit plus élevée dans la prostate que dans tous les autres tissus, elle est aussi exprimée dans les tissus des organes reproducteurs féminins (seins et ovaires).¹³⁷ En outre, la prostate est une source extrahypophysaire de FSH.¹³⁸ Les niveaux de FSH qui sont plus élevés en cas d'hyperplasie bénigne de la prostate et la présence de récepteurs prostatiques pour la FSH indiquent que la prolifération des tissus prostatiques est stimulée de manière à la fois autocrine et paracrine par cette hormone.^{139,140} Il est probable que PSP-94 soit un régulateur du développement de la prostate pour la PSP-94 en inhibant la FSH.¹³⁵

3.1.2 PSP-94 et cancer

La PSP-94 a d'abord été associée au cancer puisque ses niveaux d'expression diminuent avec la progression du cancer de la prostate. En effet, dans la prostate saine, les niveaux de PSP-94 sont élevés. Le cancer en diminue l'expression, jusqu'à sa disparition complète au stade avancé.^{141,142} De plus, les patients avec un cancer de la prostate qui

ont un taux élevé de PSP-94 ont un meilleur pronostic que ceux qui ne l'expriment.¹⁴³ Le groupe de Shukeir et coll. a analysé l'effet de la PSP-94 sur la croissance des tumeurs prostatiques.¹⁴⁴ Leurs études ont démontré que la PSP-94 diminue la croissance des tumeurs sous-cutanées chez le rat et qu'elle ralentit l'apparition de métastases osseuses.

3.2 PCK3145 et cancer de la prostate

Fort de ces résultats intéressants, d'autres travaux ont été réalisés pour identifier la partie de la protéine responsable de l'activité anticancéreuse. Des peptides synthétiques correspondant à différentes séquences de la PSP-94 ont été synthétisés puis, testés dans le même modèle de rat. Parmi les peptides évalués, seul le PCK3145 a montré une activité anticancéreuse. Comme la PSP-94, ce peptide peut diminuer la croissance des tumeurs prostatiques sous-cutanées et ralentir le développement des métastases. En utilisant ce modèle de rat, d'autres effets ont été notés comme la normalisation de l'hypercalcémie associée au cancer prostatique et l'augmentation de l'apoptose dans les tumeurs des rats traités au PCK3145.¹³³

De plus, dans une étude clinique effectuée chez des patients atteints de cancer de la prostate en phase avancée, le PCK3145 a pu stabiliser la progression de la maladie chez plusieurs patients et faire chuter le taux de MMP-9 sanguin, ce qui indique un potentiel pour le traitement de cancers métastatiques. Au cours de cette étude, il a aussi été démontré que ce peptide est très bien toléré par les patients et entraîne très peu d'effets secondaires.¹⁴⁵

3.2.2 Mécanisme d'action du PCK3145

Plusieurs études ont ensuite été menées pour expliquer comment ce peptide de 15 acides aminés exerce son activité anticancéreuse. On a d'abord étudié son effet sur la sécrétion de MMP-9 (Figure 2). Le PCK3145 agit de deux façons pour inhiber MMP-9.

Premièrement, le PCK3145 se lie au récepteur de la laminine 67LR et probablement au récepteur de type intégrine $\alpha3\beta1$. La stimulation de la voie ERK qui en découle a pour effet de diminuer l'expression de la protéine HuR^{146,147}. Comme le rôle de la protéine HuR est de stabiliser l'ARN messager de MMP-9,¹⁴⁸ PCK3145 favorise la dégradation de l'ARNm de MMP-9 et réduit par conséquent la sécrétion de MMP-9.¹⁴⁷

Deuxièmement, le clivage du récepteur externe des MMP-9, CD44, est induit par le PCK3145 qui stimule la voie RhoA/MT1-MMP.¹⁴⁹ Cette métalloprotéinase membranaire clive le CD44 empêchant MMP-9 de s'y lier. La liaison de MMP-9 à son récepteur externe permet aux cellules d'adhérer à la membrane basale et de cibler les zones qui doivent être hydrolysées ce qui favorise la dissémination des métastases.^{150,151} Ainsi, la diminution de sécrétion de MMP-9 et la perte de sa capacité de dégradation pourraient expliquer en partie le retard d'apparition des métastases.

De plus, l'inhibition de MMP-9 pourrait contribuer à la réduction de croissance de la tumeur primaire en limitant sa capacité d'expansion²⁶ et en réduisant l'angiogénèse nécessaire à la croissance tumorale.^{40,41}

De surcroît, la voie NF- κ B est stimulée elle aussi, bien qu'à une intensité moindre que la voie ERK.¹⁵² En effet, NF- κ B pourrait être impliqué dans l'induction de l'apoptose observée *in vivo* dans les tumeurs chez les rats traités.^{133,153} L'augmentation de l'apoptose pourrait contribuer à diminuer la croissance tumorale.

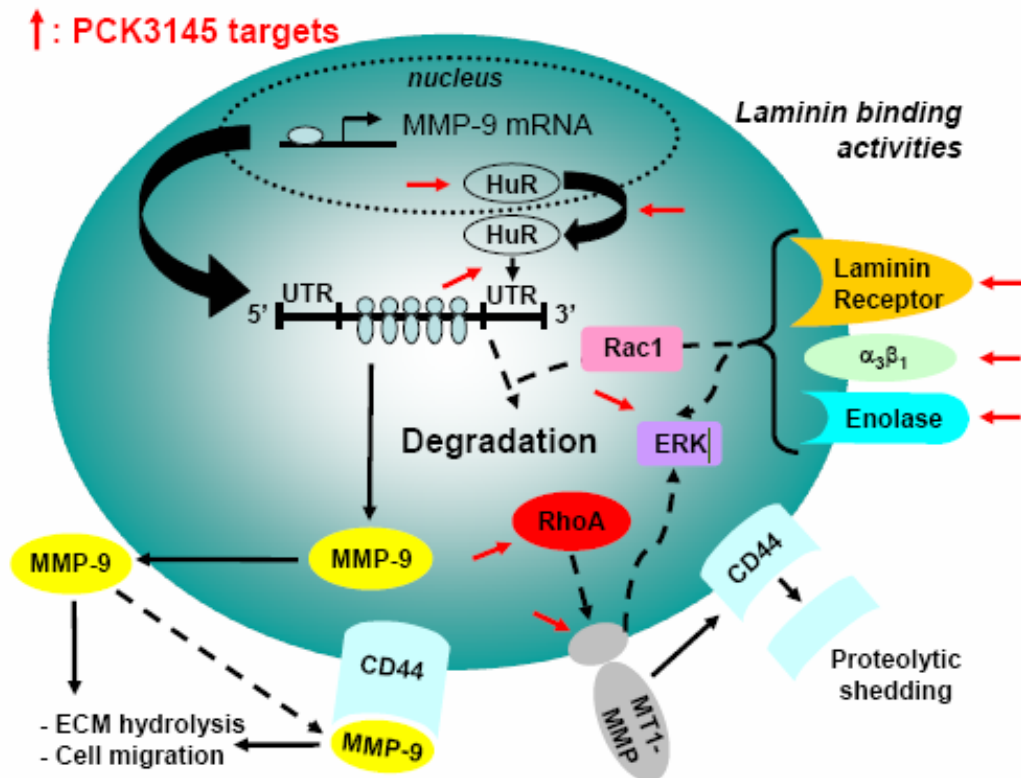


Figure 2 : Modèle intégré du mécanisme d'action du PCK3145.¹⁵⁴

Par ailleurs, d'autres travaux ont démontré que le PCK3145 possède une activité antiangiogénique complémentaire à son activité antimétastatique. En effet, le PCK3145 inhibe la phosphorylation de la tyrosine kinase du récepteur VEGFR-2. Ainsi, le récepteur du VEGF ne peut plus modifier les activités des cellules endothéliales. Cela diminue leur croissance et leur prolifération et dans un modèle de cancer de la prostate chez le rat, réduit la quantité de microvaisseaux formés.¹⁵⁵

Comme l'angiogénèse est un processus qui contribue au développement des tumeurs primaires et à la dissémination des métastases,¹³ l'inhibition de ce phénomène par le PCK3145 pourrait aider à limiter l'expansion de plusieurs types de cancers.

3.3 PCK3145 et cancers hématologiques

Le premier argument qui suggère que le PCK3145 pourrait être utilisé efficacement dans le traitement des cancers hématologiques est que les métastases du cancer de la prostate se disséminent principalement au niveau des os.¹⁵⁶ Ainsi, la possibilité que le PCK3145 puisse avoir des effets sur d'autres cancers infiltrant la moelle osseuse et les os doit être envisagée. Les cancers hématologiques sont des cancers qui prennent non seulement naissance dans la moelle osseuse,⁵³ mais ils induisent aussi des lésions osseuses.¹⁵⁷ Certains lymphomes peuvent aussi se développer dans les os ou se disséminer à la moelle osseuse.^{158,159} Il est alors plausible que des caractéristiques communes existent entre les cellules tumorales prostatiques et les cellules malignes hématologiques comme par exemple, l'expression de molécules d'adhésion spécifiques.³⁸ Ainsi, plusieurs cancers hématologiques comme des leucémies myéloïdes aiguës¹⁵⁶ et des lymphomes agressifs^{160,161} possèdent à leur surface le récepteur 67LR auquel se lie le PCK3145, ce qui pourrait lui permettre d'agir sur ces cellules cancéreuses.

Ensuite, plusieurs cancers hématologiques entraînent une augmentation de l'angiogénèse dans la moelle osseuse ou dans les organes qu'ils colonisent.^{70,71,114,123} De plus, des cellules leucémiques^{71,74,76} possèdent à leur surface des récepteurs VEGFR-2 qui leur procurent des signaux de survie.

L'inhibition de la phosphorylation de VEGFR-2 par le PCK3145 pourrait diminuer l'intensité des signaux de survie et favoriser la mort de ces cellules leucémiques.¹⁵⁵ Le récepteur VEGFR-2 est essentiel au développement de nouveaux vaisseaux sanguins capables de soutenir la prolifération et l'apport en nutriments des cancers hématologiques.¹⁶²

Enfin, le PCK3145 inhibe la sécrétion et l'activité de MMP-9 qui est exprimée par de nombreuses cellules leucémiques,⁶⁶⁻⁶⁸ lymphomateuses et myélomateuses.^{67-69,109,125} Dans les cancers hématologiques, MMP-9 favorise la dégradation des membranes basales, stimule la migration des cellules et le développement de foyers métastatiques secondaires.^{110,123} L'inhibition de ces processus pourrait faciliter le traitement de ces néoplasies hématologiques.

4. Description du projet de recherche

4.1 Problématique

Les cancers hématologiques sont fréquents et encore difficiles à guérir malgré les progrès de la médecine; aussi, de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être développées. Alors que les traitements actuels causent beaucoup de morbidité, le PCK3145 est sécuritaire et très bien toléré.¹⁴⁵ Ses effets inhibiteurs sur la croissance tumorale, les métastases et l'angiogénèse pourraient améliorer les traitements des cancers hématologiques.^{133,155}

4.2 Objectifs

Mon projet de recherche avait donc pour but de déterminer l'effet du PCK3145 sur les cancers hématologiques. Pour ce faire, nous avons procédé à des expériences *in vitro* et *in vivo* sur plusieurs lignées de cancers hématologiques humaines et murines. Nous avons également étudié les mécanismes d'action impliqués dans les effets du PCK3145 sur les cancers hématologiques.

4.3 Procédure expérimentale

4.3.1 Expériences *in vitro*

Des expériences *in vitro* nous ont permis de mesurer l'effet du PCK3145 sur la prolifération cellulaire et la capacité clonogénique des cellules hématologiques malignes. Nous avons également évalué l'apoptose et l'expansion de ces cellules en présence de PCK3145.

Afin d'étudier les mécanismes d'action du PCK3145, nous avons mesuré l'effet du PCK3145 sur la sécrétion de MMP-9 dans le milieu extracellulaire de plusieurs lignées hématologiques.

4.3.2 Expériences *in vivo*

De plus, deux modèles murins ont été utilisés pour vérifier l'effet du PCK3145 sur le développement des tumeurs hématologiques *in vivo*. Le premier consistant en un modèle syngénique avec de mastocytome de souris. Nous avons mesuré l'impact du PCK3145 administré en traitement sous-cutané ou intrapéritonéal sur la croissance des tumeurs, la dissémination des métastases et la sécrétion de MMP-9 dans le sang périphérique. Dans le second modèle, il s'agissait de xénogreffe dans des souris dont l'immunité spécifique était déficiente. Ce modèle nous a permis d'évaluer l'effet du PCK3145 sur la progression d'un lymphome humain *in vivo*.

L'effet du PCK3145 a été comparé au véhicule seul et à deux peptides dont l'un correspondait aux acides aminés 52 à 66 de la PSP-94 et l'autre, contenait les mêmes acides aminés que le PCK3145, mais alignés dans un ordre aléatoire (peptide aléatoire).

ARTICLE

DÉCLARATION DE PARTICIPATION SIGNIFICATIVE À L'ARTICLE

Par la présente, je déclare avoir participé de façon importante aux travaux présentés dans l'article autant dans la préparation des expériences que dans leur exécution. De plus, j'ai participé de façon significative à la rédaction de cet article.

Les figures présentant des résultats de test MTT ont été réalisées en collaboration avec Cynthia Thérien (Figure 1A, 5A et 5B). Les expériences *in vivo* incluant les courbes de croissance des tumeurs et les expériences sur les métastases avec P815 ont été réalisées par moi (Figure 2 et 3). La zymographie présentée en Figure 4A a été réalisée par Cynthia Thérien alors que la zymographie en Figure 4B sur la sécrétion des tumeurs a été faite par moi. Les tests ELISA ont été effectués par moi. Finalement, Cynthia Thérien a participé également à une des expériences avec les cellules SR dans les souris NOD/SCID présentées en Figure 6.

Mireille Guérin

**SYNTHETIC 15-MER PEPTIDE (PCK3145) DERIVED FROM PROSTATE
SECRETORY PROTEIN HAS *IN VITRO* AND *IN VIVO* ACTIVITY AGAINST
NON-HODGKIN'S LYMPHOMA AND OTHER HEMATOLOGIC
MALIGNANCIES.**

Mireille Guérin*, Cynthia Thérien*, Gorazd Krosl* et Denis Claude Roy*

Division of Hematology-Immunology, Hôpital Maisonneuve-Rosemont Research
Center; Department of Medecine, Université de Montréal, Montreal, Canada.

