

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2015

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 23 janvier 2015 à Poitiers
par **Romain Lorion, interne des hôpitaux de Poitiers**

Rôles de PAGE4 et PAX6 dans le cancer de la prostate

COMPOSITION DU JURY

Président : Professeur Jacques Irani

Membres : Professeur Alan Spatz
Professeur Bertrand Doré
Professeur Jean-Marc Tourani

Directeur de thèse : Professeur Franck Bladou

Résumé

Introduction

La physiopathologie du cancer de la prostate demeure peu connue. Cette méconnaissance freine le développement de nouveaux outils pronostiques et thérapeutiques. PAGE4 et PAX6 sont deux protéines dont le rôle de suppresseur de tumeur est suspecté dans le cancer de prostate. Les buts de cette étude étaient de 1) confirmer l'expression de PAGE4 et PAX6 dans des échantillons et des lignées cellulaires de cancer de prostate, 2) rechercher un lien entre l'expression de PAGE4 et de PAX6, 3) d'évaluer les liens entre PAGE4, PAX6 et des acteurs majeurs de l'oncogenèse du cancer de la prostate : le récepteur des androgènes (RA) et le PSA (KLK3).

Matériel et méthodes

Les biopsies de cancer de prostate de 60 patients, ainsi que 32 échantillons de cellules LuCaP ont été analysées en immunohistochimie. La coloration a été quantifiée par calcul du H score. Trois lignées cellulaires de cancer de prostate (LnCaP, DU145 et PC3), ainsi que les effets de la sur-expression de PAGE4 et PAX6 dans LnCaP, ont été analysés par qPCR et western blot.

Résultats

PAGE4 était exprimé dans le cytoplasme cellulaire et PAX6 dans le noyau. Il existait une corrélation linéaire inverse entre l'expression de PAX6 et celle de RA dans la lignée cellulaire LuCaP. Dans LnCaP, la sur-expression de PAX6 a entraîné une diminution de l'expression protéique de RA et PSA ; ainsi qu'une baisse de l'expression de RA au niveau de l'ARNm. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'expression de PAGE4 et PAX6 dans les échantillons prostatiques et dans les lignées cellulaires après sur-expression de PAGE4 et PAX6. L'expression de PAGE4 n'influencait pas l'expression de RA, PSA ou PAX6.

Conclusion

Le rôle de PAX6 apparaît comme majeur dans l'oncogenèse du cancer de prostate. PAGE4 et PAX6 pourraient dans l'avenir devenir des marqueurs pronostiques et/ou devenir des cibles thérapeutiques dans le cadre de la prise en charge personnalisée du cancer de la prostate.

Mots clés

cancer de la prostate, cancer testis antigen, prostate-associated gene 4, PAX6, récepteurs aux androgènes, physiopathologie du cancer de prostate, médecine personnalisée.

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2015

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 23 janvier 2015 à Poitiers
par **Romain Lorion, interne des hôpitaux de Poitiers**

Rôles de PAGE4 et PAX6 dans le cancer de la prostate

COMPOSITION DU JURY

Président : Professeur Jacques Irani

Membres : Professeur Alan Spatz
Professeur Bertrand Doré
Professeur Jean-Marc Tourani

Directeur de thèse : Professeur Franck Bladou

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE UNIVERSITE DE POITIERS

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Année universitaire 2014-2015

Professeurs des Universités-Praticiens hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BENSADOUN René-Jean, oncologie – radiothérapie (en disponibilité)
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie - virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- EUGENE Michel, physiologie (surnombre)
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion
- GUILLET Gérard, dermatologie
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HERPIN Daniel, cardiologie
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- IRANI Jacques, urologie
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, oncologie

- KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (en détachement)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie - réanimation
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- POURRAT Olivier, médecine interne
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (surnombre)
- SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- TOUCHARD Guy, néphrologie
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- ARIES Jacques, anesthésiologie - réanimation
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie - virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie - hygiène
- CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
- CREMNITER Julie, bactériologie - virologie

- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie - réanimation
- DIAZ Véronique, physiologie
- FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
- FRASCA Denis, anesthésiologie - réanimation
- HURET Jean-Loup, génétique
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, hépato-gastro-entérologie

Professeur des Universités de Médecine générale

- GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de Médecine générale

- BINDER Philippe
- VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de Médecine générale

- BIRAULT François
- BOUSSAGEON Rémy
- FRECHE Bernard
- GIRARDEAU Stéphane
- GRANDCOLIN Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- PERKINS Marguerite, maître de langues étrangères

Professeurs émérites

- DORE Bertrand, urologie
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie - virologie
- GIL Roger, neurologie
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique
- MARCELLI Daniel, Pédopsychiatrie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardiovasculaire

Remerciements

À mes maîtres et juges

À Monsieur le Professeur Jacques Irani : Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de cette thèse. Vos enseignements et vos conseils sont de précieux guides sur le voie de l'Urologie. Veuillez recevoir le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Bertrand Doré : Je vous remercie de participer au jury de cette thèse. Vos enseignements et vos conseils sont de précieux guides sur le voie de l'Urologie. Je vous prie d'agréer toute ma gratitude.

À Monsieur le Professeur Franck Bladou : Je vous remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour votre accueil et votre guidance lors de mon travail de recherche Canadien. Soyez assuré de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Alan Spatz : Je vous remercie de participer au jury de cette thèse. Merci pour votre accueil et votre guidance lors de mon travail de recherche Canadien. Soyez assuré de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Jean-Marc Tourani : Je vous remercie de participer au jury de cette thèse. Merci pour votre accueil et vos enseignements lors de mon stage dans votre service. Soyez assuré de mon profond respect.

Aux membres du X chromosome and cancer laboratory (Lady Davis Institute, Montréal, Canada)

Dr Van Kempen and Professor Alan Spatz : thank you for having given me the opportunity to joint the laboratory. At every steps of my project you were there to help me. It was a wonderful experience.

Mounib Elchebly, Sanne Janssen, Tal Cantor, Marie Noël Boutchou, Samuel Ohayon, Naciba Benlimame, Anke Rijk, Jasmin Sander: thank you for having integrated me so easily in the lab and helped me so much.

À ma famille (qui ne cesse de s'agrandir pour notre plus grand bonheur !):

À ma mère, Madame le Professeur Isabelle Penher: la meilleure mère doublée du meilleur professeur qui soit. Trente années que je suis tes cours sans jamais m'en lasser ! Merci de ton soutien sans faille tout au long de mon chemin de vie. Merci beaucoup pour ta relecture ! Viele danke mutti, du bist die perfekte mutter.

À mon père pour son legs.

À Monsieur Yvon Penher : merci pour tous tes conseils et ta guidance.

À Charlotte (encore un professeur !) et Benjamin, Maxence, Gwenaëlle et Vivien, Flavie, Gabin, Edgar, Annaïg et Jean-Baptiste (vivement le mariage !), Brieg, Mélanie.

À ma grande-mère

À mes beaux-parents : Madame Vilaplana Maryse et Monsieur Vilaplana Vincent

À Monsieur Langlois Vincent

Et bien sûr, à mon extraordinaire femme et à notre futur enfant. Marlène, ton soutien et ta confiance me portent jour après jour. Notre famille me remplit déjà d'une joie et d'un amour incommensurable.

À mes amis

Laurent, Flore, Fix, Charlotte, Adrien, Damien, Perrine, Damien, Magalie, David, Mélissa, Émilie, Bao, Maria, Guillaume, Pierre, Arnaud, Benoît, Lucille.

À mes collègues et maîtres de stage

Aux équipes du CHU de Poitiers, du CH de la Rochelle, du CH de Châtelleraut et du CH d'Angoulême.

Table des matières

Abréviations.....	p 15
liste des figures.....	p 17
liste des tableaux.....	p 20
<u>Partie I :Introduction.....</u>	p21
I) Épidémiologie du cancer de prostate.....	p21
II) Facteurs de risques du cancer de prostate.....	p 24
1) Age.....	p 24
2) Facteurs héréditaires.....	p 24
3) Origine ethnique et facteurs environnementaux.....	p 24
III) Éléments de physiologie prostatique.....	p 25
1) L'épithélium prostatique.....	p 25
2) Stroma prostatique.....	p 25
3) Homéostasie prostatique.....	p 26
a) Biosynthèse des androgènes.....	p 26
b) Rôles de la testostérone et de la DHT.....	p 28
c) Physiologie du récepteur aux androgènes.....	p 28
d) Autres acteurs.....	p 29
IV) Physiopathologie du cancer de la prostate.....	p 30
V) Anatomopathologie du cancer de la prostate.....	p 30
VI) Diagnostic du cancer de prostate.....	p 30
1) Toucher rectal.....	p 30
2) PSA.....	p 30
a) PSA total, libre et complexé.....	p 30

b) Vitesse et temps de doublement du PSA.....	p 31
c) Autres formes de PSA.....	p 31
3) Biopsies de la prostate.....	p 31
a) Indications.....	p 31
b) Complications.....	p 32
c) Première série de biopsies.....	p 32
d) Deuxième série de biopsies.....	p 32
4) Place de l'IRM.....	p 32
5) Analyse anatomopathologique des biopsies.....	p 32
VII) Dépistage du cancer de la prostate.....	p 33
VIII) Bilan extension locale et à distance.....	p 33
IX) Facteurs pronostiques.....	p 34
1) Clinique.....	p 34
2) Biologique.....	p 34
3) Anatomopathologique.....	p 34
a) Analyse des biopsies.....	p 34
b) Analyse de la pièce de prostatectomie.....	p 34
4) Radiologique : l'IRM.....	p 35
X) Principaux traitements.....	p 35
1) Cancer de stade localisé.....	p 35
2) Cancer métastatique.....	p 35
a) Hormonothérapie.....	p 35
b) Hormonothérapies de nouvelle génération.....	p 36
c) Chimiothérapie.....	p 36
XI) Suivi après traitement.....	p 36
XII) Cancer de la prostate résistant à la castration.....	p 37

XIII) Cancer/Testis Antigens et Prostate-associated gene 4 (PAGE4)	p 37
1) Cancer/Testis Antigens.....	p 37
2) Prostate-associated gene 4 (PAGE4).....	p 37
a) Structure, expression et rôle de PAGE4.....	p 37
b) Intérêt thérapeutique de PAGE4.....	p 38
c) Intérêt pronostique de PAGE4.....	p 38
XIV) Paired box (Pax) genes family et PAX6	p 39
1) Paired box (Pax) genes family.....	p 39
2) PAX6.....	p 40
a) Structure et fonctions de PAX6.....	p 40
b) PAX6 et cancer.....	p 41
XV) Hypothèses	p 42
XVI) Objectifs	p 43
<u>Partie II : Matériel et méthodes</u>	p 44
I) TMA de prostate	p 44
1) H score.....	p 44
2) TMAa.....	p 44
3) TMAb.....	p 45
II) Immunohistochimie	p 46
III) Culture cellulaire	p 46
IV) Western Blot	p 47
1) Préparation des lysas cellulaires.....	p 47
2) Migration protéique.....	p 47

3) Transfert protéique.....	p 48
4) Blocage et coloration par anticorps.....	p 48
5) Ablation des anticorps.....	p 49
6) Contrôle de la quantité de protéines du western blot par B actine.....	p 49

V) PCR quantitative.....p 49

1) Purification de l'ARN total.....	p 49
2) Détermination de la concentration en ARN.....	p 49
3) Vérification de la qualité de l'ARN.....	p 50
4) Transcription inverse de l'ARN.....	p 50
5) PCR quantitative.....	p 50
6) Analyse des résultats de qPCR.....	p 51

VI) Sur-expression protéique.....p 51

VII) tests statistiques.....p 51

Partie III : Résultats.....p 52

I) Étude de l'expression de PAGE4, PAX6, KLK3 et RA.....p 52

1) Expression protéique dans les échantillons de tissu prostatique par immunohistochimie.....	p 52
2) Expression de PAGE4 et PAX6 dans 293FT par sur-expression protéique fluorescente.....	p 53
3) Expression de PAGE4, PAX6, RA et KLK3 dans DU145, LnCaP et PC3.....	p 54
a) ARNm.....	p 54
b) Expression protéique.....	p 55

II) Relation entre l'expression de PAX6, PAGE4, KLK3 et des RA.....p 56

1) Étude par WB et qPCR des protéines et des gènes cibles dans la lignée LnCaP.....	p 56
a) Contrôle de la sur-expression de PAX6, PAX6(5a) et PAGE4 par WB.....	p 56

b) Contrôle de la sur-expression de PAX6 et PAX6(5a) par qPCR.....	p 57
c) Recherche d'un lien entre l'expression de PAX6, PAX6(5a), PAGE4 et KLK3, RA par WB.....	p 58
d) Recherche d'un lien entre l'expression de PAX6, PAX6(5a) et les RA par qPCR....	p 59
2) Étude immunohistochimique de l'expression des protéines cibles dans des biopsies de xénogreffes LuCaP et des biopsies humaines de cancer de prostate.....	p 60
a) Biopsies de xénogreffes LuCaP.....	p 60
b) Biopsies prostatiques humaines.....	p 61
III) Étude de la corrélation entre l'expression de PAX6, PAGE4 et les données anatomopathomiques et biochimiques.....	p 61
1) Étude de la variation de l'expression de PAX6 et PAGE4 en fonction de la nature du prélèvement et de la résistance ou non à la castration	p 61
2) Autres études de la variation de l'expression de PAX6 sur les biopsies de xénogreffes LuCaP.....	p 63
<u>Partie IV : Discussion</u>.....	p 64
I) Principaux résultats et comparaison avec les données de la littérature.....	p 64
1) Principaux résultats.....	p 64
2) Comparaison de nos résultats par rapport aux données de la littérature.....	p 65
a) Localisation cellulaire TMA et sur-expression.....	p 65
b) Expression en WB et qPCR dans DU145, LnCaP et PC3.....	p 65
c) Lien PAGE4/PAX6.....	p 65
3) Biais et limitations de l'étude.....	p 65
II) enjeux actuels du traitement du cancer de la prostate.....	p 66
1) Facteurs pronostiques.....	p 66
2) Le cancer de la prostate résistant à la castration.....	p 66
a) Mécanismes indépendants du récepteur aux androgènes.....	p 67
b) Mécanismes impliquant le récepteur aux androgènes.....	p 67

III) PAX6 et PAGE4 dans le cancer de la prostate.....p 68

1) PAX6.....p 68

2) PAGE4.....p 68

3) Utilisation de PAX6 et PAGE4 dans le cadre de la médecine personnalisée.....p 69

a) Le concept de médecine personnalisée.....p 69

b) Intégration de PAGE4 et PAX6 dans une démarche de médecine personnalisée.....p 69

Partie V :Conclusion.....p 71

Références.....p 72

Annexes.....p 79

Annexe 1 : Complications après biopsies de prostate.....p 79

Annexe 2 : Recommandations de l'EAU pour la réalisation du dépistage individuel du cancer de la prostate.....p 80

Annexe 3 :Classification TNM 2010 du cancer de la prostate.....p 81

Annexe 4 : Classification de D'Amico.....p 83

Annexe 5 : Modalités des principaux traitements du cancer localisé de prostate.....p 84

Annexe 6 :Indications de la suppression androgénique dans le traitement du cancer de la prostate.....p 87

Annexe 7 : Recommandations de l'AFU et de l'EAU pour le traitement du cancer de la prostate.....p 88

Annexe 8 : Critères de récidives biologique du cancer de prostate.....p 92

Annexe 9 : Composition du sérum RPMI.....p 93

Annexe 10 :Voies alternatives de production de DHT dans le CPRC.....p 95

Annexe11 :Score IPSS.....p 96

Résumé.....p 97

Mots clés.....p 97

Serment.....p 98

Abréviations

5 α R ou 5-AR : 5 alpha reductase
AFU : Association Française d'Urologie
APS : ammoniac persulfate
AR : androgen receptor
ARNm : acide ribonucléique messenger
ASAP : atypical small acinar proliferation
BCA : bicinehoninic acid
BSA : bovine serum albumine
CaPS: N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
CP : cancerous prostate
cQ: cycle quantification
CPRC : cancer de prostate résistant à la castration
CRPC : castrated resistance prostate cancer
CTA : cancer testis antigen
CT-X antigen: cancer testis antigen localised on X chromosome
DHT : dihydrotestostérone
EAU : European Association of Urology
EDTA : ethylene diamine tetracetic acid
EV : empty vector
HIFU : ultrasons focalisés à haute intensité
IC : intervalle de confiance
IHC : immunohistochemistry
Index PHI : prostate health index
IPSS : international prostate symptome score
IRM : imagerie par résonance magnétique
KLK3 : kallikrein 3 (aussi appelé PSA: prostate specific antigen)
LHRH : luteinizing hormone releasing hormone
NP : normal prostate
NR : non résistant (to castration)
NSE : neuron-specific enolase
PAGE4 : prostate-associated gene 4
PAP : phosphatases acides prostatiques
PAX6 : paired box gene 6
PBS : phosphate buffered saline
Pca : prostate cancer
PIN : prostatic intraepithelial neoplasia
PSA : prostate specific antigen (aussi appelé KLK3)
PSADT : temps de doublement du PSA
PSAV : vélocité du PSA
PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF : polyvinylidene fluoride
qPCR: quantitative polymerase chain reaction
R : résistant (to castration)
RA : récepteurs aux androgènes
RECIST : response evaluation criteria in solid tumors
RIPA buffer: radio immuno precipitation assay buffer

RPMI : Roswell Park Memorial Institute
RTUP : résection transurétrale de prostate
SDS : sodium dodecyl sulfate
SPBP : stromelysin-1 platelet derived growth factor-responsive element Binding protein
Scr : scrambled
TAA : tumor associated antigen
TAC : transit-amplifying cells
TAE buffer: Tris base, acetic acid and EDTA
TBST : tris-buffered saline with Tween 20
TDM : tomodensitométrie
TEP : tomographie par émission de positons
TNM classification : tumor, node, metastasis
TMA : tissue microarray
TR : toucher rectal
UV : ultraviolet

Liste des figures

- Figure 1 : incidence et mortalité du cancer de prostate dans le monde en 2012 (d'après the world health organization).....p 22
- Figure 2 : incidence et mortalité du cancer de la prostate par âge en 2009 en France (d'après Rébillard et al).....p 23
- Figure 3 : tendance chronologique de l'incidence et de la mortalité du cancer de prostate en France (d'après Rébillard et al).....p 23
- Figure 4 : physiologie de la prostate (figure modifiée d'après le Campbell-Walsh Urology).....p 26
- Figure 5 : voies de synthèse des androgènes (d'après le Campbell-Walsh Urology).....p 27
- Figure 6 : zones de la prostate (d'après la Société canadienne du cancer).....p 30
- Figure 7 : rôle de PAGE4 dans la cellule prostatique.....p 39
- Figure 8 : classification des facteurs de transcription Pax selon leur structure protéique (d'après Blake et al).....p 40
- Figure 9 : rôle de PAX6 dans la cellule prostatique.....p 42
- Figure 10 : modèle de travail.....p 43
- Figure 11 : coloration immunohistochimique de PAGE4 et de PAX6 sur des lames de biopsie de prostate (27x).....p 52
- Figure 12 : coloration immunohistochimique de KLK3 (figure 13) et de RA (figure 14) sur des lames de biopsie de prostate (27x).....p 53

Figure 13 : sur-expression de PAGE4 et PAX6 marquées dans 293FT (lignée cellulaire rénale).....p 53

Figure 14 : expression relative de PAGE4, PAX6, KLK3 et RA dans DU-145, LnCaP et PC3 ; par qPCR.....p 54

Figure 15 : western blot du récepteur aux androgènes (99 kDa) dans DU145, LnCaP et PC3.....p 55

Figure 16 : western blot de KLK3 (28kDa) dans DU145, LnCaP, lysa cellulaire de LnCaP du laboratoire Santa Cruz et PC3.....p 55

Figure 17 : western blot : anticorps de PAX6 (figure du haut) et contrôle avec un anticorps anti-B actin (figure du bas). PLHK Scr LnCap, PLHK PAX6 LnCaP, PLHK PAX6(5a) LnCaP, PLHK PAGE4 LnCaP. Remarque : poids moléculaire de PAX6 : 46 kDa, poids moléculaire de PLHK : 29 kDa, poids moléculaire de la B actin : 43 kDa.....p 56

Figure 18 : western blot : anticorps de PAGE4 (figure du haut) et contrôle avec un anticorps anti-B actin (figure du bas). PLHK Scr LnCaP, PLHK PAX6 LnCaP, PLHK PAX6(5a) LnCaP, PLHK PAGE4 LnCaP. Remarque poids moléculaire de PAGE4 :11 kDa, poids moléculaire de PLHK : 29 kDa, poids moléculaire de la B actin : 43kDa.....p 58

Figure 19 : expression relative de PAX6 dans LnCaP + vecteur nu (EV : empty vector), LnCaP + sur-expression de PAX6 (LNCaP+ PAX6) et LnCaP + sur-expression de PAX6(5a) (LNCaP + PAX6 (5a), en qPCR.....p 57

Figure 20 : western blot : anticorps de RA (figure du haut) et contrôle avec un anticorps anti-B actin (figure du bas). PLHK Scr LnCap (1), PLHK PAX6 LnCaP (2), PLHK PAX6(5a) LnCaP (3), PLHK PAGE4 LnCaP (4). Remarque : poids moléculaire du RA : 99 kDa poids moléculaire de la B actin : 43 kDa.....p 58

Figure 21 : western blot : anticorps de KLK3 (figure du haut) et contrôle avec un anticorps anti-B actin (figure du bas). PLHK Scr LnCap (1), PLHK PAX6 LnCaP (2), PLHK PAX6(5a) LnCaP (3), PLHK PAGE4 LnCaP (4). Remarque : poids moléculaire de KLK3 :

28 kDa, poids moléculaire de la B actin : 43 kDa.....p 59

Figure 22 : expression relative de RA dans LnCaP + vecteur nu (EV : empty vector), LnCaP + sur-expression de PAX6 (LNCaP+ PAX6) et LnCaP + sur-expression de PAX6(5a) (LNCaP + PAX6 (5a), en qPCR.....p 59

Figure 23 : représentation graphique des H scores de RA et PAX6 dans le groupe de xénogreffes de LuCaP.....p 60

Figure 24 : biopsies de xénogreffes LuCaP, H score moyen de PAX6 en fonction de la résistance ou non à la castration, les barres représentent les écarts types.....p 62

Figure 25 : biopsies humaines, H score moyen de PAGE4 en fonction de la présence ou non de cancer et la résistance ou non à la castration.....p 62

Figure 26 : groupe biopsies humaines, H score moyen de PAX6 en fonction de la présence ou non de cancer et la résistance ou non à la castration.....p 63

Figure 27 : nouveau modèle de travail.....p 64

Figure 28 : mécanismes de développement des cancers de la prostate résistant ou non à la castration (d'après Debes et al).....p 68

Figure 29 : utilisation potentielle des CTAs dans le traitement personnalisé des cancers urologiques, exemple du cancer du rein (d'après Kulkarni et al).....p 70

Liste des tableaux

Tableau 1 : caractéristiques des échantillons de la TMAa.....p 45

Tableau 2 : caractéristiques des échantillons de la TMAb.....p 45

Tableau 3 : expression relative de PAGE4, PAX6, KLK3 et RA dans DU-145, LnCaP et PC3 ; en qPCR.....p 55

Tableau 4 : expression relative de PAX6 dans LnCaP + vecteur nu (EV : empty vector), LnCaP + sur-expression de PAX6 (LNCaP+ PAX6) et LnCaP + sur-expression de PAX6(5a) (LNCaP + PAX6 (5a), en qPCR.....p 58

Tableau 5 : expression relative de RA dans LnCaP + vecteur nu (EV : empty vector), LnCaP + sur-expression de PAX6 (LNCaP+ PAX6) et LnCaP + sur-expression de PAX6(5a) (LNCaP + PAX6 (5a), en qPCR.....p 60

Partie I :Introduction

I) Épidémiologie du cancer de prostate

Au niveau mondial le cancer de la prostate¹ est le 2^e cancer le plus courant chez l'homme après celui du poumon. Environ 1,1 millions de nouveaux cancers de prostate ont été diagnostiqués en 2012, représentant 15 % des cancers diagnostiqués chez l'homme. L'incidence du cancer de prostate varie fortement d'une région du globe à une autre (voir figure 1) ; 70 % des nouveaux cas ont été diagnostiqués dans des pays développés. Les taux les plus élevés sont retrouvés en Australie et Nouvelle-Zélande (111,6 cas pour 100 000 hommes), en Amérique du Nord (97,2 cas pour 100 000 hommes) et en Europe (entre 59 cas pour 100 000 en Europe du Sud et 98 cas pour 100 000 en Europe de l'Ouest). Ces taux sont en partie expliqués par le dosage répandu du PSA et la réalisation de biopsies de prostate en cas d'anormalités du dosage du PSA. D'autres régions, disposant d'un moindre accès au dépistage personnalisé du cancer de la prostate, connaissent un taux d'incidence élevé (notamment les Caraïbes (79,8 cas pour 100 000)). A contrario, l'incidence du cancer de prostate reste faible en Asie (10,5 à 4,5 cas pour 100 000). Avec environ 307000 décès en 2012, le cancer de prostate est la 5^e cause de décès par cancer chez l'homme. Cependant le taux de mortalité varie selon les populations. Il est élevé dans les populations noires (29 pour 100 000) et bas dans les populations asiatiques (2,9 pour 100 000). En Europe et en Amérique le taux est intermédiaire.

