HAL
open science

Etablissement d'un nouveau modèle pérclinique de cancer de la prostate et identification de biomarqueurs de résistance au docetaxel

Nader Al Nakouzi

To cite this version:

Nader Al Nakouzi. Etablissement d'un nouveau modèle pérclinique de cancer de la prostate et identification de biomarqueurs de résistance au docetaxel. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T063 . tel-00739261

HAL Id: tel-00739261

https://theses.hal.science/tel-00739261

Submitted on 7 Oct 2012

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

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

UNIVERSITÉ PARIS XI

FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS SUD

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS XI

Discipline : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

Nader AL NAKOUZI

Le 12 Octobre 2011

ETABLISSEMENT D'UN NOUVEAU MODELE PRECLINIQUE DE CANCER DE LA PROSTATE ET IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS DE RESISTANCE AU DOCETAXEL

Directrice de thèse : Dr. Anne CHAUCHEREAU

JURY
Pr. Karim FIZAZI *Président*
Pr. Stéphane CULINE *Rapporteur*
Dr. Patricia VRIGNAUD *Rapporteur*
Pr. Philippe CLEZARDIN *Examinateur*
Pr. Charbel MASSAAD *Examinateur*
Dr. Anne CHAUCHEREAU *Directrice de thèse*

Ecole doctorale : ED 418 Cancérologie

Unité de recherche : INSERM U981*"Biomarqueurs prédicteurs et nouvelles stratégies moléculaires en thérapeutique anticancéreuse"*. Institut de cancérologie Gustave Roussy

A mes parents,

qui m'ont transmis courage et ténacité,

qui m'ont toujours porté pour mener à bien mes études,

qui ont su m'épauler et me guider tout au long de ces années, durant les moments difficiles et les remises en question afin que jamais je ne baisse les bras…

« On ne dit jamais assez aux gens qu'on aime qu'on les aime »

-Louis Chedid-

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse,
Monsieur le professeur Karim Fizazi qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse,
Madame le docteur Patricia Vrignaud et Monsieur le professeur Stéphane Culine qui ont assumé la charge exigeante de rapporteur,
Monsieur le professeur Charbel Massaad et Monsieur le professeur Philippe Clézardin pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.

Durant ces quatre années passées au laboratoire du Docteur Anne Chauchereau, j'ai eu la chance de rencontrer et de travailler avec de nombreuses personnes. Sans eux, jamais ce travail n'aurait pu aboutir. Je tiens à les remercier pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté, toujours avec sympathie et bonne humeur.

Je remercie, tout particulièrement Anne Chauchereau pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour avoir endossé la difficile casquette de directrice de thèse. Anne, avec ta patience, tes encouragements et ta disponibilité, tu m'as permis de terminer au mieux ce travail long et parfois semé d'embuches.

Je remercie également tous les membres de l'équipe Prostate, en particulier, le Docteur Catherine Gaudin pour son aide, son soutien, ses nombreux conseils techniques qui, au jour le jour, m'ont permis d'avancer tout au long de ma thèse.
Merci à Shanna et Sandra pour m'avoir aidé à avancer dans mes « manips » de dernière minute. Je remercie Shanna et Safae de m'avoir supporté et toujours répondu à toutes mes questions cliniques, et, bien sûr aussi pour les discutions amusantes qu'on a pu avoir.
Je n'oublie pas l'ensemble des étudiants et techniciens qui, pour certains sont partis, ou encore présents dans l'équipe, lesquels m'ont, sans faille, accompagné et soutenu tout au long de ma thèse (Fany Tabarin, Sylvestre Le Moulec, Nicolas Martin, Lucile Delbruel, Tuan-anh).

Un merci plus particulier à Maya Jeitany pour toutes nos discussions scientifiques, parfois polémiques, souvent constructives et toujours complices, alternant les moments de pur fou-rire et de chamailleries, les moments heureux et les instants difficiles : en toute amitié !
Je garde des souvenirs impérissables des manips de culture cellulaire.

Je remercie l'ensemble des personnes de l'unité Inserm U981 dans laquelle j'ai mené mes travaux, et en particulier Frédric Commo, qui m'a patiemment aidé dans mes analyses statistiques, avec sa bonne humeur légendaire et ses encouragements.
Sans oublier Estelle Taronchon et Virginie Marty qui m'ont formé et aidé dans toutes mes manips d'immunohistochimie.
Merci à Samar Al safadi pour son amitié, ses conseils, et ses encouragements surtout dans les moments de nostalgie.

Un merci particulier à Ludovic Bigot et Sophie Broutin pour m'avoir accordé, derrière beaucoup de complicité, de taquineries et de blagues, une profonde amitié qui va bientôt me manquer…
Et bien sûr, je ne saurai oublier Virginie Quidville (mini Boss) qui m'a tant aidé dans ma thèse, merci pour toutes les discussions scientifiques intenses que nous avons eues. Virginie ton aide et ton soutien m'ont été précieux pendant ces quatre ans.

Plus généralement, j'adresse des remerciements à toutes les personnes du 12ème étage, surtout du bureau 401, qui ont toujours eu un mot d'encouragement au détour d'un couloir, dans l'ascenseur ou bien autour d'une pause café. Une pensée spéciale à Nyam, Angélique, Niko, ken…. Et les autres …

Mille mercis au relecteur de ma thèse et mon ami Guy Ducarne, c'était une tache difficile que tu as assumée toujours avec bonne humeur et beaucoup d'encouragements.

Bien sûr, la thèse ne se limite ni au laboratoire ni à la science. La contribution de tous ceux qui m'ont aéré le cerveau fut vitale… Dans une thèse, il y a aussi une contribution importante de tous ceux qui comprennent, par amitié ou par amour, que la thèse est un challenge personnel sans concessions. Merci à tous ceux qui ont compris à quel point c'était important pour moi, qui ont accepté mes absences et mes silences radio, qui m'ont soutenu dans tous les moments : mes parents, mon frère, ma sœur, mes amis et mon oncle préféré Emile.

Merci à tous ceux que j'aurais pu oublier…avec un clin d'œil pour le neuf …

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES 1

LISTE DES TABLEAUX 2

LISTE DES ABREVIATIONS 3

RESUME 6

LISTE DES PUBLICATIONS 7

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE 9

I. CHAPITRE I: LE CANCER DE LA PROSTATE (CAP) 11

I.1 LA PROSTATE: STRUCTURE ET FONCTION 11

I.1.1 Anatomie de la glande prostatique 11

I.1.2 Role physiologique de la prostate 12

I.2 EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DE LA PROSTATE 13

I.3 LES FACTEURS DE RISQUE 13

I.4 CARACTERISTIQUES CLINIQUES DU CAP 15

I.4.1 Confirmation diagnostique 15

I.4.2 Anatomopathologie du CaP 17

I.4.3 Classification TNM 18

I.4.4 classification de d'AMICO 18

I.5 STRUCTURE CELLULAIRE DE LA PROSTATE 19

I.6 LA CANCEROGENESE PROSTATIQUE - ETHIOLOGIE 20

I.6.1 Mécanismes impliqués dans les phases initiales du développement tumoral 20

I.6.2 Mécanismes impliqués dans l'évolution du CaP 23

I.6.3 Processus Métastatique 28

I.6.4 Angiogénèse 36

II. CHAPITRE II : MODELES DE CANCER DE LA PROSTATE 37

II.1 LIGNEES CELLULAIRES DE CAP HUMAINS 37

II.1.1 Lignées cellulaires androgéno-indépendantes 38

II.1.2 lignées cellulaires androgéno-dépendantes ou sensibles 40

II.1.3 Lignées cellulaires dérivées d'une tumeur primitive *43*
II.1.4 Lignées cellulaires immortalisées *45*
II.2 LES MODELES ANIMAUX 45
II.2.1 Modèles orthotopiques *46*
II.2.2 Modèles de xénogreffes tumorales de CaP humains *46*
II.2.3 Modèles de CaP spontanés *50*
II.2.4 Modèles transgéniques chez la souris *51*
II.3 MODELES DE METASTASES OSSEUSES DE CANCER DE LA PROSTATE : 52
II.3.1 L'injection intracardiaque *52*
II.3.2 L'injection intraosseuse *53*
II.4 MODELES DE CULTURES 3D 54
II.5 MODELES DE RESISTANCE A LA CHIMIOTHERAPIE 55

ARTICLE 1: STEMNESS MARKERS CHARACTERIZE IGR-CAP1, A NEW CELL LINE DERIVED FROM PRIMARY EPITHELIAL PROSTATE CANCER 57

ARTICLE 2: REPRODUCING BONE WIDESPREAD OF HUMAN PROSTATE CANCER IN IGR-CAP1 *IN VIVO* MODEL 79

***RESULTATS COMPLEMENTAIRES* 117**

DISCUSSION 119

III. CHAPITRE III : LES TRAITEMENTS DU CANCER DE LA PROSTATE 123

III.1 LES OPTIONS THERAPEUTIQUES: 123
III.2 LES INDICATIONS THERAPEUTIQUES : 126
III.3 LA CHIMIOTHERAPIE 127
III.3.1 Principe de la chimiotherapie *128*
III.3.2 Les classes des agents anticancéreux *130*

IV. CHAPITRE IV : LES TAXANES 133

IV.1 HISTORIQUE 133
IV.2 LE DOCETAXEL 133
IV.3 LE CABAZITAXEL 134
IV.4 LES MICROTUBULES : CIBLES DES TAXANES 135

IV.4.1 Les microtubules : structure et dynamique 135

IV.5 MECANISME D'ACTION DES TAXANES AU NIVEAU DES MICROTUBULES DU FUSEAU MITOTIQUE 140

IV.6 LA REPONSE CELLULAIRE AUX ANTI-MITOTIQUES..... 141

IV.6.1 La catastrophe mitotique (MC)..... 142

V. CHAPITRE V : LES MECANISMES DE RESISTANCES AUX TAXANES ET LES PROTEINES IMPLIQUEES 145

V.1 MECANISMES GENERAUX DE LA RESISTANCE :..... 146

V.1.1 Distribution de la drogue..... 146

V.1.2 Hétérogénéité de la tumeur 146

V.1.3 Microenvironnement tumoral 147

V.2 MECANISMES DE RESISTANCE INTRACELLULAIRE 147

V.2.1 Les Mutations de la béta tubuline..... 147

V.2.2 Les isotypes de la béta tubuline 148

V.2.3 Les protéines associées aux microtubules (MAPs) 150

V.2.4 La résistance de type multidrogues (MDR)..... 152

V.2.5 Les protéines impliquées dans l'apoptose 153

VI. CHAPITRE VI : LA MITOSE ET LA RESISTANCE AUX TAXANES 159

VI.1 LA PHASE M, DEROULEMENT ET ACTEURS..... 159

VI.1.1 Le MPF (M-phase Promoting Factor) 159

VI.1.2 Les transitions G2/M et prophase/métaphase :..... 160

VI.1.3 L'APC « Anaphase Promoting Complex » 161

VI.1.4 La transition métaphase/anaphase 161

VI.1.5 La transition anaphase/télophase 162

VI.2 LES POINTS DE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE 162

VI.2.1 Le point de contrôle de la phase G1..... 162

VI.2.2 Le point de contrôle de la transition G2/M 163

VI.2.3 Le point de contrôle du fuseau mitotique « spindle assembly checkpoint » 163

VI.3 LES PROTEINES DE LA PROGRESSION MITOTIQUE ET DES CHECKPOINTS IMPLIQUEES DANS LA RESISTANCE AUX TAXANES 165

VI.3.1 Les protéines de SAC «spindle assembly checkpoint » 165

VI.3.2 Survivine, Aurora kinases A et B 165

VI.3.3 La protéine p53..... 166

RESULTAT 3 : RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA RESISTANCE AU DOCETAXEL DANS LE CANCER DE LA PROSTATE..... 169

RESULTATS PREALABLES 170

ARTICLE 3: LOSS OF THE CELL CYCLE REGULATOR LZTS1 IN DOCETAXEL-RESISTANT PROSTATE CANCER CELLS 177

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES 209

DISCUSSION 212

CONCLUSION GENERALE 217

RÉFERENCES 219

ANNEXES..... 247

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'appareil génital masculin. 11
Figure 2: Les zones anatomiques de la glande prostatique. 12
Figure 3 : Représentation des grades histologiques du cancer de la prostate. 17
Figure 4 : Les différents types cellulaires de la prostate. 19
Figure 5 : Evènements moléculaires impliqués dans la cancérogenèse prostatique. 23
Figure 6 : Acteurs moléculaires impliqués dans le processus métastatique osseux du CaP..... 28
Figure 7: La lignée PC3 et ses dérivées. 39
Figure 8 : La lignée LNCaP et ses dérivés. 41
Figure 9 : Recherche de la présence du gène de fusion TMPRSS2/ERG dans la lignée IGR-CaP1. 117
Figure 10 : Mécanismes de la régulation endocrinienne et localisation de l'effet des hormonothérapies. 126
Figure 11 : Mode d'action des agents anticancéreux cytotoxiques..... 128
Figure 12 : Structure de la tubuline..... 136
Figure 13 : Représentation schématique de la dynamique des microtubules (Mts) au cours de la mitose. 139
Figure 14 : Sortie de la mitose après traitement par docetaxel 142
Figure 15 : Modes de mort cellulaire en réponse aux taxanes..... 144
Figure 16 : Schéma récapitulatif représentant les différents mécanismes de résistances aux taxanes dans le CaP. 145
Figure 17 : Stabilisation des microtubules par la protéine MAPT/tau. 151
Figure 18 : Représentation schématique des deux voies majeures de l'apoptose. 153
Figure 19 : Rôle de la survivine dans le blocage de l'apoptose mitochondriale. 157
Figure 20 : Représentation schématique de l'implication de LZTS1 au cours de la mitose. 168
Figure 21 : Expression des gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux taxanes 171
Figure 22 : Comparaison de l'expression de la β3-tubuline entre les lignées IGR-CaP1-S et R100 avec et sans Dtx 172
Figure 23 : Implication de CHK1 dans le mécanisme de résistance au Dtx..... 209
Figure 24 : Immunomarquage des deux biomarqueurs potentiels LZTS1 et β3-tubuline dans les tumeurs de prostate..... 210
Figure 25 : Courbes de survie globale en fonction de l'expression de LZTS1 ou β3-tubuline 211
Figure 26: Modèle du rôle de LZTS1 dans la résistance au Docetaxel. 214