Key words: Non-Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, mastocytoma, matrix
metalloproteinase-9 (MMP-9), metastasis, angiogenesis, xenograft model.

Correspondence to: Denis Claude Roy
Division of Hematology-Oncology
Hôpital Maisonneuve-Rosemont Research Center
5415 L'Assomption Blvd.
Montreal, QC, H1T 2M4, Canada
Tel.: (514) 252-3400
Fax: (514) 252-3430

ABSTRACT

PCK3145 has been shown to exert anti-tumor activity against prostate cancer cells. To determine whether PCK3145 could exert cytotoxic activity against other marrow infiltrating cancers, we tested its activity against hematologic cancers. Interestingly, PCK3145 inhibited the proliferation of human NHL (SR) and myeloma (RPMI-8226) cell lines and murine mastocytoma (P815) cell line *in vitro*. Moreover, PCK3145 reduced the clonogenicity of these cell lines. To explore its activity *in vivo*, DBA/2 mice were injected subcutaneously with P815 cells. PCK3145 treatment significantly decreased P815 tumor growth in comparison to PBS ($p<0.001$), scrambled peptide ($p<0.05$) and PCK5266 (amino acids 52-66 of PSP-94) ($p<0.01$). Intraperitoneal PCK3145 treatment led to a decreased number of liver metastases compared to PBS ($p<0.05$) and scrambled peptide ($p<0.05$). MMP-9 levels, as measured by ELISA, in the peripheral blood of treated P815 bearing mice were similar to those obtained with healthy animals (12.8 ± 1.9 (mean \pm SD) ng/ml and 6.5 ± 0.4 ng/ml, respectively), while MMP-9 levels were elevated in mice treated with PBS and scrambled peptide (35.1 ± 8.6 ng/ml and 22.60 ± 3.9 ng/ml, respectively; $p<0.05$). In NOD/SCID mice PCK3145 treatment resulted in significant inhibition of human NHL SR growth compared to treatment with PBS ($p<0.001$) and scrambled peptide ($p<0.01$). Consequently, treatment with PCK3145 can reduce tumor cell proliferation of murine and human hematologic cancers. In addition, PCK3145 has the potential to inhibit tumor cell dissemination by lowering MMP-9 secretion. Thus, PCK3145 represents a unique peptide demonstrating sequence-specific anti-tumor activity in hematologic malignancies.

Abbreviation used in this paper: MM: Multiple Myeloma, MMP-9: Matrix Metalloproteinases-9, mRNA: messenger RNA, NHL: Non Hodgkin Lymphoma, NOD/SCID: Non Obese Diabetic/Severe Combined Immuno-Deficient, PBS: Phosphate Buffered Saline, PSP-94: Prostate Secretory Protein of 94 amino acids, 67LR: laminin receptor of 67kDa, PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, s.c.: subcutaneous, i.p.: intraperitoneal, NF-kB: Nuclear Factor kB, VEGF: vascular endothelial growth factor, VEGFR-2: vascular endothelial growth factor receptor-2.

INTRODUCTION

Although major advances were achieved in the treatment of hematologic malignancies such as leukemias, lymphoma and multiple myeloma, most of these patients still succumb to their disease.^{1,2} Attempts to improve upon these results have usually focussed on intensified chemotherapy protocols and stem cell transplantation. While such approaches are yielding interesting results, maximal initially tolerable doses have been reached.^{3,4} There is a need for the development of targeted therapies with low toxicity profiles.

The PCK3145, a synthetic peptide which consists in amino acids 31 to 45 of the prostate secretory protein composed of 94 amino acids (PSP-94),⁵ represents an interesting candidate for the treatment of hematological malignancies. Indeed, PSP-94 has been shown to inhibit prostate cancer tumor growth and to reduce bone metastases in rats in a dose-dependent manner.⁶ Subsequently, PCK3145 has been found to be sufficient to achieve the anticancer activity described for PSP-94.⁵ Moreover, in a phase 1 clinical trial on patients with advanced prostate cancer, PCK3145 was shown to be safe and well tolerated, and stabilization of the disease was observed in several individuals.⁷

Similarly to prostate cancer, hematological malignancies are known to metastasize to the bones⁸ In addition, bone destruction is a hallmark of multiple myeloma.⁹ Moreover, PCK3145 exerts some of its inhibitory effects through the binding with 67LR laminin receptors which is present on 67LR anaplastic large cell lymphomas and in small

subsets of high-grade B cell non- Hodgkin's or Hodgkin's lymphomas.^{10,11} Another laminin receptor, $\alpha 3\beta 1$ integrin, also targeted by PCK3145¹⁰ is also known to regulate HuR, a factor that controls mRNA stability of a major metalloproteinase involved in cancer invasion and metastasis spreading, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).¹²⁻¹⁴ To break extra cellular matrix and metastasize to other organs, some human malignant lymphoma subsets secrete MMP-9 and the levels of secretion correlate with patient outcome.^{15,16} Additionally, multiple myeloma cell lines and primary MM cells secrete MMP-9 and this secretion can also be correlated with the disease progression.^{17,18} Therefore, PCK3145 could inhibit hematological malignancies progression and invasiveness through the inhibition of MMP-9 secretion.

In this study we show, for the first time, that PCK3145 can have an inhibitory effect on hematological malignancies and also prevent their spread. PCK3145 treatment reduced the proliferation and the clonogenic capacity of murine mastocytoma, human non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and multiple myeloma (MM) cells *in vitro*. Moreover, PCK3145 dwarted the growth of subcutaneously grown malignant cells in both a syngeneic and human NOD/SCID xenograft model. Treatment with PCK3145 also prevented metastatic spread while decreasing MMP-9 secretion in peripheral blood. Thus, these results with murine and human cells studied under *in vitro* and also *in vivo* conditions identify anti-tumor activity of PCK3145 against hematologic cancers, and uncover a pathogenic pathway.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

PCK3145, PCK5266 and scrambled peptide were produced by Ambrilia Biopharma Inc (Montreal, Quebec, Canada). PCK3145 is a synthetic peptide that corresponds to amino acids 31 to 45 of the PSP-94, PCK5266 corresponds to amino acids 52 to 66 of PSP-94 and the scrambled peptide contains the same amino acids as PCK3145 but in random order.

Cell lines

Mouse mastocytoma cells (P815), human large cell immunoblastic lymphoma (SR), human myeloma (RPMI8226) and human acute monocytic leukemia (THP-1) were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and grown as suggested by the ATCC.

Cell proliferation analysis

P815, SR and RPMI8226 cells were plated in 96-well flat-bottom plates (Sarstedt, Newton, NC, USA) in 100 µl of appropriate media and exposed to PCK3145, scrambled peptide (250 µg/ml) or medium only on alternate days. Cell proliferation was determined on day 8 for P815 and SR cells and day 21 for RPMI8226 cells using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction (MTT) assay following the manufacturer's procedure (ATCC).

Clonogenic assay

Cells were treated with PCK3145 for one (day 0) or two doses (day 0 and 2) doses in 24-well plates (Sarstedt). After 3 days, 200 cells for P815 and SR, or 500 cells for RPMI8226 were replated in semi-solid media (Methocult, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) to evaluate clonogenic capacity. Colonies were counted after 8 days for P815, or 14 days for SR and RPMI8226 cells.

MMP-9 secretion

To measure MMP-9 secretion by P815 cells *in vitro*, cells were washed 3 times to remove serum. P815 cells or THP-1 positive control cells were resuspended in 200 μ l medium without serum and incubated for 48 hours in 96-well microwell plates in the presence or absence of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, ON, Canada) which induces MMP-9 secretion. Cells were pelleted by centrifugation (4500g for 1 minute at 4°C) and resuspended in 20 μ l of a nonreducing sample buffer (0.4 M Tris, pH 6.8, 5% sodium dodecyl sulfate [SDS], 20% glycerol, 0.05% bromophenol blue. Samples were loaded on 10% SDS-polyacrylamide gels, containing 0.1% porcine skin gelatin (Type A, Sigma-Aldrich Canada Ltd.) After electrophoresis, the gels were washed twice with 2.5% Triton-X buffer (500 mM Tris (pH 6.8), 38 mM CaCl₂ and 33 mM Na₂N₂) for 1 h at room temperature and then incubated overnight at 37°C with 1% Triton-X buffer. Gels were stained with 0.5% Coomassie blue, 50% methanol and 10% acetic acid for 30 minutes and washed in 50 % methanol, 10 % acetic acid to visualize the proteolytic bands. (AlphaImager, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON, Canada). MMP-9 was also quantified in the supernatant and

in serum (intra-cardiac puncture) using the Mouse Pro-MMP-9 Quantikine ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA).

***In vivo* experiments**

DBA/2 mice (6-8 week old) were obtained from Charles River Laboratories (Kingston, NY, USA). NOD/SCID mice were bred in the animal facility of hospital Maisonneuve-Rosemont (HMR). All experimental procedures were approved by HMR Animal Care and Ethic Committee.

Tumor growth and metastases study

P815 tumors were initiated by injecting 2×10^4 cells subcutaneously (s.c.) into the right flank of DBA/2 mice. When tumors became palpable (5-9 days post inoculation), 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PCK3145, scrambled peptide, or PCK5266 were injected subcutaneously five days per week. Additional control group consisted of carrier (PBS only) treatment. Tumor size was determined by measuring two orthogonal diameters using vernier calipers and volume calculated using formula: $V = \frac{l * w^2}{2}$, where l is a length and w is a width of the tumor. Control and treated mice were sacrificed when largest diameter reached 17 mm for ethical reasons.

For SR tumors, 5×10^6 cells were injected s.c. into right flanks of 6 weeks old NOD/SCID mice that were exposed to 325 cGy $\gamma^{137}\text{Cs}$ total body irradiation 24 hours earlier. Treatment and tumor volume determination were performed as in the P815 tumor model.

To study the effect of PCK3145 on metastases development, mice were sacrificed 14 days after the start of treatment and livers, peripheral blood and tumors were recovered for analysis.

Histological analysis

Livers were fixed in 10% buffered formalin and sent to Maisonneuve-Rosemont hospital pathology laboratory where they were cut, paraffin embedded and stained with hematoxylin/phloxine, (Sigma-Aldrich Canada Ltd.). Metastases (revealed as darker blue nodules of tightly packed cells) were counted at 100x magnification in 25 visual fields per section using optical microscope (Leitz Laborlux S, Wild Leitz, Germany).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM of at least triplicate determinations and statistical comparisons are based on the Student's *t* test or ANOVA. $p < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

PCK3145 inhibits proliferation and clonogenic capacity of P815 cells *in vitro*.

The impact of the treatment with PCK3145 on the proliferative capacity of hematologic malignant cells was first evaluated by culturing P815 cells for 7 days in the presence or absence of 250 $\mu\text{g/ml}$ PCK3145 and measuring survival in a MTT assay. In order to ensure that the effect was specific, a small peptide of the same size and same amino acid content but in random order was also used as control. Treatment with PCK3145 significantly reduced the proliferation of P815 cells compared to both medium only control and scrambled peptide (Fig 1A; OD = 1.21 ± 0.02 , 1.20 ± 0.03 and 1.08 ± 0.02 for control, scrambled peptide and PCK3145, respectively; $p < 0.001$ comparing to control and $p < 0.01$ comparing to scrambled peptide). Then, to test the clonogenicity of the PCK3145 treated P815 cells, a semi-solid media assay was initiated with cells that were exposed or not to one or two doses of 125 $\mu\text{g/ml}$ of PCK3145. Increasing PCK3145 treatment doses significantly decreased colony formation compared to control cells. (Fig 1B; 289.8 ± 14.90 , 233.0 ± 23.06 , 227.3 ± 17.64 for control, 1 dose and 2 doses of PCK3145, respectively; $p < 0.05$ comparing 2 doses of PCK3145 to control). These results indicate that PCK3145 has an inhibitory effect on P815 cells proliferation *in vitro* and also reduces clonogenic capacity of P815 cells.

PCK3145 decreases subcutaneous P815 tumor growth *in vivo*.

To determine if the observed *in vitro* inhibition of proliferation and clonogenicity by PCK3145 on P815 cells translates into an *in vivo* effect on tumor growth, DBA/2 mice were inoculated with P815 cells into the right flank.

PCK3145 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was administered subcutaneously for 30 days, 5 days per week, starting on the day when tumors became palpable. In order to investigate the possibility that a different portion of PSP-94 could also demonstrate anti-tumor activity, another 15 a.a peptide (PCK5266) was also used to treat the animals. A significant reduction in tumor volume was observed with mice that received PCK3145 treatment compared to vehicle control ($p < 0.001$) and both peptide controls, scrambled peptide ($p < 0.05$). In contrast PCK5266 ($p < 0.01$) did not impair tumor growth (Fig. 2A). Since the administration route could have had an effect on treatment efficacy, the same experiments were performed with the treatment administered intra-peritoneally. Similar to subcutaneous treatment, PCK3145 significantly decreased growth of P815 tumors (Fig. 2B) compared to vehicle control ($p < 0.001$), and scrambled peptide control ($p < 0.01$). These results indicate that PCK3145 can inhibit the growth of a hematological malignancy *in vivo* and moreover, that the effect is also sequence specific and independent of the administration route.

PCK3145 treatment decreases P815 liver metastases

Hematologic malignancies have a high propensity to disseminate systemically.^{19,20} Since P815 cells predominantly metastasize to the liver,²¹ we next evaluated the effect of intraperitoneal PCK3145 treatment on the dissemination kinetics of subcutaneously inoculated P815 tumors. Mice were sacrificed at day 14 of the treatment and livers were evaluated for the presence of metastatic nodules. In PCK3145 treated mice, the number of metastases was significantly decreased compared to the mice that received vehicle alone or scrambled peptide (Fig 3A; 356.7 ± 178.7 , 176.9 ± 125.3 and 1.0 ± 0.5 for vehicle control, scrambled peptide and PCK3145 treatment, respectively; $p < 0.05$

comparing PCK3145 with both, vehicle alone and scrambled peptide). Indeed, control mice livers were massively infiltrated by malignant cells (Fig 3B; left panel), while in contrast, PCK3145 treated mice livers contained very few metastatic nodules (Fig 3B; right panel). These results show that PCK3145 inhibits not only growth of primary P815 tumors, but also inhibits its metastatic dissemination and indicate that the effect of PCK3145 treatment is systemic.