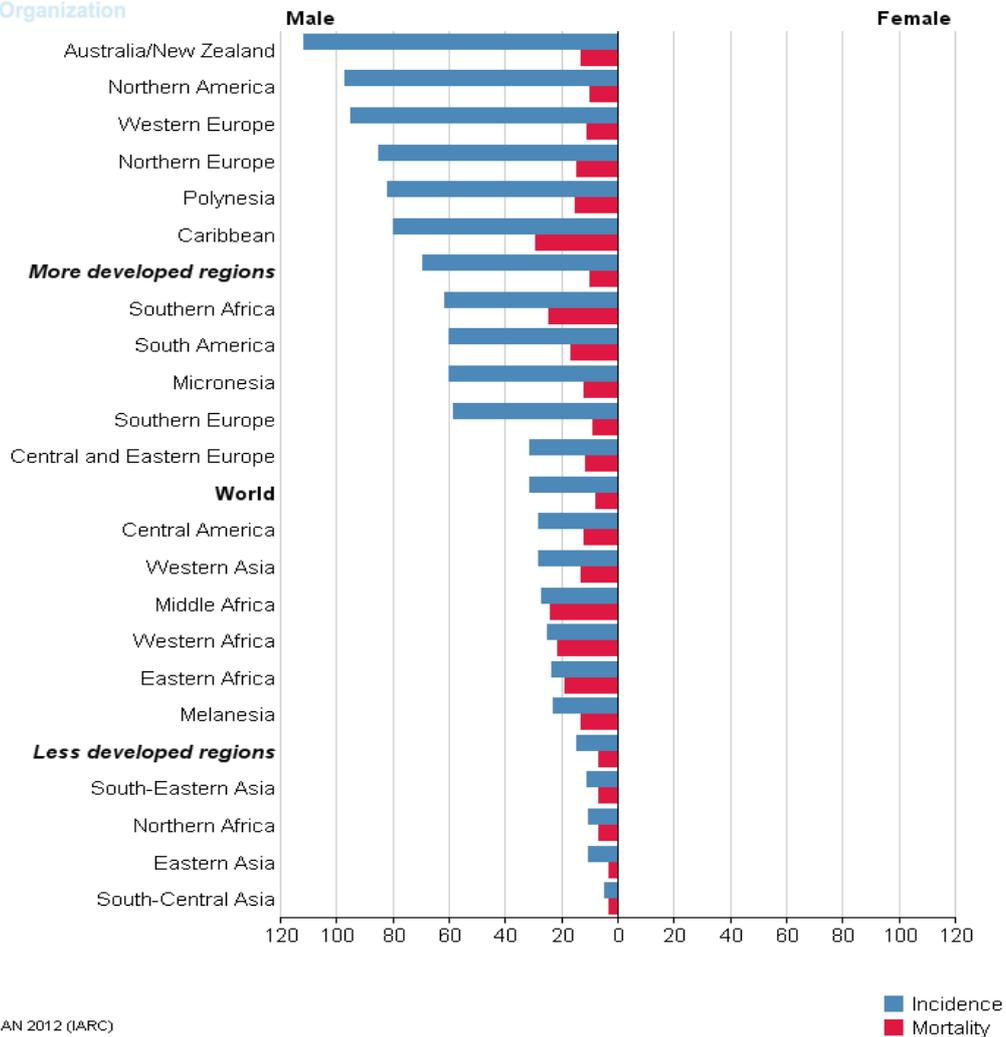


Figure 1 : Incidence et mortalité du cancer de prostate dans le monde en 2012 (d'après the world health organization¹⁾)

En France le cancer de la prostate² est le premier cancer chez l'homme en terme d'incidence. Il se classe devant le cancer du poumon et du côlon. En terme de mortalité par cancer, il se classe en 2^e position, derrière le cancer du poumon et devant le cancer du côlon. En 2009³, l'incidence était de 99,4 pour 100 000 et la mortalité de 11,3 pour 100 000 en France. Ces chiffres varient beaucoup avec l'âge (pic d'incidence à 70 ans et âge médian de décès supérieur à 80 ans) (voir figure 2).

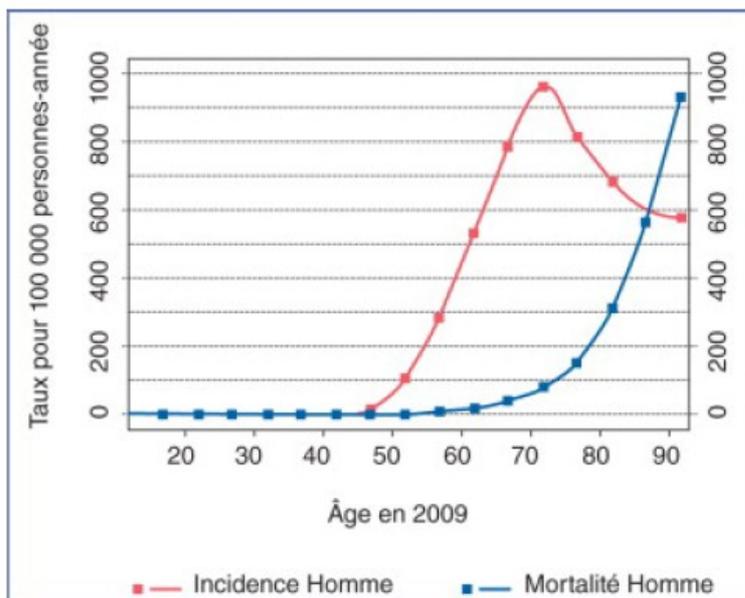


Figure 2 : Incidence et mortalité du cancer de la prostate par âge en 2009 en France (d'après Rébilard et al³)

Entre 1980 et 2009 l'incidence et la mortalité du cancer de prostate ont fortement évolué (voir figure 3). La large utilisation du dosage du PSA et l'évolution des traitements ont grandement contribué à ces évolutions.

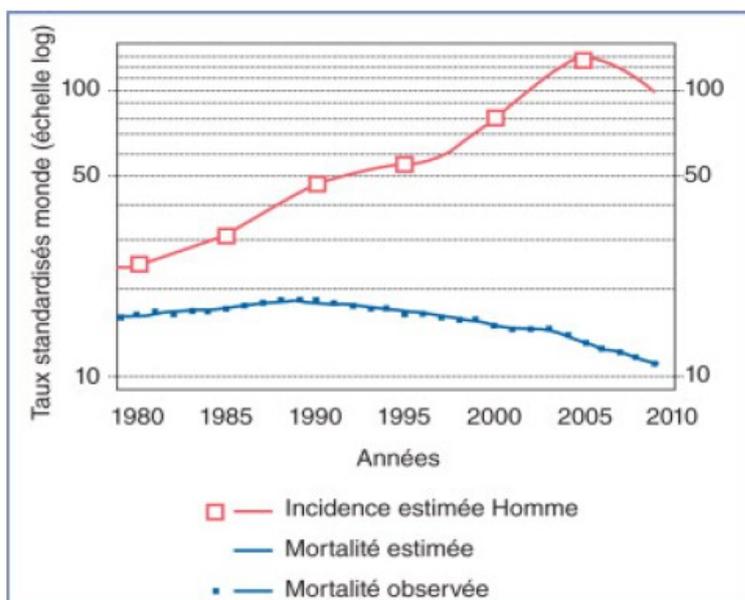


Figure 3 : Tendence chronologique de l'incidence et de la mortalité du cancer de prostate en France (d'après Rébillard et al³)

La survie des patients diagnostiqués entre 1989 et 2004⁴ en France fut de :

- 96 % à 1 an
- 84 % à 5 ans
- 70 % à 10 ans

II) Facteurs de risques du cancer de prostate

Les facteurs de risques du cancer de la prostate⁵ sont peu connus. Cependant 3 ont pu être clairement établis : l'âge, les facteurs héréditaires et l'origine ethnique.

1) Age

Le cancer de la prostate⁶ est rare avant 50 ans (<0.1 % des cas) mais son incidence augmente rapidement avec l'âge et plus de 75 % des nouveaux cas sont diagnostiqués après 65 ans.

2) Facteurs héréditaires

Les cancers héréditaires sont relativement rares (environ 9 % des cas). Ils sont définis par au moins 3 apparentés atteints ou 2 apparentés atteints avant 55 ans. Les patients atteints d'une forme héréditaire de cancer de prostate développent des formes précoces de cancer de prostate (en moyenne 6 à 7 ans plus tôt que les autres formes) cependant leur évolution est comparable aux formes spontanées. Si un apparenté du premier degré (père, fils, frère) est atteint, le risque relatif est de 2 pour les autres apparentés. Si 2 ou plus d'apparentés du premier degré sont atteints ce risque varie de 5 à 11.

3) Origine ethnique et facteurs environnementaux

Le dernier facteur de risque établi est l'origine ethnique. Ainsi il semble que dans les populations des caraïbes par exemple, le taux de mortalité par cancer de prostate soit très élevé et, à contrario, ce taux soit plutôt faible dans les populations d'Asie. Cependant, ces taux sont à pondérer car d'autres facteurs, notamment environnementaux, semblent les modifier. Il a ainsi été démontré que les Japonais qui émigraient aux USA voyaient leur

taux d'incidence de cancer de prostate augmenter, approchant celui des hommes blancs Américains⁵.

Parmi les facteurs environnementaux l'alimentation semble jouer un rôle prépondérant même si pour le moment, aucun aliment ou substance (à quelques exceptions près, la chlordecone⁷ par exemple) n'ont pu être directement incriminés.

III) Éléments de physiologie prostatique

La prostate est composée, en volume, d'environ 30 % de cavité, 30 % de tissu épithélial, 10 % à 20 % de tissu musculaire et 20 à 30 % de tissu conjonctif⁸.

1) L'épithélium prostatique

L'épithélium prostatique comprend plusieurs types cellulaires : les cellules épithéliales, les cellules neuroendocrines, les cellules intermédiaires (transit-amplifying cells [TAC]) et les cellules basales (cellules souches de l'épithélium) (voir figure 4).

Les cellules épithéliales bordent la lumière des canaux de la glande prostatique et déversent leurs sécrétions dans les acini prostatique. Ces cellules sont riches en PSA, en phosphatases acides prostatiques (PAP), en kératine et expriment RA.

Les cellules neuroendocrines sont intraglandulaires, font partie de l'épithélium sécrétoire et sont visibles dans tous les secteurs de la prostate. Elles n'expriment pas, sauf cas exceptionnel, le PSA. Ces cellules participent à la croissance et à la différenciation de l'épithélium, via un contrôle autocrine et paracrine.

Les TAC sont des cellules intermédiaires entre les cellules souches basales de l'épithélium glandulaire et les cellules épithéliales matures de la couche supérieure.

Les cellules basales sont peu nombreuses, pluripotentes et quiescentes, situées à proximité de la membrane basale de l'épithélium, et sécrètent peu ou pas de PSA (ou KLK3) et de PAP. Elles servent de réserve pour régénérer l'épithélium prostatique. La castration n'entraîne pas la mort de ces cellules qui peuvent ensuite régénérer l'épithélium. Elles n'expriment pas ou peu le RA, mais sont sensibles à l'action des estrogènes.

2) Stroma prostatique

Le stroma est séparé de l'épithélium par la membrane basale. Il contient la matrice extracellulaire, des fibroblastes, des capillaires, des cellules endothéliales lymphatiques, des cellules musculaires lisses, des cellules neuroendocrines et des axones. La matrice extracellulaire est le vecteur indispensable pour les facteurs de croissance et la communication intercellulaire.

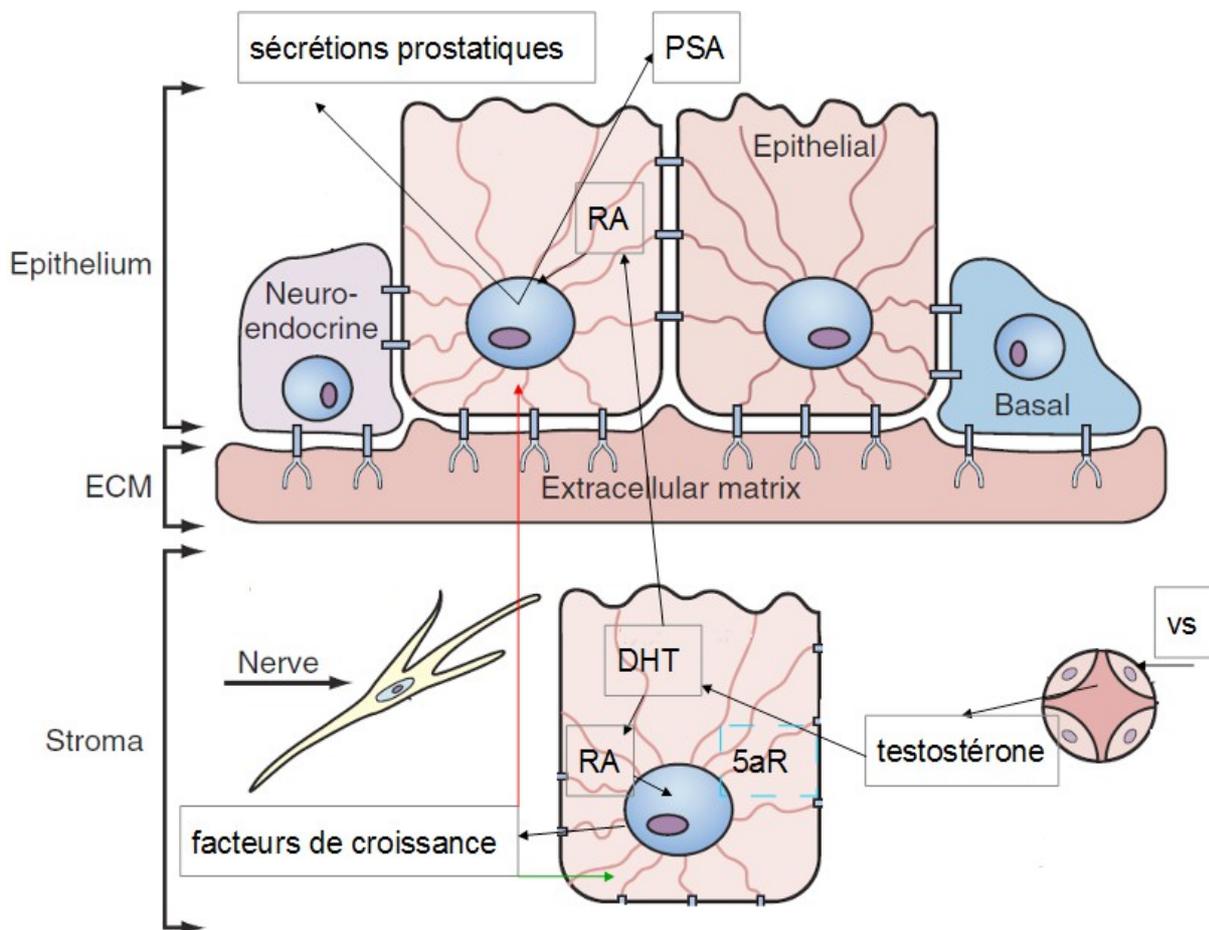


Figure 4 : physiologie de la prostate, la flèche rouge indique un mode de sécrétion paracrine, la flèche verte indique un mode de sécrétion autocrine, VS : vaisseau sanguin, (figure modifiée d'après le Campbell-Walsh Urology⁹).

3) Homéostasie prostatique

a) Biosynthèse des androgènes

La stimulation androgénique est fondamentale pour la croissance du cancer de prostate et

ultimement pour sa létalité. La testostérone est le principal androgène circulant chez l'homme. La quantité d'androgènes sérique est sous la dépendance de l'axe hypothalamo-antéhypophysaire¹⁰. La luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) ou gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) est sécrétée par l'hypothalamus et stimule l'antéhypophyse qui va principalement sécréter de la LH et de l'adrénocorticotropin hormone (ACTH). La LH stimule la sécrétion d'androgènes au niveau des testicules, alors que l'ACTH la stimule au niveau des glandes surrénales. Environ 95 % de la testostérone est synthétisée par les testicules, au niveau des cellules de Leydig, et 5 % par les glandes surrénales (zone réticulée de la corticosurrénale)¹¹, sous forme d'androsténédione principalement (voir figure 5). La biosynthèse de la testostérone peut aussi se faire, de façon pathologique, dans les cellules cancéreuses de prostate¹².

Les androgènes sont synthétisés à partir du cholestérol¹⁰, via de nombreuses étapes, faisant intervenir plusieurs enzymes. La plupart de ces enzymes appartiennent à la famille des cytochromes P450 (CYP). Dans la prostate, la testostérone est transformée en 5 alpha-dihydrotestostérone (DHT) par la 5 alpha-réductase (5-AR) au niveau du cytoplasme. Les récepteurs aux androgènes (RA) peuvent se lier à la testostérone ou à la DHT mais ont une plus grande affinité pour la DHT.

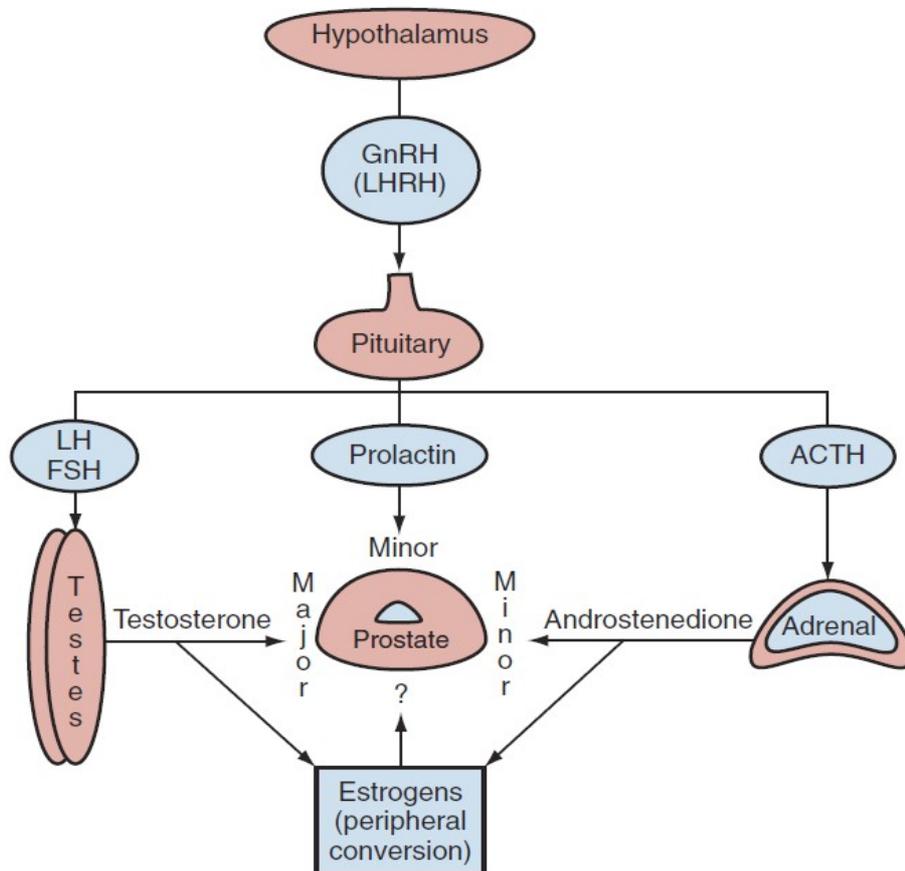


Figure 5 : voies de synthèse des androgènes (d'après le Campbell-Walsh Urology⁹)

b) Rôles de la testostérone et de la DHT

La DHT¹⁰ semble jouer un rôle dans la prostate, le scalp, la différenciation génitale et les corps caverneux. Ainsi, les inhibiteurs de 5-AR induisent une diminution de la taille de la prostate et une baisse du PSA sérique.

Le rôle de la testostérone¹⁰ est dominant dans la spermatogenèse, et le développement des muscles et des os. Indépendamment de la DHT, elle joue aussi un rôle dans le fonctionnement prostatique. Ceci fut démontré par les agonistes de la LHRH (qui induisent une baisse de la testostérone et par conséquent de la 5-DHT) qui induisent une réduction plus importante du volume prostatique et du PSA que les inhibiteurs de 5-AR (qui induisent une baisse de la 5-DHT seule).

c) Physiologie du récepteur aux androgènes dans la prostate

Le RA est un régulateur clé de la prostate physiologique¹³. Le RA appartient à la famille des récepteurs aux stéroïdes. Il contient 3 domaines fonctionnels distincts représentés par le domaine N-terminal (NTD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison au ligand carboxyterminal (LBD). Il est composé de 919 acides aminés pour un poids de 99 kDa (source : phosphosite.org). Son locus est: Xq11.2-q12 (source : hprd.org). Dans sa forme non liée, le RA se trouve dans le cytoplasme des cellules de cancer de prostate complexé avec des protéines de choc thermique (HSP)¹⁴. Dès la liaison du ligand (testostérone ou DHT), le récepteur change de conformation et se dissocie des HSP. Après dimérisation et phosphorylation le RA est transloqué dans le noyau¹⁵. Dans le noyau le DBD se lie avec les éléments de réponse aux androgènes (ARE) et entraîne le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et la transcription des gènes cibles (gène du PSA (aussi appelé KLK3) par exemple)¹⁶. KLK3 est composé de 28 acides aminés, pour un poids moléculaire de 29 kDa (source : phosphosite.org). Son locus est : 19q13.41 (source : .hprd.org).

d) Autres acteurs

Les autres acteurs de l'homéostasie prostatique sont les estrogènes, la DHEA, les facteurs de croissance et les sécrétions prostatiques (qui participent à la formation du sperme).

IV) Physiopathologie du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le plus souvent un adénocarcinome développé aux dépens de l'épithélium prostatique. Il envahit tout d'abord la prostate puis la capsule avant de disséminer par voie lymphatique et hématogène. Les cellules tumorales naissent au niveau de l'épithélium où elles perdent leur équilibre prolifération/quiescence à la faveur de l'accumulation d'anomalies génétiques (mutations somatiques tumorales).

Les mécanismes moléculaires impliquent notamment la 5aR, le RA, les estrogènes et les voies de signalisation du cancer. La 5aR et les RA vont voir leur expression et leur activité augmentées par mutation. Le rôle des estrogènes n'est pas encore élucidé mais il semblerait qu'elles soient impliquées dans la transduction de gènes de fusions et dans la régulation du RA. Enfin, la dérégulation des voies de signalisation entraîne une augmentation de production des facteurs de croissance et une augmentation de la transcription de RA.

V) Anatomopathologie du cancer de la prostate

Dans environ 90 % des cas, l'anatomopathologie du cancer de prostate correspond à un adénocarcinome¹⁷. Les autres types ; tels les sarcomes, les lymphomes ou les carcinomes transitionnels, sont rares.

Dans le cas de l'adénocarcinome, 70 % des tumeurs siègent dans la zone périphérique (accessible au TR à partir d'un certain volume) de la prostate, 10 % dans la zone centrale et 20 % dans la zone transitionnelle (le plus souvent découvert sur les copeaux de RTUP) (voir figure 6).