Treatment with PCK3145 inhibits tumor-associated increase of MMP-9 serum levels.

One of the main pathways involved in tumor cell infiltration and dissemination is the secretion of MMP-9.²² To determine if such a mechanism may be involved in the inhibition of P815 tumor growth and metastatic dissemination, MMP-9 secretion from these cells was first analyzed *in vitro*. To ensure that MMP-9 had functional activity, its enzymatic potential was first measured using zymography, which assesses its ability to degrade gelatin. No secretion of MMP-9 was detected in *in vitro* cultured P815 cells. In addition, even cell stimulation with PMA, which is a strong inducer of MMP-9 secretion²³ failed to induce MMP-9 excretion (Fig 4A). Interestingly, when P815 cells were grown *in vivo* and then, placed in media, these tumors produced considerable amounts of MMP-9 indicating that the microenvironment altered the tissue infiltration capability of tumor cells (Fig 4B). To measure more precisely MMP-9 levels detected, ELISA assays were performed and showed that *in vivo* grown P815 cells secreted MMP-9, confirming findings with zymography assays (Fig 4C). Next, MMP-9 levels were measured in the peripheral blood of tumor-bearing mice, and found to be higher than in the peripheral blood of healthy mice. To determine if PCK3145 altered the tissue

infiltration potential of tumor cells, MMP-9 levels were measured in tumor-bearing mice treated with PCK3145, scrambled peptide or PBS. Mice that received PBS and scrambled peptide treatment had higher serum MMP-9 levels than healthy mice. (Fig 4D; MMP-9 (ng/ml): 6.48 ± 0.84 , 35.12 ± 8.56 and 26.42 ± 8.56 for healthy, PBS receiving and scrambled peptide receiving mice, respectively; $p < 0.05$ comparing MMP-9 levels in mice without tumor with both controls and tumor-bearing mice). In contrast, PCK3145 treated tumor-bearing mice MMP-9 serum levels were similar to those of healthy mice. (Fig 4D; MMP-9 secretion (ng/ml): 6.48 ± 0.84 , and 12.83 ± 1.89 for healthy and PCK3145 treated mice, respectively). These results indicate that MMP-9 secretion by tumor cells is induced *in vivo*. They also suggest that PCK3145 can inhibit tumor growth and metastatic dissemination through the inhibition of MMP-9 secretion by tumor cells.

PCK3145 reduces proliferation and clonogenic capacity of human lymphoma and myeloma cells.

We next wanted to determine whether the favorable effect of PCK3145 on murine tumors would also apply to human cancers. For this purpose, human hematological cancer cells representing common and deadly malignancies SR non-Hodgkin's lymphoma cells and RPMI8226 myeloma cells were treated with PCK3145. The expansion of cells exposed *in vitro* to 250 $\mu\text{g/ml}$ of PCK3145, scrambled peptide or medium alone was evaluated using an MTT assay. Treatment with PCK3145 significantly decreased the proliferation of SR and RPMI8226 cells compared to both scrambled peptide and medium alone controls. (Fig 5A; SR cell line OD = 0.65 ± 0.007 , 0.59 ± 0.0056 and 0.54 ± 0.0068 for control, scrambled peptide and PCK3145,

respectively; $p < 0.001$ comparing PCK3145 to control and scrambled peptide. Fig 5B; RPMI8226 cell line OD = 0.71 ± 0.017 , 0.72 ± 0.038 , 0.6085 ± 0.019 for control, scrambled peptide and PCK3145, respectively; $p < 0.05$ comparing PCK3145 to control and scrambled peptide). To ascertain the impact of short PCK3145 exposure on the clonogenicity of treated SR and RPMI8226 cells, cells were first treated or not with one or two doses of $125 \mu\text{g/ml}$ PCK3145 and plated in methylcellulose. Similarly to the results obtained with P815 cells, the number of colonies arising from cells that were treated with two doses of PCK3145 was significantly lower compared to control for both NHL and MM cells. (Fig 5C; SR; 514.4 ± 2.01 , 348.6 ± 41.5 , 311.5 ± 44.1 for control, 1 dose and 2 doses of PCK3145 respectively; $p < 0.05$ comparing 2 doses of PCK3145 to control; and Fig 5D; RPMI8226; 250.8 ± 31.75 , 152.3 ± 100.3 and 108.8 ± 28.75 for control, 1 dose and 2 doses of PCK3145, respectively; $p < 0.05$ comparing cells receiving 2 doses of PCK3145 and control cells). These results suggest that human non-Hodgkin's lymphomas and multiple myelomas are sensitive to PCK3145.

PCK3145 treatment has an inhibitory effect on subcutaneous growth of SR lymphoma in NOD/SCID xenograft model.

In order to determine whether the ability of PCK3145 to impair tumor growth *in vitro* could translate into a clinical benefit when administered *in vivo*, NOD/SCID mice were irradiated and inoculated with SR lymphoma cells subcutaneously and PCK3145 ($500 \mu\text{g/kg}$) was administered s.c. for 30 days, 5 days per week starting at the day when tumors became palpable. A significant reduction in tumor volume was observed with mice that received PCK3145 treatment compared to vehicle control ($p < 0.01$) and scrambled peptide ($p < 0.001$) (Fig. 6). This result shows for the first time that PCK3145

treatment can decrease the growth of human malignant non-Hodgkin's lymphoma *in vivo*.

DISCUSSION

In this study, we have evaluated for the first time the ability of PCK3145 to eliminate hematologic malignancies. Our results provide extensive evidence that PCK3145 exposure eliminates blood-borne cancer cells. Indeed, PCK3145 inhibited the proliferation of a large variety of cancer cells, including some of the most prevalent and lethal hematologic malignancies, such as non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma.

PCK3145 was found to eliminate P815 tumor cells using well known colorimetric assays. In addition, to determine whether cell mortality reflected the elimination of mature cells, instead of the more important progenitor cell subsets, clonogenic assays were also performed. Interestingly, incubation with PCK3145 inhibited the colony forming ability of tumor cells. This has major implications since the early replicating cells represent those cells ultimately responsible for tumor growth and dissemination.

To ensure that *in vitro* findings had biological significance and could translate into therapeutic applications, these same tumor cells (P815) were injected into syngeneic animals and treated with PCK3145. There was a sharp decrease in tumor cell proliferation in the animals receiving PCK3145. Although subcutaneous injections

cause very limited pain, it remained possible that these procedures could induce altered biologic and immune responses and contribute to the beneficial effect. Nevertheless, therapeutic benefit was observed while control animals received subcutaneous injections of saline or the same vehicle as PCK3145. In addition, animals treated with a peptide of the same length and same amino acid content, but with a different sequence were not able to generate the same positive effect. This treatment conditions indicates that the response is highly specific for the peptide sequence. A different sequence from the same protein was also used, but also failed to generate the desired beneficial effect. These results show that the small peptide selected has uniquely selective activity. The limited size of this peptide may represent a particularly favourable profile to limit side-effects and generate specific activity.

The decrease of P815 tumor volume observed with DBA/2 mice upon PCK3145 treatment could be due to many factors. First, PCK3145 may have slowed proliferation rate of tumors as seen in the *in vitro* experiments. Second, since higher levels of apoptosis have been reported previously for prostate cancer tumors treated with PCK3145,⁵ an increase in apoptotic activity may have contributed to observed decrease in tumor growth in our model. It has also been shown that PCK3145 activates the NF- κ B pathway,¹⁰ which can consequently lead to activation of pro-apoptotic pathway.^{24,25} Third, the reduction of the tumor growth could have been induced by PCK3145 mediated inhibition of phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2),²⁶ an important mediator of angiogenesis.²⁷ The resulting decrease in tumor vascularization would then lead to reduced growth due to oxygen and nutrient

deprivation.^{28,29} Since studies on hematological malignancies demonstrated that the autocrine stimulation of VEGFR-2 receptor by malignant cells secreting VEGF triggers survival signaling,^{30,31} the PCK3145 mediated inhibition of VEGFR-2 signaling could lead to decreased survival of malignant cells.

Importantly, the decrease in growth kinetics was not dependent on PCK3145 administration route. This implied that the effect of treatment is systemic and could have a beneficial effect on tumor dissemination. This was demonstrated by the fact that mice bearing P815 tumor that have been treated with PCK3145 presented almost no malignant infiltration in the liver for 14 days after the beginning of the therapy. In contrast, a significant metastatic infiltration was observed in livers from control (untreated or scrambled peptide treated) mice. Although this difference was lost on day 21 post beginning of the treatment, the time delay in metastatic dissemination suggests that the treatment had affected its kinetics.

There are several, not mutually exclusive, possible explanations for observed decrease in metastatic infiltration associated with PCK3145 treatment. Firstly, the decrease of the primary tumor growth kinetics most likely results in a delay in the metastatic dissemination process, since a certain “critical” tumor size is needed before dissemination can occur.³² Secondly, PCK3145 induced loss of clonogenicity observed *in vitro* may be another possible cause for decreased frequency of P815 cells capable of colonizing distant organs, resulting in slower metastasis formation in PCK3145 treated mice. Thirdly, tumor dissemination depends on enzymes and factors that allow passage

of cells through basement membrane barrier and microcapillaries, such as MMP-9 and VEGF,^{33,34} which have previously been shown to be negatively affected by PCK3145.^{10,26,35} Indeed, we have demonstrated that the level of MMP-9 in peripheral blood was significantly lower in mice treated with PCK3145, compared to untreated tumor-bearing animals. Interestingly, we also observed that the microenvironment in mice play a crucial role for the induction of MMP-9 secretion even in cells that have no MMP-9 excretion *in vitro*. This induction could be due to the presence of growth factors or cytokines and to the contact with the extracellular matrix that occur *in vivo*.³⁶ This induction of MMP-9 secretion was not observed in PCK3145 treated mice suggesting that this peptide interfere with these processes. In addition, this inhibition could be reinforced by the adherence of PCK3145 to its receptors 67LR and $\alpha 3\beta 1$ that leads to inhibition of HuR, which results in a destabilization of MMP-9 mRNA and subsequently in a decrease of MMP-9 secretion.^{10,14} Moreover, PCK3145 has also been shown to induce the shedding of CD44 which is the external docking receptor of MMP-9.^{10,37,38} A decrease in MMP-9 is likely at least in part responsible for observed decrease in liver infiltration, since MMP-9 is involved in the basement membrane degradation,³⁹ an important step in metastatic dissemination of tumor.⁴⁰ Moreover, MMP-9 is associated with increased VEGF and soluble kit ligand release, which promote angiogenesis and inflammation⁴¹ and this process is likely slowed in the PCK3145 treated animals due to decreased MMP-9 levels.

Furthermore, the reported inhibition of VEGFR-2 phosphorylation induced by PCK3145²⁶ could also be involved in the metastatic dissemination delay, since new

blood vessels are more permissive to migration of malignant cells.⁴² Further studies will be needed to fully elucidate which of numerous mechanisms are most important for PCK3145 induced inhibition on both primary tumor growth and its metastatic dissemination. More detailed knowledge of these mechanisms would allow for additional refining of the treatment protocol and combination of PCK3145 with other treatment protocols targeted for maximum effect on dissemination inhibition.

Finally, a reduction in human SR lymphoma growth kinetics in a xenograft model is the first demonstration that PCK3145 can affect the growth of human hematopoietic malignancy. Despite more human hematopoietic tumors have to be tested, there is an indication that PCK3145 could be effective in the treatment of human hematological malignancies. Similar to SR cell line, *in vitro* results obtained with human myeloma RPMI8226 cells are also predicting an inhibition of *in vivo* tumor growth kinetics by PCK3145 treatment in a xenograft model. Moreover, the presence of an inhibitory effect in NOD/SCID mice suggests that the specific (T and B cell mediated) immune response is not essential for PCK3145 effects, which indicates that treatment could be used in patients with deficient immune system due to myelosuppressive chemotherapy and/or radiotherapy.^{4,43,44}

Altogether, these results showed that PCK3145 decreases primary hematopoietic tumor growth and metastatic dissemination. Similar to prostate cancer patients, where PCK3145 treatment induced a decrease of MMP-9 secretion in peripheral blood,⁷ we have observed similar decrease in peripheral enzyme levels indicating that PCK3145-

mediated MMP-9 inhibition could play a role in treatment of hematological malignancies. Thus, PCK3145 could have beneficial effects for patients with lymphoma or myeloma by slowing the progression of their diseases. The clinical study performed on prostate cancer patient revealed that PCK3145 has a low toxicity profile. Indeed, in a combination with chemotherapeutic agent or other cytotoxic treatments, PCK3145 could increase the disease free period without adding severe adverse effects.⁷ Therefore, our results will support a clinical trial with patients that have lymphomas or myelomas.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. PCK3145 decreases proliferation and clonogenic capacity of P815 cells.

A. MTT assay of cell proliferation. Cells were plated at a concentration of 300 cells/ml and were treated or not with 250 mg/ml of PCK3145 or scrambled peptide on alternate days for 7 days. Bars represent mean of 18 wells \pm SEM. Control vs. PCK3145; $p < 0.001$. Scrambled peptide vs. PCK3145; $p < 0.01$.

B. Clonogenic assay. The cells were treated or not with one or two doses of PCK3145 (125 μ g/ml) during a 3 day culture and seeded in methylcellulose. After 7 days the number of colonies was determined. Bars represent mean \pm SEM of 6 petri dish in each group in 3 independent experiments. (Control vs. 2 doses of PCK3145 $p < 0.05$)

Figure 2. PCK3145 treatment inhibits P815 tumor growth in DBA/2 mice.

P815 cells (2×10^4) were injected s.c. in the right flank of DBA/2 mice and treated by peritumoral subcutaneous injection of 500 μ g/kg PCK3145, scrambled peptide and PCK5266 oligopeptide 5 times per week. Control groups received vehicle alone (PBS) or were left untreated. *A.* Tumor volumes of mice receiving s.c. treatment with PCK3145 (n=22), vehicle alone (n=21), scrambled peptide (n=15) and PCK5266 (n=7). Lines represent mean of 3 independent experiments \pm SEM. Significant differences were indicated by * ($p < 0.05$) ** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$). *B.* Tumor volumes of mice receiving i.p. treatment with PCK3145 (n=18) vehicle alone (n=18) and scrambled peptide (n=17).

Lines represent the mean of 3 independent experiments \pm SEM. Significant differences compared to scrambled are indicated by * ($p < 0.05$) on day 12, ** $p < 0.01$ on day 14. Significant differences compared to vehicle alone are $p < 0.01$ on day 12 and $p < 0.001$ on day 14 (not shown on figure).

Figure 3. PCK3145 decreases liver infiltration by P815 tumor cells in treated mice.

P815 cells (2×10^4) were injected s.c. in the right flank of DBA/2 mice. For PCK3145 and scrambled peptide groups, mice were injected intraperitoneally 5 times per week with 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of peptides. Control mice received vehicle alone (PBS). Mice were sacrificed at day 14. *A.* Bars represent mean \pm SEM of number of metastases observed in 25 visual fields at 100x magnification in livers of 8 mice from 2 independent experiments. PBS and scrambled peptide vs. PCK3145 $p < 0.05$. *B.* Representative histological preparation of a control liver (left panel) from PBS receiving mouse with several metastases (arrows) and a liver from PCK3145 treated mice (right panel) with no detectable metastases.

Figure 4. Treatment with PCK3145 inhibits increased tumor-associated MMP-9 serum levels.

A. Different cell lines were cultured for 48 hours in serum free media, which was subsequently analyzed for presence of secreted MMP-9 by zymography. White bands correspond to the areas of gelatin degradation by MMP-9. THP1 cells were used as positive control and secreted MMP-9 *in vitro* (lane 1). PMA induction of THP1 MMP-9 secretion causes a larger area of degradation (lane 2). No MMP-9 secretion was detected for P815 cells without or with PMA induction (lane 3 and 4).

B. In vivo MMP-9 secretion by P815 cells:, tumors were extracted 14 days after they became palpable and overlaid with serum-free media for 72 hours in a 24-well plate. Media was analyzed for MMP-9 secretion by zymography. THP1 cells were used as positive control and secreted MMP-9 (lane 1 and 2). Media samples from 6 different tumors were loaded on gel. For each tumor, areas of degradation have been observed (lane 3 to 8). *C. MMP-9 evaluation in peripheral blood of P815 tumor bearing mice:* Peripheral blood was obtained by intra cardiac punctures 14 days after tumors became palpable and MMP-9 secretion in peripheral blood was evaluated by ELISA. Bars represent means \pm SEM of 15 mice for PBS, 12 mice for scrambled peptide, 12 mice for PCK3145 and 7 mice for mice without tumor in two independent experiments. Mice without tumor vs. PBS and scrambled peptide; $p < 0.05$. Mice without tumor vs. PCK3145; $p > 0.05$. PCK3145 vs. PBS and scrambled peptide; $p < 0.05$.

Figure 5: PCK3145 reduces proliferation and clonogenic capacity of human lymphoma cells (SR) and human myeloma cells (RPMI8226). *A. MTT assay:* SR cells were plated at a concentration of 2×10^4 cells/well and were treated or not with 250 mg/ml PCK3145 or scrambled peptide on alternate days for 8 days. Bars represent means \pm SEM of 18 wells. Control vs. PCK3145; $p < 0.001$. Scrambled peptide vs. PCK3145; $p < 0.001$. *B. Clonogenic assay:* Cells were treated or not with one or two doses of PCK3145 (125 μ g/ml) during 3 days in suspension culture and then plated in methyl cellulose. Number of colonies was determined 14 days later. Bars represent mean \pm SEM of 6 Petri dishes in 3 independent experiments. Control vs. 2 doses of PCK3145; $p < 0.05$.

C. *MTT assay with* RPMI8226 cells plated at 333 cells/well and treated or not 250 mg/ml of PCK3145 or scrambled peptide on alternate days for 21 days. Control vs. PCK3145; $p < 0.05$. Scrambled peptide vs. PCK3145; $p < 0.05$.

D. *Clonogenic assay* RPMI8226 cells were treated or not with one or two doses of PCK3145 (125 $\mu\text{g/ml}$) during 3 days in suspension culture and then plated in semi solid media. After 14 days number of colonies was evaluated. Bars represent mean \pm SEM of 6 Petri dishes in 3 independent experiments. Control vs. 2 doses of PCK3145; $p < 0.05$.

Figure 6: Subcutaneous treatment with PCK3145 decreases human lymphoma SR subcutaneous tumor growth kinetics NOD/SCID mice. Sublethally irradiated (3.25 Gy) NOD/SCID mice were injected s.c. with 5×10^6 SR cells NOD/SCID. Mice were treated s.c. with 500 $\mu\text{g/kg}$ of PCK3145, scrambled peptide or with PBS alone 5 days per week starting at day when tumors became palpable. Tumor volumes of mice treated with PCK3145 (n=22), vehicle alone (n=21), scrambled peptide (n=15) and PCK5266 (n=7) were measured 3 times per week. Lines represent mean \pm SEM of 13 mice in 2 independent experiments. Significant differences were indicated by ** ($p < 0.01$) for PBS vs. PCK3145 and *** ($p < 0.001$) for scrambled peptide vs. PCK3145.