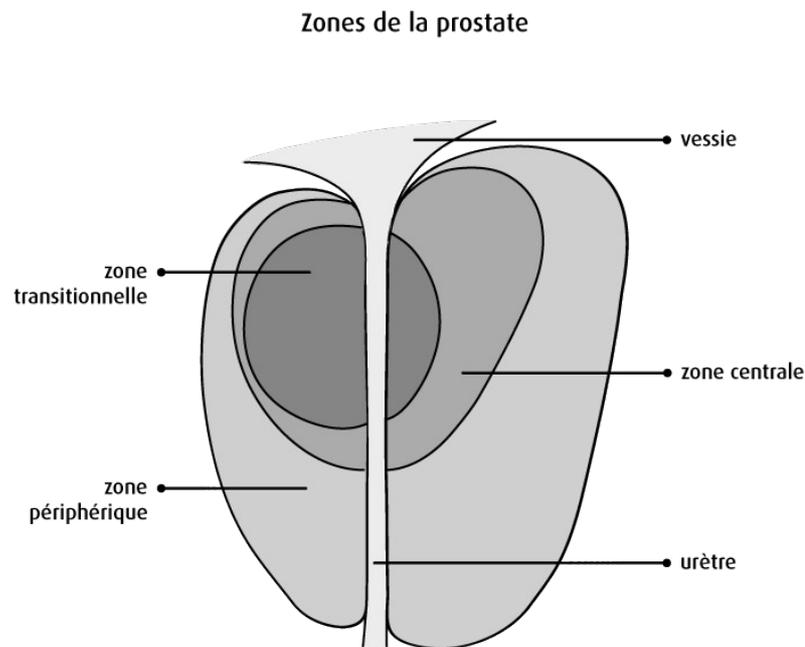


Figure 6 : zones de la prostate (d'après la Société canadienne du cancer¹⁸)

VI) Diagnostic du cancer de prostate

Actuellement le diagnostic du cancer de prostate repose sur 3 piliers¹⁹ : le toucher rectal, le dosage du PSA et les biopsies de prostate.

1) Toucher rectal

Le toucher rectal est, en cas d'anormalité (induration), un examen suffisant devant conduire à la réalisation de biopsies de prostate. Ainsi, un toucher rectal suspect, associé à une valeur de PSA de 2ng/ml présente une valeur prédictive positive allant de 5 à 30%⁵.

2) PSA

a) PSA total, libre et complexé

Le PSA est présent dans l'organisme sous différentes formes dont les plus courantes sont le PSA total, le PSA libre et le PSA complexé. Classiquement, la valeur seuil de 4ng/ml de PSA total a été reconnue comme étant la valeur limite normale du PSA. Au-delà de cette limite la réalisation de biopsies de prostate doit être envisagée. Ainsi, pour une valeur de

PSA total comprise entre 4 et 10 ng/ml la valeur prédictive positive est de 25 à 35% et elle passe à 50 à 80% pour une valeur supérieure à 10 ng/ml¹⁹. Lorsque la valeur du PSA total est comprise entre 4 et 10 ng/ml, 70 % des cancers diagnostiqués sont localisés.

Après une première série de biopsies de prostate négatives, le dosage sérique du PSA libre peut être utilisé. En effet, la fraction libre du PSA est plus diminuée en cas de présence de cancer qu'en cas d'hyperplasie bénigne. La valeur seuil du rapport PSA libre/total qui fait suspecter un cancer est le plus souvent de 15%¹⁹. L'utilisation de ce ratio n'a pas sa place en cas de PSA>10ng/ml ou durant le suivi d'un patient atteint d'un cancer de prostate⁵.

b) Vitesse et temps de doublement du PSA

La vitesse du PSA (PSAV) s'exprime en ng/ml/an et représente l'augmentation linéaire du PSA dans le temps. La valeur seuil de 0,75ng/ml/an est souvent proposée mais sans réel consensus.

Le temps de doublement du PSA (PSADT) exprime l'augmentation exponentielle du PSA (inverse de la demi-vie du PSA) en mois. Il est surtout utilisé chez les patients en cours de surveillance ou lors d'une récurrence biologique après traitement curatif. Plus le PSADT est court et plus la maladie est considérée comme agressive. Son calcul se fait à partir de nomogrammes.

Ces 2 indicateurs, PSAV et PSADT, n'ont que peu de place dans le diagnostic de la maladie, mais peuvent être utiles dans son suivi⁵.

c) Autres formes de PSA

D'autres formes de PSA sont en cours d'évaluation : densité du PSA, score PCA3 et index PHI notamment. Ces différentes formes prometteuses sont encore en cours d'évaluation et ne sont pas utilisées, pour le moment, en pratique clinique courante^{5,19}.

3) Biopsies de la prostate

a) Indications

Les biopsies de prostate sont indiquées en cas de toucher rectal suspect et/ou en cas de dosage de PSA élevé (sur au moins 2 dosages sériques)^{5,19}.

b) Complications

Les complications des biopsies de prostate sont principalement l'hémospermie, l'hématurie et dans une plus faible mesure la prostatite (détail des complications en annexe 1)

c) Première série de biopsies

Le schéma classique de la première série de biopsies comprend 12 prélèvements. Celui-ci pourra être modifié en cas d'anomalie clinique ou radiologique.

d) Deuxième série de biopsies

En cas de négativité de la première série de biopsies, une 2^e série peut être envisagée dans les 3 à 6 mois. Les principales indications sont la présence d'atypies (ASAP : atypical small acinar proliferation) ou un doute diagnostique^{5,19} (persistance d'un taux élevé de PSA, élévation du PSA, apparition d'une anomalie au TR).

4) Place de l'IRM

La place de l'IRM dans le diagnostic du cancer de prostate est en cours d'évaluation. Cependant il semble que cette technique permettrait d'augmenter la détection des cancers tout en réduisant le nombre de prélèvements nécessaires. Selon l'Association Européenne d'Urologie⁵ (EAU), une IRM multiparamétrique avant une 2^e série de biopsies peut être envisagée.

5) Analyse anatomopathologique des biopsies

Après réalisation des biopsies leur analyse par un anatomopathologiste permet de déterminer le score de Gleason. Ce score s'obtient en additionnant le grade histologique le plus représenté avec le grade le plus péjoratif. On obtient ainsi un score allant de 6 à 10.

VII) Dépistage du cancer de la prostate

L'intérêt du dépistage du cancer de la prostate est un sujet régulièrement débattu. Malgré plusieurs études randomisées^{20,21}, il n'a pas été mis en évidence de gain en terme de survie globale dans la population générale masculine. Devant le risque de sur-traitement de formes potentiellement bénignes de cancer de la prostate et l'absence de gain formel en terme de survie globale, l'HAS ne recommande pas le dépistage systématique de masse de ce cancer²². L'Association Française d'Urologie¹⁹ (AFU), elle, recommande une détection précoce individualisée du cancer de la prostate ayant pour objectif essentiel de ne pas méconnaître un cancer agressif. Celle-ci se fait après information éclairée sur les modalités, les enjeux et les risques éventuels liés aux différentes stratégies de prise en charge. Ce dépistage est fondé sur le toucher rectal et le dosage du PSA total chez les hommes sans polyopathie à partir de 50 ans.

Dans le cas particulier des patients d'origine afro-antillaise ou en cas d'antécédent familial de cancer de la prostate (au moins 2 cas collatéraux ou de survenue d'un cas avant 55 ans), la détection est recommandée à partir de 45 ans. En cas d'âge avancé ou de polyopathie sévère, la détection n'est pas recommandée.

Les recommandations de l'EAU pour le dépistage individuel du cancer de la prostate sont résumées dans l'annexe 2.

VIII) Classifications de la maladie

Une fois le diagnostic de la maladie établi, elle est classée selon son stade TNM (voir annexe 3). La classification TNM permet d'évaluer l'extension locale et à distance de la maladie.

La classification de D'Amico^{23,24} (voir annexe 4), elle, intègre la valeur du PSA, le score de Gleason et le stade TNM de la tumeur afin d'évaluer le risque (faible, intermédiaire ou élevé) de progression tumorale après prostatectomie radicale, radiothérapie externe ou curiethérapie interstitielle.

Un bilan d'extension locale et à distance sera proposé en fonction du risque de progression de la maladie et du type de traitement envisagé (curatif ou palliatif).

IX) Facteurs pronostiques

Ces facteurs sont de 4 natures¹⁹ : clinique, biologique, anatomopathologique et radiologique.

1) Clinique

Les facteurs cliniques sont principalement liés aux données du TR. Ainsi, les tumeurs localement avancées (cT3) sont associées à un risque évolutif péjoratif après traitement local.

2) Biologique

Après traitement curatif par radiothérapie ou curiethérapie, indépendamment d'une hormonothérapie associée, un nadir du PSA total < 0,5 ng/ml est un facteur de bon pronostic. De même, la valeur du PSA initial et la cinétique du PSA (vélocité et temps de doublement) sont des facteurs indépendants de l'évolution de la maladie. D'autres marqueurs, notamment urinaire (gène PCA3 et gène de fusion Tmprss2) semblent prometteurs du point de vue pronostique, cependant ils ne sont pas encore utilisés en pratique courante.

3) Anatomopathologique

a) Analyse des biopsies

Le pourcentage et la longueur des biopsies positives sont un facteur pronostique¹⁹. De même, la présence et le pourcentage de grade 4 et 5 sont des facteurs majeurs de récurrence biologique. Dans le cas de biopsies positives au niveau des vésicules séminales (non réalisées de façon systématique), il y a un risque accru de récurrence locale et à distance après traitement curatif⁵.

b) Analyse de la pièce de prostatectomie

Son analyse, avec celle des ganglions lymphatiques, permet de déterminer le score de Gleason « chirurgical », le stade pTNM et le statut des limites d'exérèse¹⁹. Ces éléments permettent d'évaluer le risque de récurrence et la nécessité de traitements complémentaires.

4) Radiologique : l'IRM

Les évolutions récentes des techniques d'IRM ont permis une meilleure appréciation de l'extension locale, de l'extension à la graisse périphérique et de l'extension ganglionnaire de la maladie.

X) Principaux traitements

1) Cancer localisé

La gamme des traitements du cancer de la prostate est large. Les cancers de stade localisé peuvent être traités par abstention-surveillance^{5,19}, surveillance active^{19,25,26}, chirurgie^{19,27-30} (prostatectomie radicale), radiothérapie externe^{5,19,19,27,31}, curiethérapie^{5,19,32}, ultrasons focalisés à haute intensité^{5,33,34} (HIFU), cryothérapie³⁵ (détail des modalités techniques de ces traitements en annexe 5). Les stades métastatiques seront principalement traités par hormonothérapie (ancienne et nouvelle génération) et chimiothérapie.

2) Cancer métastatique

a) Hormonothérapie

La castration peut être obtenue de différentes façons³⁶ : par castration chirurgicale, par analogue ou antagoniste de la LHRH, par les anti-androgènes (stéroïdiens et non stéroïdiens). L'objectif actuel est de maintenir le niveau de testostérone sérique inférieur à 0,5 ng/ml. Le blocage androgénique, lorsqu'il associe l'inhibition de la sécrétion testiculaire de testostérone et l'inhibition des effets biologiques des androgènes rémanents par un anti-androgène, est dit complet. De même, selon le caractère continu ou non du traitement, celui-ci sera dénommé traitement continu ou intermittent. L'annexe 6 récapitule les indications de l'hormonothérapie comme traitement principal.

Les effets secondaires de l'hormonothérapie doivent être recherchés et pris en charge. Les principaux sont : bouffée de chaleur, troubles de l'érection et de la libido, altérations cognitives, troubles de l'humeur, anémie, syndrome pseudo-métabolique (dont la résistance à l'insuline) et ostéoporose.

b) Hormonothérapies de nouvelle génération

Après une période de sensibilité à la castration le cancer de la prostate devient résistant à la castration (CPRC). C'est pour répondre à cette résistance que 2 molécules ont été développées : l'acétate d'abiratéron et l'enzumalide. L'acétate d'abiratéron est un inhibiteur de la synthèse des androgènes. Il agit notamment au niveau des glandes surrénales où il bloque la production résiduelle androgénique³⁷. Il s'utilise en pré- et post-docétaxel¹⁹. Ses principaux effets secondaires sont l'hypertension artérielle, les œdèmes des membres inférieurs, l'hypokaliémie et les perturbations du bilan hépatique. L'enzumalide est un anti-androgène qui se fixe sur le domaine de liaison du récepteur aux androgènes des cellules du cancer de prostate³⁸. Il s'utilise en post-docétaxel. Ses effets secondaires sont l'asthénie et des crises d'épilepsie. D'autres molécules sont en cours d'évaluation¹³.

c) Chimiothérapie

La chimiothérapie de première ligne repose sur la mitoxantrone et le docétaxel^{5,19}. Ils sont indiqués dans le cancer de prostate résistant la castration métastatique symptomatique.

3) Choix du traitement

Les recommandations de l'AFU¹⁹ et de l'EAU⁵ concernant les indications des traitements du cancer de la prostate sont résumés en annexe 7.

XI) Suivi après traitement

Le suivi du cancer de prostate après traitement vise principalement à détecter la survenue d'une récurrence de la maladie ou la survenue de complications du traitement. Il repose sur l'examen clinique et le dosage du PSA (sauf en cas de métastases osseuses dont l'évaluation se fait selon les critères RECIST³⁹). Selon les traitements, le nadir du PSA sera obtenu plus ou moins rapidement (moins de 3 mois pour la chirurgie, jusqu'à 5 à 6 ans pour la curiethérapie). Les critères de récurrences biologiques de l'AFU sont regroupés dans l'annexe 8.

XII) Cancer de la prostate résistant à la castration

En cas de traitement par hormonothérapie, l'évolution de la maladie connaît le plus souvent 2 grandes phases. Une phase de réponse au traitement, durant laquelle la maladie est contrôlée et le PSA diminué. Puis une phase de résistance à la castration, caractérisée par la reprise de la croissance tumorale et l'augmentation du PSA. L'évolution du CPCR est marquée par l'apparition de métastases, notamment osseuses, et ultimement le décès du patient. Historiquement, la survie médiane des patients atteints d'un CPCR était inférieure à 2 ans⁴⁰. Cependant, avec l'apparition de nouveaux traitements, elle augmente progressivement.

XIII) Cancer/Testis Antigens et Prostate-associated gene 4 (PAGE4)

1) Cancer/Testis Antigens

Les Cancer/Testis Antigens (CTAs) sont une classe de tumour-associated antigens (TAAs). Ils sont divisés en 2 groupes selon leur localisation chromosomique⁴¹. Les CT-X antigens sont localisés sur le chromosome X et les non-X CT antigens sur les autosomes. Les CTAs sont typiquement exprimés dans les cellules souches embryonnaires et les cellules germinales testiculaires⁴². Ils ne sont pas ou peu exprimés dans les tissus somatiques, mais sont retrouvés de façon aberrante dans plusieurs types de cancer⁴¹. Dans les cellules cancéreuses, les CTAs sont généralement sur-exprimés en réponse à l'hypométhylation de l'ADN. Ils sont associés aux formes de cancers avancés et/ou de pronostic péjoratif⁴³. De part leur restriction d'expression tissulaire, ils pourraient devenir des cibles pour les immunothérapies⁴⁴ et/ou servir de biomarqueurs. En effet, des anticorps anti-CTAs ont été mis en évidence dans plusieurs cancers et sont associés à un meilleur pronostic⁴⁵.

2) Prostate-associated gene 4 (PAGE4)

a) Structure, expression et rôle de PAGE4

PAGE4 est un membre de la famille des CT-X antigens⁴². Son gène est situé sur le chromosome X (locus : Xp11.23 (hprd.org)). Sa protéine est composée de 102 acides

amines (phosphosite.org). À partir de l'ARNm de PAGE4, Iavarone et al⁴⁶ ont estimé son poids moléculaire à 16000 Da. PAGE4 est exprimé dans le cytoplasme des cellules épithéliales de prostates saines et malignes⁴⁶, ainsi que dans le noyau des cellules prostatiques normales⁴⁷. Cependant le niveau d'expression de PAGE 4 est plus faible dans les cellules cancéreuses de prostate par rapport aux cellules saines. Cette baisse semble linéaire, le niveau étant maximal dans la prostate saine, intermédiaire dans les lésions de type PIN et le cancer de prostate localisé, et minimal dans les métastases⁴⁷. Au niveau des lignées cellulaires de cancer de prostate, l'expression de l'ARNm de PAGE4 est forte dans LnCaP, moyenne dans DU145 et nulle dans PC3⁴². Au niveau protéique, PAGE4 n'a pas été mis en évidence dans ces lignées⁴⁷. PAGE4, tout comme les autres membres de la famille des PAGE, est aussi exprimé dans les cellules du placenta, les cellules testiculaires et les cellules utérines⁴⁸.

La structure de la protéine de PAGE4 est de type Intrinsically Disordered Protein (IDP)⁴². Ce type de protéines est impliquée dans la régulation de la transcription et dans la signalisation cellulaire. La sur-expression de PAGE4, dans les cellules de cancer de prostate LnCaP, induit une baisse de l'activité des RA⁴⁷. Cela se traduit notamment par une baisse de l'expression de ses gènes cibles, dont celui du PSA (voir figure 7). La fonction de PAGE4 sur la croissance tumorale est contradictoire. Sa sur-expression⁴⁷, tout comme la baisse de son expression⁴², entraînent un ralentissement de la croissance tumorale des cellules LnCaP dans les modèles de xéno greffe murins. Son rôle dans la croissance tumorale pourrait être lié à son interaction avec c-Jun⁴⁹ ; une protéine appartenant aux voies de régulation du stress cellulaire et jouant un rôle dans le développement des pathologies prostatiques.

b) Intérêt thérapeutique de PAGE4

Au niveau thérapeutique, PAGE4 pourrait devenir la cible d'un vaccin⁵⁰ du cancer de la prostate. En effet, PAGE4 est capable d'activer les lymphocytes-T cytotoxiques et de déclencher une réponse immunitaire.

c) Intérêt pronostique de PAGE4

L'intérêt de PAGE4 comme facteur pronostique du cancer de la prostate n'est pas démontré. Son niveau expression ne semble pas lié avec le score histologique de Gleason,

ou l'index de prolifération cellulaire⁴⁷. De même, son niveau d'expression ne varie pas entre les cellules sensibles à la castration et les cellules résistantes. Cependant, un haut niveau d'expression de PAGE4 semblerait être un facteur de bon pronostic chez les patients naïfs en hormonothérapie.

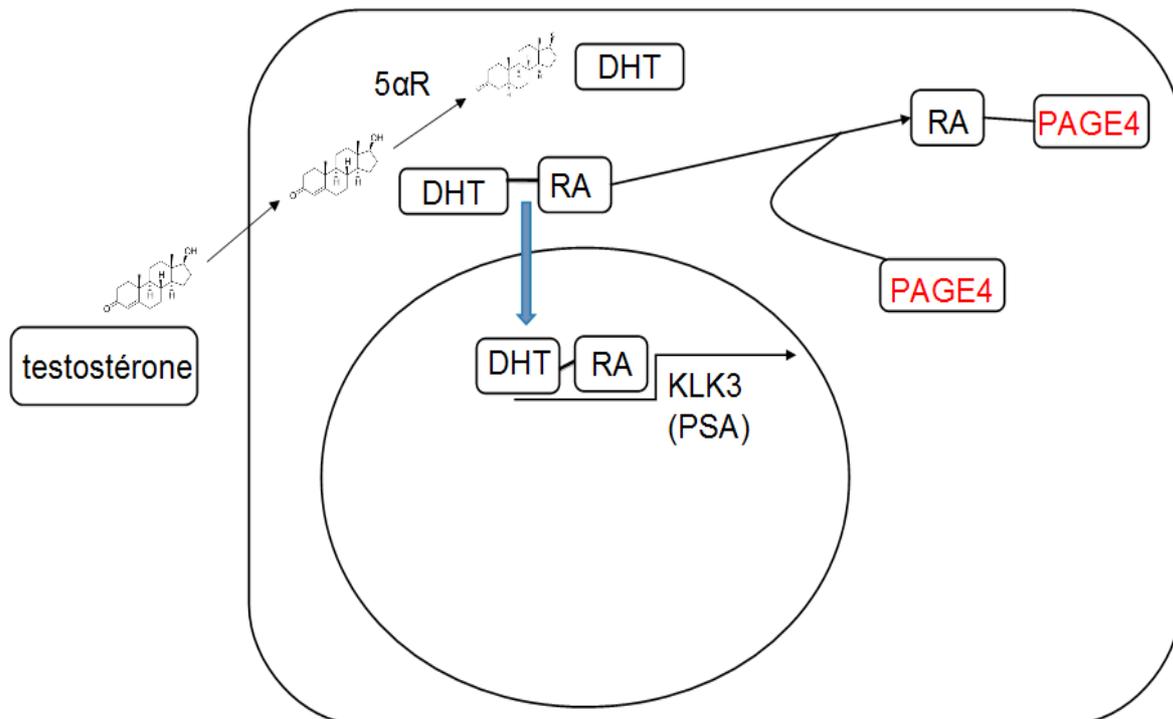


Figure 7 : rôle de PAGE4 dans la cellule prostatique

XIV) Paired box (Pax) genes family et PAX6

1) Paired box (Pax) genes family

La famille des genes Pax code pour des facteurs de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, appelé domaine apparié (paired domain)⁵¹ ; ainsi qu'un domaine de transactivation au niveau C-terminal permettant l'augmentation de l'expression des genes cibles. Certaines protéines Pax contiennent un deuxième domaine de liaison à l'ADN (homéodomaine). Leur classification est basée sur la présence ou non d'un homéodomaine et/ou d'une région octapeptique supplémentaire permettant la fixation

de co-activateurs (voir figure 8). Les facteurs de transcription Pax jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression génétique, notamment lors de la croissance tissulaire⁵². 9 gènes Pax (Pax1-Pax9) ont été caractérisés chez les mammifères⁵¹.

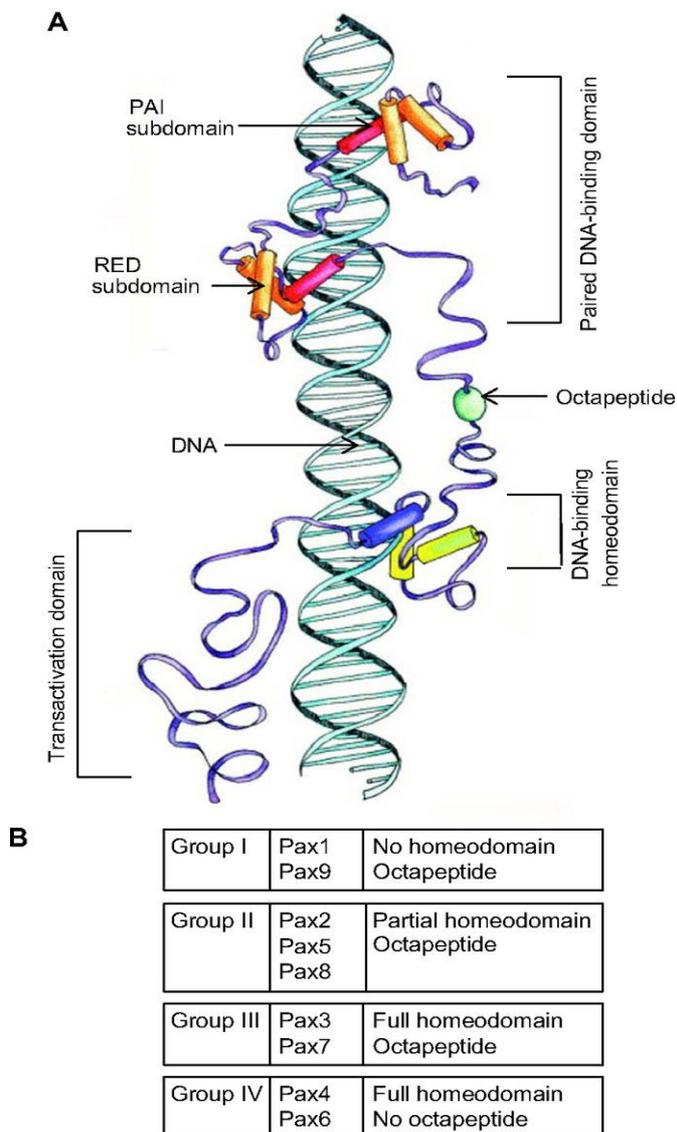


Figure 8 : classification des facteurs de transcription Pax selon leur structure protéique (d'après Blake et al⁵¹)

2) PAX6

a) Structure et fonctions de PAX6

PAX6 appartient à la famille des Paired Box gene. La protéine de PAX6 a un poids moléculaire de 46.683 kDa (phosphosite.org) et est composée de 422 acides aminés. Dans la prostate, elle est exprimée dans le noyau cellulaire⁵³. Son gène est situé sur le chromosome 11 (locus : 11p33 (hprd.org)). PAX6 fonctionne comme un facteur de transcription et est impliqué dans différents processus développementaux, notamment de l'œil⁵⁴. Cependant, PAX6 est aussi connu pour avoir une fonction de suppresseur de tumeur⁵⁵.

La protéine de PAX6 contient trois domaines : le domaine apparié, un homéodomaine et le domaine de transactivation⁵⁶. Une forme alternative d'épissage, PAX6(5a), contient 14 acides aminés supplémentaires au niveau du domaine apparié⁵². Cette insertion change considérablement le domaine de fixation à l'ADN. PAX6 (5a) constitue jusqu'à 20 % des transcrits de PAX6. Chez l'Homme et la souris, la perte de PAX6(5a) entraîne des phénotypes oculaires distincts⁵⁷. Dans le développement cérébral, la sur-expression de PAX6 inhibe la prolifération cellulaire des progéniteurs et augmente la neurogénèse. La sur-expression de PAX6(5a) provoque une inhibition de la croissance cellulaire, mais ne modifie pas la neurogénèse⁵⁸. Ainsi, il semble que PAX6(5a) contrôle la prolifération cellulaire, alors que PAX6 contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire.

b) PAX6 et cancer

Alors que la majorité des gènes de la famille PAX sont associés à un pronostic défavorable en cas de cancer ; PAX6 semble avoir un rôle de suppresseur de tumeur dans le glioblastome⁵⁹ et le cancer de prostate⁵³. Dans le cancer de prostate et le cancer de vessie, PAX6 semble être hyperméthylé⁶⁰⁻⁶².

Dans le cancer de prostate, PAX6 entre en compétition avec un facteur de transcription, la Stromelysin-1 PDGF-responsive element Binding Protein (SPBP) et entraîne une baisse de l'expression des gènes cibles du RA. La SPBP est une protéine nucléaire qui joue le rôle de co-activateur transcriptionnel du RA. Elle se fixe directement sur le RA et permet la transcription des gènes cibles. PAX6 entre en compétition avec SPBP en empêchant sa fixation (voir figure 9) et en se fixant à sa place sur le RA⁶³. Dans les cellules LnCaP, la surexpression de PAX6 entraîne un ralentissement de la croissance cellulaire et une baisse de l'expression des gènes androgéno-dépendants (baisse de l'ARNm du PSA)⁵³.

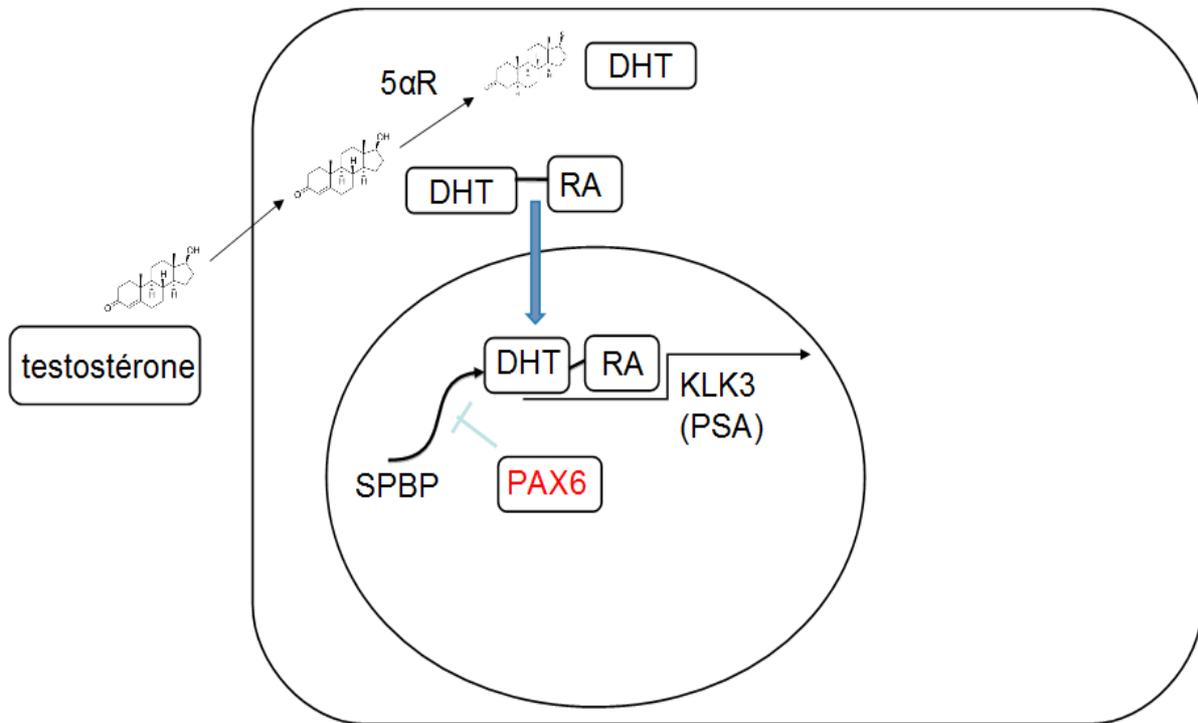


Figure 9: rôle de PAX6 dans la cellule prostatique

XV) Hypothèses

Une étude *in silico* du promoteur de PAGE4 a révélé un site de fixation potentielle de PAX6 (www.ifti.org). Ainsi, PAX6 régulerait l'activité du RA à 2 niveaux : au niveau de l'expression des gènes androgéno-dépendants et au niveau de l'expression de PAGE4 (voir figure 10). Selon notre modèle une baisse de l'expression de PAX6 conduirait à une augmentation de l'expression des gènes androgéno-dépendants par baisse de l'inhibition de SPBP et baisse de l'expression de PAGE4.

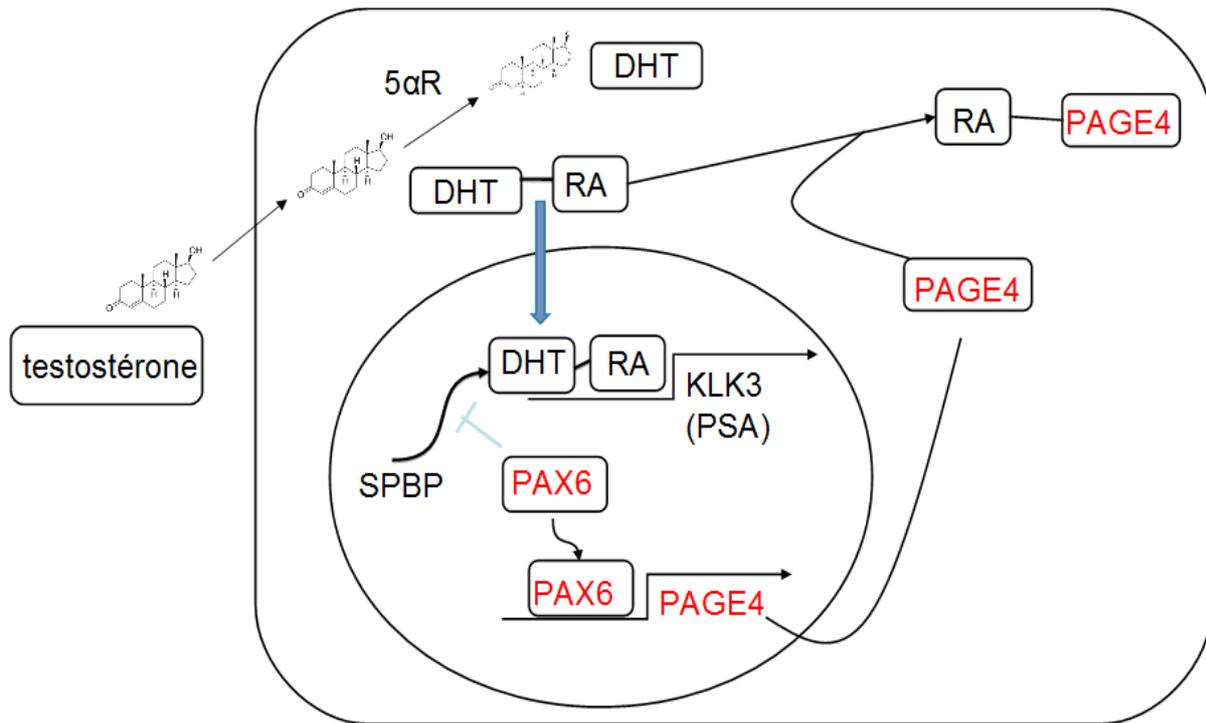


Figure 10: modèle de travail

XVI) Objectifs

- 1) Déterminer l'expression de PAGE4, PAX6, RA et KLK3 dans des échantillons de biopsies de prostate et dans les 3 lignées cellulaires majeures de cancer de prostate : DU145, PC3 et LnCaP.
- 2) Déterminer la relation entre l'expression de PAX6 et PAGE4.
- 3) Déterminer la relation entre l'expression de PAX6, PAGE4 et RA, KLK3.

Partie II : Matériel et méthodes

Notre étude s'est déroulée en plusieurs parties. La première fut d'étudier l'expression de PAGE4 et de PAX6 dans des échantillons tissulaires (par immunohistochimie) et dans des lignées cellulaires (par western blot et qPCR). La seconde partie fut de rechercher le rôle et les liens de PAGE4 et PAX6 par sur-expression cellulaire. Les résultats furent confirmés par WB et qPCR. La même étude fut aussi entreprise en immunohistochimie sur des échantillons tissulaires.

I) TMA de prostate

L'expression des protéines d'intérêt fut étudiée sur des biopsies de prostates regroupées en TMA (Tissue Micro Arrays) gracieusement offertes par le Dr Eva Corey (University of Washington).

1) H score

L'expression des protéines fut évaluée en utilisant le H score. Ce score utilise une échelle d'intensité allant de 0+ (aucune coloration) à 3+ (coloration maximale). Il se calcule en additionnant le pourcentage relatif de chaque intensité de coloration. Il varie ainsi de 0 (100 % de 0+, soit $100 \times 3=0$) à 300 (100 % de 3+, soit $100 \times 3=300$). 2 H scores étaient considérés comme différents si la différence de leurs scores était d'au moins 100.

2) TMAa

Deux sortes d'échantillon furent évaluées. La TMAa contenait des biopsies de xénogreffes LuCaP (voir tableau 1). Les cellules LuCaP sont une lignée cellulaire obtenues par greffe de cellules humaines de cancer de prostate chez la souris. 42 échantillons provenant de 19 patients furent analysés. 17 patients avaient eu 2 biopsies (provenant du même site) greffées dans 2 souris (17×2 , soit 34 échantillons), 2 patients avaient eu 4 biopsies (provenant de 2 sites différents) greffées dans 4 souris (8 échantillons). Chaque site de biopsie a donc été prélevé 2 fois. Afin d'éviter d'obtenir des résultats biaisés (aléas liés à la culture cellulaire, mauvaise coloration...) la moyenne des H scores des 2 prélèvements a

été calculée. Si les 2 H scores étaient différents de plus de 100, les échantillons ne furent pas inclus. Au total, 32 échantillons provenant de 15 patients furent inclus.

TMAa	nombre	pourcentage		nombre	pourcentage
patients	15		résistance à la castration?		
échantillons	32	100	oui	14	44
source			non	18	56
autopsie	14	44	statut des RA		
biopsie	18	56	sauvage	20	62,5
Types de tissus			mutation	4	12,5
foie	4	12,5	non connu	8	25
ganglion lymphatique	10	31,25	PSA		
côte	2	6,25	haut	4	12,5
péritoine	2	6,25	intermédiaire	10	31,25
prostate	8	25	bas	10	31,25
vessie	2	6,25	non connu	8	25
liquide d'ascite	2	6,25	temps doublement de du PSA (mois)		
femur	2	6,25	moyenne	23,1	
histologie			médiane	14,5	
adénocarcinome	24	75		[8-70]	
neuroendocrine	8	25			

Tableau 1 : caractéristiques des échantillons de la TMAa

3) TMAb

La TMAb contenait des biopsies de prostate de patients atteints d'un cancer de prostate (voir tableau 2). Pour chaque patient 4 biopsies étaient disponibles : 2 de prostates malades et 2 de prostates saines. La moitié des patients étaient résistants à la castration au moment des biopsies.

TMAb	nombre	pourcentage
échantillons	240	
patients	60	100%
résistance à la castration	30	50%
Absence de résistance à la castration	30	50%

Tableau 2 : caractéristiques des échantillons de la TMAb

II) Immunohistochimie

La coloration des lames par immunohistochimie a été conduite au Segal Cancer Centre Research Pathology Facility (Jewish General Hospital). Les échantillons de tissus furent placés sur des lames types SuperFrost/Plus (Fisher) et séchés pendant 12 heures à 37 °c. Après séchage elles furent fixées et colorées au moyen d'une Discovery XT Autostainer (Ventana Medical System). Toutes les solutions utilisées pour l'immunohistochimie proviennent de Ventana Medical System. Les différents anticorps primaires utilisés furent : l'anticorps de lapin polyclonal anti-PAGE4 (Sigma HPA 023880) dilué à 1 : 300, l'anticorps de lapin polyclonal anti-PAX6 (Sigma HPA 030775) dilué à 1:50, l'anticorps de lapin polyclonal anti-KLK3 (Dako A0562) dilué à 1:5000 et l'anticorps de souris monoclonal anti-AR (Cell Marque AR441) dilué à 1:25. Ces anticorps furent appliqués manuellement sur les lames pendant 32 minutes à 37 °c. Les anticorps secondaires appropriés furent appliqués pendant 8 minutes (anticorps OmniMap anti-Rabbit-HRP, référence : 760-4311 ou anticorps OmniMap anti-Mouse-HRP, référence : 760-4310). L'absence d'application de l'anticorps primaire sur plusieurs lames permit d'obtenir un contrôle négatif. Les lames furent contre-colorées par de l'hématoxylin pendant 4 minutes, puis par du Bluing Reagent pendant 4 minutes, puis rincées à l'eau, déshydratées dans l'alcool, et nettoyées dans du xylène. Les lames furent scannées et analysées via le logiciel Aperio.

Remarque : il n'existait pas, à notre connaissance, d'anticorps spécifique de PAX6(5a) en immunohistochimie. L'anticorps que nous avons utilisé (Sigma HPA 030775) reconnaissait les 2 isoformes (PAX6 et PAX6(5a)). Dans les études immunohistochimiques, le terme PAX6 regroupe ainsi PAX6 et PAX6(5a).

III) Culture cellulaire

Trois lignées cellulaires de cancer de prostate (DU-145, LnCaP et PC3), ainsi qu'une lignée cellulaire rénale (293FT) furent utilisées. Elles ont été cultivées dans un milieu type RPMI 1640 (voir composition en annexe 9) contenant aussi de la pénicilline (25U/ml), de la streptomycine (25mg/ml) et 10 % de sérum bovin fœtal. Toutes les cultures furent incubées à 37 °c dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. Les cellules étaient régulièrement passées avant leur confluence.

IV) Western Blot

1) Préparation des lysas cellulaires

Après culture, $8,8 \times 10^6$ cellules ont été lavées avec du PBS, transférées dans un tube et centrifugées à 13000 tours par minute pendant 5 minutes. Le surnageant fut jeté. Le culot cellulaire fut lysé dans 250 μ l de RIPA lysis buffer et mélangé à des inhibiteurs de protéases (apoptinin 1000x; PMSF 100x; leupeptin 1000x; phosphatase inhibitor 100x). Les tubes ont ensuite été déposés sur la glace pendant 30 min, puis ont subi une sonification par ultrasons (amplitude : 15-20%, 3 séries de 10 secondes séparées par des intervalles de 1 minute (machine : sonic dismembrator model 500)). Après sonification les lysas cellulaires furent mis sur glace pendant 10 minutes puis centrifugés à 13000 tr/min pendant 10 min à 4 degrés. Après cette étape, la phase liquide fut transférée dans un nouveau tube et le culot, contenant les débris cellulaires, fut jeté.

L'étape suivante fut de mesurer la concentration en protéines des échantillons au moyen du BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit). Après dilution (6x) dans de l'eau, un échantillon de la solution fut placé sur une plaque de 96 puits (10 μ l par puits). L'utilisation de différentes concentrations d'albumine permet d'obtenir une courbe de concentration protéique. Dans chaque puits, 200 μ l d'agent de réaction (Pierce BCA Protein Assay Kit) furent ajoutés. La plaque fut ensuite mélangée pendant 30 secondes et incubée à 37 °c pendant 30 minutes. La concentration en protéines fut déterminée en utilisant la BCA absorbance (Fluostar Optima). Ensuite, le lysa cellulaire fut dilué 4 fois dans du SDS contenant 15 % de 2-mercaptoethanol et de RIPA de façon à obtenir une concentration de 3.15 μ g/ μ l. Les échantillons ont été incubés 5 min à 95 °c afin de dénaturer les protéines puis placés sur de la glace. Enfin les échantillons furent rapidement vortexés puis placés sur un gel de SDS.

2) Migration protéique

Un gel de polyacrylamide SDS de 10 % surmonté d'un gel de 4 % fut préparé. Chaque gel contenait de la ddH₂O, de l'acrylamide (40 %, sigma, 3ml), du SDS (10 %, Sigma), de l'APS (10 %, Pierce), du TEMED (Sigma) et du 1.5 M tris-HCl (ph 8.8) pour le gel à 10 % ou 0,5 M Tris-HCl (ph 6.8) pour le gel à 4 %. Dans chaque puits une quantité égale de protéines fut placée. Le marqueur de poids moléculaire (Biorad precision plus protein dual color standards) fut placé dans le premier puits. Les puits vides furent remplis avec 10 μ l de

SDS-SB 1x. La migration protéique se fit dans du tampon (ph : 8,3 ; composition : tris base, glycine, méthanol, ddH₂O) à 150 volts à température ambiante.

3) Transfert protéique

Avant le transfert des protéines, le gel de SDS fut plongé dans du tampon type CaPS pendant au moins 5 minutes, à température ambiante. Une membrane de PVDF (Bio-Rad Systems) fut incubée dans du méthanol pendant 10 minutes à température ambiante suivi par 5 minutes dans le tampon CaPS. Les protéines furent ensuite transférées depuis le gel de SDS vers la membrane de PVDF durant une nuit entière à 30 volts à 4 °c, en utilisant le Bio-Rad transfer system.

4) Blocage et coloration par anticorps

La membrane fut bloquée dans du BSA 5 % (Sigma) (préparé avec 1,5 g de BSA dans 30 ml de TBST (1x)) pendant une heure à température ambiante. La membrane fut ensuite incubée avec l'anticorps primaire pendant une heure à température ambiante. Les anticorps utilisés furent : l'anticorps anti PAGE4 (Sigma HPA023880, 1:2000), l'anticorps commun anti PAX6 et anti PAX6(5a) (Sigma HPA030775, 1:2000), l'anticorps anti KLK3 (Santa Cruz biotechnology PSA (C-19): sc-7638, 1:1000), l'anticorps anti RA (Cells Signaling Technology D6F11, 1:2000) et l'anticorps anti B actine (Medimabs (BA3R) MM-0164-P, 1:2000). Tous les anticorps furent dilués dans du BSA 1 %. La membrane fut ensuite rincée dans du TBST (1x) pendant 15 minutes, puis suivirent 3 rinçages rapides de 5 minutes à température ambiante. Après rinçage la membrane fut incubée avec l'anticorps secondaire (anticorps de lapin, (Jackson laboratory ,115-035-144, 1:1500) ou anticorps de souris (Sigma, A2228, 1 :1500) ou anticorps de chèvre (Sigma, A 5420, 1 :1500)) pendant une heure à température ambiante, puis se succédèrent un rinçage de 15 minutes et 3 rinçages de 5 minutes. Après rinçage, les protéines furent détectées par un Molecular Imager ChemiDoc system (Bio-Rad) après ajout d'agents de chemiluminescence (Bio-Rad).

Remarque : comme pour l'étude en immunohistochimie, l'anticorps anti-PAX6 que nous avons utilisé reconnaissait PAX6 et PAX6(5a).

5) Ablation des anticorps

Après détection des protéines, les anticorps furent enlevés de la membrane. Une solution

contenant 6,25 ml de tris HCL 0,5 molar pH 6,8 ; 33,75 ml de ddH₂O et 10ml de SDS 10 % fut placée dans un tube de verre chauffé à l'intérieur d'un four à 50 °c pendant 5 minutes. La membrane fut ensuite placée dans le tube après ajout de 350 ul de 2-mercaptoéthanol. L'ensemble fut placé dans un four à 50 °c pendant 30 minutes. À la sortie du four la membrane fut lavée et refroidie par de la ddH₂O pendant 5 minutes puis placée dans du TBST (1x) pendant 5 minutes à température ambiante.

6) Contrôle de la quantité de protéines du western blot par B actine

Pour le contrôle de la concentration protéique des Western Blot, nous avons utilisé la B actine. La B actine est une protéine majeure du cytosquelette. Son poids moléculaire est de 43 kDa et son expression est ubiquitaire.

V) PCR quantitative

1) Purification de l'ARN total

Les cellules ($8,8 \times 10^6$) furent récoltées par curetage et collectées dans un tube d'Eppendorff de 1,5ml et mises en suspension dans 1 ml de QIAzol Lysis Reagent. La solution fut ensuite placée sur la paillasse à température ambiante pendant 5 minutes. Ensuite, 0,2 ml de chloroforme par ml de QIAzol Lysis Reagent furent ajoutés. La solution fut ensuite vortexée pendant 2-3 minutes et centrifugée à 13000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °c. Après centrifugation, l'échantillon était séparé en 3 phases : une phase supérieure, aqueuse, contenant l'ARN, une phase blanchâtre intermédiaire et une phase basse, rouge, organique. La phase haute fut transférée dans un nouveau tube et 0,5 ml d'isopropanol par ml de QIAzol Lysis Reagent fut ajouté. L'échantillon fut ensuite vortexé et placé sur la paillasse à température ambiante pendant 10 min. L'échantillon fut ensuite centrifugé à 13000 tr/min pendant 4 °c et le surnageant soigneusement enlevé. La palette d'ARN fut séchée à température ambiante pendant 5 à 10 minutes. Enfin l'ARN fut remis en suspension dans 30 ul de ddH₂O RNA-free.

2) Détermination de la concentration en ARN

La concentration en ARN fut déterminée en utilisant le système Nanodrop. Après

nettoyage du Nanodrop avec 2 ul de RNase free ddH₂O, 2 ul de RNA furent placés sur la machine et la concentration en RNA fut déterminée.

3) Vérification de la qualité de l'ARN

Un gel de 1,5 % d'agarose fut préparé en mélangeant 60ml de tampon TAE avec 0,9g d'agarose (Sigma) et placé dans un four à micro-onde pendant 1,5 minute. 1 ul d'étidium bromide fut ajouté. La solution fut mélangée et placée dans un moule. Pendant ce temps, l'ARN fut dilué dans de la RNase-free ddH₂O. Au total, 500ng de RNA furent ajoutés et incubés à 70 °c pendant 2 minutes puis placés immédiatement sur glace. Après ajout de DNA loading dye 6x (Thermo Scientific) à l'échantillon, l'ARN fut chargé dans le gel d'agarose. Le gel fut plongé dans du TAE et soumis à un courant de 70V pendant 20 minutes. Les bandes furent détectées en utilisant un détecteur d'UV (Chemidoc (Bio-Rad)).

4) Transcription inverse de l'ARN

1 ug d'ARN total fut placé dans 1 tube de PCR avec 1ul d'enzyme iScript reverse transcriptase (iScript cDNA synthesis kit, Bio-Rad), 4 ul de iScript reverse transcription buffer (iScript cDNA synthesis kit, Bio-Rad) et 20ul de RNase-free ddH₂O. Les échantillons furent placés dans un thermal cycler (Bio-Rad C1000) et soumis au protocole de PCR standard iScript: 5 minutes à 25 °c, 30 minutes à 42 °c, 5 min à 85 °c et enfin 4 °c. Les échantillons furent conservés à -80°c jusqu'à leur utilisation.

5) PCR quantitative

Le cDNA obtenu fut dilué 5 fois. 4ul de cDNA furent mélangés avec du PCRmm 2x (Ssofast evagreen Bio-Rad) et 400 nM de primer (KLK3-F_13, KLK3-R_108; PAX6-F_1091, PAX6-R_1227; PAGE4-F_91, PAGE4-R_194; AR-F_1843, AR-R_1937). La PCR en temps réel se déroula sur 40 cycles au moyen d'une CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Toutes les réactions furent réalisées trois fois et les données analysées au moyen de CFX manager Software (Bio-Rad). L'expression fut normalisée grâce à un gène présent de façon ubiquitaire dans les cellules (HPRT1, life-technologies).