FIGURE 1

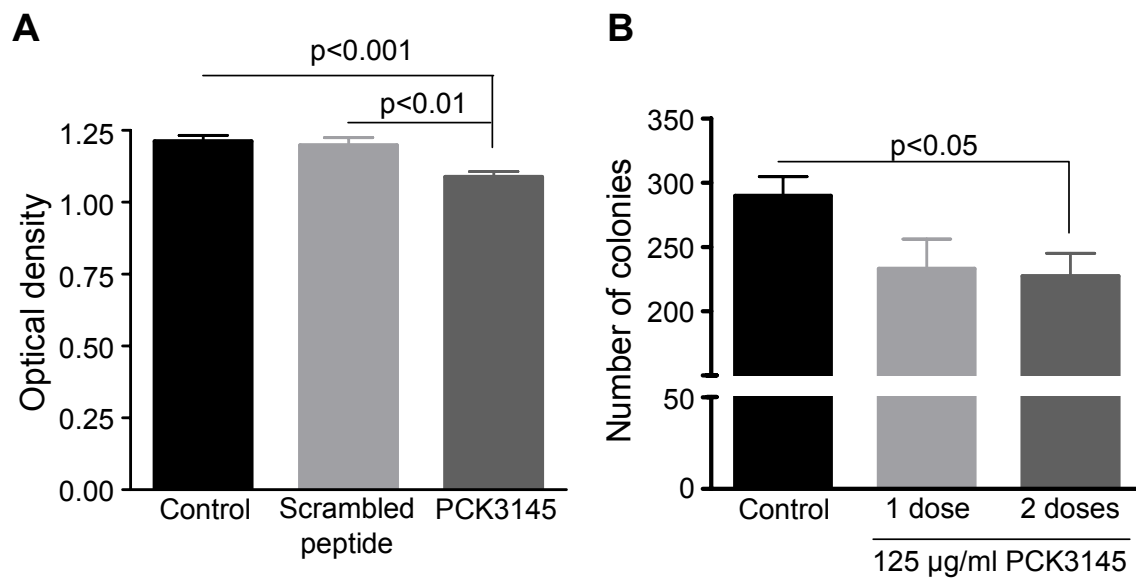


FIGURE 2

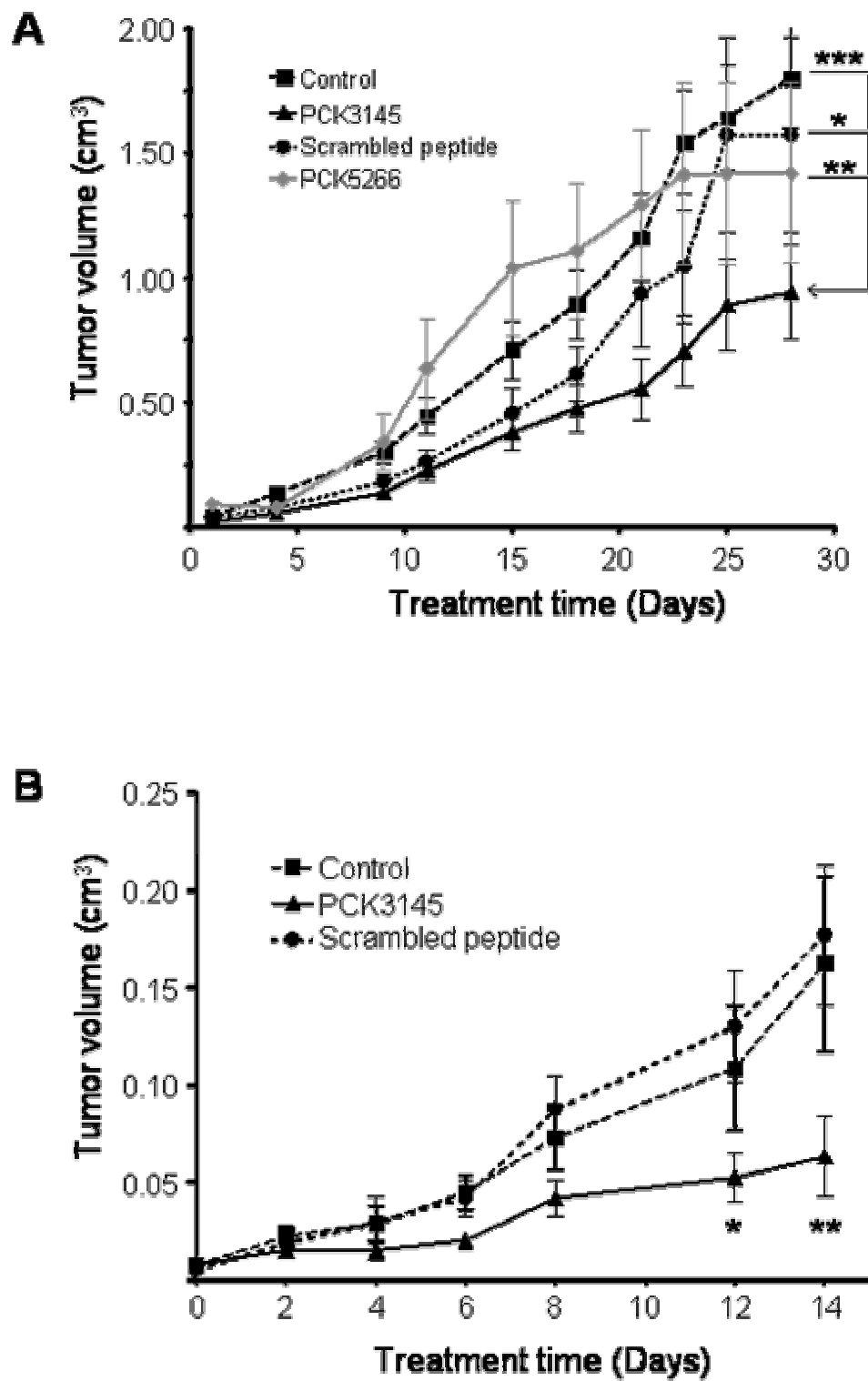


FIGURE 3

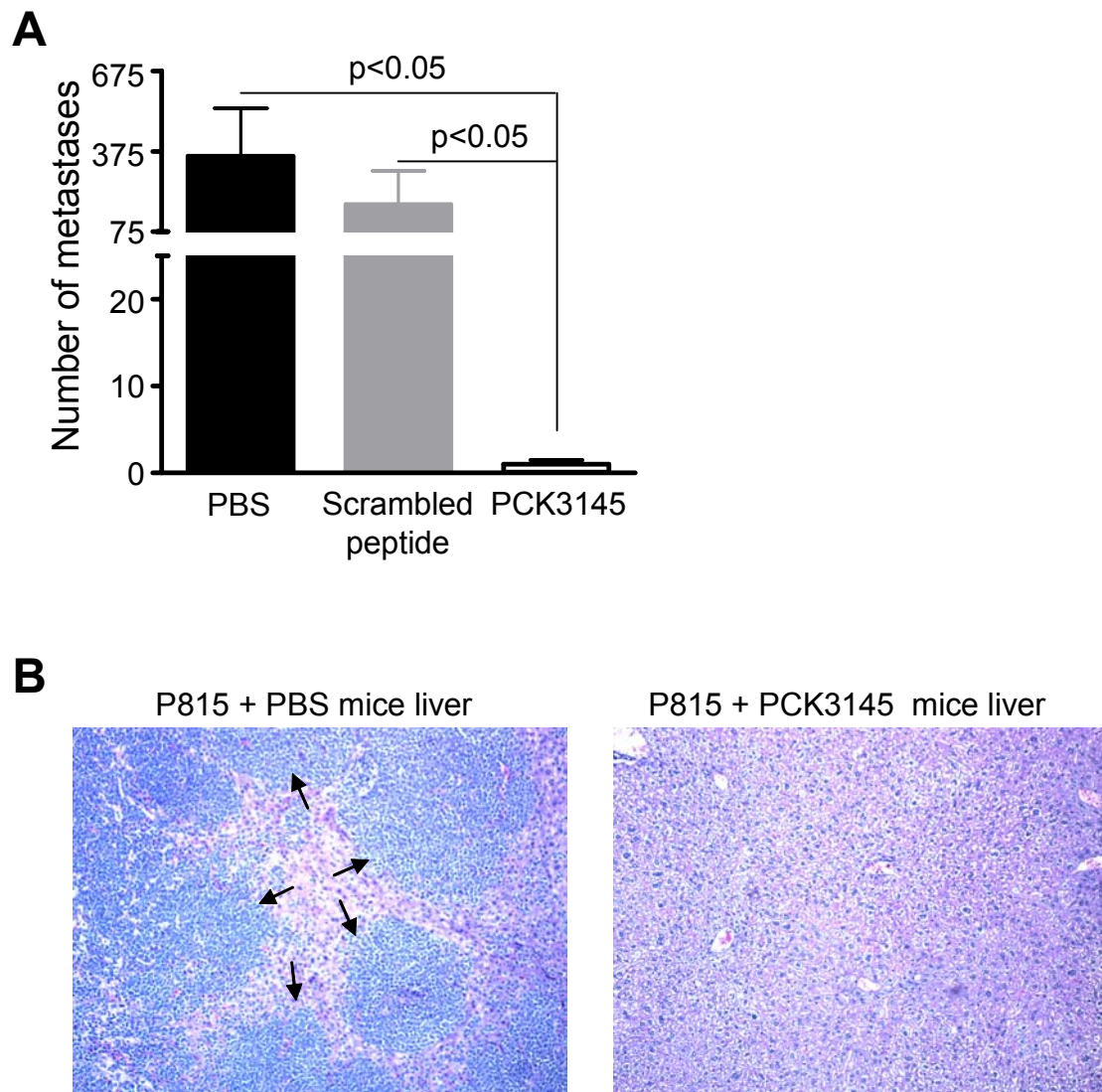


FIGURE 4

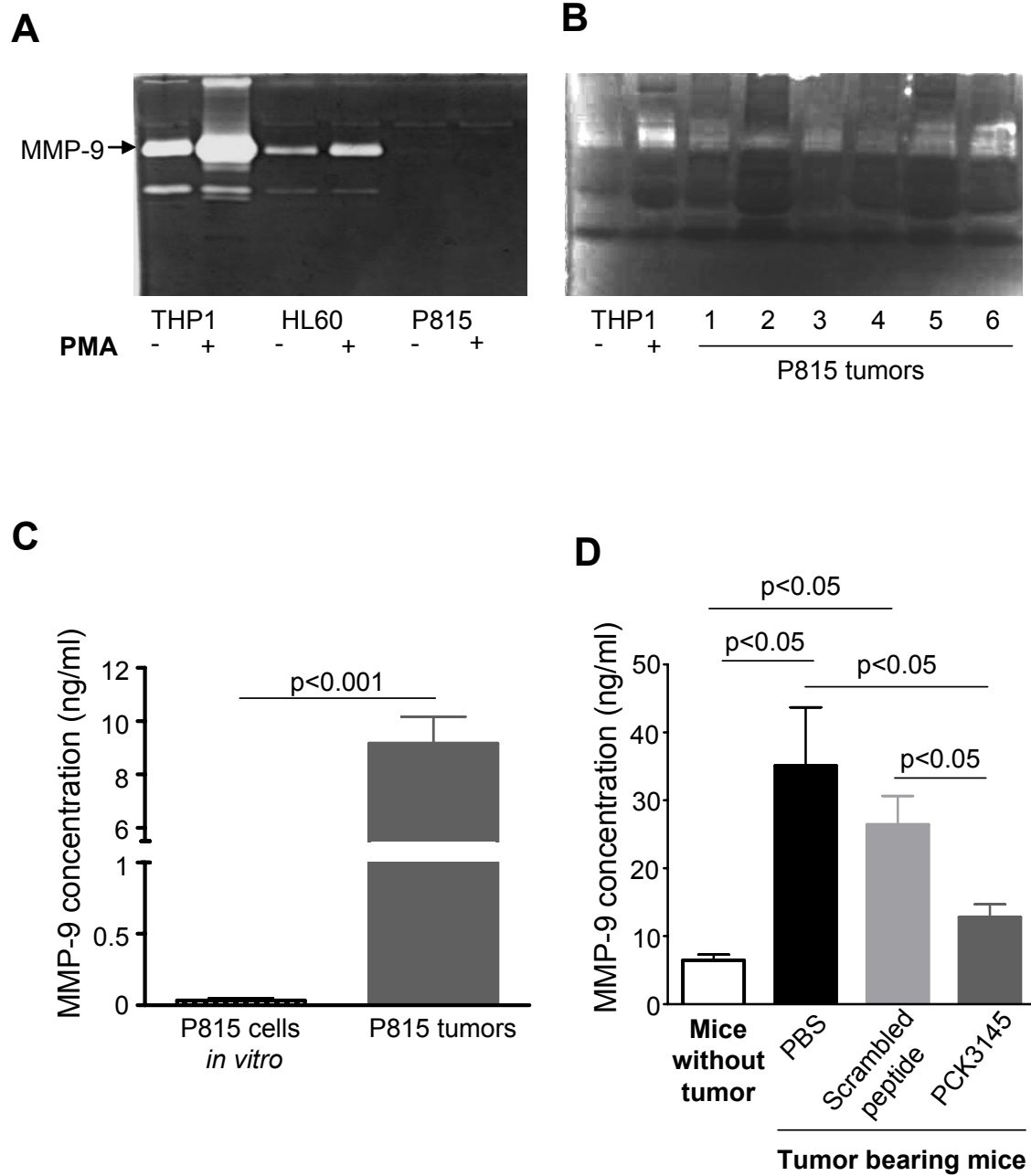


FIGURE 5

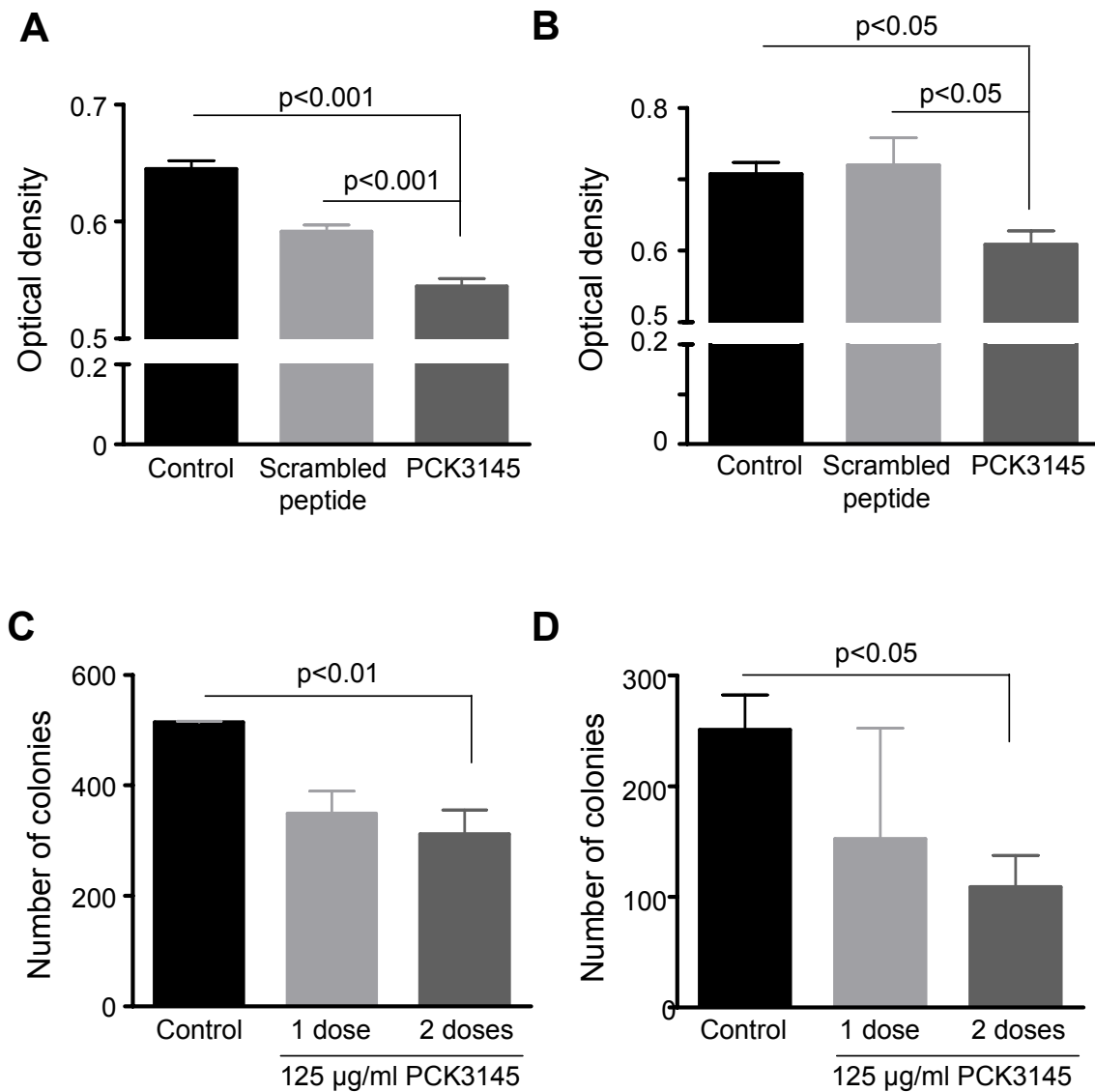
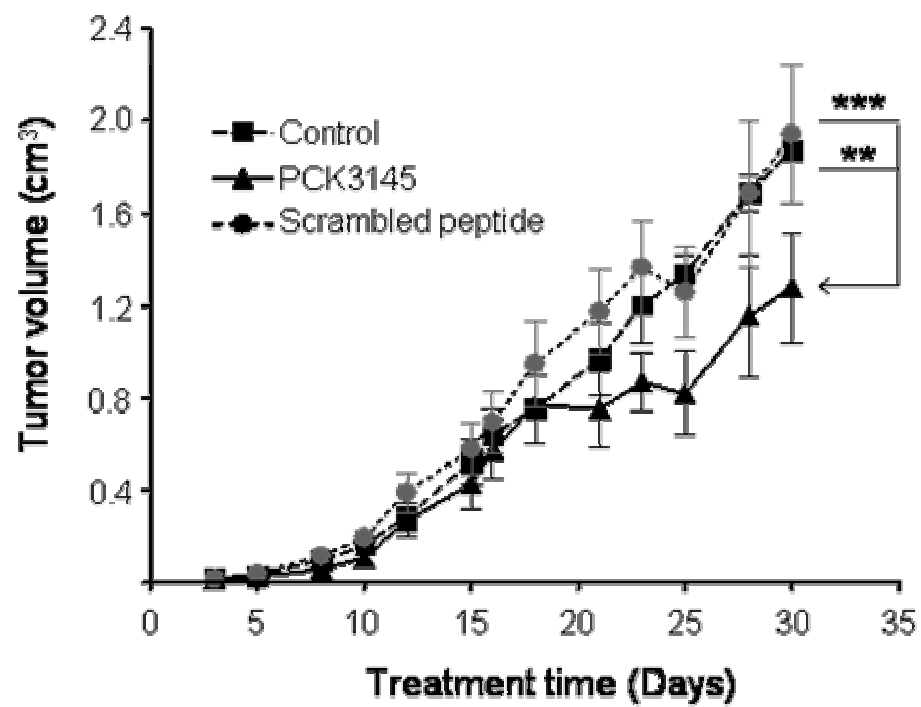


FIGURE 6



References

1. Wu XH, Zhou HJ, Lee J. Dihydroartemisinin inhibits angiogenesis induced by multiple myeloma RPMI8226 cells under hypoxic conditions via downregulation of vascular endothelial growth factor expression and suppression of vascular endothelial growth factor secretion. *Anticancer Drugs*. 2006;17:839-848.
2. Cooper AC, Karp RM, Clark EJ, et al. A novel methionine aminopeptidase-2 inhibitor, PPI-2458, inhibits Non-Hodgkin Lymphoma proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res*. 2006;12 (8):2583-2590.
3. Sierra J, Martino R, Sanchez B, Pinana JL, Valcarcel D, Brunet S. Hematopoietic transplantation from adult unrelated donors as treatment for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:425-437.
4. van Tiel FH, Harbers MM, Kessels AG, Schouten HC. Home care versus hospital care of patients with hematological malignancies and chemotherapy-induced cytopenia. *Ann Oncol*. 2005;16:195-205.
5. Shukeir N, Arakelian A, Chen G, et al. A synthetic 15-mer peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia. *Cancer Res*. 2004;64:5370-5377.
6. Shukeir N, Arakelian A, Kadhim S, Garde S, Rabbani SA. Prostate secretory protein PSP-94 decreases tumor growth and hypercalcemia of malignancy in a syngenic *in vivo* model of prostate cancer. *Cancer Res*. 2003;63:2072-2078.
7. Hawkins RE, Daigneault L, Cowan R, et al. Safety and tolerability of PCK3145, a synthetic peptide derived from prostate secretory protein 94 (PSP94) in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2005;4:91-99.
8. Yun HK, Shin MG, Bo D, et al. [Laboratory evaluation of bone marrow metastasis: single institute study]. *Korean J Lab Med*. 2007;27:96-101.
9. Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*. 2006;108:3992-3996.
10. Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, et al. Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling. *Anticancer Drugs*. 2006;17:429-438.
11. Carbone A, Gloghini A, Colombatti A, Castronovo V, Menard S. Expression of the monomeric 67-kd laminin-binding protein in human lymphomas as defined by MLC5 monoclonal antibody and paraffin section immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1995;26:541-546.
12. Iyer V, Pumiglia K, Di Persio CM. $\alpha 3\beta 1$ integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *Journal of Cell Science*. 2005;118:1185-1195.
13. Huwiler A, Akool E-S, Aschrafi A, Hamada FMA, Pfeilschifter J, Eberhardt W. ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *J Biol Chem*. 2003;278:51758-51769.
14. Westermarck J, Kähäri V-M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal*. 1999;13:781-792.
15. Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, et al. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of

- metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*. 1999;94:2080-2089.
16. Citak EC, Oguz A, Karadeniz C, Akyurek N. Role of gelatinases (MMP-2 and MMP-9), TIMP-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), and microvessel density on the clinicopathological behavior of childhood non-Hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 2008;25:55-66.
 17. Vande Broek I, Asosingh K, Allegaert V, et al. Bone marrow endothelial cells increase the invasiveness of human multiple myeloma cells through upregulation of MMP-9: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Leukemia*. 2004;18:976-982.
 18. Alexandrakis MG, Sfiridaki A, Miyakis S, et al. Relationship between serum levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-9 with biochemical markers of bone disease in multiple myeloma. *Clinica Chimica Acta*. 2007;379:31-35.
 19. Pejovic T, Schwartz PE. Leukemias. *Clin Obstet Gynecol*. 2002;45:866-878.
 20. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32:290-292.
 21. Demehri S, Corbin A, Loriaux M, Druker BJ, Deininger MW. Establishment of a murine model of aggressive systemic mastocytosis/mast cell leukemia. *Exp Hematol*. 2006;34:284-288.
 22. Basset P, Okada A, Chenard MP, et al. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol*. 1997;15:535-541.
 23. Park JM, Kim A, Oh JH, Chung AS. Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*. 2007;28:837-847.
 24. Tabruyn SP, Griffioen AW. NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis*. 2008;11:101-106.
 25. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem*. 2000;267:3828-3835.
 26. Lamy S, Ruiz MT, Wisniewski J, et al. A prostate secretory protein94-derived synthetic peptide PCK3145 inhibits VEGF signalling in endothelial cells: implication in tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2006;118:2350-2358.
 27. Dong X, Han ZC, Yang R. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62:105-118.
 28. Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, et al. Bortezomib mediated antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Research*. 2006;66 (1):184-191.
 29. Aragon-Ching JB, Dahut WL. The role of angiogenesis inhibitors in prostate cancer. *Cancer J*. 2008;14:20-25.
 30. Dias S, Hattori K, Zhu Z, et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest*. 2000;106(4):511-521.