6) Analyse des résultats de qPCR

À chaque cycle de PCR la quantité d'ADNc (qADN) est multipliée par 2. Ainsi après (n) cycle de qPCR on obtient : $(qADN) \times 2^{(n)}$. La réaction de PCR est exponentielle et atteint après (n) cycles une phase de plateau. Cette phase de plateau est atteinte lorsque les réactifs viennent notamment à manquer. Ainsi, plus la quantité d'ADNc est importante en début d'expérience, plus la phase de plateau est atteinte rapidement et plus (n) est faible. En pratique courante (n) est appelé cQ (cycle quantification) et correspond au nombre de cycles nécessaires pour atteindre la phase de plateau. Pour calculer la valeur de l'expression relative de chaque gène, nous avons comparé son expression dans une lignée cellulaire (lignée cellulaire de référence) par rapport à son expression dans les autres lignée. La lignée de référence était celle dans laquelle le gène était le plus exprimé. La formule était : $2^{(cQ \text{ lignée de référence})} / 2^{(cQ \text{ autre lignée})}$. L'expression relative variait ainsi de 1 (expression du gène dans la lignée de référence) à 0 (en cas de cQ non déterminable).

VI) Sur-expression protéique

La sur-expression de PAGE4, PAX6 et PAX6(5a) fut obtenue en utilisant le vecteur pLHK, qui dérive du lentivirus pGIPZ. Sur chaque gène étudié, une séquence supplémentaire, codant pour une protéine fluorescente (6xHis-Katushka), a été ajoutée au niveau N-terminal. Cette construction fut greffée sur le vecteur et mise en présence des cellules étudiées : LnCaP ou 293 FT.

VII) tests statistiques

Les tests de corrélation ont été effectués au moyen du test de Pearson (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>).

Partie III : Résultats

I) Étude de l'expression de PAGE4, PAX6, KLK3 et RA

1) Expression protéique dans les échantillons de tissu prostatique par immunohistochimie

L'expression de PAGE4, PAX6, RA et KLK3 était constante dans les différents échantillons. PAGE4 et KLK3 étaient exprimés dans le cytoplasme cellulaire ; PAX6 et RA dans le noyau (voir figure 11, 12).

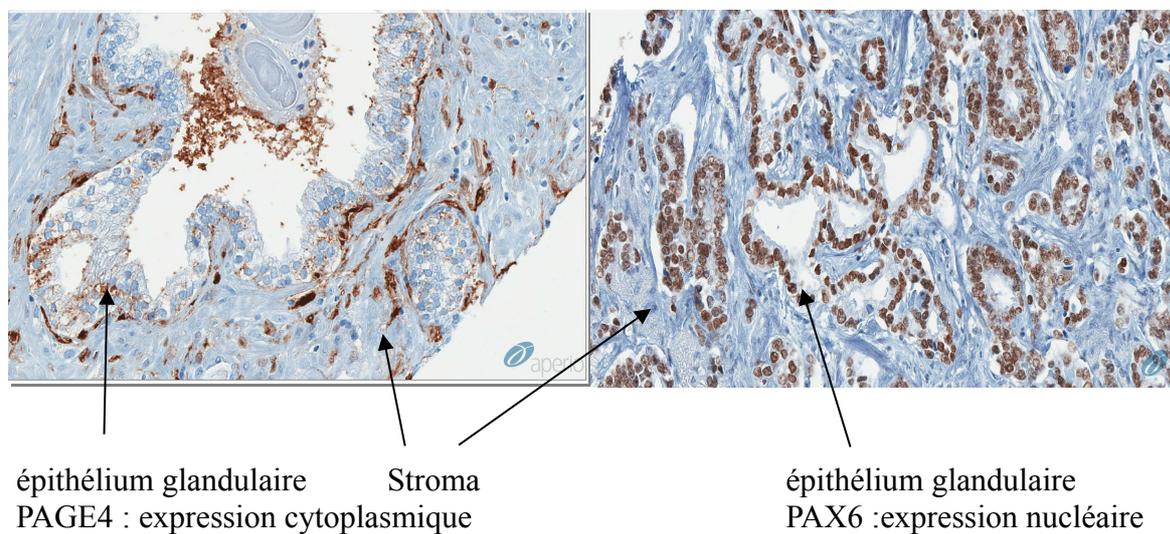
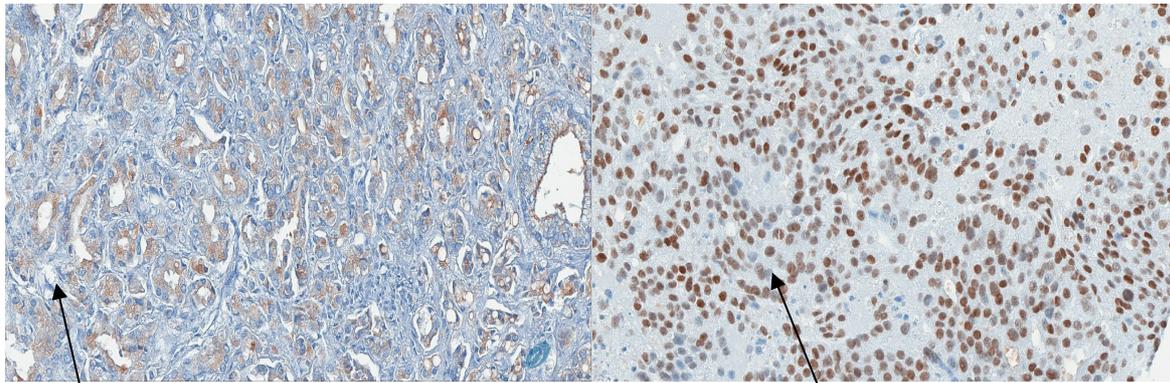


Figure 11 : coloration immunohistochimique de PAGE4 et de PAX6 sur des lames de biopsie de prostate (27x)



épithélium glandulaire

KLK3 : expression cytoplasmique

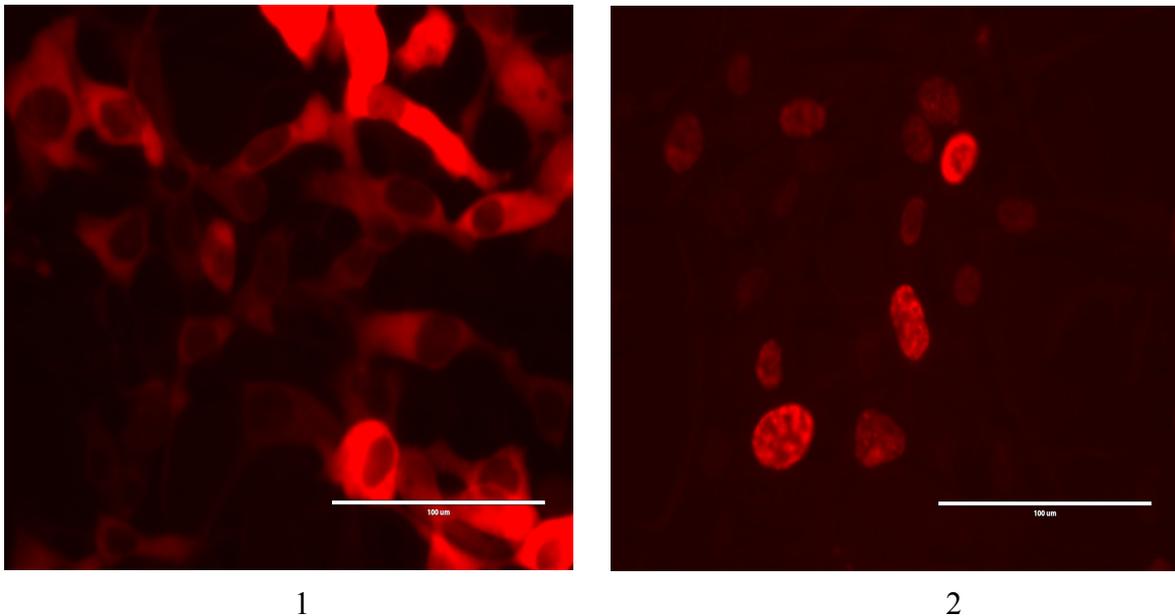
épithélium glandulaire indifférencié

RA : expression nucléaire

Figure 12 : coloration immunohistochimique de KLK3 et de RA sur des lames de biopsie de prostate (27x)

2) Expression de PAGE4 et PAX6 dans 293FT par sur-expression protéique fluorescente

La sur-expression de PAGE4 et PAX6 dans 293 FT nous a permis de confirmer les données de l'immunohistochimie (figure 13).



1

2

Figure 13 : sur-expression de PAGE4 (1) et PAX6 (2) marquées dans 293FT (lignée cellulaire rénale)

3) Expression de PAGE4, PAX6, RA et KLK3 dans DU145, LnCaP et PC3

a) ARNm

Les expressions relatives des ARNm par qPCR des gènes étudiés sont regroupées dans la figure 14 et le tableau 3. PAGE4, RA et KLK3 étaient très majoritairement exprimés dans LnCaP. PAX6 était principalement retrouvé dans PC3 et, dans une moindre mesure, DU145.

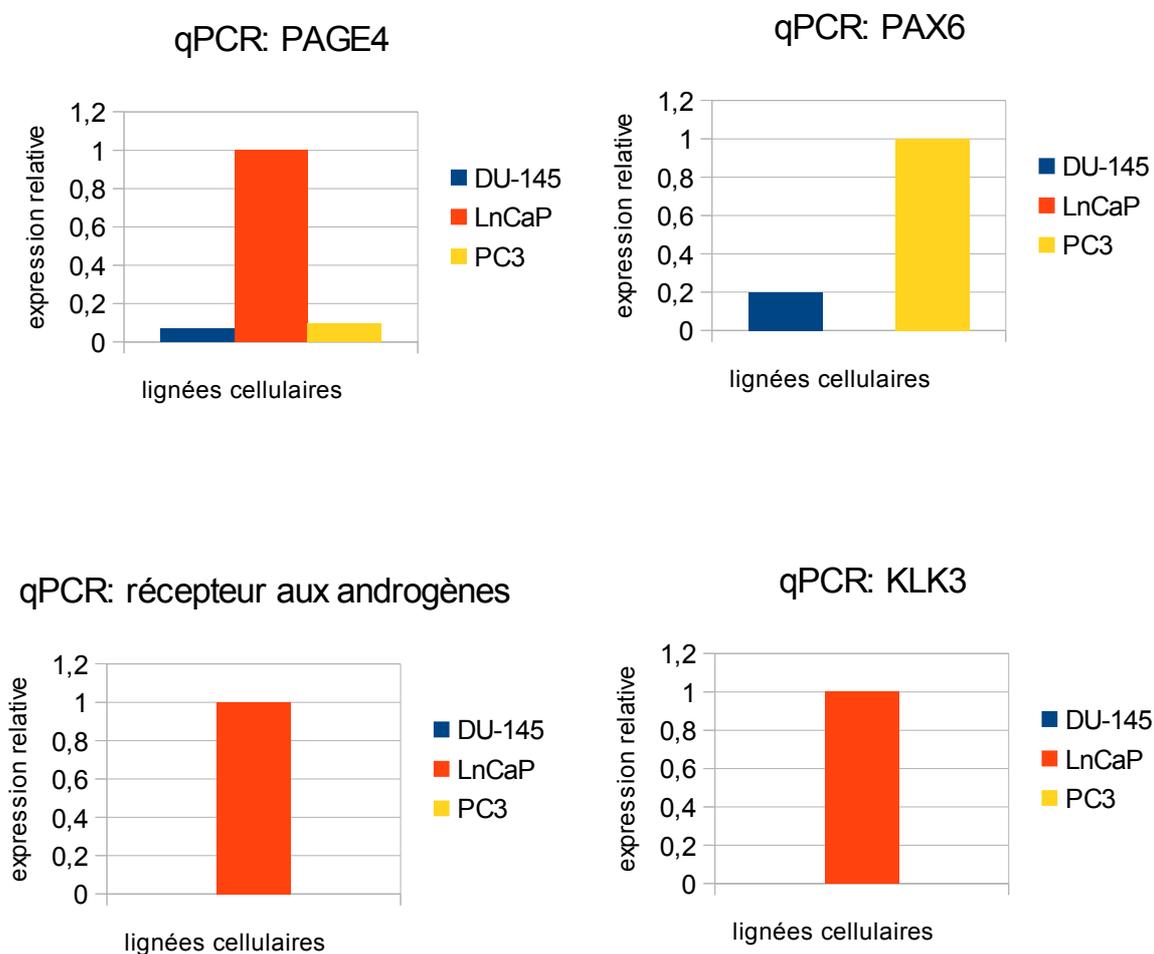


Figure 14 : expression relative de PAGE4, PAX6, KLK3 et RA dans DU-145, LnCaP et PC3 ; par qPCR

gène cible/lignée cellulaire	expression relative		
	DU-145	LnCaP	PC3
HPRT1	non inclus	non inclus	non inclus
AR	$6,7 \cdot 10^{-6}$	1	$5 \cdot 10^{-5}$
KLK3	0	1	0
PAGE4	0,07	1	0,1
PAX6	0,2	$1,1 \cdot 10^{-4}$	1

Tableau 3 : expression relative de PAGE4, PAX6, KLK3 et RA dans DU-145, LnCaP et PC3 ; par qPCR

b) Expression protéique

L'étude par WB a confirmé les résultats de la qPCR pour RA, PAGE4 et KLK3. RA et KLK3 avaient une forte expression au niveau de leur ARNm dans LnCaP, confirmée au niveau protéique (voir figure 15 et 16). PAGE4 avait une faible expression au niveau de son ARNm, confirmée en WB par l'absence de signal (figure non incluse).

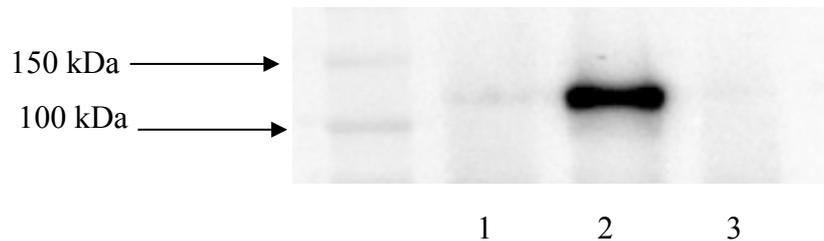


Figure 15 : western blot du récepteur aux androgènes (99 kDa) dans DU145 (1), LnCaP (2) et PC3 (3)

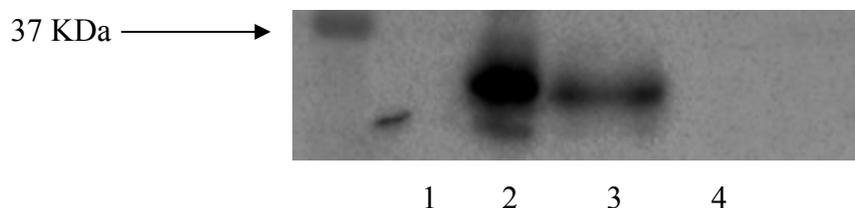


Figure 16 : western blot de KLK3 (28kDa) dans DU145 (1), LnCaP (2), lysa cellulaire de LnaP du laboratoire Santa Cruz (3) et PC3 (4)

L'expression de PAX6 fut discordante entre le niveau des ARNm et le niveau protéique ; PAX6 n'ayant pas été mis en évidence en WB (figure non incluse).

II) Relation entre l'expression de PAX6, PAGE4, KLK3 et des RA

L'étude des liens entre PAX6, PAGE4, KLK3 et les RA s'est effectuée au niveau des lignées cellulaires de cancer de prostate et au niveau des échantillons de tissus humains.

1) Étude par WB et qPCR des protéines et des gènes cibles dans la lignée LnCaP

PAGE4, PAX6 et PAX6(5a) ne sont normalement pas exprimés au niveau protéique dans LnCaP. Afin d'étudier leur rôle, ils ont donc été sur-exprimés dans cette lignée.

a) Contrôle de la sur-expression de PAX6, PAX6(5a) et PAGE4 par WB

La première étape de cette expérimentation fut de contrôler l'efficacité de la sur-expression. Ce contrôle fut, tout d'abord, effectué en WB (figure 17 et 18).

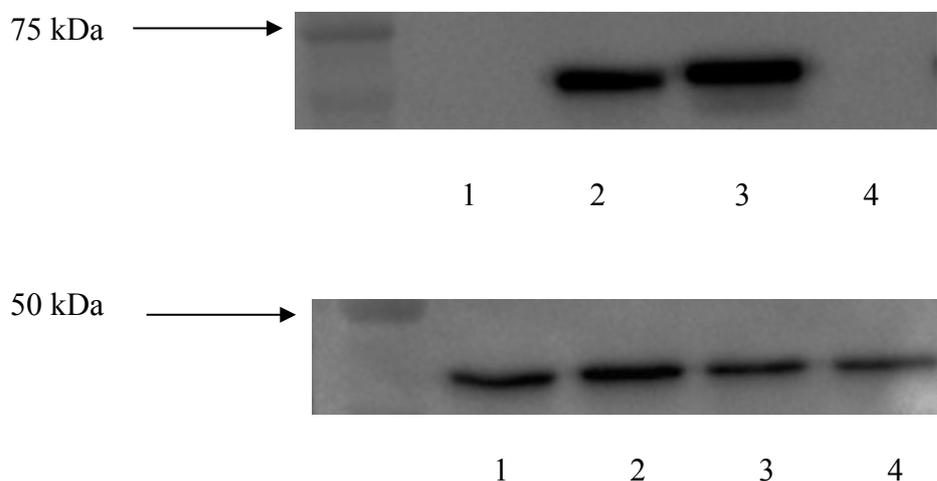


Figure 17 : western blot : anticorps de PAX6 (figure du haut) et contrôle avec un anticorps anti-B actin (figure du bas). PLHK Scr LnCaP (1), PLHK PAX6 LnCaP (2), PLHK PAX6(5a) LnCaP (3), PLHK PAGE4 LnCaP (4). Remarque : poids moléculaire de PAX6 : 46 kDa, poids moléculaire de PLHK : 29 kDa, poids moléculaire de la B actin : 43 kDa

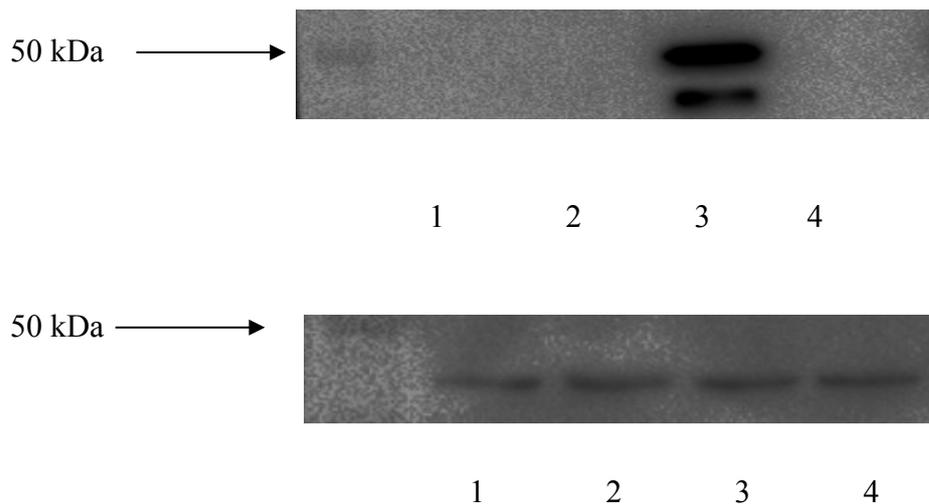


Figure 18 : western blot : Anticorps de PAGE4 (figure du haut) et contrôle avec un anticorps anti-B actin (figure du bas). PLHK Scr LnCaP (1), PLHK PAX6 LnCaP (2), PLHK PAX6(5a) LnCaP (3), PLHK PAGE4 LnCaP (4). Remarque poids moléculaire de PAGE4 :11 kDa, poids moléculaire de PLHK : 29 kDa, poids moléculaire de la B actin : 43kDa

b) Contrôle de la sur-expression de PAX6 et PAX6(5a) par qPCR

Afin de confirmer les données du WB, un contrôle fut effectué par qPCR (figure 19 et tableau 4). La sur-expression de PAGE4 n'a pas été étudiée par cette technique.

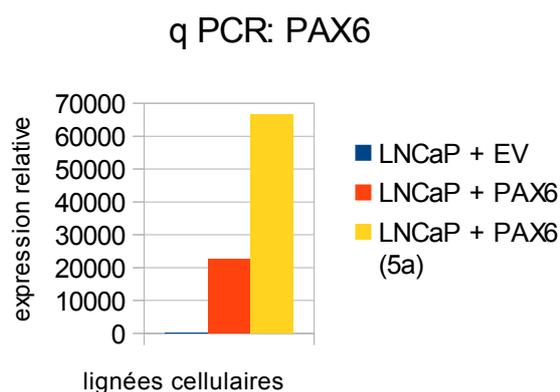


Figure 19 : expression relative de PAX6 dans LnCaP + vecteur nu (EV : empty vector), LnCaP + sur-expression de PAX6 (LNCaP+ PAX6) et LnCaP + sur-expression de PAX6(5a) (LNCaP + PAX6 (5a), en qPCR

	PAX6
LNCaP + EV	1
LNCaP + PAX6	22454
LNCaP + PAX6 (5a)	66625

Tableau 4 : expression relative de PAX6 dans LnCaP + vecteur nu (EV : empty vector), LnCaP + sur-expression de PAX6 (LNCaP+ PAX6) et LnCaP + sur-expression de PAX6(5a) (LNCaP + PAX6 (5a), en qPCR

c) Recherche d'un lien entre l'expression de PAX6, PAX6(5a), PAGE4 et KLK3, RA par WB

L'analyse de l'étude par WB a mis en évidence une disparition du signal de KLK3 et RA dans les lignées sur-exprimant PAX6 ou PAX6(5a) (voir figures 20 et 21). La sur-expression de PAGE4 n'a pas modifié l'expression de KLK3 ou de RA (voir figures 20 et 21). Enfin, la sur-expression de PAX6 ou de PAX6(5a) n'a pas modifié l'expression de PAGE4 et inversement (voir figure 17 et 18).

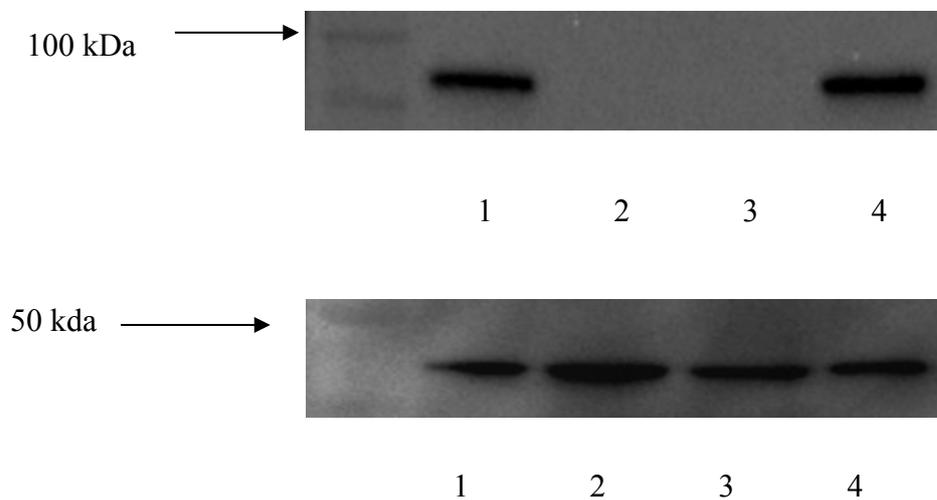


Figure 20 : western blot : anticorps de RA (figure du haut) et contrôle avec un anticorps anti-B actin (figure du bas). PLHK Scr LnCap (1), PLHK PAX6 LnCaP (2), PLHK PAX6(5a) LnCaP (3), PLHK PAGE4 LnCaP (4). Remarque : poids moléculaire du RA : 99 kDa poids moléculaire de la B actin : 43 kDa

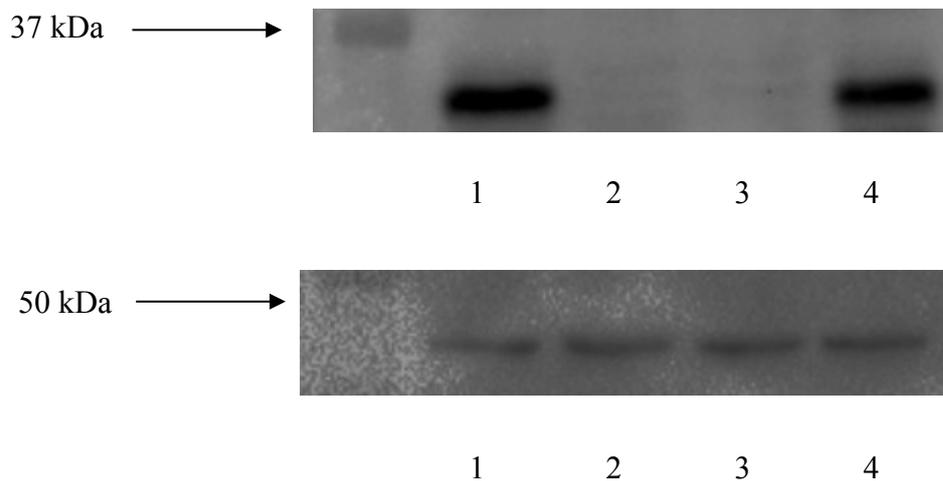


Figure 21 : western blot : anticorps de KLK3 (figure du haut) et contrôle avec un anticorps anti-B actin (figure du bas). PLHK Scr LnCaP (1), PLHK PAX6 LnCaP (2), PLHK PAX6(5a) LnCaP (3), PLHK PAGE4 LnCaP (4). Remarque : poids moléculaire de KLK3 : 28 kDa, poids moléculaire de la B actin : 43 kDa

d) Recherche d'un lien entre l'expression de PAX6, PAX6(5a) et les RA par qPCR

Les résultats du WB ont été confirmés en qPCR pour RA (figure 22 et tableau 5). Le contrôle de l'expression de KLK3 ne fut pas techniquement réalisable.

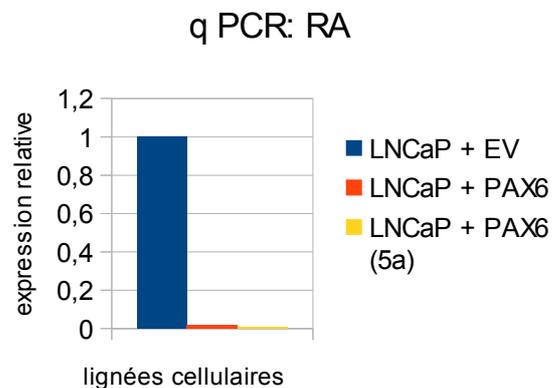


Figure 22 : expression relative de RA dans LNCaP + vecteur nu (EV : empty vector), LNCaP + sur-expression de PAX6 (LNCaP+ PAX6) et LNCaP + sur-expression de PAX6(5a) (LNCaP + PAX6 (5a), en qPCR

	PAX6	RA
LNCaP + EV	1	1
LNCaP + PAX6	22454	0,01639
LNCaP + PAX6 (5a)	66625	0,00689

Tableau 5 : expression relative de RA dans LNCaP + vecteur nu (EV : empty vector), LNCaP + sur-expression de PAX6 (LNCaP+ PAX6) et LNCaP + sur-expression de PAX6(5a) (LNCaP + PAX6 (5a), en qPCR

Afin de valider nos résultats au niveau tissulaire, nous avons recherché un lien entre l'expression de PAX6, PAX6(5a) et KLK3 ou RA en immunohistochimie.

2) Étude immunohistochimique de l'expression des protéines cibles dans des biopsies de xénogreffes LuCaP et des biopsies humaines de cancer de prostate

a) Biopsies de xénogreffes LuCaP

Les échantillons de xénogreffes LuCaP n'étaient pas homogènes avec notamment 2 sous-groupes, l'un sensible à la castration et l'autre résistant. Dans le sous groupe sensible à la castration il a été mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression de PAX6 et des RA (score de Pearson, $p=0,02$, intervalle de confiance à 95 $[-0,94 ; -0,16]$, voir figure 23), ce qui a confirmé nos précédents résultats.

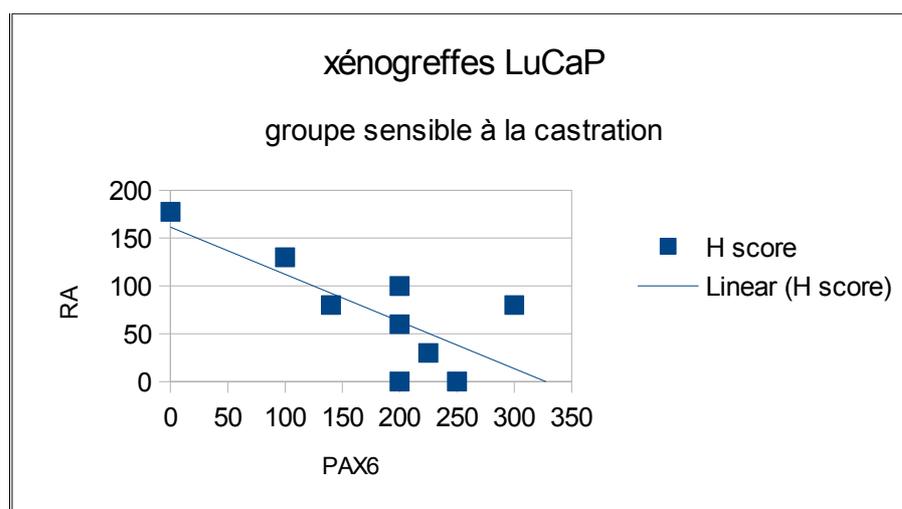


Figure 23 : représentation graphique des H scores de RA et PAX6 dans le groupe de xénogreffes de LuCaP, en immunohistochimie

Les autres analyses, portant sur PAX6 et RA dans le groupe résistant à la castration ainsi que PAX6 et KLK3, n'ont pas mis en évidence de corrélation (score de Pearson avec $p>0,05$). PAGE4 ne fut pas étudié sur cette TMA car il n'était pas exprimé dans les xénogreffes de LuCaP.

b) Biopsies prostatiques humaines

Les mêmes études, conduites sur la TMA de biopsies de prostate humaine, n'ont pas mis en évidence de corrélation (score de Pearson avec $p>0,05$). De même, aucune corrélation ne fut mise en évidence entre l'expression de PAGE4 et de PAX6 ou KLK3 ou RA (score de Pearson avec $p>0,05$).

III) Étude de la corrélation entre l'expression de PAX6, PAGE4 et les données anatomopathologiques et biochimiques

1) Étude de la variation de l'expression de PAX6 et PAGE4 en fonction de la nature du prélèvement et de la résistance ou non à la castration

Aucune variation significative d'expression ne fut retrouvée dans cette étude (voir figures 24, 25 et 26). En effet, quels que soient les groupes (xénogreffes LuCaP ou biopsies humaines) et leurs caractéristiques (résistance ou non à la castration, tissu sain ou cancer) PAX6 était très exprimé (H score moyen le plus bas égale à 179) et PAGE4 peu exprimé (H score moyen le plus élevé égal à 7 dans les biopsies humaines, absence d'expression dans les xénogreffes LuCaP).

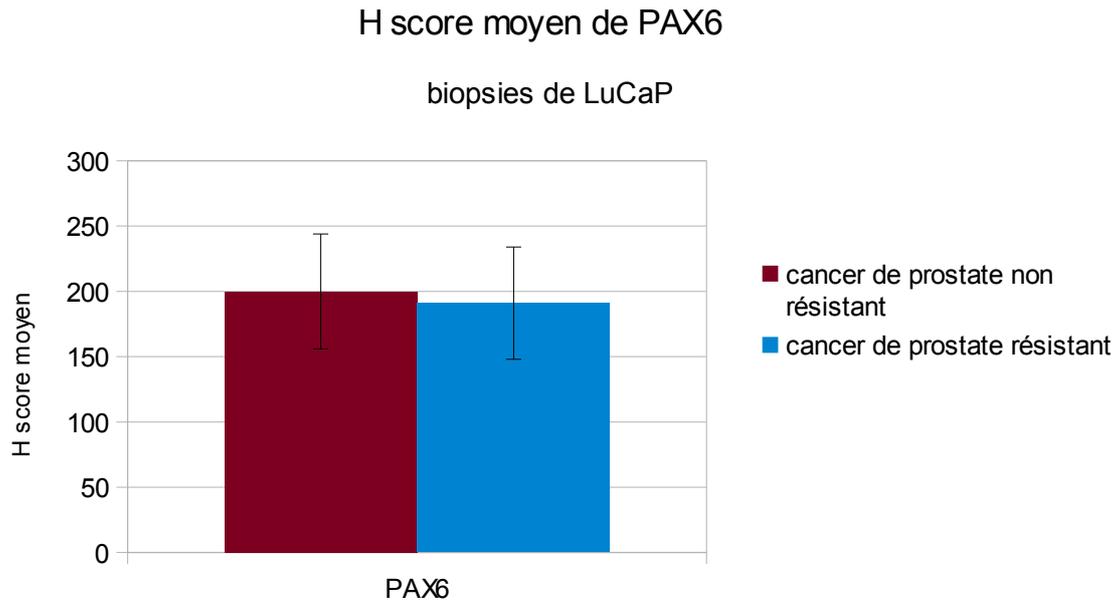


Figure 24 : biopsies de xénogreffes LuCaP, H score moyen de PAX6 en fonction de la résistance ou non à la castration, les barres représentent les écarts types

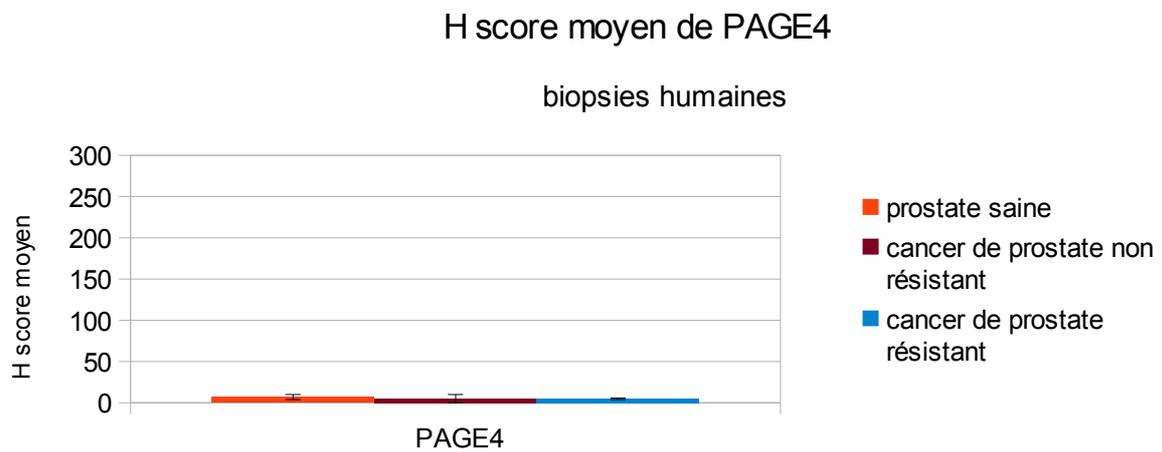


Figure 25 : biopsies humaines, H score moyen de PAGE4 en fonction de la présence ou non de cancer et la résistance ou non à la castration

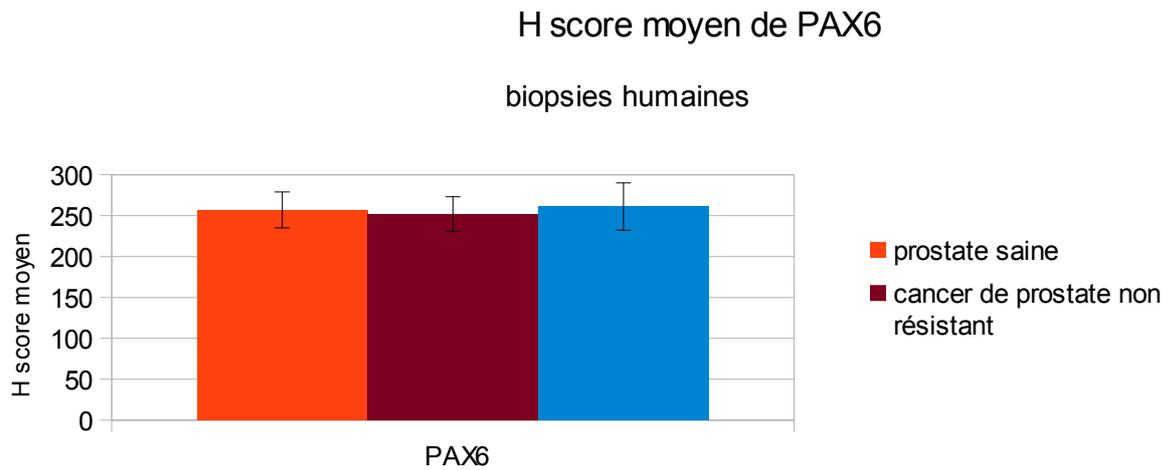


Figure 26 : groupe biopsies humaines, H score moyen de PAX6 en fonction de la présence ou non de cancer et la résistance ou non à la castration

2) Autres études de la variation de l'expression de PAX6 sur les biopsies de xénogreffes LuCaP

Aucune différence significative de l'expression de PAX6 ne fut mise en évidence entre les sous-groupes RA sauvages ou mutants. De même, aucune corrélation ne fut établie entre l'expression de PAX6 et le temps de doublement du PSA.

Partie IV : Discussion

I) Principaux résultats et comparaison avec les données de la littérature

1) Principaux résultats

PAGE4 est exprimé dans le cytoplasme cellulaire et PAX6 dans le noyau.

PAX6 supprime l'expression de RA au niveau protéique et de l'ARNm (confirmé en qPCR, WB et immunohistochimie) et de KLK3 au niveau protéique (confirmé en WB).

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'expression de PAGE4 et celle de PAX6 ou KLK3 ou RA.

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'expression de PAGE4 ou de PAX6 et les données anatomopathologiques, biochimiques ou biologiques disponibles.

La figure 27 résume les mécanismes d'action de PAGE4 et de PAX6.

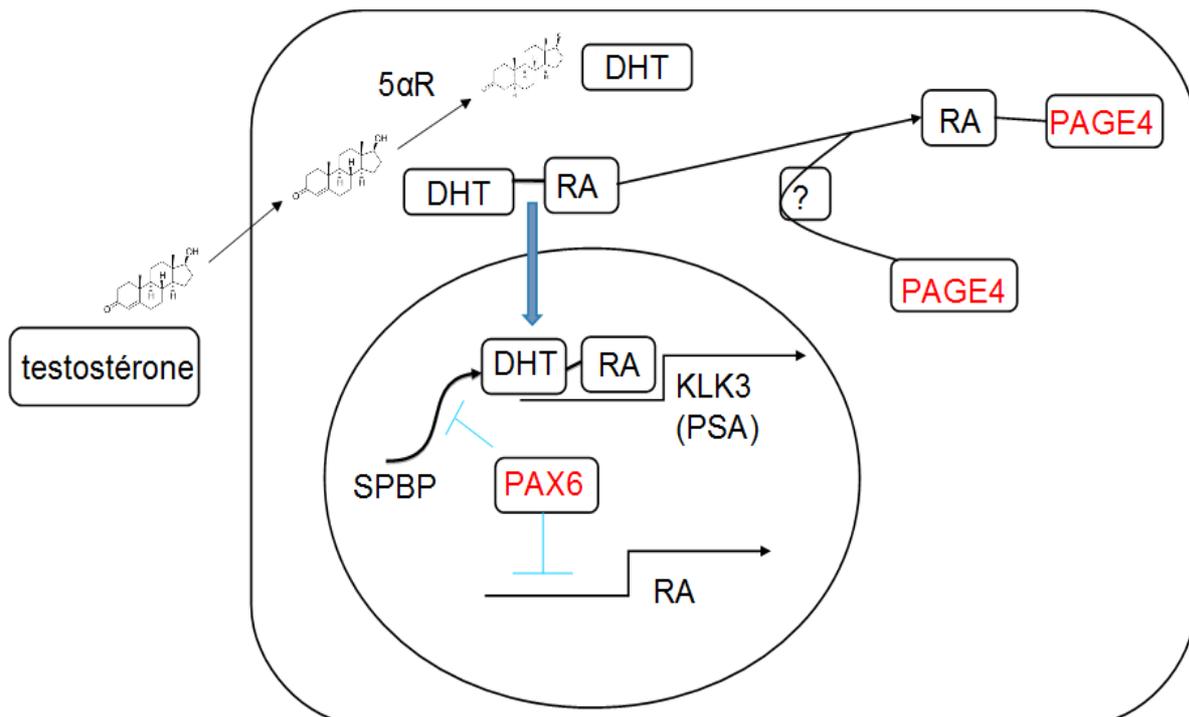


Figure 27 : nouveau modèle de travail

2) Comparaison de nos résultats par rapport aux données de la littérature

a) localisation cellulaire TMA et sur-expression

Le site web human protein atlas⁶⁴ (<http://www.proteinatlas.org/>) regroupe l'expression tissulaire et cellulaire de la majorité des protéines humaines connues. Avec les mêmes anticorps utilisés, nos données d'immunohistochimie étaient comparables pour PAGE4, mais discordantes pour PAX6 en terme d'intensité de coloration, mais comparables pour la localisation de l'expression. Sampson et al⁴⁷ avaient retrouvé une forte expression de PAGE4 dans une série de biopsies humaines prostatiques mais avaient utilisés un anticorps de conception locale (sans toutefois préciser la valeur du H score).

b) Expression en WB et qPCR dans DU145, LnCaP et PC3

L'expression de PAGE4 et PAX6 dans les lignées cellulaires de cancer de prostate reste débattue. En WB, PAGE4 n'a jamais réellement été mis en évidence dans LnCaP^{47,64} et PC3⁶⁴. En qPCR, son expression semble constante^{42,47} dans LnCaP. En WB, PAX6 a été mis en évidence dans LnCaP, DU-145 et PC3⁵³, et en qPCR dans DU-145⁵³ et PC3^{53,64}. Les résultats de l'expression de RA et KLK3 étaient conformes avec ceux de la littérature⁶³.

c) Lien PAGE4/PAX6

Malgré la présence d'un site de fixation potentielle de PAX6 sur le promoteur de PAGE4 (www.ifti.org), aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'expression de PAGE4 et de PAX6. PAGE4 et PAX6 ne sont pas exprimés dans le même compartiment cellulaire, ni dans les mêmes lignées cellulaires en qPCR. Enfin, la sur-expression de l'un (PAGE4 ou PAX6) n'influe pas sur l'expression de l'autre.

3) Biais et limitations de l'étude

Les limitations et biais de notre étude sont inhérents à beaucoup d'études fondamentales. Parmi ceux-ci, la reproductibilité des résultats représente un des plus grands défis. À Chaque étape on trouve une potentielle source de biais (nombre de passages de la lignée cellulaire, type de réactifs et d'anticorps utilisés, température du laboratoire...), et

maintenir des conditions d'expérimentations identiques intra et, à fortiori, inter-laboratoire est très ardu. Afin de limiter le biais de reproductibilité intra-laboratoire, nous avons répété nos expérimentations au moins deux fois.

Une autre limitation de notre étude est le faible nombre d'échantillons de notre étude immunohistochimique, qui illustre bien la difficulté à se procurer du matériel (d'origine humaine ou animale).

II) Enjeux actuels du traitement du cancer de la prostate

Le clinicien doit actuellement faire face à 2 défis majeurs dans le traitement du cancer de la prostate : la recherche de facteurs pronostiques fiables et le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration.

1) Facteurs pronostiques

Les méthodes diagnostiques du cancer de la prostate sont aujourd'hui bien établies, cependant, les facteurs pronostiques restent en grande partie méconnus. Cette méconnaissance se traduit par exemple par une absence de critère d'inclusion précis pour le traitement par surveillance active¹⁹. En effet, les outils pronostiques actuels (PSA, score de Gleason, IRM) ne permettent pas de prédire de manière fiable l'évolution de la maladie.

2) Le cancer de la prostate résistant à la castration

À l'autre extrémité du spectre des traitements du cancer de la prostate, se trouve la prise en charge des tumeurs résistantes à la castration dont l'espérance de vie était encore récemment inférieure à 2 ans⁴⁰. Aucune réponse curative n'a pour le moment été trouvée devant cette impasse thérapeutique. La réponse proviendra sûrement d'une amélioration des connaissances physiopathologiques de cette évolution du cancer de la prostate.

Les mécanismes de résistance à la castration sont de 2 grands types : les mécanismes dépendant du récepteur aux androgènes et les mécanismes indépendants du récepteur aux androgènes (voir figure 28).

a) Mécanismes indépendants du récepteur aux androgènes

Ils concernent principalement les voies pro-apoptotiques⁶⁵. L'apoptose est exécutée par des caspases qui sont activées par l'une des 2 principales voies d'activation. La voie extrinsèque est initiée par des signaux extracellulaires (necrosis factor par exemple) et peut induire l'apoptose sans impliquer les mitochondries. La voie intrinsèque est activée par différentes formes de stress, incluant les cytokines et diverses formes de dommages cellulaires (hypoxie, infection...). Dans le cancer de prostate résistant à la castration, un certain nombre de voies de l'apoptose sont dérégulées, favorisant la croissance tumorale et la résistance aux traitements. Ainsi, la sur-expression de Bcl-2 est liée à une résistance aux traitements, une augmentation des rechutes et une baisse de la survie^{66,67}. De même, il a été mis en évidence une baisse du death receptor (DR5) dans le cancer de prostate⁶⁸, conduisant à une baisse de l'apoptose via la voie extrinsèque. Les protéines chaperonnes, HSP27 et clusterines, qui stabilisent les cellules contre le stress, sont, elles, régulièrement sur-exprimées dans le cancer de prostate⁶⁹. Enfin, Bcl-xL, une protéine de survie cellulaire, est plus fréquemment sur-exprimée dans les cancers résistant à la castration métastatique que dans la prostate normale ou les tumeurs primaires⁷⁰. Il serait impliqué dans la progression vers la résistance à la castration.

b) Mécanismes impliquant le récepteur aux androgènes

En phase de résistance à la castration, plusieurs mécanismes permettent au RA de maintenir son rôle central dans le développement de la maladie. Il a ainsi été démontré que dans le CRPC le gène du RA peut être amplifié entraînant sa sur-expression au niveau protéique⁷¹. De même, de nouvelles formes de RA peuvent apparaître entraînant une perte de spécificité du ligand⁷². Ces formes peuvent ainsi être activées par différentes molécules, dont les anti-androgènes, expliquant ainsi le syndrome de retrait dans anti-androgènes⁷³. Le RA peut aussi être rendu constitutivement actif par des variations d'épissage de son ARN⁷⁴. Des voies alternatives existent permettant de produire de la 5-DHT sans passer par la testostérone. Ainsi dans le « backdoor pathway »⁷⁵ (voir annexe 10), dont une des enzymes clé est la CYP17A1 (17 α -hydroxylase/C17-20-lyase), la progestérone va être transformée en 5-DHT.

Plusieurs voies de transduction du signal, activées dans les CRPC en cas de baisse de la testostéronémie, peuvent augmenter l'activité des RA¹³. C'est le cas des voies PI3K/Akt,

Ras/Raf/MEK/ERK et des tyrosines kinases SRC et ACK1. L'insulin-like growth factor1 (IGF1) et HER2 sembleraient aussi jouer un rôle dans ce mécanisme.

Enfin, le rôle précis du gène de fusion TMPRSS2-ERG⁷⁶, tout comme celui des cellules neuroendocrines⁷⁷, reste à déterminer.