31. Dias S, Shmelkov SV, Lam G, Rafii S. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood*. 2002;99:2532-2540.
32. Withers HR, Lee SP. Modeling growth kinetics and statistical distribution of oligometastases. *Semin Radiat Oncol*. 2006;16:111-119.
33. Yodkeeree S, Garbisa S, Limtrakul P. Tetrahydrocurcumin inhibits HT1080 cell migration and invasion via downregulation of MMPs and uPA. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29:853-860.
34. Yang EV, Donovan EL, Benson DM, Glaser R. VEGF is differentially regulated in multiple myeloma-derived cell lines by norepinephrine. *Brain Behav Immun*. 2008;22:318-323.
35. Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, et al. A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding: implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2005;22:429-439.
36. Woessner JF. The matrix metalloproteinases family. In: Park WC, Mecham RP, eds. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego: Academic Press; 1998:1-14.
37. Bourguignon LY, Gunja-Smith Z, Iida N, et al. CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 1998;176:206-215.
38. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*. 1999;13:35-48.
39. Liotta LA, Trygguason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastasis potential correlate with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 1980;284:67-68.
40. van Hinsbergh VWM, Engelse MA, Quax PHA. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:716-728.
41. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25:9-34.
42. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*. 1997;79:233-269.
43. Cheson BD. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphomas. *Curr Drug Targets*. 2006;7:1293-1300.
44. Mac Manus M, Lamborn K, Khan W, Varghese A, Graef L, Knox S. Radiotherapy-associated neutropenia and thrombocytopenia: analysis of risk factors and development of a predictive model. *Blood*. 1997;89:2303-2310.

DISCUSSION

5. Discussion

Les leucémies, les lymphomes et les myélomes sont des cancers fréquents.¹ Les conséquences de ces néoplasmes peuvent être très graves puisqu'ils empêchent le déroulement de l'hématopoïèse normale, entraînant de l'anémie, des hémorragies et des infections potentiellement mortelles.⁵³ Les traitements présentement utilisés comme la chimiothérapie et les greffes de moelle osseuse causent des effets secondaires aux patients.⁸² De plus, comme l'efficacité de ces traitements est limitée beaucoup de patients n'atteignent pas une rémission complète. Aussi, les rechutes sont malheureusement très fréquentes.⁸⁰ Par ailleurs, on sait que les mécanismes d'invasion tumorale comme la sécrétion de protéases et l'angiogénèse participent au développement des cancers hématologiques.^{111,114} Comme le PCK3145 inhibe en partie ces deux mécanismes et qu'il est très bien toléré chez les patients avec un cancer de la prostate,^{147,155} son utilisation dans le cadre de traitements contre les cancers hématologiques pourrait limiter l'invasion des tissus par les cellules malignes. Le PCK3145 serait un candidat intéressant pour limiter la dissémination de certains cancers hématologiques et contribuer à leur rémission.

5.1 But du projet et résultats obtenus

Le but du projet était de déterminer si le PCK3145 possède des effets anticancéreux sur les cancers hématologiques. Pour ce faire, des tests de prolifération ont d'abord été réalisés sur des lignées de cancers hématologiques *in vitro*. Lorsque les lignées de lymphome non-Hodgkinien immunoblastique à grandes cellules B (SR), de myélome multiple humain (RPMI-8226) et de mastocytome murin (P815) ont été exposées au

PCK3145, nous avons observé une diminution de leur prolifération. Par la suite, nous avons analysé la capacité clonogénique des cellules traitées par le PCK3145. De manière intéressante, le nombre de colonies issues des cellules traitées des lignées SR, RPMI-8226 et P815 était inférieur au nombre de colonies formées par les cellules contrôles, ce qui indique une perte de la capacité clonogénique de ces cellules. Ainsi les lignées SR, RPMI-8226 et P815 sont sensibles aux effets du PCK3145 *in vitro* et ce composé limite leur prolifération et leur clonogénicité.

Afin de vérifier si ces résultats se traduisaient par des effets inhibiteurs *in vivo*, nous avons étudié le développement de tumeur en injectant des cellules P815 chez des souris syngéniques DBA/2. Les résultats se sont avérés particulièrement intéressants puisque le traitement par le PCK3145 diminue la croissance des tumeurs et réduit la quantité de métastases hépatiques 14 jours après le début du traitement. De plus, les niveaux de MMP-9 dans le sang périphérique des souris traitées avec le PCK3145 étaient comparables aux niveaux observés chez des souris sans tumeur, alors que chez les souris des groupes contrôles, les niveaux de MMP-9 sanguins étaient plus élevés. De plus, le traitement par le PCK3145 de souris sévèrement immunodéficientes greffées avec des cellules de lymphome humain SR a montré que ce peptide provoque également une diminution de la croissance tumorale. Ce résultat indique que ce composé peut inhiber la progression d'un lymphome humain dans des conditions *in vivo*, ce qui est particulièrement prometteur pour son utilisation en clinique.

5.2 Effet du PCK3145 sur la prolifération et la capacité clonogénique

Premièrement, les résultats obtenus de nos recherches ont montré que le PCK3145 diminue la prolifération et la capacité clonogénique de lignées de cancers hématologiques. L'inhibition de prolifération observée révèle que le PCK3145 peut ralentir le rythme de prolifération des cellules malignes SR, RPMI-8226 et P815 en absence de cytotoxicité. En effet, les tests effectués sur l'induction de l'apoptose chez les cellules de ces lignées n'ont pas révélé d'augmentation de la mort cellulaire chez les cellules traitées au PCK3145. Ce résultat suggère que le PCK3145 affecte le cycle cellulaire. Dans les études effectuées sur le mécanisme d'action de la molécule Annabi et coll. ont montré que la phosphorylation de ERK était 5 à 6 fois plus élevée en présence du PCK3145.¹⁴⁷ Comme la voie des MAP kinases est impliquée dans la prolifération des cellules hématopoïétiques,¹⁶³ la stimulation rapide et transitoire de ERK par le PCK3145 pourrait modifier ses effets sur la prolifération.

De plus, la diminution du nombre de colonies formées par les cellules traitées au PCK3145 indique une réduction de la clonogénicité des cellules tumorales et une limitation du potentiel d'expansion de ces cancers. En effet, la capacité clonogénique mesure l'aptitude des cellules tumorales à former de nouveaux foyers cancéreux en proliférant de manière clonale. Le PCK3145 pourrait donc réduire la capacité de dissémination de ces cancers hématologiques en affectant les propriétés qui permettent la formation de colonies comme par exemple, les molécules d'adhésion. Cette perte de

clonogénicité pourrait expliquer en partie la diminution des métastases hépatiques dans le modèle P815.

5.3 Effet du PCK3145 sur la croissance tumorale

D'abord, le PCK3145 diminue la croissance du mastocytome induit chez les souris par injection sous-cutanée. Cette réduction de croissance de la tumeur primaire est la première évidence d'un effet anticancéreux sur un cancer hématologique *in vivo*. La diminution de la croissance tumorale a été observée tant en présence d'un traitement sous-cutané administré à proximité de la tumeur qu'en présence d'un traitement systémique intrapéritonéal. Cette observation indique que la distribution du médicament permet l'utilisation de plusieurs modes d'administration, ce qui pourrait être bénéfique pour les patients. En effet, une administration systémique assure une distribution dans tous les sites où la tumeur pourrait se loger. De plus, selon le site d'origine du cancer, il peut s'avérer difficile d'injecter le traitement localement. Le fait que ce traitement fonctionne alors que les doses utilisées sont faibles démontre que le composé est particulièrement puissant ou que les cellules y sont très sensibles.

Ensuite, la diminution de la croissance tumorale pourrait être causée par plusieurs effets du PCK3145 puisque ses mécanismes d'action sont multiples. Premièrement, la diminution de la capacité proliférative des cellules qui a été démontrée *in vitro* pourrait expliquer la réduction de la croissance de la tumeur primaire P815. De plus, la diminution des niveaux de MMP-9 observée dans le sang des souris pourrait également expliquer le défaut d'expansion de la tumeur primaire comme c'est le cas pour le cancer de la prostate.²⁶ La résistance de la membrane basale et des constituants de la matrice

extracellulaire pourrait entraver la croissance de la tumeur. De plus, MMP-9 est connue pour recruter des facteurs pro-inflammatoires qui favorisent le développement tumoral et le processus de formation des vaisseaux sanguins permettant de soutenir la croissance de la tumeur.^{34,38} Effectivement, la diminution de l'angiogénèse peut priver la tumeur primaire de nutriments et d'oxygène, ce qui pourrait en limiter l'expansion.⁴⁰

En plus de réduire la quantité de VEGF disponible, dont la sécrétion est augmentée par MMP-9, le PCK3145 peut aussi inhiber la phosphorylation de VEGFR-2.¹⁵⁵ Conséquemment, la réduction de la stimulation via VEGFR-2 des cellules endothéliales peut réduire l'angiogénèse déjà induite par une carence en VEGF.¹¹⁵ Un dérèglement de l'angiogénèse est associé au développement des leucémies,⁷² des lymphomes¹¹⁴ et des myélomes.¹⁶⁴ En outre, l'inhibition de VEGFR-2 peut freiner la croissance tumorale en réduisant l'intensité des signaux de survie intracellulaires.⁷⁴

De plus, une augmentation de l'apoptose au sein des tumeurs a été documentée dans le modèle de cancer de la prostate.¹³³ Il est possible que des conditions présentes seulement *in vivo*, comme le confinement de la tumeur et le manque de nutriments, favorisent l'induction de l'apoptose dans le mastocytome par le PCK3145. En outre, les recherches d'Annabi et coll. ont démontré que le PCK3145 stimule la voie NF- κ B.¹⁴⁷ Cette voie de signalisation régule l'apoptose.¹⁵³ Il est possible que l'intensité et la durée du signal induit par la liaison du PCK3145 au récepteur 67 LR produisent un effet pro-apoptotique chez les cellules tumorales P815, réduisant ainsi leur croissance *in vivo*.

5.4 Effet du PCK3145 sur le développement des métastases

En plus de réduire la croissance des tumeurs primaires, les expériences effectuées avec le modèle murin de mastocytome indiquent que le PCK3145 diminue l'apparition des métastases au foie. Alors que les métastases ont presque totalement infiltré le foie des souris contrôles 14 jours après le début du traitement, les foies des souris traitées par le PCK3145 sont peu ou pas du tout infiltrés par les métastases. Cela suggère que le PCK3145 non seulement a un effet sur les cellules malignes elles-mêmes, mais aussi un effet systémique qui limite la capacité de dissémination des cellules malignes.

La diminution de la croissance tumorale que nous avons observée a pu contribuer à l'inhibition du processus métastatique puisque les tumeurs doivent atteindre une taille suffisante pour pouvoir se disséminer.¹⁶⁵ De plus, la diminution de la capacité clonogénique des cellules malignes observée *in vivo* pourrait se traduire par une plus faible quantité de cellules ayant la capacité de former des métastases. De ce fait, le PCK3145 pourrait diminuer les propriétés invasives du mastocytome.

Deuxièmement, le PCK3145 peut restreindre la dissémination de la tumeur primaire en induisant une diminution de l'angiogénèse via une inhibition de VEGFR-2. La réduction du nombre de vaisseaux pourrait limiter la capacité des cellules à migrer vers d'autres organes. D'ailleurs, les vaisseaux sanguins nouvellement formés offrent une plus grande perméabilité, ce qui facilite leur pénétration par les cellules malignes détachées de la tumeur primaire.¹⁶⁶

Troisièmement, le PCK3145 induit la diminution des niveaux de MMP-9 dans le sang périphérique des souris traitées, ce qui indique que ce mécanisme pourrait être impliqué dans le ralentissement du processus métastatique. L'inhibition de MMP-9 peut limiter la dégradation de la membrane basale entourant la tumeur et ainsi rendre plus difficile l'évasion des cellules tumorales.¹⁵ De plus, les cellules malignes circulantes sont plus vulnérables aux attaques des cellules immunitaires puisque MMP-9 a des effets immunosuppresseurs ce qui implique que moins de cellules survivent à leur passage dans le flot sanguin.³⁵ De surcroît, le PCK3145 peut également diminuer la qualité des niches qui sont formées entre autres par la dégradation des membranes basales par MMP-9 et par le recrutement de facteurs inflammatoires, ce qui les rend moins accessibles pour les cellules malignes circulantes.³⁸ Ainsi, le foie des souris traitées par le PCK3145 serait plus difficile à coloniser pour les métastases P815 que le foie des souris contrôles. Par ailleurs, le PCK3145 est connu pour induire le clivage du récepteur externe de MMP-9, CD44.¹⁴⁹ L'association de MMP-9 à ce récepteur favorise l'adhésion aux constituants devant être hydrolysés.^{150,151} Ainsi, en induisant le clivage de CD44, le PCK3145 peut diminuer l'adhésion cellulaire qui est nécessaire à la formation des métastases.

5.5 Effet du PCK3145 sur le lymphome humain

Le modèle xénogénique de lymphome humain SR injecté en sous-cutané dans une souris immunoincompétente NOD/SCID a permis de déterminer l'effet du PCK3145 sur un cancer hématologique humain. Dans ce modèle, le PCK3145 administré en sous-cutané diminue la croissance du lymphome. Ce résultat suggère fortement que des lymphomes humains pourraient être traités par le PCK3145.