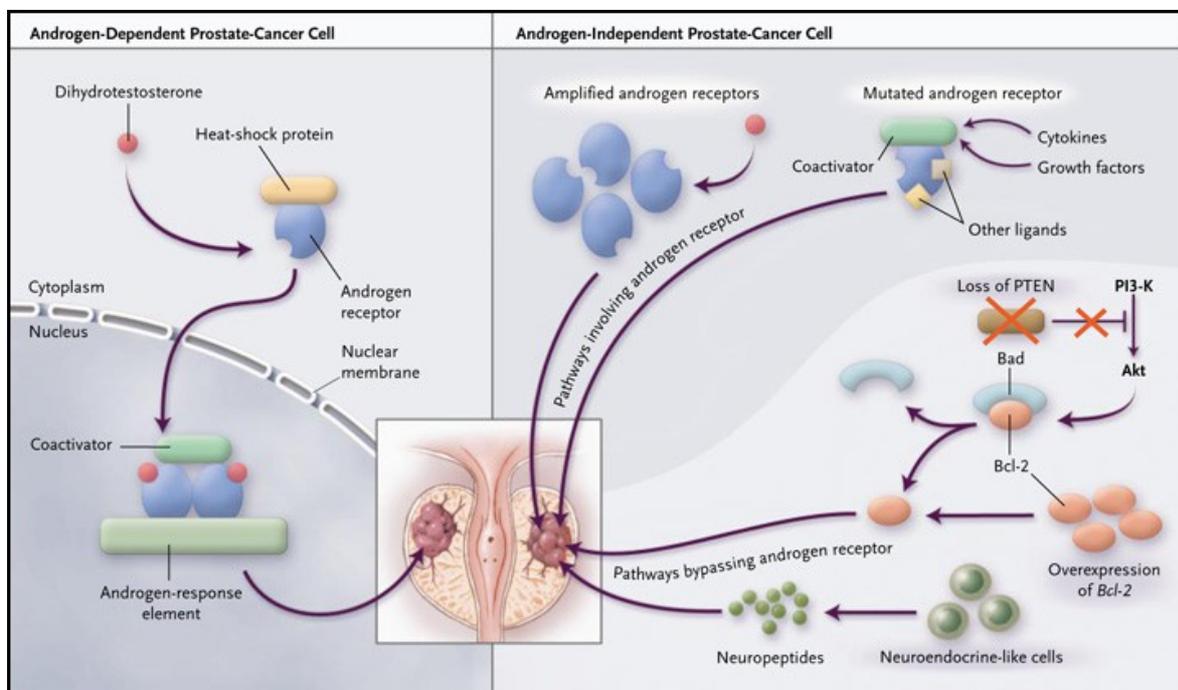


Figure 28 : mécanismes de développement des cancers de la prostate résistant ou non à la castration (d'après Debes et al⁷⁸)

III) PAX6 et PAGE4 dans le cancer de la prostate

1) PAX6

Le rôle de suppresseur de tumeur de PAX6 fut suspecté après la découverte de son hyperméthylation dans le cancer de prostate et de vessie⁶⁰⁻⁶². De part son action sur le RA

(via l'inhibition de SPBP⁶³ et la suppression directe de l'expression du RA), PAX6 semble impliquée dans l'oncogénèse primaire du cancer de la prostate et dans l'acquisition du phénotype de résistance à la castration.

2) PAGE4

Le rôle de PAGE4 dans le cancer de prostate reste débattu^{42,47}, cependant il semble agir comme un gène suppresseur de tumeur. La baisse de son expression dans les phénotypes agressifs de cancer de prostate le prédispose à son utilisation comme facteur pronostique. Son implication dans l'acquisition du phénotype de résistance à la castration n'a pas été étudiée de façon spécifique, mais demeure très probable.

3) Utilisation de PAX6 et PAGE4 dans le cadre de la médecine personnalisée

a) Le concept de médecine personnalisée

L'oncogénèse de la plupart des cancers est marquée par l'accumulation de mutations génétiques. Certaines sont communes à toutes les tumeurs d'un type histologique donné, mais beaucoup sont spécifiques de sous groupes phénotypiques précis. Ceci explique que 2 tumeurs histologiquement identiques puissent ne pas réagir de la même façon face à un traitement donné. Cette constatation a amené à rechercher une classification plus précise des tumeurs. Celle-ci se passe désormais au niveau de la biologie moléculaire avec la recherche de mutations ayant une valeur pronostique de la réponse au traitement. Ces mutations pourraient même devenir des cibles thérapeutiques via la mise en place de vaccins spécifiques. Cette recherche d'adaptation au cas par cas, patient par patient, des traitements anticancéreux définit le concept de médecine personnalisée. Ce concept est aujourd'hui déjà une réalité pour certains cancers dont celui du côlon⁷⁹ par exemple (recherche d'une mutation de KRAS avant la mise en place d'un traitement par anti-EGFR).

b) Intégration de PAGE4 et PAX6 dans une démarche de médecine personnalisée

Les propriétés de PAGE4 et PAX6 pourraient les conduire à être intégrés dans une démarche de médecine personnalisée du cancer de prostate. En effet, leur expression est diminuée^{47,80} dans le cancer de prostate et ils semblent jouer un rôle important dans

l'oncogénèse. Ainsi, la recherche de leur expression et de leur mutation sur les biopsies de tumeur de prostate, en association avec d'autres marqueurs, pourraient permettre une meilleure caractérisation de la tumeur au niveau moléculaire. Cette analyse pourrait ensuite déboucher sur un traitement spécifique de la tumeur. La famille des CTAs a d'ailleurs déjà fait l'objet d'un essai clinique de classe I⁴⁴ dans le cadre du traitement des cancers de prostate résistant à la castration avec des résultats prometteurs. Une autre utilisation potentielle des CTAs serait la création de vaccins dirigés contre eux. En effet, la plupart des CTAs (contrairement à PAGE4) sont sur-exprimés dans le cancer de prostate⁸⁰ et seraient donc des cibles potentielles d'un traitement visant spécifiquement les cellules pathologiques (voir figure 29).

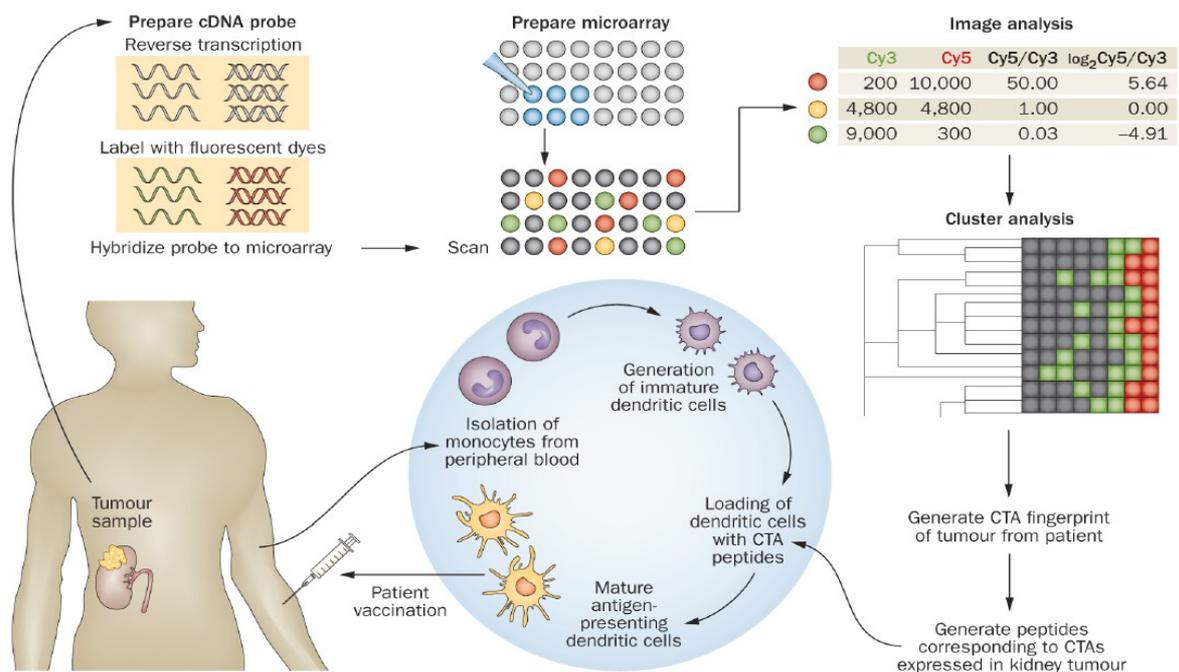


Figure 29 : utilisation potentielle des CTAs dans le traitement personnalisé des cancers urologiques, exemple du cancer du rein (d'après Kulkarni et al⁴¹)

Partie V : Conclusion

Dans le cancer de prostate, PAX6 et PAGE4 ont un rôle de suppresseur de tumeur via l'inhibition de l'action du RA. Notre étude a permis de préciser le rôle de PAX6 et de mettre en évidence son action inhibitrice sur l'expression du RA. PAGE4 et PAX6 semblent être des marqueurs pronostiques prometteurs qui pourront s'intégrer dans une démarche de traitement personnalisé du cancer de la prostate.

Références

1. world health organization. <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Agnès Dessaigne *et al.* *Cancer de la prostate : identification des facteurs de risque et pertinence d'un dépistage par dosage de l'antigène spécifique prostatique (PSA) de populations d'hommes à haut risque ?*. (haute autorité de santé, 2012).
3. Rébillard, X. *et al.* Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer urologique en France en 2012. *Prog. En Urol.* **23**, **Supplement 2**, S57–S65 (2013).
4. <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/1-types-cancer/10-cancer-prostate/19-epidemiologie-cancer-prostate-france-metropolitaine-essentielles.html>.
5. EAU Guidelines, edition presented at the 25th EAU Annual Congress, Barcelona 2010. ISBN 978-90-79754-70-0.
6. G.Fournier, A. Valeri, P. Mangin, O. Cussenot. cancer de la prostate: épidémiologie, facteurs de risques et anatomopathologie. *EMC* (2004).
7. Multigner, L. *et al.* Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3457–3462 (2010).
8. Cornu J.-N., Cussenot O. in **EMC, Urologie, 18-500-B-10**, (Elsevier Masson SAS, Paris, 2011).
9. David M. Berman, Ronald Rodriguez, Robert W. Veltri. in *Campbell-Walsh Urology* 2540–2541 (2012).
10. Tostain, J., Rossi, D. & Martin, P. M. Physiologie des androgènes chez l'homme adulte. *Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol.* **14**, 639–660 (2004).
11. Lasselin, J. *et al.* Influence de la testostérone plasmatique au cours de l'histoire naturelle du cancer de la prostate : analyse de la littérature. *Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol.* **23**, 438–443 (2013).
12. Locke, J. A. *et al.* Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* **68**, 6407–6415 (2008).
13. Wong, Y. N. S., Ferraldeschi, R., Attard, G. & de Bono, J. Evolution of androgen receptor targeted therapy for advanced prostate cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 365–

376 (2014).

14. Black, B. E. & Paschal, B. M. Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **15**, 411–417 (2004).
15. Roy, A. K. *et al.* Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **949**, 44–57 (2001).
16. Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K. & Yong, E.-L. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* (2014).
doi:10.1038/aps.2014.18
17. Fournier, G., Valeri, A., Mangin, P. & Cussenot, O. Cancer de la prostate. Épidémiologie. Facteurs de risques. Anatomopathologie. *Ann. Urol.* **38**, 187–206 (2004).
18. Société canadienne du cancer. Anatomie et physiologie de la prostate. at
<<https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/anatomy-and-physiology/?region=qc>>
19. Salomon, L. *et al.* Recommandations en onco-urologie 2013 du CCAFU : Cancer de la prostate. *Prog. En Urol.* **23**, **Supplement 2**, S69–S101 (2013).
20. Andriole, G. L. *et al.* Mortality Results from a Randomized Prostate-Cancer Screening Trial. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1310–1319 (2009).
21. Schröder, F. H. *et al.* Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N. Engl. J. Med.* **366**, 981–990 (2012).
22. HAS. *Détection précoce du cancer de la prostate. Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé (EPS).* (2013).
23. D'Amico, A. V. *et al.* Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* **280**, 969–974 (1998).
24. D'Amico, A. V. *et al.* Cancer-specific mortality after surgery or radiation for patients with clinically localized prostate cancer managed during the prostate-specific antigen era. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 2163–2172 (2003).
25. Wilt, T. J. *et al.* Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **367**, 203–213 (2012).

26. Bill-Axelson, A. *et al.* Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1708–1717 (2011).
27. E. Xylinas, M. Peyromaure. Cancer de la prostate : traitements. **EMC**, (2012).
28. E. Xylinas, L. Salomon, C. Abbou, A. de la Taille. Prostatectomie radicale extrapéritonéale coelioscopique robot-assistée : technique chirurgicale, résultats oncologiques et fonctionnels. *EMC* (2009).
29. Baron JC, Challey J. prostatectomie radicale par voie laparoscopique. *EMC* (2002).
30. C Barré, P Chauveau. prostatectomie radicale rétropubienne. *EMC* (2002).
31. C. Hennequin, L. Quero, H. Soudi, G. Sergent, C. Maylin. Radiothérapie conformationnelle du cancer de la prostate : technique et résultats. *EMC* (2006).
32. F. Bladou a, R. Thuret b, G. Gravis c, G. Karsenty a, G. Serment a, N. Salem d. Techniques, indications et résultats de la curiethérapie interstitielle par implants permanents dans le cancer localisé de la prostate. *EMC* (2007).
33. Évaluation des Ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) dans le traitement à visée curative du cancer localisé de la prostate à risque faible ou intermédiaire et dans le traitement des récurrences après radiothérapie dans le cadre du forfait innovation (ART.L-165 de la loi HPST).
34. L. Poissonnier, F.-J. Murat, J.-Y. Chapelon, A. Gelet. Indications, techniques et résultats du traitement par ultrasons focalisés (HIFU) du cancer localisé de la prostate. *EMC* 41–304–B (2007).
35. Ward, J. F. & Jones, J. S. Focal cryotherapy for localized prostate cancer: a report from the national Cryo On-Line Database (COLD) Registry. *BJU Int.* **109**, 1648–1654 (2012).
36. Salomon, L. *et al.* Recommandations en Onco-Urologie 2010 : Cancer de la prostate. *Prog. En Urol.* **20**, S217–S251 (2010).
37. Attard, G., Belldegrun, A. S. & de Bono, J. S. Selective blockade of androgenic steroid synthesis by novel lyase inhibitors as a therapeutic strategy for treating metastatic prostate cancer. *BJU Int.* **96**, 1241–1246 (2005).
38. Jung, M. E. *et al.* Structure-activity relationship for thiohydantoin androgen receptor

- antagonists for castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J. Med. Chem.* **53**, 2779–2796 (2010).
39. Therasse, P. *et al.* New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 205–216 (2000).
40. Michael S. Cookson, Bruce J. Roth, Philipp Dahm, Christine Engstrom, Stephen J. Freedland, Maha Hussain, Daniel W. Lin, William T. Lowrance, & Mohammad Hassan Murad, William K. Oh, David F. Penson and Adam S. Kibel. Castration-resistant prostate cancer: AUA guideline. (2014).
41. Kulkarni, P. *et al.* Cancer/testis antigens and urological malignancies. *Nat. Rev. Urol.* **9**, 386–396 (2012).
42. Zeng, Y. *et al.* The Cancer/Testis Antigen Prostate-associated Gene 4 (PAGE4) Is a Highly Intrinsically Disordered Protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 13985–13994 (2011).
43. Scanlan, M. J., Simpson, A. J. G. & Old, L. J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* **4**, 1 (2004).
44. Fong, L. *et al.* Potentiating endogenous antitumor immunity to prostate cancer through combination immunotherapy with CTLA4 blockade and GM-CSF. *Cancer Res.* **69**, 609–615 (2009).
45. Scanlan, M. J., Gure, A. O., Jungbluth, A. A., Old, L. J. & Chen, Y.-T. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* **188**, 22–32 (2002).
46. Iavarone, C. *et al.* PAGE4 Is a Cytoplasmic Protein That Is Expressed in Normal Prostate and in Prostate Cancers. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 329–335 (2002).
47. Sampson, N., Ruiz, C., Zenzmaier, C., Bubendorf, L. & Berger, P. PAGE4 Positivity Is Associated with Attenuated AR Signaling and Predicts Patient Survival in Hormone-Naive Prostate Cancer. *Am. J. Pathol.* **181**, 1443–1454 (2012).
48. Brinkmann, U. *et al.* PAGE-1, an X chromosome-linked GAGE-like gene that is expressed in normal and neoplastic prostate, testis, and uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

- S. A.* **95**, 10757–10762 (1998).
49. Mooney, S. M. *et al.* Cancer/testis antigen PAGE4, a regulator of c-Jun transactivation, is phosphorylated by homeodomain-interacting protein kinase 1, a component of the stress-response pathway. *Biochemistry (Mosc.)* **53**, 1670–1679 (2014).
 50. Yokokawa, J. *et al.* Identification of cytotoxic T-lymphocyte epitope(s) and its agonist epitope(s) of a novel target for vaccine therapy (PAGE4). *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **121**, 595–605 (2007).
 51. Blake, J. A. & Ziman, M. R. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development* **141**, 737–751 (2014).
 52. Carbe, C. *et al.* An allelic series at the paired box gene 6 (Pax6) locus reveals the functional specificity of Pax genes. *J. Biol. Chem.* **288**, 12130–12141 (2013).
 53. Shyr, C.-R. *et al.* Tumor suppressor PAX6 functions as androgen receptor Co-repressor to inhibit prostate cancer growth. *The Prostate* n/a–n/a (2009).
doi:10.1002/pros.21052
 54. Tang, S. M. *et al.* PAX6 gene associated with high myopia: a meta-analysis. *Optom. Vis. Sci. Off. Publ. Am. Acad. Optom.* **91**, 419–429 (2014).
 55. Robson, E. J. D., He, S.-J. & Eccles, M. R. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 52–62 (2006).
 56. Epstein, J. A. *et al.* Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev.* **8**, 2022–2034 (1994).
 57. Singh, S. *et al.* Iris hypoplasia in mice that lack the alternatively spliced Pax6(5a) isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6812–6815 (2002).
 58. Berger, J. *et al.* Conditional activation of Pax6 in the developing cortex of transgenic mice causes progenitor apoptosis. *Dev. Camb. Engl.* **134**, 1311–1322 (2007).
 59. Mayes, D. A. *et al.* PAX6 suppresses the invasiveness of glioblastoma cells and the expression of the matrix metalloproteinase-2 gene. *Cancer Res.* **66**, 9809–9817 (2006).
 60. Mishra, D. K. *et al.* Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 33–45 (2010).

61. Salem, C. E. *et al.* PAX6 methylation and ectopic expression in human tumor cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **87**, 179–185 (2000).
62. Hellwinkel, O. J. C., Kedia, M., Isbarn, H., Budäus, L. & Friedrich, M. G. Methylation of the TPEF- and PAX6-promoters is increased in early bladder cancer and in normal mucosa adjacent to pTa tumours. *BJU Int.* **101**, 753–757 (2008).
63. Elvenes, J. *et al.* Pax6 Represses Androgen Receptor-Mediated Transactivation by Inhibiting Recruitment of the Coactivator SPBP. *PLoS ONE* **6**, e24659 (2011).
64. Knut & Alice Wallenberg foundation. <http://www.proteinatlas.org/>.
65. Zielinski, R. R., Eigl, B. J. & Chi, K. N. Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *Cancer J. Sudbury Mass* **19**, 79–89 (2013).
66. Zellweger, T. *et al.* Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **113**, 619–628 (2005).
67. Yoshino, T. *et al.* Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 6116–6124 (2006).
68. Sanlioglu, A. D. *et al.* Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues. *J. Urol.* **177**, 359–364 (2007).
69. Rocchi, P. *et al.* Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* **64**, 6595–6602 (2004).
70. Sun, A. *et al.* Androgen receptor-dependent regulation of Bcl-xL expression: Implication in prostate cancer progression. *The Prostate* **68**, 453–461 (2008).
71. Edwards, J., Krishna, N. S., Grigor, K. M. & Bartlett, J. M. S. Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *Br. J. Cancer* **89**, 552–556 (2003).
72. Taplin, M.-E. *et al.* Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 2673–2678 (2003).
73. Small, E. J. *et al.* Antiandrogen withdrawal alone or in combination with

- ketoconazole in androgen-independent prostate cancer patients: a phase III trial (CALGB 9583). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 1025–1033 (2004).
74. Sun, S. *et al.* Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J. Clin. Invest.* **120**, 2715–2730 (2010).
75. Mohler, J. L. Concept and viability of androgen annihilation for advanced prostate cancer. *Cancer* **120**, 2628–2637 (2014).
76. Farooqi, A. A., Hou, M.-F., Chen, C.-C., Wang, C.-L. & Chang, H.-W. Androgen receptor and gene network: Micromechanics reassemble the signaling machinery of TMPRSS2-ERG positive prostate cancer cells. *Cancer Cell Int.* **14**, 34 (2014).
77. Lugnani, F., Simone, G., Biava, P. M. & Ablin, R. J. The role of neuroendocrine cells in prostate cancer: a comprehensive review of current literature and subsequent rationale to broaden and integrate current treatment modalities. *Curr. Med. Chem.* **21**, 1082–1092 (2014).
78. Debes, J. D. & Tindall, D. J. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1488–1490 (2004).
79. A. Al-Mamgani, W.D. Heemsbergen, S.T.H. Peeters, J.V. Lebesque. Role of intensity-modulated radiotherapy in reducing toxicity in dose escalation for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73 (3)**, pp. 685–691 (2009).
80. Suyama, T. *et al.* Expression of cancer/testis antigens in prostate cancer is associated with disease progression. *The Prostate* **70**, 1778–1787 (2010).
81. American Joint Committee on Cancer: Cancer staging Handbook. Seventh ed Springer Eds 2010;525:34.
82. Barry, M. J. *et al.* The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. The Measurement Committee of the American Urological Association. *J. Urol.* **148**, 1549–1557; discussion 1564 (1992).

Annexes

Annexe 1 : Complications après biopsies de prostate⁵

	pourcentage
complications	e
hémospermie	37,4
hématurie > 1 journée	14,5
saignement rectal < 2 jours	2,2
prostatite	1
fièvre > 38,5 °c	0,8
épididymite	0,7
saignement rectal > 2 jours nécessitant ou non une intervention chirurgicale	0,7
rétention urinaire	0,2
autres complications nécessitant une hospitalisation	0,3

Annexe 2 : Recommandations de l'EAU⁵ pour la réalisation du dépistage individuel du cancer de la prostate

L'EAU propose la réalisation d'un dépistage individuel chez les patients informés et ayant au moins 10 à 15 ans d'espérance de vie. Ce dépistage concerne :

- les hommes de plus de 50 ans
- les hommes de plus de 45 ans ayant une histoire familiale de cancer de prostate
- les afro-américains
- les hommes ayant un PSA > 1ng/ml à l'âge de 40 ans
- les hommes ayant un PSA > 2ng/ml à l'âge de 60 ans

De même l'EAU recommande la mise en place d'une stratégie adaptée au risque (basée sur le PSA initial). Ainsi, le PSA pourra être redosé tous les 2 ans chez les patients à risques ou après 8 ans chez les patients non à risque. L'âge auquel le dépistage devra être arrêté dépend de l'espérance de vie (< 15 ans) et du performance status du patient.

Annexe 3 : classification TNM 2010 du cancer de la prostate⁸¹

T Tumeur primitive

- TX : tumeur primitive non évaluée

- T0 : tumeur primitive non retrouvée

- T1 : tumeur ni palpable au toucher rectal (TR), ni visible en imagerie
 - T1a : tumeur occupant moins de 5 % du tissu réséqué avec un score de Gleason < 7 ou absence de grade 4 ou 5
 - T1b : tumeur occupant plus de 5 % du tissu réséqué ou un score de Gleason > 7 ou présence de grade 4 ou 5
 - T1c : tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'une élévation de la valeur des PSA

- T2 : tumeur limitée à la prostate
 - T2a : tumeur atteignant la moitié d'un lobe ou moins
 - T2b : tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais sans atteindre les 2 lobes
 - T2c : tumeur atteignant les 2 lobes

- T3 : extension au- delà de la capsule
 - T3a : extension extra- capsulaire uni- ou bilatérale
 - T3b : extension aux vésicules séminales uni- ou bilatérale

- T4 : tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscles releveurs de l'an us ou la paroi pelvienne)

N Ganglions régionaux

- NX : ganglions régionaux non évalués
- N0 : absence de métastases ganglionnaire régionale
- N1 : atteinte ganglionnaire régionale
- N1 mi : métastase ganglionnaire < ou = 0,2 cm (optionnel)

Métastases à distance

- MX : métastases à distance non évaluées
- M0 : absence de métastase à distance
- M1 : métastases à distance
- M1a : atteinte des ganglions non régionaux
- M1b : atteinte osseuse
- M1c : autres sites avec ou sans atteinte osseuse

Classification pathologique (pTNM)*

- pT0 : absence de tumeur identifiée après prostatectomie totale
- pT2 : tumeur limitée à la prostate
 - pT2a : tumeur limitée à un demi- lobe ou moins
 - pT2b : tumeur unilatérale avec atteinte de plus d'un demi- lobe, mais pas des 2 lobes
 - pT2c : tumeur bilatérale
- pT3 : extension extraprostatique
 - pT3a : extension extraprostatique uni- ou bilatérale incluant le col vésical**
 - pT3b : envahissement des vésicules séminales uni- ou bilatérales
- pT4 : envahissement d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscles releveurs de l'anus ou paroi pelvienne)

R Reliquat tumoral postopératoire

- Rx : présence de résidu tumoral non évaluée
- R0 : absence de reliquat tumoral macroscopique ou Microscopique
- R1 : reliquat tumoral microscopique (focal ou étendu)
- R2 : reliquat tumoral macroscopique

* pas de classification pT pour le stade T1

** l'atteinte de l'apex et de la capsule (sans dépassement) est classée pT2

Annexe 4 : classification de D'Amico^{23,24}

- Faible risque : PSA \leq 10 ng/ml et score de Gleason \leq 6 et stade clinique T1c ou T2a.
- Risque intermédiaire : PSA entre 10 et 20 ng/ml ou score de Gleason 7 ou stade clinique T2b.
- Risque élevé : PSA $>$ 20 ng/ml ou score de Gleason $>$ 7 (8, 9 ou 10) ou stade clinique T2c.