La réduction de la croissance du lymphome pourrait être induite par la liaison du PCK3145 au récepteur 67LR.¹⁴⁷ La présence de ce récepteur à la surface des lymphomes anaplasiques à grandes cellules¹⁴⁶ permet de supposer que plusieurs autres lymphomes expriment aussi ce récepteur et que le PCK3145 puisse induire ses effets chez les lymphomes en se liant à ce récepteur. La liaison à ce récepteur dans notre modèle a pu induire une diminution de sécrétion de MMP-9 en déstabilisant son ARN messenger et ainsi réduire la capacité de croissance du lymphome SR.¹⁴⁷

Par ailleurs, comme les lymphomes stimulent l'angiogénèse dans les ganglions et dans la rate, le PCK3145 pourrait également inhiber la formation des vaisseaux sanguins en empêchant la phosphorylation de VEGFR-2 et limiter la croissance des lymphomes.¹⁵⁵ On croit que le défaut d'angiogénèse a pu, dans ce cas réduire la croissance tumorale par une carence de nutriments. Dans ce modèle de xéno greffe, comme le lymphome SR est demeuré localisé, il n'a pas été possible d'évaluer alors l'effet du PCK3145 sur le processus métastatique du lymphome.

5.5.1 L'effet du PCK3145 est indépendant de l'immunité spécifique

La réduction de la croissance du lymphome dans notre modèle de xéno greffe indique que l'immunité spécifique n'est pas essentielle au traitement fonctionne. Cette observation présente un intérêt pour le traitement des cancers hématologiques. En effet, les souris NOD/SCID utilisées ne possèdent aucuns lymphocytes, ou cellules NK fonctionnelles. Ces dernières sont impliquées dans l'élimination des cellules tumorales.⁵⁰ Le fait que le PCK3145 diminue la croissance tumorale dans ces conditions signifie que l'immunité médiée par les cellules lymphoïdes n'exerce aucun rôle sur la

croissance des tumeurs. Puisque, les cancers hématologiques sont traités par des chimiothérapies myéloablatives, les patients ont une immunité spécifique déficiente. Comme l'effet du PCK3145 est indépendant de la réponse immunitaire, les patients immunodéprimés pourraient bénéficier du traitement.

5.6 La sécrétion de MMP-9 provient des tumeurs

Les cellules P815 *in vitro* ne sécrètent pas MMP-9 dans le milieu extracellulaire. Par contre, l'extraction des tumeurs sous-cutanées P815 des souris DBA/2 a permis de constater que les cellules tumorales P815 sécrètent MMP-9 dans un milieu de culture approprié. Les conditions présentes *in vivo* pourraient donc induire la sécrétion de MMP-9. En effet, les cellules en culture ont un accès direct aux nutriments présents dans le milieu. Ainsi, elles n'ont pas besoin de sécréter MMP-9 pour induire l'angiogénèse et avoir plus d'espace pour croître comme c'est le cas lorsque ces cellules sont injectées sous la peau. Ce phénomène pourrait expliquer que des cellules qui n'expriment pas MMP-9 *in vitro* soient tout de même sensibles aux effets du PCK3145 *in vivo*.

Les dosages de MMP-9 indiquent que malgré une absence de sécrétion *in vitro*, les tumeurs peuvent sécréter MMP-9 dans le milieu extracellulaire après extraction. De plus, la combinaison des observations du modèle P815 sur la sécrétion de MMP-9 qui est diminuée dans le sang périphérique et l'absence d'élévation de MMP-9 endogène chez les souris NOD/SCID suggère que le PCK3145 inhibe la sécrétion de MMP-9 fournie par les tumeurs elles-mêmes.

5.7 Utilisations potentielles du PCK3145

Même si le PCK3145 diminue la croissance des tumeurs murines (P815) et humaines (SR) la persistance de cellules malignes indique que le PCK3145 ne permet pas de faire disparaître entièrement les tumeurs. Néanmoins, le PCK3145 a permis une éradication des tumeurs dans certains cas, ce qui indique que le PCK3145 peut, dans certaines conditions, entraîner une rémission complète. Il ne faut pas oublier que dans beaucoup de modèles, les agents antinéoplasiques sont utilisés pour prévenir la croissance des tumeurs. Au contraire, nous avons commencé à traiter nos animaux qu'après avoir identifié une croissance tumorale. Dans un tel cas, la masse tumorale est déjà importante lors du début du traitement. Également, il faut noter que le PCK3145 est un traitement très bien toléré qui ne cause pas d'effets secondaires graves similaires à ceux observés avec les agents habituels de chimiothérapie. Comme le PCK3145 est une molécule peu ou pas toxique, elle pourrait donc être facilement utilisée en combinaison avec d'autres agents de chimiothérapies puisqu'elle ne devrait pas causer d'augmentation des effets secondaires.

De plus, le PCK3145 peut limiter les processus nécessaires à l'invasion tumorale, cela devrait permettre aux traitements de chimiothérapie conventionnelle d'exercer leur action cytotoxique non seulement de façon plus complète, mais d'atteindre plus souvent une cure. En effet, le PCK3145 pourrait maintenir plus longtemps la maladie à un stade localisé. De plus, en permettant l'apoptose, le PCK3145 pourrait accroître l'effet des traitements actuels, et ce, sans ajouter d'effets secondaires importants.

Les observations effectuées grâce à nos deux modèles *in vivo* suggèrent que l'inhibition de la prolifération et la perte de clonogénicité sont liées à l'effet inhibiteur du PCK3145 sur la croissance des tumeurs *in vivo*. Ainsi, le myélome multiple RPMI-8226 pourrait être sensible au traitement par le PCK3145 dans un modèle de xénogreffe d'abord via des mécanismes impliquant une diminution de sa prolifération et de sa capacité clonogénique *in vitro*. Par ailleurs, les myélomes sécrètent MMP-9 et induisent l'angiogénèse dans la moelle osseuse. Le PCK3145 pourrait donc inhiber ces deux mécanismes et augmenter l'efficacité des traitements contre le myélome.

Comme les leucémies myéloïdes aiguës expriment aussi, le récepteur 67 LR,¹⁶⁰ elles pourraient répondre au PCK3145. De plus, dans plusieurs cas de leucémie, les cellules reçoivent des signaux de survie par la stimulation autocrine de VEGFR-2. La diminution de ces signaux induite par le PCK3145 pourrait faciliter l'élimination des blastes par des agents cytotoxiques. Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches sur le PCK3145 dans un modèle de leucémie *in vivo*. En ce sens, la lignée HL-60 est la seule lignée pour laquelle une sécrétion de MMP-9 a été détectée *in vitro*. Il serait intéressant d'étudier l'effet du PCK3145 sur la progression des leucémies myéloïdes aiguës en utilisant cette lignée dans un modèle de xénogreffe.

6. Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus permettent de conclure que la croissance de certains cancers hématologiques est inhibée par le traitement au PCK3145. Le potentiel thérapeutique de ce peptide envers les lymphomes est prometteur. De plus, la prolifération et la capacité clonogénique d'une lignée de myélome humain ont été diminuées par ce traitement, ce qui permet d'envisager que le traitement au PCK3145 puisse aussi s'appliquer au myélome. Le PCK3145 ayant déjà été utilisé dans des études cliniques pour le cancer de la prostate, il serait fort intéressant de le tester chez l'humain pour le traitement des lymphomes et des myélomes.

7. Perspectives

Les résultats prometteurs obtenus permettent d'identifier plusieurs pistes intéressantes d'investigation. Premièrement, il pourrait être intéressant d'étudier l'effet du PCK3145 sur d'autres cancers hématologiques humains dans un modèle de xéno greffe. De plus, il serait utile de déterminer l'impact du PCK3145 sur l'angiogénèse induite par ces cellules cancéreuses. En effet, il est plausible que le PCK3145 puisse diminuer l'angiogénèse par le biais de l'inhibition de VEGFR-2. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer la densité des microvaisseaux sanguins dans les tumeurs chez les souris traitées par le PCK3145. Si le PCK3145 diminue l'angiogénèse, la phosphorylation de VEGFR-2 pourrait être mesurée par immunofluorescence. La quantité de MMP-2 dans le sang pourrait aussi être mesurée, car elle participe activement au processus d'angiogénèse.

Pour élargir l'éventail des résultats déjà obtenus, un modèle de lymphome humain métastatique pourrait être utilisé pour étudier l'impact de PCK3145 sur la dissémination des lymphomes *in vivo*.

D'autre part, le potentiel de traitement du PCK3145 sur les leucémies est également intéressant. Puisque les leucémies sont très envahissantes et agressives, la limitation de leur capacité d'invasion et d'infiltration pourrait grandement contribuer à leur guérison. Ainsi, des études plus approfondies sont nécessaires pour évaluer les effets du PCK3145 sur les leucémies myéloïdes et lymphoïdes *in vivo*.

Finalement, il serait intéressant de tester le PCK3145 sur des cellules de patients atteints de lymphomes, de myélomes et de leucémies afin de connaître l'étendue des effets du PCK3145 sur les cancers hématologiques et de discriminer les caractéristiques des cancers qui sont sensibles aux effets anticancéreux du PCK3145. Les résultats générés dans la présente étude sont donc fort intéressants et devraient mener à des études cliniques de premier plan chez les patients atteints de cancers hématologiques.

8. Bibliographie

1. Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada. Statistiques canadiennes sur le cancer 2008. Toronto, Canada; 2008.
2. Statistique Canada. Taux de mortalité normalisés, selon certaines causes de décès et le sexe. Organisme statistique national du Canada; 2007.
3. Organisation mondiale de la santé. Le cancer; 2008.
4. Bishop JM, Weinberg RA. *Molecular Oncology*. New York: Scientific American Inc.; 1996.
5. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. *Introduction à l'analyse génétique* (ed 3). Paris: de Boeck; 2002.
6. Foulds L. *The experimental study of tumor progression*. Vol. I-III. London: Academic Press; 1954.
7. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194:23-28.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
9. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:178-194.
10. Symonds H, Krall L, Remington L, et al. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*. 1994;78:703-711.
11. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998;281:1317-1322.
12. Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science*. 1997;278:1305-1309.
13. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *The journal of biological chemistry*. 1992;267(16):10931-10934.
14. Schmidmaier R, Baumann P. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology. *Curr Med Chem*. 2008;15:978-990.
15. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25:9-34.
16. Citak EC, Oguz A, Karadeniz C, Akyurek N. Role of gelatinases (MMP-2 and MMP-9), TIMP-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), and microvessel density on the clinicopathological behavior of childhood non-Hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 2008;25:55-66.
17. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:602-608.
18. Woessner JF. The matrix metalloproteinases family. In: Park WC, Mecham RP, eds. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego: Academic Press; 1998:1-14.
19. Basset P, Okada A, Chenard MP, et al. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol*. 1997;15:535-541.
20. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:667-671.

21. Fingleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci.* 2006;11:479-491.
22. Shiraga M, Yano S, Yamamoto A, et al. Organ heterogeneity of host-derived matrix metalloproteinase expression and its involvement in multiple-organ metastasis by lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 2002;62:5967-5973.
23. Chu JH, Sun ZY, Meng XL, et al. Differential metastasis-associated gene analysis of prostate carcinoma cells derived from primary tumor and spontaneous lymphatic metastasis in nude mice with orthotopic implantation of PC-3M cells. *Cancer Letters.* 2005.
24. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 2001;153:893-904.
25. Lochter A, Sternlicht MD, Werb Z, Bissell MJ. The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;857:180-193.
26. London CA, Sekhon HS, Arora V, Stein DA, Iversen PL, Devi GR. A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:823-832.
27. Kupferman ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ. Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol.* 2000;157:1777-1783.
28. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kahari VM, Pyrhonen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11:5158-5166.
29. Nakajima M, Welch DR, Wynn DM, Tsuruo T, Nicolson GL. Serum and plasma M(r) 92,000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1993;53:5802-5807.
30. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004;117:927-939.
31. Kido A, Tsutsumi M, Iki K, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-9 correlates with metastatic potency of spontaneous and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO)-induced transplantable osteosarcomas in rats. *Cancer Lett.* 1999;137:209-216.
32. Hua J, Muschel RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res.* 1996;56:5279-5284.
33. Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell.* 1998;94:353-362.
34. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860-867.
35. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 2001;61:237-242.
36. Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Brocker EB, Becker JC. Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental

- melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res.* 2003;63:8221-8225.
37. Sanceau J, Truchet S, Bauvois B. Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem.* 2003;278:36537-36546.
 38. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002;109:625-637.
 39. Littlepage LE, Egeblad M, Werb Z. Coevolution of cancer and stromal cellular responses. *Cancer Cell.* 2005;7:499-500.
 40. Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest.* 1999;103:1237-1241.
 41. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000;2:737-744.
 42. Chantre CF, Henriot P, Jodele S, et al. Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer.* 2006;42:310-318.
 43. Jodele S, Chantre CF, Blavier L, et al. The contribution of bone marrow-derived cells to the tumor vasculature in neuroblastoma is matrix metalloproteinase-9 dependent. *Cancer Res.* 2005;65:3200-3208.
 44. Huang S, Van Arsdall M, Tedjarati S, et al. Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1134-1142.
 45. Giraud E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2004;114:623-633.
 46. Mira E, Lacalle RA, Buesa JM, et al. Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *J Cell Sci.* 2004;117:1847-1857.
 47. Seidl S, Kaufmann H, Drach J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2003;4:557-564.
 48. Ravandi F, Talpaz M, Estrov Z. Modulation of cellular signaling pathways: prospects for targeted therapy in hematological malignancies. *Clin Cancer Res.* 2003;9:535-550.
 49. Cavazzana-Calvo M, Six E, Andre-Schmutz I, Coulombel L. [Human hematopoiesis: from CD34 cells to T lymphocytes]. *Med Sci (Paris).* 2007;23:151-159.
 50. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *IMMUNOLOGIE Le cours de Janis Kuby* (ed 4). Paris: Dunod; 2003.
 51. Lemischka I. Stem cell dogmas in the genomics era. *Rev Clin Exp Hematol.* 2001;5:15-25.
 52. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol.* 2008;141:367-375.
 53. Pejovic T, Schwartz PE. *Leukemias.* Clin Obstet Gynecol. 2002;45:866-878.
 54. Lensch MW. *Ontogeny of blood production* Boston; 2007:Research description.

55. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3:730-737.
56. Buzzai M, Licht JD. New molecular concepts and targets in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2008;15:82-87.
57. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350:1535-1548.
58. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005;23:6306-6315.
59. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243:290-293.
60. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell.* 1984;37:1035-1042.
61. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol.* 1999;17:399-408.
62. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2008;371:1017-1029.
63. Ries C, Kolb H, Petrides PE. Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia cells: tumor necrosis factor-alpha as an autocrine stimulus for basal- and phorbol ester-induced secretion. *Blood.* 1994;83:3638-3646.
64. Freireich EJ. Acute leukemia. A prototype of disseminated cancer. *Cancer.* 1984;53:2026-2033.
65. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Steeg PS. Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest.* 1991;9:543-551.
66. Campbell EJ, Cury JD, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Neutral proteinases of human mononuclear phagocytes. Cellular differentiation markedly alters cell phenotype for serine proteinases, metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Immunol.* 1991;146:1286-1293.
67. Ries C, Loher F, Zang C, Ismail MG, Petrides PE. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Clinical cancer research.* 1999;5:1115-1124.
68. Vacca A, Ribatti D, Ria R, et al. Proteolytic activity of human lymphoid tumor cells. Correlation with tumor progression. *Dev Immunol.* 2000;7:77-88.
69. Aref S, Salama O, Shamaa S, El-Refaie M, Mourkos H. Angiogenesis factor pattern differs in acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Hematology.* 2007;12 (4):319-324.
70. Padro T, Ruiz S, Bieker R, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2000;95:2637-2644.
71. Gerber HP, Ferrara N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med.* 2003;81:20-31.
72. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2000;96:3374-3380.

73. Avramis IA, Panosyan EH, Dorey F, Holcenberg JS, Avramis VI. Correlation between high vascular endothelial growth factor-A serum levels and treatment outcome in patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: A report from Children's Oncology Group Study CCG-1962. *Clin Cancer Res.* 2006;12(23):6978-6984.
74. Dias S, Hattori K, Zhu Z, et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest.* 2000;106(4):511-521.
75. Dias S, Shmelkov SV, Lam G, Rafii S. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood.* 2002;99:2532-2540.
76. Chen H, Treweeke AT, West DC, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2000;96:3181-3187.
77. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia.* 2002;16:911-919.
78. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273:13313-13316.
79. Faderl S, Do KA, Johnson MM, et al. Angiogenic factors may have a different prognostic role in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2005;106:4303-4307.
80. Appelbaum FR, Downing J, William C. The biology and therapy of acute myelogenous leukemia. *ASH: Education Program;* 1995:23-30.
81. Yanada M, Garcia-Manero G, Borthakur G, Ravandi F, Kantarjian H, Estey E. Potential cure of acute myeloid leukemia: analysis of 1069 consecutive patients in first complete remission. *Cancer.* 2007;110(12):2756-2760.
82. Scheinberg DA, Maslak P, M. W. Acute leukemias. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology* (ed 6th). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:2404-2432.
83. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75:555-562.
84. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:35.
85. Kanojia MD, Anagnostou AA, Zander AR, et al. High-dose methylprednisolone treatment for acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation in adults. *Transplantation.* 1984;37:246-249.
86. Goldman JM, Szydlo R, Horowitz MM, et al. Choice of pretransplant treatment and timing of transplants for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood.* 1993;82:2235-2238.
87. Enright H, McGlave PB. Biology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncology (Williston Park).* 1997;11:1295-1300; discussion 1302-1210.
88. Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alfa-2b as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Eng J Med.* 1994;330:280-288.

89. Appelbaum FR. Perspectives on the future of chronic myeloid leukemia treatment. *Semin Hematol.* 2001;38:35-42.
90. Boren J, Cascante M, Marin S, et al. Gleevec (STI571) influences metabolic enzyme activities and glucose carbon flow toward nucleic acid and fatty acid synthesis in myeloid tumor cells. *J Biol Chem.* 2001;276:37747-37753.
91. Etienne G, Mahon FX. [Leukemogenesis and new therapy development: the example of chronic myelogenous leukemia]. *Bull Cancer.* 2001;88:651-658.
92. Khouri S, Kotliroff A, Lishner M, Amital H. Imatinib-Induced agranulocytosis in a patient with chronic myelogenous leukemia in remission. *Isr Med Assoc J.* 2008;10:320-321.
93. Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia.* 2003;17:2385-2391.
94. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood.* 1998;92:1165-1171.
95. Myint H, Copplestone JA, Orchard J, et al. Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1995;91:341-344.
96. Hainsworth JD, Litchy S, Barton JH, et al. Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol.* 2003;21:1746-1751.
97. Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA, et al. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood.* 2003;101:6-14.
98. Rui L, Goodnow CC. Lymphoma and the control of B cell growth and differentiation. *Curr Mol Med.* 2006;6:291-308.
99. Brown JR, Freedman AS. Pathobiology of the non-Hodgkin's lymphomas. In: Arnold S, Freedman, Rebecca F, Connor eds: *UpToDate*; 2007.
100. Skibola CF, Curry JD, Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica.* 2007;92:960-969.
101. Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood.* 1991;77:1508-1515.
102. Tycko B, Sklar J. Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. *Cancer Cells.* 1990;2:1-8.
103. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999;341:1520-1529.
104. Skibola CF, Bracci PM, Halperin E, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor 1 and vitamin C and matrix metalloproteinase gene families are associated with susceptibility to lymphoma. *PLoS ONE.* 2008;3:e2816.
105. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, et al. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood.* 1999;93:3081-3087.

106. Dave SS, Wirght G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Eng J Med.* 2004;351:2159-2169.
107. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol.* 2006;24:5350-5357.
108. Travert M, Ame-Thomas P, Pangault C, et al. CD40 Ligand Protects from TRAIL-Induced Apoptosis in Follicular Lymphomas through NF- κ B Activation and Up-Regulation of c-FLIP and Bcl-xL. *J Immunol.* 2008;181:1001-1011.
109. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Huchcroft SA, Edwards DR. Relationship between the clinical aggressiveness of large cell immunoblastic lymphomas and expression of 92 kDa gelatinase (type IV collagenase) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNAs. *Oncol Res.* 1992;4:233-240.
110. Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood.* 2000;95:314-319.
111. Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, et al. Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol.* 1998;152:565-576.
112. Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, et al. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.* 1999;94:2080-2089.
113. Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol.* 1996;156:1-4.
114. Koster A, Raemaekers JM. Angiogenesis in malignant lymphoma. *Curr Opin Oncol.* 2005;17:611-616.
115. Wang ES, Teruya-Feldstein J, Wu Y, Zhu Z, Hicklin DJ, Moore MA. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood.* 2004;104:2893-2902.
116. Freedman AS, Friedberg JW. Treatment of aggressive non Hodgkin's lymphomas. In: Freedman AS, Connor RF eds: *UpToDate*; 2008.
117. Chao NJ, Rosenberg SA, Horning SJ. CEPP(B): an effective and well-tolerated regimen in poor-risk, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1990;76:1293-1298.
118. Cooper AC, Karp RM, Clark EJ, et al. A novel methionine aminopeptidase-2 inhibitor, PPI-2458, inhibits Non-Hodgkin Lymphoma proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res.* 2006;12 (8):2583-2590.
119. Cruciani M, Rampazzo R, Malena M, et al. Prophylaxis with fluoroquinolones for bacterial infections in neutropenic patients: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 1996;23:795-805.
120. Gorschlüter M, Schmitz V, Mey U, Hahn-Ast C, Schmidt-Wolf IGH, Sauerbruch T. Endoscopy in patients with acute leukaemia after intensive chemotherapy. *Leukemia Research.* 2008;32:1510-1517.
121. Singhal S, Mehta J. Multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1:1322-1330.

122. Stewart AK, Fonseca R. Prognostic and therapeutic significance of myeloma genetics and gene expression profiling. *J Clin Oncol.* 2005;23:6339-6344.
123. Mitsiades CS, Mitsiades N, Munshi NC, Anderson KC. Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2004;6:439-444.
124. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1994;87:503-508.
125. Alexandrakis MG, Sfiridaki A, Miyakis S, et al. Relationship between serum levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-9 with biochemical markers of bone disease in multiple myeloma. *Clinica Chimica Acta.* 2007;379:31-35.
126. Vande Broek I, Asosingh K, Allegaert V, et al. Bone marrow endothelial cells increase the invasiveness of human multiple myeloma cells through upregulation of MMP-9: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Leukemia.* 2004;18:976-982.
127. Rosinol L, Perez-Simon JA, Sureda A, et al. A prospective pethema study of tandem autologous transplantation versus autograft followed by reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 2008.
128. Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, Fonseca R, Greipp PR. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2006;24:431-436.
129. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med.* 2003;348:2609-2617.
130. Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, et al. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood.* 2002;100:3063-3067.
131. Ludwig H, Fritz E. Supportive therapy. *Myeloma.* London: Martin Dunitz; 2002:397-412.
132. Berenson JR, Hillner BE, Kyle RA, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2002;20:3719-3736.
133. Shukeir N, Arakelian A, Chen G, et al. A synthetic 15-mer peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia. *Cancer Res.* 2004;64:5370-5377.
134. Abrahamsson PA, Lilja H. Three predominant prostatic proteins. *Andrologia.* 1990;22 Suppl 1:122-131.
135. Mundle SD, Sheth NA. In vivo suppression of pituitary and circulatory follicle stimulating hormone by human seminal plasma inhibin. *Indian J Exp Biol.* 1991;29:310-314.
136. Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaines (ed 6): Édition du Renouveau Pédagogique Inc;* 2005.
137. Baijal-Gupta M, Clarke MW, Finkelman MA, McLachlin CM, Han VK. Prostatic secretory protein (PSP94) expression in human female reproductive tissues, breast and in endometrial cancer cell lines. *J Endocrinol.* 2000;165:425-433.

138. Garde SV, Sheth AR, Shah MG, Kulkarni SA. Prostate--an extrapituitary source of follicle-stimulating hormone (FSH): occurrence, localization, and de novo biosynthesis and its hormonal modulation in primates and rodents. *Prostate*. 1991;18:271-287.
139. Porter AT, F ACRO, Ben-Josef E. Humoral mechanisms in prostate cancer: A role for FSH. *Urol Oncol*. 2001;6:131-138.
140. Ben-Josef E, Yang SY, Ji TH, et al. Hormone-refractory prostate cancer cells express functional follicle-stimulating hormone receptor (FSHR). *J Urol*. 1999;161:970-976.
141. Zhang PJ, Driscoll DL, Lee HK, Nolan C, Velagapudi SR. Decreased immunoexpression of prostate inhibin peptide in prostatic carcinoma: a study with monoclonal antibody. *Hum Pathol*. 1999;30:168-172.
142. Tsurusaki T, Koji T, Sakai H, Kanetake H, Nakane PK, Saito Y. Cellular expression of beta-microseminoprotein (beta-MSP) mRNA and its protein in untreated prostate cancer. *Prostate*. 1998;35:109-116.
143. Hyakutake H, Sakai H, Yogi Y, et al. Beta-microseminoprotein immunoreactivity as a new prognostic indicator of prostatic carcinoma. *Prostate*. 1993;22:347-355.
144. Shukeir N, Garde S, Wu JJ, Panchal C, Rabbani SA. Prostate secretory protein of 94 amino acids (PSP-94) and its peptide (PCK3145) as potential therapeutic modalities for prostate cancer. *Anticancer Drugs*. 2005;16:1045-1051.
145. Hawkins RE, Daigneault L, Cowan R, et al. Safety and tolerability of PCK3145, a synthetic peptide derived from prostate secretory protein 94 (PSP94) in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2005;4:91-99.
146. Iyer V, Pumiglia K, Di Persio CM. alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *Journal of Cell Science*. 2005;118:1185-1195.
147. Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, et al. Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling. *Anticancer Drugs*. 2006;17:429-438.
148. Huwiler A, Akool E-S, Aschrafi A, Hamada FMA, Pfeilschifter J, Eberhardt W. ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *J Biol Chem*. 2003;278:51758-51769.
149. Annabi B, Bouzeghrane M, Currie JC, et al. A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding: implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2005;22:429-439.
150. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*. 1999;13:35-48.
151. Bourguignon LY, Gunja-Smith Z, Iida N, et al. CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 1998;176:206-215.
152. Annabi B, Currie J-C, Moghrabi A, Béliveau R. Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG. *Leukemia Research*. 2006;31:1277-1284.

153. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem.* 2000;267:3828-3835.
154. Ambrilia Biopharma, Béliveau R. Modèle intégré du mécanisme d'action du PCK3145. Montréal: <http://www.ambrilia.com/docs/PCK3145-Integrative-mechanism-action.pdf>; 2005.
155. Lamy S, Ruiz MT, Wisniewski J, et al. A prostate secretory protein94-derived synthetic peptide PCK3145 inhibits VEGF signalling in endothelial cells: implication in tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2006;118:2350-2358.
156. Reddi AH, Roodman D, Freeman C, Mohla S. Mechanisms of tumor metastasis to the bone: challenges and opportunities. *J Bone Miner Res.* 2003;18:190-194.
157. Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood.* 2006;108:3992-3996.
158. Someya M, Sakata K-i, Nagakura H, et al. Three cases of diffuse large B-cell lymphoma of the mandible treated with radiotherapy and chemotherapy. *Radiat Med.* 2005;23:296-302.
159. Yun HK, Shin MG, Bo D, et al. [Laboratory evaluation of bone marrow metastasis: single institute study]. *Korean J Lab Med.* 2007;27:96-101.
160. Montuori N, Selleri C, Risitano AM, et al. Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1465-1472.
161. Carbone A, Gloghini A, Colombatti A, Castronovo V, Menard S. Expression of the monomeric 67-kd laminin-binding protein in human lymphomas as defined by MLuC5 monoclonal antibody and paraffin section immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 1995;26:541-546.
162. Dong X, Han ZC, Yang R. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;62:105-118.
163. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood.* 2003;101:4667-4679.
164. Bertolini F, Mancuso P, Gobbi A, Pruneri G. The thin red line: angiogenesis in normal and malignant hematopoiesis. *Exp Hematol.* 2000;28:993-1000.
165. Withers HR, Lee SP. Modeling growth kinetics and statistical distribution of oligometastases. *Semin Radiat Oncol.* 2006;16:111-119.
166. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS.* 1997;79:233-269.