Une distinction existerait au sein du groupe à risque intermédiaire entre les tumeurs de score de Gleason 3+4 et les tumeurs de score de Gleason 4+3 qui appartiendraient plutôt au groupe à haut risque.

1) Abstention-surveillance

Ce traitement est à visée palliative, centré sur le traitement de symptômes. Il concerne les hommes ayant une maladie initialement localisée mais ayant une espérance de vie limitée (< 10 ans)^{5,19}.

2) Surveillance active

Contrairement à l'abstention-surveillance, ce traitement est à visée curative. Il s'adresse à des patients demandeurs, sans polyopathie, ayant un cancer de prostate cliniquement localisé à faible risque de progression. Après sélection, ces patients sont surveillés jusqu'à ce que l'évolution de la maladie (ou la volonté du patient) impose la mise en place d'un traitement curatif. Le principal but de cette surveillance est d'épargner au patient les effets secondaires des traitements aussi longtemps que possible, tout en restant dans la fenêtre de curabilité de la maladie.

Les modalités précises d'inclusion et de surveillance ne sont pas encore fermement établies^{19,25,26}. Cependant, concernant la surveillance, le consensus actuel est de réaliser régulièrement un TR, un dosage du PSA et des biopsies de prostate. La place de l'IRM et des marqueurs comme le PCA3 reste à déterminer.

3) Chirurgie : prostatectomie radicale

Celle-ci peut être réalisée par voie ouverte rétro-pubienne ou périnéale, laparoscopique transpéritonéale ou extrapéritonéale, robot assisté ou non²⁷⁻³⁰. Que ce soit sur le plan carcinologique ou fonctionnel, toutes ces voies semblent équivalentes¹⁹. En cas de tumeur à risque intermédiaire ou élevé un curage ganglionnaire ilio-obturateur, iliaque interne et iliaque externe bilatéral remontant jusqu'à la bifurcation iliaque est recommandé.

Afin de préserver au mieux la fonction érectile, une préservation des bandelettes vasculo-nerveuses uni- ou bi-latérales peut être envisagée. Cette préservation ne concerne pas les patients à risque d'atteinte extra-capsulaire.

En cas d'atteinte extracapsulaire (pT3) une radiothérapie adjuvante pourra être proposée. Une hormonothérapie adjuvante pourra être discutée pour les patients pN1.

Les contre-indications sont principalement liées aux antécédents chirurgicaux de la région pelvienne et les risques liés à l'anesthésie. Les complications sont principalement la dysfonction érectile et l'incontinence urinaire²⁷.

4) Radiothérapie externe

La radiothérapie a une large place dans le traitement du cancer de la prostate^{5,19,31}. Ses indications sont triples : traitement curatif, adjuvant/de rattrapage ou palliatif. Actuellement^{5,19}, la technique recommandée est la radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle, si possible en modulation d'intensité de dose. La dose dépend de l'indication ; en cas de traitement à visée curative une escalade de dose à 74-80 Gy est jugée nécessaire. Concernant les indications d'irradiation des chaînes ganglionnaires, la question n'est pas complètement tranchée. Cependant elle semble apporter un bénéfice en cas de tumeur à haut risque ou localement avancée. En cas de tumeur à risque intermédiaire, élevé ou localement avancé une hormonothérapie complémentaire pourra être mise en place^{5,19}.

Les principales contre-indications sont une irradiation pelvienne antérieure ou une maladie inflammatoire rectale active. La présence de symptômes obstructifs urinaires sévères n'est pas une contre-indication absolue, la radiothérapie pouvant être réalisée après résection trans-urétrale de prostate.

Les effets secondaires sont liés à l'irradiation de l'appareil urinaire et du rectum³¹. La radiothérapie entraîne aussi des risques de dysfonctions érectiles²⁷.

5) Curiethérapie

La curiethérapie est une alternative thérapeutique pour les tumeurs à faible risque ou pour certaines du groupe intermédiaire en association avec une radiothérapie externe^{5,19}. Elle consiste en l'implantation permanente de grains, le plus souvent d'iode 125.

Ses contre-indications sont un volume prostatique > 50-60 ml, l'existence d'un lobe médian, un antécédent de résection endoscopique de prostate et des troubles mictionnels préexistants.

Les principales complications sont la rétention d'urine, l'urétrite radique, la sténose de l'urètre, l'incontinence, la rectite radique et les troubles de l'érection³².

6) Ultrasons focalisés à haute intensité (HIFU)

Ce traitement, réalisé par voie endorectale, génère une nécrose tissulaire. En France¹⁹, il concerne les patients de plus de 70 ans, ayant une espérance de vie de 7 ans au moins et atteints d'une tumeur T1-T2N0M0, un score de Gleason ≤ 7 (3+4), une valeur du PSA < 15 ng/ml, un volume prostatique < 50 ml et un volume tumoral limité (moins de 4 zones prostatiques atteintes sur 6). Cette technique fait actuellement l'objet d'une étude dont le promoteur est l'AFU³³.

Ces principales complications sont l'incontinence, la sténose urétrale et l'impuissance³⁴.

7) Cryothérapie

Cette technique s'adresse aux tumeurs de risque faible à intermédiaire avec un volume prostatique < 40 ml. La principale complication est l'impuissance³⁵.

Annexe 6 : indications de la suppression androgénique dans le traitement du cancer de la prostate¹⁹

Stade	Recommandations de la suppression androgénique
T1a	N'est pas une option
T1b-T2b	Très discutée pour pallier les symptômes de patients ne relevant pas d'un traitement curatif, mais ayant un cancer peu différencié Les anti-androgènes ne sont pas une option
T3-T4	Option pour les patients jeunes (< 70 ans), symptomatiques, avec forte masse tumorale, PSA élevé (20-50 ng/ml), temps de doublement du PSA < 1 an
N+ M0	Standard, mais initiation précoce ou différée, continue ou intermittente, discutée au cas par cas
M+	Standard, mais initiation précoce ou différée, continue ou intermittente, discutée au cas par cas

Annexe 7 : recommandations de l'AFU¹⁹ et de l'EAU⁵ pour le traitement du cancer de la prostate

Recommandations de l'AFU

Tumeurs à faible risque : T1- T2a et PSA < ou = 10 ng/ml et score de Gleason < ou = 6

Traitements standards validés:

- Prostatectomie totale (curage lymphonodal optionnel)
- Curiethérapie avec implants permanents d'iode 125
- Radiothérapie externe prostatique à la dose de 76 Gy ou plus
- Surveillance active selon les critères tumoraux

Traitements optionnels ou en cours d'évaluation :

- Ultrasons de haute fréquence (HIFU)
- Cryothérapie (en évaluation)
- Thérapie focale (en évaluation)

Tumeurs à risque intermédiaire : Stade clinique T1- T2b ou PSA 10-20 ng/ml ou score de Gleason biopsique = 7

Traitements standards validés :

- Prostatectomie totale avec curage lymphatique
- Radiothérapie externe conformationnelle avec augmentation de dose > 76 Gy
- Radiothérapie externe avec une hormonothérapie courte (6 mois) par agoniste ou antagoniste de LH- RH

Traitement optionnel :

- Curiethérapie associée à une radiothérapie externe conformationnelle

Traitements optionnels en cours d'évaluation :

- HIFU (protocole AFU forfait innovation)
- Cryothérapie

Tumeurs à haut risque : Stade clinique T2c, T3a ou PSA > 20 ng/ml ou score de Gleason biopsique > ou = 8

Traitements standards validés :

- Radiothérapie externe avec une hormonothérapie longue (2 ou 3 ans) par a- ou anta-LH-RH
- Prostatectomie totale avec curage lymphonodal (possible pour certains cT3a N0M0)

Stades métastatiques ganglionnaires

L'hormonothérapie (agoniste ou antagoniste de la LHRH) est le traitement standard. En fonction de la situation clinique elle sera associée ou non à un traitement local (radiothérapie ou chirurgie).

Stades métastatiques osseux

L'hormonothérapie (agoniste ou antagoniste de la LHRH) est le traitement standard.

Recommandations de l'EAU

Stade	traitement	commentaire
T1a	abstention-surveillance	Pour les patients avec une espérance de vie < 10 ans et un score de Gleason < ou = à 7
	surveillance active	Pour les patients avec une espérance de vie > 10 ans, une re-stadification par biospsies échoguidées est recommandée
	prostatectomie radicale	Option envisageable pour les patients jeunes ayant longue espérance de vie, spécialement si le score de Gleason est > ou = à 7
	radiothérapie externe	Option envisageable pour les patients jeunes ayant une longue espérance de vie, en particulier pour les tumeurs peu différenciées. Risque accru de complications si antécédent de RTUP
	hormonothérapie	Non envisageable
	combinaison de	Non envisageable

	traitements	
T1b- T2b	abstention-surveillance	patients ayant une espérance de vie < 10 ans
	surveillance active	Option envisageable si chez les patients stade cT1c-cT2a, PSA < 10 ng/mL, score de Gleason < ou = à 6, biopsies positives < ou = à 2, envahissement tumoral des biopsies < ou = à 50%
		ou patient ayant une espérance de vie > 10 ans après information de l'absence de données sur la survie après 10 ans
		ou patient n'acceptant pas les complications du traitement
T1a- T2c	abstention-surveillance	patients ayant une espérance de vie < 10 ans et un score de Gleason < ou = à 7
	prostatectomie radicale	Optionnel pour les patients stade pT1a, traitement standard pour les patients ayant une espérance de vie > 10 ans
	radiothérapie externe	patients ayant une espérance de vie > 10 ans, patients contre-indiqués pour la chirurgie
	curiethérapie	Option envisageable si volume prostatique < ou = à 50 mL et score d'IPSS (voir annexe 11) < ou = à 12
	hormonothérapie	Patients symptomatiques en situation palliative
	combinaison de traitements	Pour les patients à haut risque, une radiothérapie associée à une hormonothérapie néo-adjuvante et concomitante augmente la survie globale
T3-T4	abstention-surveillance	Option envisageable pour les patients T3 asymptomatiques, avec un score de Gleason < ou = à 7, une espérance de vie < 10 ans chez qui un traitement local n'est pas envisageable
	prostatectomie radicale	Option envisageable pour des patients sélectionnés, au stade T3a, PSA < 20 ng/mL, score de Gleason < ou = à 8 et une espérance de vie > 10 ans
	radiothérapie externe	Pour les patients au stade T3 ayant une espérance de vie > 5-10 ans. Une hormonothérapie pourra être proposée
	hormonothérapie	Patients symptomatiques, au stade T3-T4, PSA > 25-50 ng, PSADT < 1 an, pas une option en monothérapie si une radiothérapie est envisageable

	combinaison de traitements	Si possible proposer une radiothérapie avec une hormonothérapie concomitante et adjuvante
N+, M0	abstention-surveillance	Patients asymptomatiques, PSA < 20-50 ng/mL, PSADT > 12 mois, requiert un suivi très rapproché
	prostatectomie radicale	Option envisageable pour des patients hautement sélectionnés, ayant une espérance de vie > 10 ans, au sein d'une approche multimodale
	radiothérapie externe	Option envisageable chez des patients hautement sélectionnés ayant une espérance de vie > 10 ans, une association avec une hormonothérapie adjuvante de 3 ans est obligatoire
	hormonothérapie	Traitement standard en particulier si présence de plus de 2 ganglions envahis, l'hormonothérapie ne s'utilise en monothérapie que pour les patients non éligibles pour un traitement local
	combinaison de traitements	N'est pas le traitement standard
M+	abstention-surveillance	N'est pas le traitement standard
	prostatectomie radicale	N'est pas le traitement standard
	radiothérapie externe	Pas dans le cadre d'un traitement curatif, mais option thérapeutique en combinaison avec une hormonothérapie pour un traitement symptomatique
	hormonothérapie	Traitement standard, obligatoire chez les patients symptomatiques

Annexe 8 : Critères de récives biologiques du cancer de prostate¹⁹

Traitement	Définition de la récive biologique
Prostatectomie radicale	PSA > 0,2 ng/ml confirmé sur 2 dosages successifs
Radiothérapie	PSA Nadir + 2ng/ml
Curiethérapie	PSA Nadir + 2ng/ml
HIFU	PSA Nadir + 1,2 ng/ml
Hormonothérapie	Groupe pronostique après 6 à 9 mois de traitement : <ul style="list-style-type: none"> - favorable : PSA < 0,2 ng/ml - intermédiaire : 0,2 < PSA < 0,4 ng/ml - défavorable : PSA > 0,4 ng/ml
CPRC	Élévation du PSA de 25 % par rapport au nadir sous traitement, sur deux dosages successifs réalisés à au moins 15 jours d'intervalle

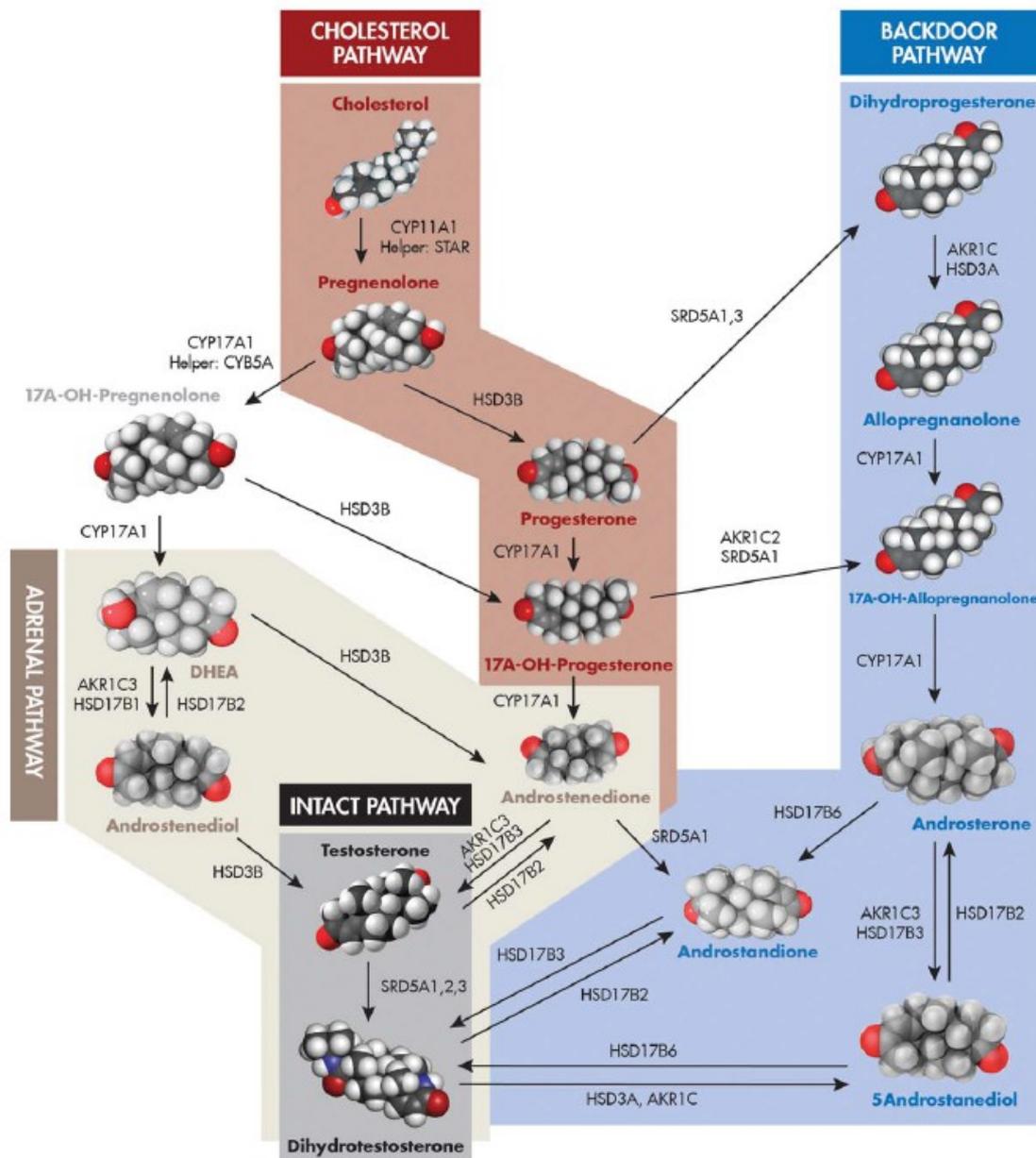
Annexe 9: composition du sérum RPMI

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75.0	10.0	0.133333 34
L-Alanine	89.0	8.9	0.099999 994
L-Arginine	174.0	200.0	1.149425 3
L-Asparagine	132.0	50.0	0.378787 88
L-Aspartic acid	133.0	20.0	0.150375 93
L-Cystine 2HCl	313.0	65.0	0.207667 74
L-Glutamic Acid	147.0	20.0	0.136054 43
L-Histidine	155.0	15.0	0.096774 19
L-Hydroxyproline	131.0	20.0	0.152671 75
L-Isoleucine	131.0	50.0	0.381679 4
L-Leucine	131.0	50.0	0.381679 4
L-Lysine hydrochloride	146.0	40.0	0.273972 6
L-Methionine	149.0	15.0	0.100671 14
L-Phenylalanine	165.0	15.0	0.090909 09
L-Proline	115.0	20.0	0.173913 05
L-Serine	105.0	30.0	0.285714 3
L-Threonine	119.0	20.0	0.168067 23
L-Tryptophan	204.0	5.0	0.024509 804
L-Tyrosine disodium salt	225.0	29.0	0.128888 89
L-Valine	117.0	20.0	0.170940 18
Vitamins			
Ascorbic Acid phosphate	289.54	2.5	0.008634 386
Biotin	244.0	0.2	8.196721 3E-4
Choline chloride	140.0	3.0	0.021428 572
D-Calcium pantothenate	477.0	0.25	5.24109E -4
Folic Acid	441.0	1.0	0.002267 5737
Niacinamide	122.0	1.0	0.008196 721
Para-Aminobenzoic Acid	137.0	1.0	0.007299 27

Pyridoxine hydrochloride	206.0	1.0	0.004854 369
Riboflavin	376.0	0.2	5.319149 E-4
Thiamine hydrochloride	337.0	1.0	0.002967 359
Vitamin B12	1355.0	0.0050	3.690037 E-6
i-Inositol	180.0	35.0	0.194444 45
Inorganic Salts			
Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236.0	100.0	0.423728 82
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120.0	48.84	0.407 5.333333
Potassium Chloride (KCl)	75.0	400.0	5 23.80952
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84.0	2000.0	5 103.4482
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	6000.0	7
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄) anhydrous	142.0	800.0	5.633803 0.003034
Zinc sulfate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	288.0	0.874	7223
Proteins			
AlbuMAX® II		400.0	Infinity
Human Transferrin (Holo)		7.5	Infinity
Insulin Recombinant Full Chain		10.0	Infinity
Trace Elements			
Ammonium Metavanadate	116.98	3.0E-4	2.564541 E-6
Cupric Sulfate	250.0	0.00125	5.0E-6 2.525252
Manganous Chloride	198.0	5.0E-5	4E-7 2.890173
Sodium Selenite	173.0	0.0050	3E-5
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	2000.0	11.111111 0.019479
Ethanolamine	97.54	1.9	187 0.003257
Glutathione (reduced)	307.0	1.0	3289 0.013283
Phenol Red	376.4	5.0	741
Sodium Pyruvate	110.0	110.0	1.0

Source: <http://www.lifetechnologies.com/>

Annexe 10 : voies alternatives de production de DHT dans le CPRC (d'après Mohler et al 75)



Annexe 11 : score IPSS⁸²

IPSS : International Prostate Score Symptom							
	Jamais	Environ 1 fois sur 5	Environ 1 fois sur 3	Environ 1 fois sur 2	Environ 2 fois sur 3	Presque toujours	
Au cours du dernier mois, avec quelle fréquence avez vous eu la sensation que votre vessie n'était pas complètement vidée après avoir uriné ?	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
Au cours du dernier mois, avec quelle fréquence avez vous eu besoin d'uriner moins de 2 heures après avoir fini d'uriner ?	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
Au cours du dernier mois, avec quelle fréquence avez vous eu une interruption du jet d'urine c'est à dire démarrage de la miction puis arrêt puis redémarrage ?	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
Au cours du dernier mois, après avoir ressenti le besoin d'uriner, avec quelle fréquence avez vous eu des difficultés à vous retenir d'uriner ?	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
Au cours du dernier mois, avec quelle fréquence avez vous eu une diminution de la taille ou de la force du jet d'urine ?	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
Au cours du dernier mois, avec quelle fréquence avez vous dû forcer ou pousser pour commencer à uriner ?	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
	Jamais	1 fois	2 fois	3 fois	4 fois	5 fois	
Au cours du dernier mois écoulé, combien de fois par nuit, en moyenne, vous êtes-vous levé pour uriner (entre le moment de votre coucher le soir et celui de votre lever définitif le matin ?	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
<ul style="list-style-type: none"> • 0 – 7 = léger • 8 – 19 = modéré • 20 – 35 = sévère 						Total = IPSS :	<input type="checkbox"/>

Évaluation de la qualité de vie liée aux symptômes urinaires								
	Très satisfait	Satisfait	Plutôt satisfait	Partagé (ni satisfait, ni ennuyé)	Plutôt ennuyé	Ennuyé	Très ennuyé	
Si vous deviez vivre le restant de votre vie avec cette manière d'uriner, diriez-vous que vous en seriez :	0	1	2	3	4	5	6	<input type="checkbox"/>

Résumé

Introduction

La physiopathologie du cancer de la prostate demeure peu connue. Cette méconnaissance freine le développement de nouveaux outils pronostiques et thérapeutiques. PAGE4 et PAX6 sont deux protéines dont le rôle de suppresseur de tumeur est suspecté dans le cancer de prostate. Les buts de cette étude étaient de 1) confirmer l'expression de PAGE4 et PAX6 dans des échantillons et des lignées cellulaires de cancer de prostate, 2) rechercher un lien entre l'expression de PAGE4 et de PAX6, 3) d'évaluer les liens entre PAGE4, PAX6 et des acteurs majeurs de l'oncogenèse du cancer de la prostate : le récepteur des androgènes (RA) et le PSA (KLK3).

Matériel et méthodes

Les biopsies de cancer de prostate de 60 patients, ainsi que 32 échantillons de cellules LuCaP ont été analysées en immunohistochimie. La coloration a été quantifiée par calcul du H score. Trois lignées cellulaires de cancer de prostate (LnCaP, DU145 et PC3), ainsi que les effets de la sur-expression de PAGE4 et PAX6 dans LnCaP, ont été analysés par qPCR et western blot.

Résultats

PAGE4 était exprimé dans le cytoplasme cellulaire et PAX6 dans le noyau. Il existait une corrélation linéaire inverse entre l'expression de PAX6 et celle de RA dans la lignée cellulaire LuCaP. Dans LnCaP, la sur-expression de PAX6 a entraîné une diminution de l'expression protéique de RA et PSA ; ainsi qu'une baisse de l'expression de RA au niveau de l'ARNm. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'expression de PAGE4 et PAX6 dans les échantillons prostatiques et dans les lignées cellulaires après sur-expression de PAGE4 et PAX6. L'expression de PAGE4 n'influçait pas l'expression de RA, PSA ou PAX6.

Conclusion

Le rôle de PAX6 apparaît comme majeur dans l'oncogenèse du cancer de prostate. PAGE4 et PAX6 pourraient dans l'avenir devenir des marqueurs pronostiques et/ou devenir des cibles thérapeutiques dans le cadre de la prise en charge personnalisée du cancer de la prostate.

Mots clés

cancer de prostate, cancer testis antigen, prostate-associated gene 4, paired box gene, PAX6, récepteurs aux androgènes, physiopathologie du cancer de prostate, médecine personnalisée

SERMENT

En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !