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Estimation de l'incidence des cancers de 1980 à 2005 en France. 13
Tableau 2 : Gènes de prédisposition au cancer de la prostate. 14
Tableau 3 : Caractéristiques des lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate. 38
Tableau 4 : Lignées cellulaires immortalisées de cancer de la prostate. 45
Tableau 5 : Modèles dérivés des implantations directes des tumeurs du CaP humain. 47
Tableau 6 : Modèles de souris transgéniques de la néoplasie prostatique. 52
Tableau 7 : Modèles précliniques de métastases osseuses 54
Tableau 8 : Mutations retrouvées dans la lignée IGR-CaP1 118
Tableau 9 : Recommandations thérapeutiques selon le stade du cancer de la prostate. 127
Tableau 10 : Classification des agents anticancéreux cytotoxiques. 129
Tableau 11 : Liste des gènes sélectionnés de la signature du transcriptome 173
Tableau 12 : Test de corrélation entre les différents biomarqueurs et la réponse au docetaxel. 210

LISTE DES ABREVIATIONS

5FU: 5-Fluoro-Uracile
a.a : Acide aminé
APC: Anaphase-Promoting Complex
AR: Récepteur d'androgène
BFGF: Basic fibroblast growth factor
BMP: Bone morphogenetic proteins
CAM: Cell-adhesion molecules
CaP : Cancer de la prostate
CCL2 : Chemokine ligand 2
Cdk1: Cyclin dependent kinase 1
Chk1: 1 Kinase Checkpoint
Chk2: 2 Kinase Checkpoints
CXCL12 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CKs: Cytokines
CRPC: Castration resistant prostate cancer
DHT: Dihydrotestostérone
DKK1: Dickkopf-related protein 1
Dtx: Docetaxel
EGF: Epidermal growth factor
ER: Estrogen receptor
FGFR: Fibroblast growth factor receptors
FSH: Hormone Folliculo-Stimulante
GDP: Guanosine DiPhosphate
GTP : La guanosine triphosphate
HAS: Haute autorité de santé
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HGPIN: High-grade prostatic intraepithelial neoplasia
hTERT: Human telomerase reverse transcriptase
IHC: Immunohistochimie
IKK: IKB kinase
IL: Interleukine
kDa: Kilodalton
KLK2: Kallikrein 2
KO: Knock-out
LH: Hormone Lutéïnisante
LHRH: Luteinizing-hormone-releasing hormone
MAP : Microtubule associated proteins
MAP4 : Microtubule-associated protein 4
MC: Mitotic Catastrophe
MDR: Multidrug resistance
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MMP: Matrix Metalloproteinase
MTOC: Microtubule-organizing center

MTs : Microtubules
NF-kB: Nuclear factor-kB
OPG: Ostéoprotégérine
PAP: Phosphatase acide prostatique
PAR1: Protease-Activated Receptors 1
PDGF: Platelet-derived growth factor
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PIN: Prostatic intraepithelial neoplasia
PP1: Protein Phosphatase 1
PP2A: Protein phosphatase 2
PSA: Prostate Specific Antigen
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
PTH: Parathyroïd hormone
RANK: Receptor Activator for Nuclear Factor κ B
RANKL: Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
SAC: Spindle Assembly Checkpoint
SC: Sous-cutané
SCID: Severe combined immunodeficiency
SHH: Sonic Hedgehog
SV40: Simian vacuolating virus 40
TGFβ: Transforming Growth Factor Beta
TNFα: Tumor necrosis factor alpha
TRBP: HIV-1 transactivating response RNA-binding protein
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGFR: vascular endothelial growth factor receptors
Wnt: wingless

ABSTRACT

One of the major hindrances in the study of the biology of prostate cancer is the limited number of laboratory models. Most of these models have been obtained from prostate tumor metastases or have been artificially established *in vitro*.We recently developed one new cell line (IGR-CaP1) derived from patients with clinically localized prostate cancer. In contrast to previously established models from metastases tissues, IGR-CaP1 may be a suitable model to study molecular pathways implicated in the early steps of the oncogenic development of prostate cancer. Furthermore, its high tumorigenic properties and its ability to induce mixed bone lesions, make it as a potential model for both tumor progression and drug assessment in animals.

Docetaxel is the standard treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC) since 2004. In spite of a benefit in survival, drug resistance is often observed. Therefore, it is crucial to identify predictive markers to select patients who will respond to docetaxel.

In order to investigate mechanisms of docetaxel resistance, we derived docetaxel-resistant variants from the IGR-CaP1 human prostate cancer cell line. A microarray genomic analysis comparing chemo-resistant versus sensitive prostate cell lines was used to identify a signature of genes potentially implicated in docetaxel resistance. Among these genes, we focused on LZTS1 wich is underexpressed in IGR-CaP1 resistant variants. LZTS1 is a tumor suppressor that controls the cell cycle by interacting with Cdc25C. Our data suggest that depletion of LZTS1 is potentially involved in the mecanism of docetaxel resistance. Finally, an immunohistochemical analysis will be done on human biopsies from the phase III GETUG12 trial patients. Ultimately, our study could help to improve selection of patients that could benefit from docetaxel chemotherapy.

RESUME

La mise au point de modèles de laboratoire est d'une importance cruciale pour comprendre la biologie du cancer de la prostate, ainsi que pour évaluer les nouveaux traitements. Le développement de tels modèles est particulièrement difficile et reste à ce jour insuffisant car la majorité de ces modèles est d'origine métastatique ou obtenu *in vitro* d'une façon artificielle. C'est pourquoi, nous avons entrepris au laboratoire, l'établissement de nouveaux modèles à partir d'un cancer primaire de prostate tumorale et obtenu la lignée IGR-CaP1. La lignée IGR-CaP1 constitue un modèle adapté pour étudier les étapes précoces de la cancérogenèse prostatique. De plus, sa tumoroginicité et sa capacité à induire des métastases osseuses de nature mixtes ostéoblastiques et ostéolytiques font de ce modèles un outil potentiellement intéressant pour étudier les mécanismes métastatiques et rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

Depuis 2004, le traitement de référence des cancers de la prostate métastatiques hormono-résistants est une chimiothérapie par le Docetaxel. Cependant, malgré le bénéfice de survie obtenu, presque la moitié des patients traités par le Docetaxel développent une résistance à la chimiothérapie. Il est donc urgent d'identifier un biomarqueur prédictif pour sélectionner les patients qui vont bénéficier de cette chimiothérapie afin de contourner cette résistance.

Dans le but d'étudier les mécanismes de résistance au Docetaxel dans le cancer de la prostate, nous avons établi plusieurs clones résistants au Docetaxel à partir de la lignée IGR-CaP1. Ces clones résistants nous ont permis de réaliser une analyse génomique à haut-débit par microarray comparant l'expression génique entre la lignée sensible et les clones résistants et d'identifier une signature de gènes potentiellement impliqués dans la résistance au Docetaxel. Parmi les gènes identifiés, nous nous sommes focalisés sur le gène LZTS1 sous-exprimé dans tous les clones résistants. LZTS1 est un suppresseur de tumeur qui contrôle le cycle cellulaire en interagissant avec la cycline Cdc25C. Nos résultats suggèrent que la déplétion de LZTS1 est potentiellement impliquée dans le mécanisme de résistance au Docetaxel.

La finalité de notre projet est de valider nos résultats par immunohistochimie à partir des prélèvements tumoraux obtenus dans l'essai de phase III GETUG12. Nous espérons que notre étude permettra aux cliniciens de sélectionner les sous-groupes de patients susceptibles de profiter d'un traitement par Docetaxel.

LISTE DES PUBLICATIONS

▪Nader AL NAKOUZI, Olivia BAWA, Alain LE PAPE, Stéphanie LERONDEL, Catherine GAUDIN, Paule OPOLON, Patrick GONIN, Karim FIZAZI, Anne CHAUCHEREAU. ***Bone metastasis of human prostate cancer in the IGR-CaP1 in vivo model*** (Soumis à American Journal of Pathology)

▪Nader AL NAKOUZI, Frédéric COMMO, Catherine GAUDIN, Shanna RAJPAR, Catherine RICHON, Philippe DESSEN, Agnes LAPLANCHE, Philippe VIELH, Karim FIZAZI, Anne CHAUCHEREAU. ***Extinction of the cell cycle regulator LZTS1 confers docetaxel resistance in prostate cancer cells*** (manuscrit en préparation)

▪Anne CHAUCHEREAU, Nader AL NAKOUZI, Catherine GAUDIN, Sylvestre LE MOULEC, Daniel COMPAGNO, Nathalie AUGER, Jean BÉNARD, Paule OPOLON, François ROZET, Pierre VALIDIRE, Gaëlle FROMONT, Karim FIZAZI. ***Stemness markers IGR-CaP1, a new cell line derived from primary epithelial prostate cancer*** (Experimental Cell Research ; 2011)

BREVETS (ANNEXE)

▪ European patent deposition EP 10305361.7 of 08/4/2010
Anne CHAUCHEREAU, Frédéric COMMO and Nader AL NAKOUZI
Methods for predicting or monitoring whether a patient affected by a cancer is responsive to a treatment with a molecule of the taxoid family.

▪ European patent deposition EP 09 305 315.5 du 04/14/2009
Anne CHAUCHEREAU, Karim FIZAZI, Catherine GAUDIN and Nader AL NAKOUZI
Prostate cancer cell lines and their use in screening method

▪ European patent deposition EP 08 305 634.1 n° B767EP00 of 02/10/2008
Anne CHAUCHEREAU and Nader AL NAKOUZI
Methods for predicting or monitoring whether a patient affected by a cancer is responsive to a treatment with a molecule of the taxoid family.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

-AL NAKOUZI N, OPOLON P, BAWA O, LERONDEL S, LEPAPE A, GAUDIN C, MASSARD C, FIZAZI K, CHAUCHEREAU A. ***A novel preclinical model of prostate cancer bone metastasis derived from a human primary tumor. Poster n°1597, AACR meeting, Orlando 2011.***

-AL NAKOUZI N, OPOLON P, BAWA O, LERONDEL S, LEPAPE A, GONIN P, MASSARD C, FIZAZI K, CHAUCHEREAU A. ***Prostate adenocarcinoma and intensive bone remodeling in a new prostate cancer IGR-CaP1 preclinical model derived from a human primary tumor. Abstract, AACR meeting, Washington 2010.***

-Al NAKOUZI N, GAUDIN C, DELBRUEL L, TABARIN F, DESSEN P, COMMO F, MASSARD C, GROSS-GOUPIL M, FIZAZI K, CHAUCHEREAU A. ***Molecular determinants of Docetaxel-resistance in prostate cancer cells. Poster n°2944, AACR meeting, Denver 2009.***

-AL NAKOUZI N , GAUDIN C, FIZAZI K, CHAUCHEREAU A. ***Recherche et identification des protéines impliquées dans le mécanisme de résistance au Docetaxel dans le cancer de la prostate. Prostate Tumeurs, Bulletin of the french Association of Research on Prostate Cancer (ARTP).***

-CHAUCHEREAU A, GAUDIN C, AL NAKOUZI N, OPOLON P, CONNAULT E, AUGER N, GONIN P, LE MOULEC S, MASSARD C, FIZAZI K. ***Identification of cancer stem cell properties in the human cell line IGR-CaP1, established from a localized epithelial prostate cancer. Poster n°2035, AACR meeting, San Diego, 2008.***

-CHAUCHEREAU A, GAUDIN C, AL NAKOUZI N, OPOLON P, CONNAULT E, AUGER N, GONIN P, LE MOULEC S, MASSARD C, FIZAZI K. ***Identification of cancer stem cell properties in the human cell line IGR-CaP1, established from a localized epithelial prostate cancer. The Genitourinary Cancers symposium, Abstract, San Francisco, 2008.***

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

Le thème de recherche de l'unité U981 est l'identification de biomarqueurs prédictifs et de nouvelles stratégies moléculaires en thérapeutique anticancéreuse. Notre équipe s'intéresse plus précisément à l'identification de biomarqueurs prédictifs de la réponse à la chimiothérapie et aux nouvelles thérapies dans le cancer de la prostate CaP.

Le premier objectif de l'équipe est l'obtention de nouveaux modèles précliniques qui soient reproductibles et représentatifs du cancer de la prostate afin de combler le manque de modèles, ce qui est un facteur limitant à l'étude de cette pathologie. Le chapitre II de la revue générale présente les propriétés et les caractéristiques des modèles de CaP existants. Dans ce contexte, j'ai été amené à participer à l'établissement et la caractérisation (*in vitro* et *in vivo*) d'une nouvelle lignée cellulaire de CaP (IGR-CaP1) issue d'un adénocarcinome localisé, lignée que j'ai également utilisée pour établir un modèle préclinique de métastase osseuse de CaP chez la souris nude.

Le docetaxel est le médicament de référence du traitement des cancers de la prostate métastatiques résistants à la castration. Malgré l'efficacité de cette molécule, la majorité des patients développe une résistance au traitement. Les mécanismes de résistance sont complexes, nous verrons dans le chapitre VI que certaines protéines qui jouent un rôle dans la résistance sont impliquées au niveau du cycle cellulaire.
Dans ce contexte, la deuxième partie de mon travail doctoral a porté sur la recherche et l'identification de protéines impliquées dans la résistance au docetaxel qui seront validées par immunohistochimie sur les prélèvements tumoraux d'un essai clinique de phase III mené à l'Institut Gustave Roussy.
Notre but ultime est l'identification d'un marqueur prédictif de réponse ou de résistance au traitement par chimiothérapie qui permettra aux cliniciens de sélectionner les sous-groupes de patients susceptibles de profiter de ce traitement médical.

I. CHAPITRE I: LE CANCER DE LA PROSTATE (CAP)

I.1 LA PROSTATE: STRUCTURE ET FONCTION

La prostate est un organe génital masculin situé à un carrefour stratégique entre la voie urinaire et la voie génitale.

I.1.1 ANATOMIE DE LA GLANDE PROSTATIQUE

La prostate est une glande exocrine située sous la vessie entre la symphyse pubienne et le rectum (Figure 1). C'est une formation musculo-glandulaire qui entoure la partie supérieure de l'urètre sur 3 à 4 cm. De la forme d'une châtaigne, la glande prostatique mesure 3 cm de haut, 4 cm de large et 2 cm de profondeur chez un adulte jeune. Elle pèse 20 à 25 grammes. La prostate excrète directement ses sécrétions dans l'urètre dernier par l'intermédiaire de plusieurs petits canaux.
Les vésicules séminales sont des glandes accessoires appendues à la prostate. La prostate et les vésicules séminales produisent le liquide séminal. Les canaux déférents, qui proviennent des testicules amènent dans la prostate les spermatozoïdes qui sont mélangés au liquide séminal pour former le sperme passant dans l'urètre au moment de l'éjaculation.

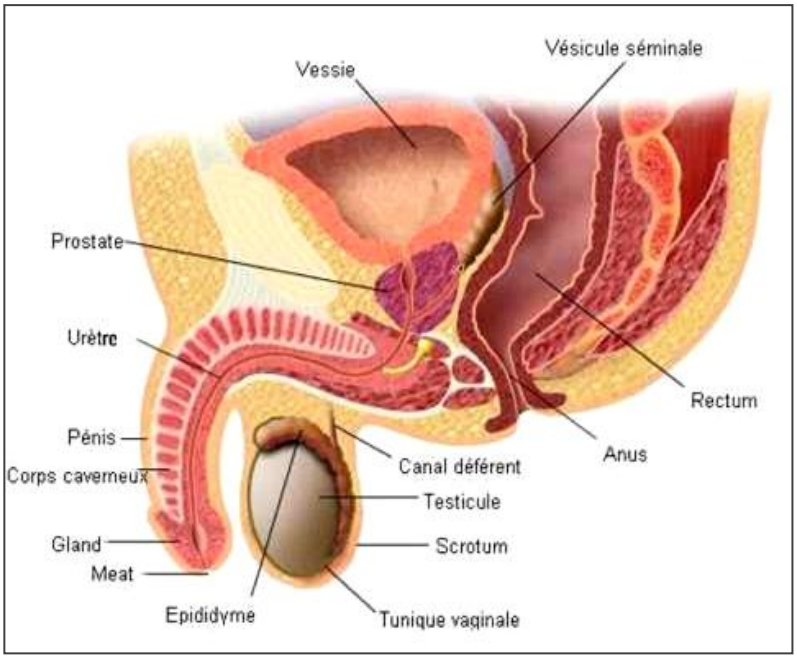


Figure 1 : L'appareil génital masculin.
(Adapté de National Cancer Institute)

Selon le modèle anatomique proposé par Mac Neal en 1988, la prostate est composée de quatre zones différentes, une zone antérieure où le cancer de la prostate ne se développe que très rarement, une zone centrale, siège de 8 % des cancers prostatiques, une zone de transition qui donne naissance à 25 % des adénocarcinomes et surtout une zone périphérique qui elle, est le siège de prédilection de l'adénocarcinome puisqu'il prend naissance dans cette zone dans 67 % des cas (Figure 2). Ces zones différentes ne sont pas des compartiments clos. Les variations histologiques subtiles (aussi bien dans l'architecture glandulaire que dans le tissu conjonctif) expliquent que le cancer puisse se retrouver, à des fréquences différentes, dans les divers lobes.

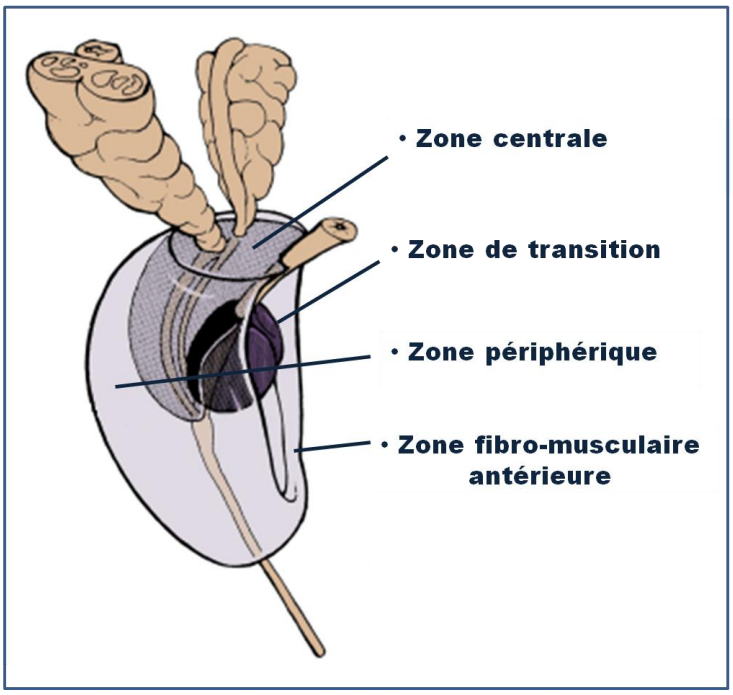


Figure 2: Les zones anatomiques de la glande prostatique.
(Adapté de Mac Neal, 1969)

I.1.2 ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA PROSTATE

La prostate contient de nombreuses petites glandes qui synthétisent environ 20% du sperme. La sécrétion prostatique favorise la traversée de la glaire cervicale et du corps de l'utérus par les spermatozoïdes. Ce fluide est riche en molécules ionisées (citrate, zinc, polyamines, glycoprotéines). On y trouve également des enzymes (PAP, PSA) et des facteurs de croissance (EGF). Enfin, ce fluide protège le spermatozoïde contre de nombreux agents et facteurs cytotoxiques.

I.2 EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DE LA PROSTATE

Le premier cas de cancer de la prostate (CaP) a été décrit chez un homme de 59 ans en 1853 par le docteur J. Adams, un chirurgien du "London Hospital" (1). Actuellement en France, le cancer de la prostate représente indéniablement un problème de santé publique. C'est le cancer le plus fréquent chez l'homme, suivi par le cancer du poumon et le cancer colorectal. C'est aussi la deuxième cause de mortalité par cancer : il représente 10% des décès par cancer (2)(3) (Tableau 1). Du fait de son incidence croissante avec l'âge et du vieillissement de la population, le cancer de la prostate va prendre, dans un avenir proche, une place prépondérante. Le nombre d'hommes de plus de 65 ans devrait être multiplié par quatre dans le monde entre 2000 et 2050 (4).

Cancer	Hommes		Femmes		Total	
	Inc.	Mor.	Inc.	Mor.	Inc.	Mor.
Prostate	**62245**	**9 202**	**-**	**-**	**62245**	**9 202**
Sein	-	-	49814	11 201	49814	11 201
Côlon & Rectum	19913	8901	17500	7964	37413	16865
Poumon	23937	20950	6714	5674	30651	26624

Tableau 1 : Estimation de l'incidence des cancers de 1980 à 2005 en France.
Source: Institut de Veille sanitaire. (Inc. : Incidence ; Mor. : Mortalité)

I.3 LES FACTEURS DE RISQUE

Les facteurs de risque sont principalement liés à l'âge, aux origines ethniques, aux habitudes alimentaires et à des prédispositions génétiques.

L'âge:

L'âge moyen lors du diagnostic était de 67 ans entre 2003 et 2007. Plus de 70% des nouveaux cas sont diagnostiqués après l'âge de 65 ans aux Etats Unis (4). L'incidence augmente régulièrement avec l'âge : le cancer de la prostate est rare avant 45 ans (0,6% des cas), sa fréquence croit progressivement jusqu'à 60-65 ans (39%) puis brutalement après 65 ans (5). Le CaP est par conséquent un problème de santé publique important dans les pays développés où l'espérance de vie est la plus longue.

Les Facteurs ethniques:

Le risque pour les hommes américains d'origine noire-africaine de développer un CaP est supérieur à celui des caucasiens, qui sont, eux-mêmes, plus à risque que les asiatiques. De plus, chez les afro-américains, le cancer se développe à un plus jeune âge. Il est souvent plus agressif et de stade plus avancé au moment du diagnostic (6)(7). En France, on constate une différence entre les départements français : les plus forts taux d'incidence sont observés en Guadeloupe et en Martinique où la population est d'origine noire-africaine (8). L'origine ethnique semble donc jouer un rôle important dans l'apparition du CaP. Un polymorphisme spécifique du gène codant pour la 5 a-réductase de type 2 (SRD5A2 localisé en 2p23) a été mis en évidence dans les populations noires américaines. Cette enzyme transforme la testostérone en dihydro-testostérone (DHT), elle est directement impliquée dans la croissance et la différenciation prostatique androgéno-dépendante. Les métabolites de la DHT ont été observés à des taux plus élevés chez les sujets mélanodermes et caucasiens que chez les asiatiques (9).

Facteur famille et prédisposition génétique :

Environ 10% des cancers de la prostate sont attribués à des causes héréditaires avec un mode de transmission autosomique dominant (10). En effet, le risque de développer un CaP est deux fois plus important lorsqu'il existe deux cas de cancer de la prostate dans la famille (11). Depuis 1996, plusieurs locus de prédisposition ont été identifiés (Tableau 2). Plusieurs variants (single nucleotide polymorphisms, SNP) pour les gènes RNASEL/ HPC1, ELAC2 ou MSR1 ont été associés au risque de cancer de la prostate. Hormis pour MSR1, le petit nombre de mutations observé dans les familles analysées n'a pas permis de définir clairement un gène dont les mutations seraient prédisposantes au CaP héréditaire. Il a été proposé que la prédisposition au CaP pourrait suivre un modèle d'hérédité polygénique (12).

gène	**locus**	**Auteur, année**
HPC1 (*hereditary prostate cancer 1 Gene*)	1q24-25	1996, Smith et al.
PCaP (*predisposing for cancer of the prostate*)	1q42.2-43	1998, Berthon et al.
HPCX	Xq 27-28	1998, Xu et al.
CAPB	1p36	1999, Gibbs et al.
HPC20	20q13	2000, Berry et al.
MSR1	8p22–23	2003, Xu et al.
ELAC2/PC2	17p11	2001, Tavtigian et al.
------	16q23.2	2000, Suarez et al

Tableau 2 : Gènes de prédisposition au cancer de la prostate.
Adapté de Ostrander et al., 2004 **(13)**

Les Facteurs alimentaires:

Il semblerait que l'alimentation influence l'incidence du CaP. Par exemple, le risque de CaP dans les populations japonaises ou chinoises vivants aux Etats-Unis est plus important que dans celles du pays d'origine (14)(15). L'alimentation dans ces pays est riche en soja, poissons, thé vert, qui auraient un rôle protecteur. En outre, la fréquence du CaP au Japon a significativement augmenté depuis que ce pays a adopté les coutumes alimentaires des pays occidentaux (16).

Plusieurs études suggèrent une corrélation entre l'alimentation riche en graisse et l'incidence du CaP (17). Les hommes qui consomment entre 30% et 40% de graisses ont un risque plus important de développer un CaP que ceux qui consomment moins de 30% de graisses (18). Enfin, une étude récente publiée en 2009 montre que la consommation de viandes transformées (charcuteries, bacon, saucisses) augmente le risque de cancer de la prostate (19).

Au contraire, certains antioxydants comme les vitamines E, les lycopènes, le sélénium et le zinc, ainsi que l'anis, auraient un effet protecteur. Une autre étude de Lansky et Kawaii montre un rôle protecteur du jus de grenade dans le cancer de la prostate, celui-ci pourrait induire l'apoptose des cellules tumorales et inhiber la prolifération tumorale *in vitro* (20).

I.4 CARACTERISTIQUES CLINIQUES DU CAP

I.4.1 CONFIRMATION DIAGNOSTIQUE

DIAGNOSTIC CLINIQUE DU CANCER DE LA PROSTATE

a) les symptômes

A un stade précoce, le cancer de la prostate est asymptomatique et sa découverte peut être fortuite. Selon le volume tumoral et l'envahissement, il peut causer des douleurs pelviennes, une dysurie, une hématurie ou hémospermie.

b) le toucher rectal

Le toucher rectal permet au clinicien d'examiner la prostate et de palper sa morphologie, sa taille et sa texture à travers la paroi rectale. Une prostate tumorale a une consistance plus dure que la prostate normale et peut être nodulaire. D'autres causes peuvent néanmoins provoquer l'induration prostatique: calculs prostatiques, prostatite, fibrose post-opératoire, ou bien infarctus prostatique. L'absence d'induration au toucher rectal n'exclut pas la présence d'un cancer.

Le toucher rectal permet aussi de connaître l'extension locale de la tumeur prostatique. Cependant, le taux de détection est inférieur à celui obtenu par le dosage du PSA seul ou avec les modalités combinées. En revanche, il est complémentaire au dosage du PSA sérique et peut augmenter le taux de

détection de cancer de la prostate (21), notamment chez les patients dont le PSA est inférieur à 10ng/ml. Le bilan biologique doit être effectué à distance du toucher rectal pour éviter les faux positifs.

LES MARQUEURS PROSTATIQUES

A ce jour, le marqueur biochimique principal utilisé dans le CaP est l'antigène prostatique spécifique (PSA). Le PSA a été découvert par Wang en 1979. Depuis les années 1980, le PSA est devenu le marqueur sérique le plus utilisé pour le dépistage, le diagnostic et le suivi du cancer de la prostate. Le PSA (KLK3) est une sérine protéase appartenant à la famille des kallikréines, principalement sécrétée par les cellules épithéliales prostatiques. Cette protéine est présente dans le liquide séminal et a pour rôle de cliver des facteurs contenus dans le sperme pour faciliter sa liquéfaction. Elle joue également un rôle dans la carcinogénèse prostatique (22).

Dans des conditions pathologiques telles que l'hypertrophie bénigne ou le cancer de la prostate, une augmentation du taux de PSA dans de sang est observée. Il existe en effet une corrélation entre le taux sérique de PSA et le volume prostatique. Le taux de PSA est difficile à interpréter, il dépend de plusieurs facteurs: le volume de la prostate, la masse tumorale et le degré de différenciation de la prostate. Un faible taux de PSA peut correspondre à une petite prostate saine mais également à une prostate néoplasique très différenciée. Il est admis toutefois que la valeur normale est comprise entre 0 et 4 ng/ml, un taux de PSA compris entre 4 et 10 ng/ml est douteux, une valeur supérieure à 10 ng/ml doit faire suspecter un cancer, une valeur supérieure à 40 ng/ml doit faire suspecter une maladie extra-capsulaire et une valeur supérieure à 100 ng/ml, un cancer métastatique. Le PSA est également un indicateur de la réponse aux traitements. Une bonne réponse aux traitements est représentée par une chute des PSA. Une augmentation de PSA sous traitement est habituellement un signe de progression et peut-être d'une résistance au traitement. La confirmation histologique est indispensable pour établir un diagnostic de certitude.

Les taux des phosphatases acides (PAP) ou des phosphatases alcalines (PAL) ne servent pas au diagnostic mais uniquement au suivi des patients. Les PAL sont un facteur pronostique important dans la maladie métastatique osseuse. Toutefois, les phosphatases alcalines n'augmentent pas toujours en proportion du volume tumoral des métastases osseuses, en particulier quand l'activité ostéoblastique n'est pas prédominante.

LES BIOPSIES PROSTATIQUES

La confirmation du diagnostic ne s'effectue que par biopsies prostatiques, celles-ci permettent de prélever des échantillons de prostate pour qu'ils soient analysés par l'anatomo-pathologiste. Les biopsies doivent être multiples et bilatérales. Elles permettent, notamment, de préciser le caractère

unilatéral ou bilatéral du cancer, le score de Gleason, le pourcentage de cancer sur chaque biopsie et éventuellement de détecter une extension extra-prostatique.

Cependant, seulement trois quarts des cancers sont diagnostiqués à la première série de biopsies. Cette faible sensibilité s'explique par le fait que ces biopsies sont faites à l'aveugle. Le cancer n'est généralement pas visible en échographie. Par conséquent, les prélèvements ne peuvent être concentrés dans la zone suspecte. En cas de doute, une deuxième série de biopsies doit être réalisée.

I.4.2 ANATOMOPATHOLOGIE DU CAP

Le CaP se développe dans 70% des cas au niveau de la zone périphérique de la prostate et plus rarement dans la zone de transition ou la zone centrale (23). En majorité, les cancers de la prostate sont des adénocarcinomes, le plus souvent multifocaux. Le CaP peut envahir les organes de voisinage en commençant par la graisse péri-prostatique puis les vésicules séminales. L'évolution peut être marquée par une dissémination métastatique préférentiellement au niveau ganglionnaire et osseux.

L'examen histologique est fondamental pour poser le diagnostic et établir une classification de la tumeur à visée pronostique qui permet d'adapter sa prise en charge ultérieure. L'évaluation anatomopathologique repose sur le score de Gleason.

Le score de Gleason fait partie des critères pronostiques histologiques et se base sur le degré de différenciation tumorale (24). Il s'évalue en fonction du degré de différenciation des cellules tumorales et de l'index mitotique (activité proliférative de la tumeur). Le score de Gleason de 2 à 10 s'établit en additionnant le grade des deux contingents tumoraux prédominants et les plus agressifs. Il tient compte de l'hétérogénéité tumorale et permet de distinguer cinq groupes histopronostiques. Le grade G1 est le plus différencié, le grade G5 le moins différencié (Figure 3). On distingue 3 groupes selon ce score :

- les tumeurs bien différenciées (G1 et G2) : score 2 à 4
- les tumeurs moyennement différenciées (G3): score 5 à 7
- les tumeurs peu ou pas différenciées (G4 et G5): score 8 à 10

Ce score est nécessaire à la prise en charge thérapeutique car il est en étroite corrélation avec la survie.

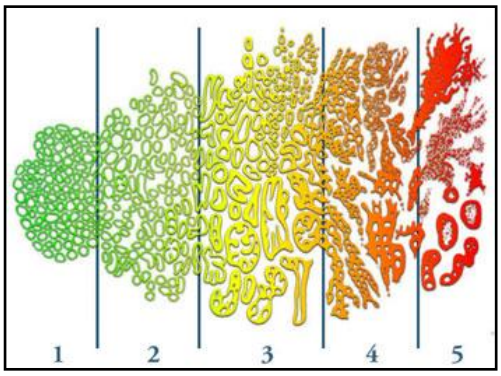


Figure 3 : Représentation des grades histologiques du cancer de la prostate.
(Adapté de : Gleason DF. Urologic Pathology: The Prostate. Lea and Febiger, Philadelphia, 1977)

I.4.3 CLASSIFICATION TNM

Parallèlement à ces grades histologiques, il existe une stadification clinico-radiologique du cancer de la prostate. Cette stadification revêt une importance particulière pour la prise en charge thérapeutique.

La classification TNM est une classification internationale qui évalue l'extension du cancer à partir de trois critères :
-T pour la tumeur primitive et son envahissement local
-N pour la présence de ganglions envahis
-M pour la présence de métastases
Le TNM permet d'évaluer le stade du cancer, son pronostic et de préciser les thérapies adaptées.

Malgré l'utilisation des nouvelles techniques d'exploration radiologique, la classification des cancers de la prostate reste difficile, en particulier au stade localisé, et la stadification est bien souvent sujette à une marge d'erreur.

Dans le cas des cancers à risque intermédiaire ou élevé, un bilan d'extension est réalisé. Il comprend une scintigraphie osseuse, une IRM pelvienne et un scanner abdomino-pelvien.

I.4.4 CLASSIFICATION DE D'AMICO

Ces différents paramètres permettent de classer le cancer de la prostate localisé en 3 groupes cliniques d'évolution différente. La classification de d'Amico utilise en effet le TNM, le score de Gleason et le PSA pour établir des groupes dont le risque de rechute est différent (25):
- Cancer de la prostate localisé à faible risque : PSA< 10 et Gleason < 6 et stade T1c ou T2a
- Cancer de la prostate à risque intermédiaire : PSA entre 10 et 20 ng/ml, Gleason = 7 et stade T2b
- le cancer de la prostate localisé à risque élevé : PSA > 20 ou Gleason > 7 ou stade ≥ T2c. Il suffit d'avoir un seul de ces 3 critères pour appartenir au groupe à haut risque.

I.5 STRUCTURE CELLULAIRE DE LA PROSTATE

Le tissu prostatique est constitué d'un stroma fibromusculaire et d'un épithélium glandulaire séparés par une membrane basale et une matrice extracellulaire. La prostate est séparée des structures adjacentes par une bande de collagène appelée capsule prostatique.

Le stroma fibromusculaire est principalement composé de fibroblastes. Il comprend également des cellules musculaires lisses, des nerfs, des cellules dendritiques et des vaisseaux sanguins.

Le compartiment glandulaire représente 60% du tissu prostatique. Il est formé d'acini composés de trois types cellulaires (Figure 4).

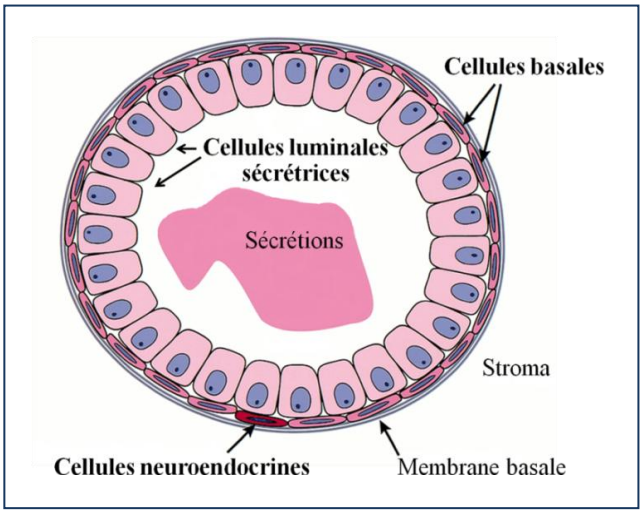


Figure 4 : Les différents types cellulaires de la prostate.
(Adapté de Abate-Shen C et al., 2000)

1. **Les cellules sécrétrices** :

Chez l'adulte, elles sont responsables de la sécrétion du liquide prostatique. Elles sont différenciées, non-prolifératives et bordent la lumière de la glande prostatique (26)(27). Elles expriment les marqueurs cytokératines (CK) 8, CK18, le récepteur des androgènes (AR), ainsi que divers marqueurs de différenciation comme le PSA et la KLK2 (28)(29). Elles nécessitent une exposition continue aux androgènes pour leur survie (30)(31).

2. **Les cellules basales**

Les cellules épithéliales basales, moins nombreuses que les cellules luminales, sont des cellules proliférative androgéno-indépendantes. Elles expriment le marqueur CD44 et les cytokératines (CK) 5 et 14, mais n'expriment pas le PSA.

3. **Les cellules neuroendocrines**.

Peu nombreuses et dispersées entre la couche basale et la couche luminale de la glande, ces cellules ne prolifèrent pas et n'expriment pas le AR. Elles expriment CK5, 14, et 18, ainsi que les marqueurs neuroendocrines comme la chromogranine A, la somatostatine, la neurone spécifique énolase (NSE), et la bombésine. Les cellules neuroendocrines sont issues des cellules souches et agissent de façon paracrine sur la prolifération et la différenciation des cellules environnantes (32).

I.6 LA CANCEROGENESE PROSTATIQUE - ETHIOLOGIE

Les mécanismes responsables de l'initiation et de la progression du cancer de la prostate sont partiellement connus. Il n'existe pas, pour l'instant, de modèle moléculaire qui permette d'expliquer complètement la cancérogénèse prostatique.

Dans la tumorigénèse prostatique, l'inflammation chronique de la prostate suite à des épisodes de prostatites ou de stress chimique et physique, ainsi que la présence de gènes de prédispositions, jouent un rôle dans l'initiation du CaP (33). Par ailleurs, d'autres acteurs de la tumorigénèse prostatique comme l'activation d'oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et de gènes gardiens de l'intégrité du génome jouent aussi un rôle important (Figure 5).

Le rôle de ces différents gènes est abordé dans ce chapitre.

I.6.1 MECANISMES IMPLIQUES DANS LES PHASES INITIALES DU DEVELOPPEMENT TUMORAL

Dans le CaP, il n'existe pas de mutations d'un gène phare à l'origine du processus de l'oncogenèse. On retrouve plutôt des modifications d'expression de gènes qui peuvent expliquer partiellement le processus néoplasique. Récemment découvert, le gène de fusion TMPRSS2-ERG intervient certainement dans le mécanisme mais ne l'explique pas à lui seul.

METHYLATION DE GSTP1

L'hyperméthylation est un événement précoce de la carcinogénèse. En favorisant une hyper condensation de la chromatine, celle-ci bloque l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription et empêche la transcription des gènes cibles (34). GSTpi ou GSTP1, codant pour la glutathion-S-transférase est le premier gène étudié, dont l'expression est réprimée par hyperméthylation dans le cancer de la prostate. L'hyperméthylation des îlots CPG du promoteur GSTP1, est observée dans 90% des adénocarcinomes prostatiques, 70% des néoplasies intra-prostatiques (PIN) de haut grade et

jamais dans l'épithélium normal (35)(36). La glutathion-s-transférase est une protéine impliquée dans le mécanisme de détoxification et dans la protection contre le stress oxydatif. La perte de l'activité de GSTP1 par méthylation augmente le risque de dommages de l'ADN et sensibilise les cellules aux phénomènes de carcinogénèse induits par l'alimentation, les oxydants et par l'inflammation (37)(38). La méthylation de GSTP1 peut être utilisée comme un marqueur de diagnostic du cancer de la prostate (35).

NKX3.1

Les délétions partielles du chromosome 8 sont fréquemment retrouvées dans les cancers de la prostate. La délétion 8p est un évènement précoce de la carcinogénèse prostatique observée au stade PIN (39). Parmi les gènes localisés en 8p, on retrouve le gène NKX3.1, codant pour une protéine *homebox* impliquée dans la morphogénèse des canaux prostatiques et dans la différenciation et l'acquisition des fonctions sécrétoires par les cellules épithéliales prostatiques. La protéine NKX3.1 est normalement exprimée par l'épithélium prostatique normal, et est absente des PIN et des cellules épithéliales tumorales. Les délétions de la région codant pour ce gène sont observées dans près de 85% des adénocarcinomes prostatiques (40). La diminution de l'expression de NKX3.1 dans les stades précoces de la carcinogénèse prostatique induit la sous-expression de gènes eux-mêmes impliqués dans la carcinogénèse prostatique comme PTEN (41).

GENE DE FUSION TMPRSS2-ETS

En 2005, le gène de fusion TMPRSS2-ETS a été découvert par l'équipe de Tomlins. Ce gène de fusion place la séquence codante d'un facteur de transcription de la famille ETS sous le contrôle du récepteur des androgènes par l'association avec la région promotrice du gène TMPRSS2. Le variant le plus fréquemment retrouvé implique 2 gènes situés sur le chromosome 21: TMPRSS2 et ERG. Ce gène de fusion est retrouvé dans environ 70% des adénocarcinomes prostatiques (42). Les gènes de la famille ETS codent pour des facteurs de transcription intervenant dans les voies de signalisation régulant la croissance cellulaire, la différenciation, la réponse au stress et la tumorigénèse (43).

Le gène TMPRSS2 code pour la sérine protéase transmembranaire 2 qui est une protéine multimère à domaine sérine-protéase contrôlée par les androgènes. Elle est fortement exprimée au niveau de la prostate (44) et sa surexpression a été observée dans environ 40% des adénomes prostatiques (45). Le gène TMPRSS2 possède dans ses promoteurs des séquences androgénodépendantes. Sous l'influence d'une stimulation androgénique, l'activation d'ERG par la fusion TMPRSS2-ERG est responsable de la surexpression des facteurs de transcription ETS (46). Il a été proposé que ceci pourrait conduire à une reprogrammation épigénétique, une signalisation de la voie WNT et une répression des voies de l'apoptose (47). Ce phénomène pourrait expliquer l'importance du gène de fusion dans les stades

précoces de la maladie. Cependant, ce gène de fusion n'est pas suffisant pour expliquer l'oncogenèse prostatique.

CELLULES SOUCHES ET CARCINOGENESE

Dans le cancer, les tumeurs se composent d'une grande hétérogénéité cellulaire (morphologique, proliférative et dans l'expression de marqueurs moléculaires). Deux modèles d'oncogenèse ont été proposés pour expliquer cette diversité (48):

Modèle classique :
Toute cellule issue d'un tissu, même si elle est différenciée, peut, à la suite de l'accumulation de mutations dans des gènes oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur, proliférer de façon indéfinie et former un clone tumoral indépendant. Au fur et à mesure de la progression tumorale, le clone le plus agressif et le plus apte à survivre est sélectionné. Dans ce modèle dit classique, il n'existe peu ou pas de hiérarchie entre les différents clones et toutes les cellules peuvent contribuer de manière équivalente à la croissance de la tumeur.

Modèle hiérarchique :
Les cellules souches représentent environ 1% des cellules prostatiques, elles possèdent un potentiel réplicatif illimité. Capables de donner naissance aux différents types de cellules prostatiques, elles peuvent régénérer l'épithélium sécrétoire après un traitement avec des androgènes chez les animaux castrés (26). Bien que les cellules souches soient décrites comme appartenant au compartiment basal, une étude récente montre leur présence dans le compartiment luminal (49). Suite à la dérégulation des voies de signalisation qui contrôlent leur mitose, les cellules souches donnent naissance à des cellules aberrantes mal différenciées : les cellules souches cancéreuses (CSC). Dans ce modèle, les CSC sont les seules à avoir la capacité de proliférer de façon indéfinie et de donner naissance à toutes les autres cellules tumorales. Ces dernières ont un potentiel de prolifération limité. Parmi les altérations responsables de l'apparition des CSC, on peut citer la présence de l'œstrogène et les dérégulations des voies hedghog, ß-catenine et c-Myc.
Actuellement, la méthode expérimentale permettant de définir la présence de CSC dans une tumeur humaine est la transplantation de ces cellules chez la souris immunodéprimée, généralement au niveau du sinus rénal (grand apport en oxygène et en nutriments). Il est alors impératif que la tumeur résultante possède une morphologie similaire à la tumeur originelle, confirmant ainsi la capacité de se différencier vers les différentes lignées cellulaires. Les CSC sont isolées de nouveau à partir de la xénogreffe et retransplantées en série chez d'autres souris pour valider la capacité d'autorenouvellement.

Ces deux théories ne sont pas mutuellement exclusives mais il semble que certains types de tumeurs suivent préférentiellement l'un ou l'autre de ces modèles.

I.6.2 MECANISMES IMPLIQUES DANS L'EVOLUTION DU CAP

L'ensemble des gènes et des mécanismes impliqués dans l'évolution du CaP sont résumés dans la figure 5.

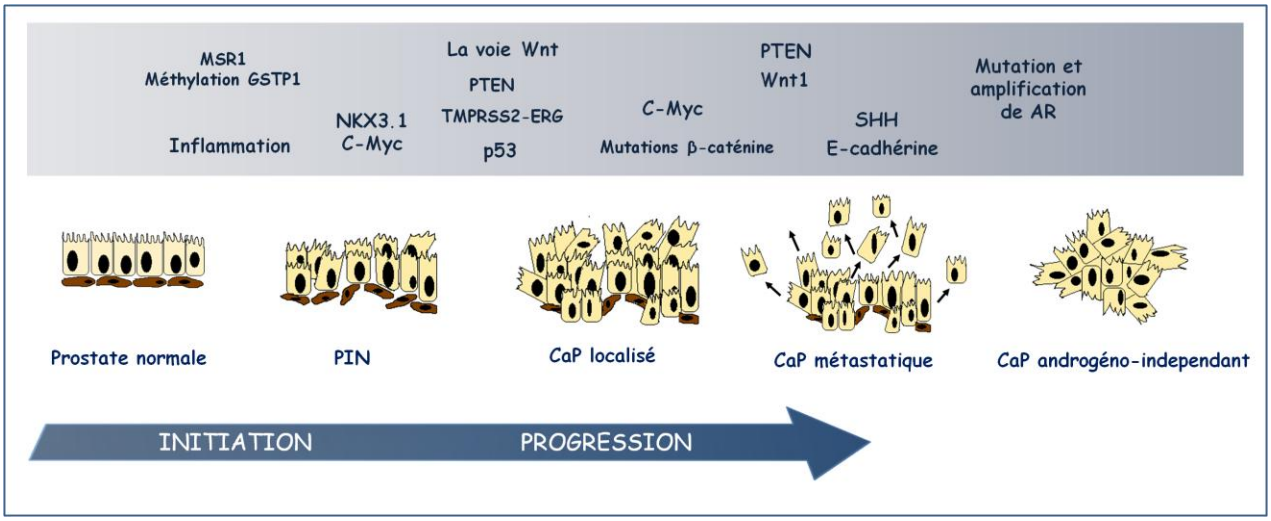


Figure 5 : Evènements moléculaires impliqués dans la cancérogenèse prostatique.
(Adapté de Abate-Shen C et al., 2000)

C-MYC

L'oncogène c-Myc est codé par un gène situé au niveau de la zone q24 du chromosome 8(50), région la plus fréquemment altérée dans les cancers, et particulièrement dans le CaP (51). La protéine c-Myc joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire en activant ou réprimant de nombreux gènes. En réponse aux signaux du micro-environnement cellulaire, c-Myc peut réguler un large spectre d'activités biologiques distinctes, telles que le cycle cellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose, l'instabilité génomique, ou encore l'angiogénèse. C-Myc est clairement un oncogène qui participe à la transformation cellulaire et par conséquent au processus de tumorigenèse.

Plusieurs mécanismes aboutissant à la dérégulation de c-Myc ont été observés. Ces mécanismes impliquent la translocation, l'amplification du gène ou des modifications du locus du gène. Dans le cancer de la prostate, 8 variants génétiques du locus 8q24 situé juste à côté du gène c-myc, sont fréquemment retrouvés dans la population et sont associés à un risque élevé de CaP, suggérant une implication de c-Myc dans la cancérogenèse prostatique (52). De plus, il a été montré que l'amplification de c-Myc est corrélée avec la progression tumorale, le grade et un mauvais pronostic du CaP (53) (54). Une autre étude a montré que l'amplification du gène c-Myc est associée à un haut pouvoir métastatique des lésions (51).

PTEN

PTEN (phosphatase and tensin homolog) est un gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 10 (q23.31). Il code pour une enzyme, une phosphatase antagoniste de PI3K. L'effet suppresseur et modérateur du cycle cellulaire de PTEN est lié à la régulation négative exercée sur la voie de signalisation de la phospho-inositol-3-kinase-AKT (PI3-kinase-AKT). En effet, l'activation de la voie AKT entraine une rétention cytoplasmique de p27 Kip1 et une augmentation de la prolifération tumorale par inhibition de l'apoptose (55)(56). PTEN intervient également dans le maintien du cytosquelette et la migration cellulaire (57). L'inactivation de PTEN est fréquente au cours du carcinome prostatique. Elle résulte le plus souvent de délétions (58), moins fréquemment de mutations (59) ou de phénomènes transcriptionnels (60). La perte de PTEN semble corrélée au stade tumoral, et a été observée dans plus de la moitié des formesde CaP métastatiques (56)(61). D'autres travaux montrent que la perte de PTEN pourrait également être impliquée dans les stades précoces du CaP (62). Combinée à la perte de NKX3.1, la perte d'expression de PTEN est associée à une plus mauvaise évolution des carcinomes prostatiques par rapport à la seule perte de PTEN (41)(63).

LA VOIE WNT/β-CATENINE

La β-caténine est une protéine de 92 kDa, initialement décrite comme faisant partie intégrante du système d'adhésion intercellulaire. Aujourd'hui, elle est considérée comme une oncoprotéine susceptible d'activer la prolifération et d'inhiber l'apoptose. Il a été montré que ce phénomène est, en outre, lié à son intervention dans la voie de Wnt qui est activée de façon aberrante dans plusieurs types de cancers en particulier le cancer du colon (64).

Le rôle de la voie Wnt/β-caténine dans le cancer de la prostate n'a pas encore été clairement élucidé (65). Cependant, il a été rapporté que la surexpression d'un certain nombre de ligands et de récepteurs de cette voie, notamment les protéines Wnt1, Wnt5a, Wnt11, WIF1, correspond à un événement précoce de la carcinogenèse prostatique. Dans le CaP, contrairement au cancer du colon, il n'existe pas de mutation au niveau du gène APC. Par contre, des mutations de la β-caténine ont été retrouvées avec une faible fréquence. Il a été montré que l'existence de ces mutations est responsable de l'apparition des lésions HGPIN chez l'animal (66) (67). La délocalisation de la β-caténine est corrélée au score de Gleason chez l'homme (68). L'expression de la β-caténine et du ligand Wnt-1, augmente avec le phénotype invasif des tumeurs (69). Les résultats obtenus montrent que l'activation de cette voie de signalisation entrainerait la surexpression de mitogènes tels que c-myc, c-ret, Cox2, cyclin-D1(70). Il existe aussi des interactions entre la voie Wnt/β-caténine et la voie de signalisation du AR ce qui

suggère que la voie Wnt/β-caténine pourrait être impliquée dans les mécanismes de résistance à la castration (68).

LA VOIE HEDGEHOG

La voie SHH (sonic hedgehog) joue un rôle fondamental au cours du développement embryonnaire. Son implication dans la cancérogenèse a été démontrée ces dernières années. La voie de signalisation SHH est dérégulée dans plusieurs types de cancer. Elle participe à la transformation maligne de différents types cellulaires, soit par mutation de certains de ses composants, soit par son activation aberrante. La surexpression du ligand SHH entraîne, *in vitro*, une activation du facteur de transcription GLI1 résultant en une surexpression de cycline D1 et c-Myc, participant ainsi au maintien de la croissance cellulaire (71). La surexpression des composants de la voie de signalisation hedgehog a été montrée dans des formes agressives et métastatiques du carcinome prostatique. Le blocage de la voie hedghog dans des xénogreffes de CaP chez la souris aboutit à une régression de la tumeur (72).

LES ANDROGENES

La testostérone est le principal androgène circulant. Elle est produite de façon quasi-exclusive (plus de 95%) par les cellules de Leydig du testicule, situées autour et entre les tubes séminifères de la glande prostatique (73). D'autres androgènes, dits "androgènes surrénaliens", sont également synthétisés en faible quantité par la glande surrénale. Le précurseur principal des androgènes est le cholestérol mais les androgènes peuvent également être synthétisés par les cellules de Leydig à partir de l'acétate.

Les androgènes jouent un rôle crucial dans le développement et l'homéostasie de la prostate chez l'homme. Dans les cellules prostatiques, le métabolite le plus actif des androgènes est la dihydrotestostérone qui résulte de la transformation de la testostérone par les 5α-réductases. La DHT se lie avec une grande affinité au récepteur d'androgènes et le complexe DHT-AR active la transcription des gènes cibles. Il en résulte l'activation d'une série de gènes. Les androgènes tiennent une place prépondérante dans le développement et la croissance du cancer de la prostate. Les androgènes sont impliqués dans le contrôle de trois processus : l'induction de la prolifération des cellules basales, l'inhibition de la prolifération cellulaire quand la prostate a atteint sa taille maximale et l'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales (74).

Dans la prostate normale, les AR sont exprimés par les cellules sécrétrices de l'épithélium et par les cellules musculaires lisses du stroma. Dans le CaP, le AR est exprimé par la majorité des cellules dans le cas des tumeurs bien différenciées (75). Contrairement aux cellules épithéliales de la prostate normale, la croissance androgéno-dépendante des tumeurs prostatiques ne dépend plus des molécules médiatrices, les andromédines, secrétées par les cellules stromales, mais de l'activation directe du AR

des cellules cancéreuses par les androgènes (76)(77). Les cellules cancéreuses prostatiques semblent moins dépendre des androgènes pour leur survie (78). Dans les modèles animaux de carcinogenèse prostatique, la présence d'androgènes est requise pour que le cancer puisse se développer (79). Différents polymorphismes du AR, ou de gènes impliqués dans le métabolisme des androgènes, ont été associés au risque de survenue du cancer de la prostate (80).

Les hommes castrés et les individus déficients en 5α-réductase ne développent pas de lésion cancéreuse prostatique (81). Néanmoins, aucun lien n'a été établi entre des concentrations sériques élevées en testostérone et DHT et le risque de survenue du cancer prostatique (82).

Androgénorésistance

Le récepteur des androgènes est amplifié d'une façon hétérogène au sein d'une même tumeur dans 20 à 30% des CaP (83). L'amplification du gène codant pour les récepteurs des androgènes suggère que la protéine est surexprimée (84)(85). Cette surexpression n'est pas indispensable, ni suffisante, à l'apparition d'une androgéno-indépendance (86). Ces résultats suggèrent l'existence d'autres mécanismes responsables de l'androgénorésistance. Plusieurs hypothèses ont déjà été décrites pour expliquer l'androgénorésistance :

A. L'augmentation de la synthèse de testostérone à partir des stéroïdes surrénaliens (87).
B. Des mutations au niveau du gène codant pour les récepteurs des androgènes.
   Ces mutations ont été décrites dans 10 à 50% de Cap androgéno-indépendants et sont dues à la pression de sélection exercée par l'environnement sur les cellules tumorales notamment par la thérapie anti-tumorale (88). Ces mutations peuvent avoir comme conséquence l'élargissement du spectre de la spécificité du récepteur des androgènes vis-à-vis d'autres stéroïdes endogènes et exogènes comme le cortisol (89), les œstrogènes ou les progestatifs (90). Les mutations peuvent également provoquer l'activation du AR par les molécules anti-androgéniques périphériques ou encore l'activation constitutive du AR indépendamment de la fixation du ligand (70)(70)(69). L'existence de ces mutations avant la mise en place d'une thérapie anti-androgénique est un facteur de risque de développement d'une tumeur agressive (70).
C. La surexpression d'un certains nombre de co-activateurs des récepteurs des androgènes au niveau de la formation du complexe transcriptionel rendant ces derniers sensibles à de plus faibles concentrations d'androgènes (78)(91).
D. La perturbation des différentes voies accessoires d'activation des récepteurs des androgènes telles que les voies EGF, Her2 et MAP Kinase, IL6, AKT (70).
E. L'activation de la voie Wnt/β-Catenine. En effet, la β-Catenine se lie au AR et agit comme un co-facteur, amplifiant la transcription ou élargissant sa sensibilité à des ligands non conventionnels (92).

Il a été montré qu'en absence d'androgènes ou de leurs récepteurs, plusieurs voies de signalisation sont perturbées, comme les altérations des gènes suppresseurs de tumeurs p53 ou Rb par exemple, ainsi qu'une inhibition de l'apoptose impliquant la protéine Bcl2 (93).

LA PROTEINE P53

La protéine p53 est un suppresseur de tumeur (94) fréquemment muté dans les cancers humains en général, et dans le cancer de la prostate, en particulier. La fréquence des mutations P53 dans le CaP est variable entre les différentes études (3%-42%). Elles sont rares dans les stades primaires et plus fréquentes dans les stades avancés, androgéno indépendants et dans les CaP métastatiques (95). Le rôle physiologique de la P53 est de garantir le maintient de l'intégrité du génome lors de la synthèse d'ADN. L'augmentation de la synthèse de p53 en réponse à un stress cytotoxique entraine le blocage du cycle cellulaire et provoque l'apoptose (96).

Dans le CaP, les mutations de la séquence codante de p53 entrainent un dysfonctionnement de l'apoptose et favorisent l'accumulation de cellules tumorales ayant des anomalies génétiques susceptibles d'entraîner une prolifération androgéno-indépendante. En revanche, l'accumulation de la protéine P53 au niveau des métastases dans la moelle osseuse n'est pas corrélée avec la reprise tumorale, ni avec la survie (97).

MOLECULE D'ADHESION CELLULAIRE

Les molécules E-cadhérine et β-caténine assurent l'adhésion intercellulaire. La perte de cette adhésion favorise la migration des cellules tumorales avec l'invasion locale puis leur dissémination par voie hématogène et la progression vers des sites métastatiques.

Dans le cancer de la prostate, la perte d'expression de l'E-cadhérine influence la propagation des métastases en provoquant le détachement de la cellule pro-métastatique de la tumeur primitive et en augmentant la mobilité cellulaire (98). La perte d'expression de l'E-cadhérine est corrélée aux tumeurs peu différenciées et à un phénotype invasif. De façon paradoxale, une surexpression d'E-cadhérine a été observée dans les formes métastatiques. Ceci suggère que son expression pourrait être diminuée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation au cours des mécanismes de migration, puis être rétablie au niveau du site métastatique (99)(100).

La ß-caténine est une molécule d'adhésion cellulaire qui se lie à l'E-cadhérine par son domaine intracytoplasmique. L'expression anormale de la ß-caténine dans les tumeurs de la prostate est associée à un mauvais pronostic. Elle est aussi connue comme étant une oncoprotéine capable, après un passage intranucléaire, d'activer la prolifération cellulaire et d'inhiber l'apoptose (101).

I.6.3 PROCESSUS METASTATIQUE

Dans le CaP, les sites métastatiques les plus fréquents sont ganglionnaires et osseux. Les métastases osseuses représentent plus de 90 % des métastases à distance. Des métastases ont été également retrouvées dans les poumons, le foie et les glandes surrénales, de manière régulière mais très peu fréquente. D'autres localisations sont beaucoup plus rares et font l'objet de publications sous forme de cas cliniques, comme par exemple les métastases cérébrales (102).

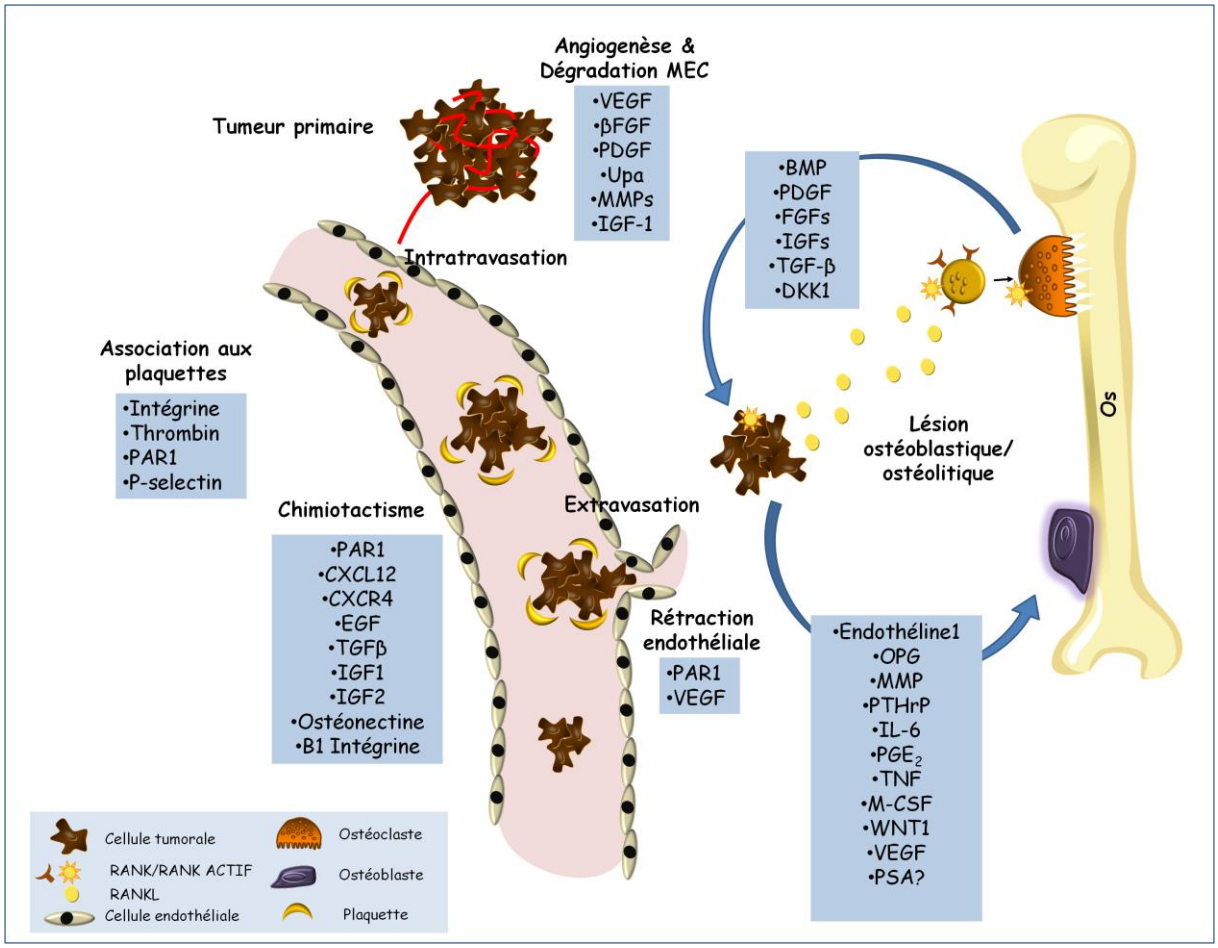


Figure 6 : Acteurs moléculaires impliqués dans le processus métastatique osseux du CaP.
Adapté de (Roodman GD, et al., 2004 - Morrissey C, Vessella RL, 2007)

Les métastases osseuses sont détectées approximativement chez 70% des patients qui meurent d'un CaP. Les métastases osseuses correspondent à un stade avancé de CaP, elles sont incurables et responsables de la mortalité due au CaP (103). Leur apparition affecte le pronostic vital et détériore la qualité de la vie du fait des complications provoquées comme les douleurs, les fractures, les compressions médullaires ou les anémies, etc …

Les sites métastatiques osseux préférentiels du CaP sont les os du bassin, les vertèbres et le sternum. Il existe deux catégories de métastases osseuses : les métastases ostéoblastiques et ostéolytiques. Les métastases ostéoblastiques sont caractérisées par une augmentation de l'activité des ostéoblastes, ce qui

entraine une augmentation de la densité osseuse. Dans le cas des lésions ostéolytiques, l'augmentation de l'activité des ostéoclastes entraine la résorption de l'os. Contrairement à ce que l'on observe dans le cancer du sein où les métastases sont majoritairement ostéolytiques, les métastases du CaP sont le plus souvent ostéoblastiques ou mixtes.

La formation de métastases osseuses associe des mécanismes communs à toute dissémination métastatique (chimiotactisme, invasion tumorale) et des mécanismes spécifiques au tissu osseux (adressage des cellules tumorales à l'os, stimulation de la résorption ou de la formation osseuse).
La dissémination métastatique est un processus complexe multi-étapes constitué d'une suite d'événements et d'interactions entre la cellule tumorale et son environnement. Toutes les cellules tumorales ne possèdent pas la capacité de métastaser. Seules 1 à 2% des cellules qui se détachent de la tumeur primaire possèdent le potentiel de survivre et de se nicher dans d'autres organes. Les étapes précoces du processus métastatique à l'os nécessitent le développement d'un réseau vasculaire autour de la tumeur, la perte des propriétés d'adhésion et l'acquisition de propriétés invasives. Quand les cellules tumorales passent dans la circulation sanguine, l'installation sélective dans l'os nécessite un chimiotactisme spécifique du microenvironnement osseux, une adhérence sélective au niveau de la moelle osseuse, l'expression de facteurs de croissance et une matrice extracellulaire (MEC) appropriée (104). Ces interactions entre la moelle osseuse et les cellules cancéreuses ont été évoquées pour la première fois par Paget qui a décrit la théorie de la bonne graine et de la bonne terre (105).

A. MECANISME D'INTRAVASATION

Lorsque la tumeur primaire atteint une taille de 1 mm de diamètre, ses besoins en oxygène et nutriments augmentent, ce qui entraine l'établissement d'un environnement pro-angiogénique et le développement de nouveaux vaisseaux pour assurer ses besoins en oxygène et en nutriments. Pour créer cet environnement angiogénique, les cellules tumorales vont synthétiser et produire des facteurs de croissance participant à l'élaboration des néo-vaisseaux tels que le VEGF, le bFGF ou le PDGF et modifier l'expression des récepteurs membranaires FGFR et VEGFR à leur surface (106). De plus, les cellules métastatiques produisent différentes métalloprotéases (MMP) qui vont favoriser l'invasion en induisant la dégradation de la MEC.

Pour pouvoir quitter la tumeur primaire, les cellules tumorales perdent leurs propriétés d'adhésion. Elles perdent l'expression des CAM (*Cell Adhesion Molecule)* impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et cellules-MEC comme les cadhérines. Ceci augmente leurs capacités invasives et métastastatiques. Dans les lignées cellulaires obtenues à partir de métastases de CaP comme les cellules C4-2, LNCaP et PC3, on observe une perte de la E-cadhérine (107). Après la perte des propriétés d'adhésion, les cellules envahissent et dégradent le stroma prostatique pour accéder aux vaisseaux.

Par ailleurs, l'hypoxie est un facteur majeur favorisant le processus métastatique. Des études ont montré que l'hypoxie des cellules tumorales prostatiques conduisait à une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la migration et l'invasion tumorale comme les MMPs ainsi que dans l'inhibition des molécules d'adhésion (E-cadhérine) (108).

B. DISSEMINATION DES CELLULES TUMORALES DANS LA CIRCULATION

Le développement du réseau vasculaire, la perte d'adhésion et la dégradation du stroma permettent l'intravasion tumorale et la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme.

Dans le cas du cancer de la prostate, le réseau vasculaire et le réseau lymphatique sont responsables de la dissémination tumorale. L'entrée dans le système lymphatique amène, en premier lieu, les cellules au niveau des noeuds lymphatiques, ce qui favorise l'apparition de métastases ganglionnaires. Dans le réseau vasculaire, les facteurs physiques et mécaniques favorisent l'envahissement des os. D'une part, les cellules pénètrent directement dans un plexus vasculaire qui irrigue en premier lieu les vertèbres et le bassin, ce qui les amène, de manière privilégiée, au niveau des os, d'autre part, les cellules tumorales dont le diamètre est de 20 µm ou plus, sont piégées au niveau des très fins capillaires du réseau vasculaire osseux (diamètre de 3 à 8 µm seulement), ce qui ralentit leur circulation et les amène à se nicher (109).

Dans la circulation sanguine, les cellules cancéreuses doivent échapper au système immunitaire et aux contraintes mécaniques du flux sanguin. Les cellules semblent être véhiculées dans le sang par un bouchon de fibrine et sont associées aux autres cellules cancéreuses et aux plaquettes via les intégrines. L'activation de PAR1 (protease activated receptor 1) au niveau des cellules circulantes induit l'augmentation de la mobilité des cellules tumorales et la régulation positive des intégrines. Ceci permet l'adhésion des cellules tumorales entre elles ainsi qu'avec les plaquettes pour se protéger du stress mécanique de la circulation (110).

Dans le même temps, les cellules cancéreuses sont soumises à des facteurs chimio-attractants qui les font préférentiellement métastaser dans l'os. Ce processus appelé chimiotactisme a été confirmé *in vivo* chez la souris SCID préalablement greffée avec de l'os humain (111). En effet, le micro-environnement osseux relargue un grand nombre de molécules dont le pouvoir chimio-attractant sur les cellules cancéreuses a été montré *in vitro*.

Il existe une classe de molécules appelées chimiokines, qui, par interaction avec leurs récepteurs couplés à une protéine G, entraîne un réarrangement du cytosquelette et une migration directionnelle. Parmi ces chimokines, CXCL12 (SDF1) et son récepteur CXCR4 ont un rôle prépondérant. D'autres molécules ont un pouvoir chimio-attractant potentiel comme l'EGF, le TGFβ, l'IGF-I, l'IGF-II et l'ostéonectine (112)(113).

Par ailleurs, la résorption osseuse favorise le chimiotactisme vers l'os et l'adhésion des cellules tumorales. Le calcium extra-cellulaire secrété participe au processus métastatique. Il est présent, à des

concentrations élevées, dans l'espace extra-cellulaire, lors du processus de résorption. Le récepteur de calcium CaSR, exprimé dans les tissus sains, est surexprimé dans les tissus tumoraux de prostate. Dans les lignées cellulaires C4-2 et PC3 qui possèdent un fort pouvoir métastatique, le calcium extra-cellulaire stimule la prolifération alors qu'il est sans effet sur la lignée LNCaP incapable de métastaser dans l'os (114).

C. MECANISME D'EXTRAVASATION

Les cellules tumorales circulantes interagissent en premier lieu avec l'endothélium vasculaire de l'organe puis avec la MEC. Les molécules d'adhésion cellulaires CAM exprimées au niveau des cellules tumorales et endothéliales sont responsables de cette interaction. Dans le cas du cancer de la prostate, plusieurs études *in vitro* montrent que les cellules PC3 adhèrent préférentiellement aux cellules de l'endothélium médullaire plutôt qu'à celles de l'endothélium de la veine ombilicale, de l'aorte ou encore de l'endothélium du derme (115)(116). Cette interaction est renforcée en présence d'une matrice extra cellulaire osseuse. Une fois que les cellules sont fixées au niveau de l'endothelium vasculaire, grâce aux lectines et aux intégrines, elles traversent l'endothélium et accèdent au micro-environnement osseux. Ce mécanisme, appelé extravasation, n'est pas encore bien élucidé.

Après l'extravasation, les cellules malignes pénètrent dans l'os et vont devoir interagir avec leur nouvel environnement pour aboutir à la formation d'une métastase. Les interactions avec le micro-environnement osseux vont, d'une part, favoriser leur survie et leur prolifération, d'autre part, altèrer l'homéostasie osseuse en sécrétant des facteurs qui affectent la fonction des ostéoblastes, des ostéoclastes, de la matrice osseuse et le micro-environnement (117).

Les cellules tumorales sont capables de produire et de sécréter des protéines de la matrice comme l'ostéopontine, l'ostéocalcine, l'ostéonectine ou encore la sialo-protéine osseuse qui ont des effets ostéomimétiques et qui peuvent contribuer à la formation de l'os (118)(119). Les cellules tumorales prostatiques produisent également des facteurs ostéoblastiques et ostéoclastiques. Les carcinomes prostatiques sont les principales tumeurs engendrant des lésions osseuses ostéoblastiques. Ces lésions condensantes, bien que dominantes, sont retrouvées conjointement à des lésions ostéolytiques. Les métastases formées dans l'os spongieux résultent d'une résorption préalable de l'os.

D. LE PHENOTYPE OSTEOCONDENSANT

Le phénomène ostéocondensant correspond à une augmentation de remodelage osseux et à un déséquilibre de celui-ci en faveur d'une production osseuse. L'os produit en excès est intrinsèquement pathologique et composé de collagène mal organisé. Le tissu osseux est alors fragile et sujet aux

fractures. Les mécanismes moléculaires du phénotype ostéo-condensant font l'objet de nombreuses études et ne sont pas encore totalement connus. Cependant, un certain nombre de molécules produites par les cellules de CaP susceptibles d'agir sur le processus osseux et sur les ostéoblastes a été identifié.

L'Endothéline-1 (ET-1)

L'endothéline appartient à la famille des endothélines qui comprend aussi ET-2 et ET-3. Les études de knock-out ont montré le rôle prépondérant d'ET-1 dans la formation osseuse puisque des souris KO présentent une hypoplasie des os de la face. L'ET-1 a été impliquée dans la formation des métastases ostéoblastiques du cancer de la prostate chez l'homme et chez la souris (120)(121). *In vitro*, l'ET-1 stimule la formation osseuse et la prolifération des ostéoblastes. *In vivo*, le traitement par un antagoniste du récepteur de l'endothéline ET_A-R diminue la formation ostéoblastique et la prolifération tumorale chez l'animal (122). Le taux sérique d'ET-1 est élevé chez les patients atteints de cancer de prostate métastatique avec des lésions ostéoblastiques (123).

TGF-β, IGF et BMPs.

Plusieurs membres de la famille du TGF-β sont des stimulants puissants de la formation osseuse. Le TGF-β2 est exprimé à des niveaux élevés par les cellules PC-3. Il stimule la prolifération des ostéoblastes *in vitro* aussi bien que la formation osseuse *in vivo*. Les IGFs sont aussi impliqués dans la formation des métastases ostéoblastiques. Les cellules du CaP expriment l'IGF-2 et les FGF-1 et 2; ces deux derniers stimulent la formation osseuse *in vivo* (121). Le PDGF est lui aussi impliqué dans les métastases osseuses ostéoblastiques, il stimule les fonctions ostéoblastiques et ostéoclastiques. L'expression des facteurs de croissance TGF-β, IGF, FGF, PDGF et leurs interactions avec leurs récepteurs peuvent être potentialisés par l'ET-1 qui est un médiateur central des métastases ostéoblastiques (120).

Les BMPs (bone morphogenetic proteins) appartiennent à la famille du TGF-β. Les BMP 2, 4 et 6 sont exprimées par les cellules de cancer prostatique (124). Elles stimulent la différenciation des ostéoblastes à travers l'activation de facteurs de transcription, en particulier Runx-2 (125). Une augmentation de l'expression de BMPs chez les patients ayant un cancer de la prostate est corrélée avec un taux de récurrence augmenté et un taux de survie diminué. Les BMPs jouent un rôle important dans la survie et la croissance des cellules cancéreuses et des ostéoblastes (126).

La voie WNT (Wingless)

Les cellules de cancer prostatique sécrètent de nombreux ligands de la famille Wnt. Une activation de la voie Wnt a été mise en évidence dans les ostéoblastes de patients ayant des lésions osseuses ostéoblastiques. Une surexpression de Wnt1 a été mise en évidence dans les cellules tumorales issues de carcinome prostatique métastatique (69). Dans les étapes précoces de la métastase médullaire, les cellules cancéreuses expriment Dkk1 (Dickkopf 1) qui est un inhibiteur extra-cellulaire de la voie Wnt.

L'expression de Dkk1 bloque l'activité ostéoblastique et favorise un phénotype ostéolytique. A un stade métastatique plus avancé, l'expression de Dkk1 diminue, permettant l'action ostéoblastique de Wnt (127).

Les protéases

Une des caractéristiques des cellules de cancer prostatique est leur capacité de synthétiser des protéases comme le PSA (prostate specific antigen) et l'uPA (urinary plasminogen activator).

Le PSA (KLK3) est une sérine-protéase de la famille des kallikréines produite par la prostate. La mesure du PSA sert de biomarqueur sérique de CaP. Chez les patients atteints de métastases osseuses, il existe une corrélation inverse entre le taux de PSA sérique et le caractère lytique des métastases. Le PSA peut dégrader des composants de la MEC comme la fibronectine et la laminine et réguler par clivage plusieurs protéines impliquées dans le processus métastatique. Il peut cliver la PTHrP et la rendre inactive induisant une réduction des taux actifs de PTHrP (Parathyroid-Hormone-Related protein) dans le micro-environnement et de l'ostéoclastogénèse (128)(129). Le PSA modère ainsi la résorption osseuse.

L'uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) est produit par les cellules tumorales prostatiques. C'est un facteur de croissance spécifique des ostéoblastes impliqué dans l'invasion tumorale et qui favorise l'activité ostéoblastique. Son expression est augmentée au niveau métastatique et corrélée à l'agressivité tumorale. L'uPA est sur-exprimé dans les lignées de CaP hautement métastatiques PC-3 et C4-2 par rapport à la lignée LNCaP faiblement métastatique (130)(131). La liaison de l'uPA à son récepteur (uPA-R) exprimé par les cellules tumorales permet l'initiation de la dégradation de la MEC par les cellules malignes. Il a été montré que l'uPA est sécrété par les cellules PC3 et qu'il possède des propriétés mitogéniques sur l'ostéoblaste (132). Il a également été montré chez le rat que l'expression de l'uPA augmente le nombre de métastases osseuses et que l'inhibition de son expression dans des cellules tumorales prostatiques inhibe de 75% le nombre de métastases formées (133).

L'uPA et le PSA peuvent aussi activer des protéines ostéogéniques issues de la matrice osseuse comme le TGF-β ou l'IGF-1 et 2, par clivage de leurs protéines transportrices comme l'IGF-BP (IGF-binding protein). La libération d'IGF actif augmente l'activité mitotique des ostéoblastes et le TGF-β stimule la formation osseuse (123).

E. LE PHENOTYPE OSTEOLYTIQUE

La métastase ostéolytique est la forme la plus courante de métastases osseuses chez les patients atteints de cancer. Les métastases ostéolytiques sont fréquemment retrouvées dans les cancers du sein mais aussi dans le cancer de la thyroïde, du poumon et du rein. Dans le CaP, il s'agit plutôt, comme nous l'avons décrit auparavant, de lésions mixtes alliant la production et la destruction de l'os. L'ostéolyse résulte de l'activité des ostéoclastes et non des cellules tumorales elles-mêmes. En revanche, en secrétant un grand nombre de cytokines et de molécules pro-ostéolytiques, les cellules tumorales interviennent sur l'ostéoclastogénèse par action directe sur les précurseurs ostéoclastiques, ou indirectement, par l'intermédiaire des ostéoblastes. La résorption osseuse induite entraîne alors la libération de facteurs de croissance de la matrice osseuse, stimulant ainsi les cellules tumorales. Carlin et Zhang ont montré que l'ostéolyse peut être une condition nécessaire à l'ostéocondensation, étant donné que la production d'os observée dans les métastases osseuses ostéocondensantes se produit au niveau d'un site de résorption osseuse. L'ostéolyse est un processus complexe dont l'acteur principal est le système RANKL/RANK/OPG.

Le RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) et l'OPG (ostéoprotégérine)

Le RANK Ligand est une protéine membranaire des ostéoblastes, dont une partie est sécrétée après clivage protéolitique. Ce facteur fait partie de la famille du TNF-α, il est produit par les cellules stromales en réponse à de nombreux stimuli mais également par de nombreux autres types cellulaires (les lymphocytes B, les lymphocytes-T activés, les cellules stromales de la moelle osseuses et les cellules endothéliales). Le RANKL est capable de se fixer sur son récepteur RANK situé sur la membrane des précurseurs des ostéoclastes. Cette fixation induit une cascade de signalisation qui déclenche le processus de la différenciation et la maturation des ostéoclastes (134).

Ce processus d'activation est régulé par l'ostéoprotégérine (OPG) qui joue un rôle d'inhibiteur physiologique de ce système. L'OPG est produite notamment par les ostéoblastes, les cellules stromales et les lymphocytes B médullaires; elle favorise la formation osseuse. La structure de l'OPG est très proche du récepteur RANK. Une fois secrétée, elle entre en compétition avec RANK pour la fixation de son ligand, bloquant ainsi l'effet inducteur de RANKL sur la différenciation ostéoclastique. D'autres facteurs ont été décrits comme régulateurs de la différenciation ostéoclastique, comme les cytokines IL-1et IL-8, la calcitonine et la parathormone (135).

Les cellules myéloïdes précurseurs ayant entamé leur processus de différenciation en ostéoclaste migrent vers les surfaces osseuses. Elles fusionnent et génèrent des cellules multinuclées. Ces cellules acquièrent leurs propriétés fonctionnelles et deviennent des ostéoclastes matures capables d'exercer la

résorption osseuse. L'arrêt de la résorption osseuse est contrôlé par l'apoptose des ostéoclastes (135)(136).

Dans le CaP, Brown et al ont montré que les cellules prostatiques tumorales sont capables de produire du RANKL et de l'OPG et que la sécrétion de ces facteurs est plus importante dans les métastases osseuses qu'au niveau des autres sites métastatiques(137).

La PTHrP (parathyroid hormone related-protein)

C'est une des cytokines majeures impliquées dans la formation des métastases ostéolytiques. Elle a une grande homologie avec PTH, le principal peptide régulateur de l'homéostase calcique. La PTH et le PTHrP lient le même récepteur PTHR1 et induisent l'expression de RANKL par les cellules stromales et les ostéoblastes et diminuent leur sécrétion d'OPG. Cela provoque une ostéoclastogénèse, la différenciation des ostéoclastes et la résorption osseuse. Par ailleurs, la PTHrP protège les cellules tumorales de l'apoptose. Elle exerce des effets mitogéniques sur les cellules tumorales prostatiques (LNCaP et PC3) (138) et favorise la progression métastatique des lignées PC3 et DU145 *in vivo* (139).
Les effets de la PTHrP sont potentialisés par l'interleukine 6 (IL-6), qui est un stimulant de l'ostéoclastogénèse. Les cellules tumorales prostatiques sécrètent d'importantes quantités d'IL-6 (140). Un taux d'IL-6 sérique élevé corrèle avec l'expression de marqueurs du CaP et la progression de la maladie (141).

Les MMPs (Matrix métalloproteinases)

Les MMPs sont des enzymes ayant pour fonction la dégradation de la MEC. A ce jour, 23 MMPs ont été identifiées. Les protéines de cette famille favorisent le mécanisme métastatique et participent à l'ostéolyse. Chez les patients atteints d'un cancer de prostate métastatique, on retrouve les MMP-2 et MMP-9 augmentées dans le sang (142). Il semble par ailleurs que les MMP induisent la résorption osseuse par le biais d'une augmentation du nombre d'ostéoclastes. Chez l'animal, l'inhibition des MMP bloque l'envahissement tumoral, le développement de métastases ostéolytiques et le remodelage osseux. La MMP 9 est surexprimée dans les tissus tumoraux prostatiques par rapport au tissu sain et est contrôlée par RUNX2 (143) et CXCR4 (144). La MMP1 est surexprimée dans les lignées prostatiques PC-3 et DU-145.

I.6.4 ANGIOGÉNÈSE

L'angiogénèse est le processus qui permet aux vaisseaux sanguins et lymphatiques de se mettre en place dans un organe pour en assurer l'oxygénation, l'apport de nutriments et l'élimination des déchets. L'angiogénèse est sous le contrôle de molécules régulatrices activatrices (facteurs angiogéniques) et inhibitrices (facteurs anti-angiogéniques) (145). L'augmentation de la masse tumorale est souvent précédée par la mise en place d'un réseau vasculaire pour assurer le développement, la croissance et la dissémination de cellules tumorales (146). Les cellules tumorales sont capables de synthétiser les facteurs de croissance nécessaires à la néoangiogénèse tumorale (147)(148). Le VEGF est le facteur prépondérant dans la néoangiogénèse tumorale et intervient de façon précoce.

Le relais est pris par le FGF-β, le TGF-β et d'autres facteurs pro-angiogéniques (149). Contrairement au tissu prostatique normal et aux adénomes, la densité des micro-vaisseaux et le niveau d'expression du VEGF sont augmentés dans le cancer de la prostate, et cela, en fonction du stade et du grade (150). L'expression immunohistochimique de VEGF est corrélée au taux de PSA, à la récidive après prostatectomie(150) et à la survie (151). Le taux plasmatique de VEGF semble être un facteur pronostique en phase métastatique. Il a été montré que les taux plasmatiques de VEGF sont plus élevés dans le CaP métastatique par rapport à ce que l'on observe chez les sujets sains et que chez les patients ayant un CaP localisé (152).

Les récepteurs de VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-2 sont surexprimés sur les cellules d'adénocarcinome de la prostate moyennement différenciées (153). La présence du récepteur VEGFR-1 a été montrée tant sur les cellules cancéreuses du cancer de la prostate que sur les cellules endothéliales. Le VEGFR-2 est exprimé dans le cancer de la prostate de bas grade, contrairement aux cellules de CaP de haut grade qui ne l'expriment pas (154).

À l'heure actuelle, les stratégies thérapeutiques fondées sur l'anti-angiogénèse n'ont pas montré d'avantage en termes de survie globale notamment le Bevacizumab associé au Docetaxel. (Kelly WK et al., abstr. 4511; ASCO 2010)

II. CHAPITRE II : MODELES DE CANCER DE LA PROSTATE

La mise au point de modèles de laboratoire est d'une importance cruciale pour comprendre la biologie du cancer de la prostate ainsi que pour évaluer les nouveaux traitements. Le développement de tels modèles est particulièrement difficile et reste à ce jour insuffisant car aucun modèle ne reproduit parfaitement l'histoire naturelle de la maladie humaine.

II.1 LIGNEES CELLULAIRES DE CAP HUMAINS

Dans le cas du cancer de la prostate, l'obtention de lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome a un taux de succès d'environ 1% pour les lignées cellulaires susceptibles d'être propageables *in vitro* et d'environ 5% pour l'obtention de xénogreffes sur l'animal (155). Seule une quinzaine de lignées cellulaires de cancer de la prostate humaines sont actuellement disponibles. Dans le CaP, les lignées peuvent être classées selon leurs origines ou bien selon leur sensibilité aux androgènes. Le Tableau 3 récapitule les principales caractéristiques des lignées cellulaires de CaP.

La contamination croisée entre les lignées cellulaires en culture peut entraîner la génération de fausses données scientifiques. La détermination du profil STR (Short Tandem Repeat) est aujourd'hui utilisée pour l'analyse du polymorphisme génétique de toute nouvelle lignée afin d'identifier une empreinte génétique. Ce test est une condition préalable nécessaire pour la publication de toutes nouvelles lignées. Le développement de ce test a permis d'identifier les contaminations entre différentes lignées ou de determiner l'origine des lignées. Par exemple, la lignée Nci-H660 initialement décrite comme une lignée de cancer du poumon a été reclassée comme une lignée de type *small cell carcinoma* de prostate.

Nom	Origine	Sensibilité aux androgènes	Marqueurs sériques et histologiques	Expression Pten	Expression TMPRSS2-ERG	Tumorigenicité *In vivo*
PC3	Méta Os.	AI, AR-	-	- /Mut	-	+
DU 145	Méta cerveau	AI, AR-	PAP	+	-	+
TSU-PR1	Méta Gang.	AI, AR-	PAP	ND	ND	+
DUPRO-1	Méta Gang.	AI, AR-	-	ND	ND	+
1013L	ADK prostate	AI, AR-	-	ND	ND	+
ND-1	Dérivée DU-145	AI	PSA+/-	+	ND	ND

LNCap (156)	Méta Gang.	AS, AR+	PSA, PAP	Mut	-	+
ARCaP	Ascites	AS, AR+	PSA	ND	-	+
MDA-PCa-2a	Méta Os.	AS, AR+	PSA	ND	-	+
MDA-PCa-2b	Méta Os.	AS, AR+	PSA	ND	-	+
VCaP	Méta Os.	AS, AR+	PSA	-	+	+
22RV1	Xéno CWR22 ADK prostate	AI, AR+	PSA	+	-	+
ALVA-31	Dérivée PC3 ; ADK prostate ?	AS, AR+	PSA-PAP	-	ND	ND
PC-346C	Xéno. PC-346 ; ADK prostate	AS, AR+	PSA	ND	ND	+
Bob (157)	Prostate CRPC	AI, AR-	PAP, PSCA	ND	ND	-
SerBob (157)	Dérivée de Bob	AI, AR-	PAP, PSCA	ND	ND	-
Nci-H660	Méta poumon	AI, AR-	PSA+	Mut	+	+

Tableau 3 : Caractéristiques des lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate.
(AI: Androgéno-Indépendante; AS : Androgéno-Sensible ; Mut : muté)

II.1.1 LIGNEES CELLULAIRES ANDROGENO-INDEPENDANTES

Parmi les lignées de cette catégorie, les deux lignées les plus utilisées sont PC-3 et DU-145. Il existe d'autres lignées qui sont moins bien caractérisées telles que PC-93, PR1, EB-33, ND-1, TSU-PR1, JCA-1, DuPro-1 et PPC1. Ces lignées sont insensibles aux androgènes et à l'exception de la lignée PC-93, aucune n'exprime les récepteurs d'androgène. Elles ne présentent pas d'activité 5α-réductase et ne produisent pas le PSA. Parmi ces lignées, seules la DU-145 et la TSUPR1 produisent la phosphatase acide (PAP) en faible quantité. Ces lignées cellulaires se cultivent facilement et plusieurs sous-lignées en ont été dérivées pour augmenter leurs pouvoirs métastatiques.

LA LIGNEE PC-3

La lignée PC-3 a été établie à partir d'une métastase vertébrale d'un patient de 62 ans porteur d'un cancer résistant à la castration (158). C'est une lignée aneuploïde à 60 chromosomes dont les chromosomes 2, 3, 5, 15 et Y sont absents. Le temps de dédoublement de cette lignée est de 33h. Elle n'exprime pas le PSA ni le AR. L'expression ectopique du AR dans ces cellules ne rétablit pas la sensibilité aux

androgènes ce qui suggère que son androgéno-indépendance est due à la déficience de fonctionnement du AR plutôt qu'à son absence. La lignée PC-3 exprime le facteur de croissance TGF-α, les récepteurs de l'EGF, l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1). Elle exprime également les cytokératines 5, 8 et 18. Du fait de son caractère tumorigénique extrêmement agressif *in vivo*, cette lignée est très utilisée dans les modèles animaux. Quand elle est injectée en S.C. chez les souris nude, la lignée PC-3 forme en trois semaines des tumeurs indifférenciées.

D'autres lignées ont été établies à partir de la lignée PC3, pour augmenter l'agressivité chez l'animal ou pour obtenir des propriétés métastatiques spécifiques: PC-3 ML, PC-3 MR, PC-3 MC et PC-3 M.

Ces quatres lignées dérivées de PC-3 sont capables de métastaser préférentiellement dans des organes spécifiques chez la souris SCID, après inoculation intraveineuse. Elles ont été sélectionnées en fonction de leur capacité à traverser la membrane de chambre de Boyden vers un milieu riche en chimio-attractants puis elles ont été injectées dans la veine caudale de souris SCID. Les métastases apparaissent chez 80% des animaux injectés au niveau des vertèbres lombaires (lignée PC-3 ML), de la mandibule (PC-3 MC), du cartilage costal (PC-3 MR) et du membre inférieur droit (PC-3 MK). Ces quatre lignées donnent également de nombreuses métastases viscérales (hépatiques, pulmonaires, coliques). D'autre lignées ont été obtenues à partir de xénogreffes S.C. ou intraprostatiques, de métastases issues de PC3, de cultures cellulaires en agar, ou de cultures en milieu conditionné : PC-3–1A, MPC-3–10, PC-3/M, PC-3/MA2, PC-3M-Pro4, PC-3M-LN4, PC-3N (Pour revue voir SOBEL et SADAR 2005). La lignée PC3 a été également utilisée pour générer des nouvelles lignées exprimants le gène de la luciférase comme les lignées PC3-Luc, PC-3M-Luc-C6.

Plusieurs lignées décrites comme primaires ont été identifiées plus tard comme dérivées ou contaminées par les cellules PC3. C'est notamment le cas des lignées ALVA-31, 41, 55 et 101, DuPro-1 et PPC-1 (Figure 7).

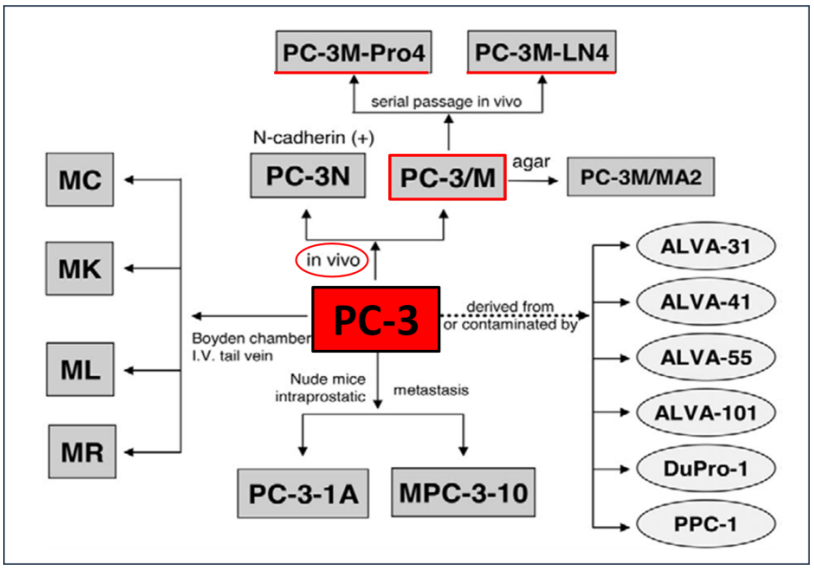


Figure 7: La lignée PC3 et ses dérivées.
(SOBEL et SADAR, 2005)

LA LIGNEE DU-145

La lignée DU-145 a été établie à partir d'une métastase cérébrale d'un patient de 60 ans porteur d'un cancer androgéno-indépendant également atteint d'une leucémie (159). Les cellules de DU-145 sont aneuploïdes et contiennent 64 chromosomes. Cette lignée n'exprime ni le PSA ni le RA. Les facteurs de croissance détectés dans les cellules DU-145 sont l'EGF et le TGF-α, ainsi que de nombreux récepteurs de l'EGF, du bFGF et du PDGF.

L'injection intrasplénique de cellules de la lignée DU-145 a permis l'obtention de métastases ganglionnaires mésentériques, hépatiques et une ascite carcinomateuse. La lignée métastatique a été dérivée et appelée DU-145M. Elle présente un taux d'implantation très élevé (90%) avec formation de métastases viscérales dans 90% des cas après injection intrasplénique.

LA LIGNEE TSU-PR1

Cette lignée, très peu utilisée, est issue d'une métastase ganglionnaire cervicale chez un patient atteint de CaP résistant à la castration. C'est une lignée à prolifération rapide androgéno-indépendante qui ne sécrète pas le PSA (160).

LA LIGNEE NCI-H660

Cette lignée est issue d'une métastase pulmonaire. Elle n'exprime pas le AR mais elle possède la translocation TMPRSS2-EGR. Cette lignée est difficile à cultiver car elle forme des sphères flottantes (161).

II.1.2 LIGNEES CELLULAIRES ANDROGENO-DEPENDANTES OU SENSIBLES

Les lignées cellulaires de CAP androgéno-sensibles disponibles sont peu nombreuses : (LNCaP, VCaP, DuCap, MDA-PCa-2a et MDA PCa-2b). La lignée LNCaP est, de loin, la lignée la plus communément utilisée.

LA LIGNEE LNCAP

La lignée LNCaP provient d'une métastase ganglionnaire prélevée chez un homme de 50 ans atteint d'un cancer de la prostate résistant à la castration. La lignée LNCaP contient des cellules aneuploïdes qui possèdent l'ensemble des chromosomes humains, y compris le chromosome Y (156).

La lignée LNCaP est restée pendant longtemps la seule lignée exprimant des récepteurs androgéniques fonctionnels et produisant du PSA. Elle exprime également la phosphatase acide prostatique (PAP) et les cytokératines 8 et 18. Les cellules LNCaP contiennent des AR mutés dans le domaine de liaison à l'hormone, ce qui les rend sensibles aux androgènes, aux œstrogènes et à la progestérone (162)(163). *In vitro*, il est possible de conserver l'androgéno-dépendance de la lignée en standardisant les conditions de culture. Cependant, ces cellules dérivent rapidement vers un état d'androgéno-indépendance puisqu'elles sont capables de pousser en absence d'androgènes, bien qu'ayant toujours le AR.
In vivo, l'utilisation de produits supports à base de protéines de la matrice extracellulaire (Matrigel® : (laminine, collagène IV, protéoglycans...), co-injectés avec les cellules LNCaP, est nécessaire pour obtenir des xénogreffes sous-cutanées chez la souris immunodéficiente. La lignée tumorale LNCaP a permis d'étudier notamment les interactions stroma-épithélium, la pharmacocinétique et les mécanismes de la progression vers l'androgéno-indépendance. Du fait de sa capacité à produire du PSA *in vivo* et *in vitro*, la lignée LNCaP a servi de modèle d'étude de la régulation du PSA.

Par ailleurs, des lignées dérivées de la lignée LNCaP ont été obtenues par différentes méthodes: déprivation d'androgène à long terme, maintient en culture pendant longtemps avec un nombre de passage élevé, co-injection ou co-culture avec d'autres lignées, passage en greffe chez la souris et récupération de métastases issues de la lignée parentale chez la souris (Figure 8).

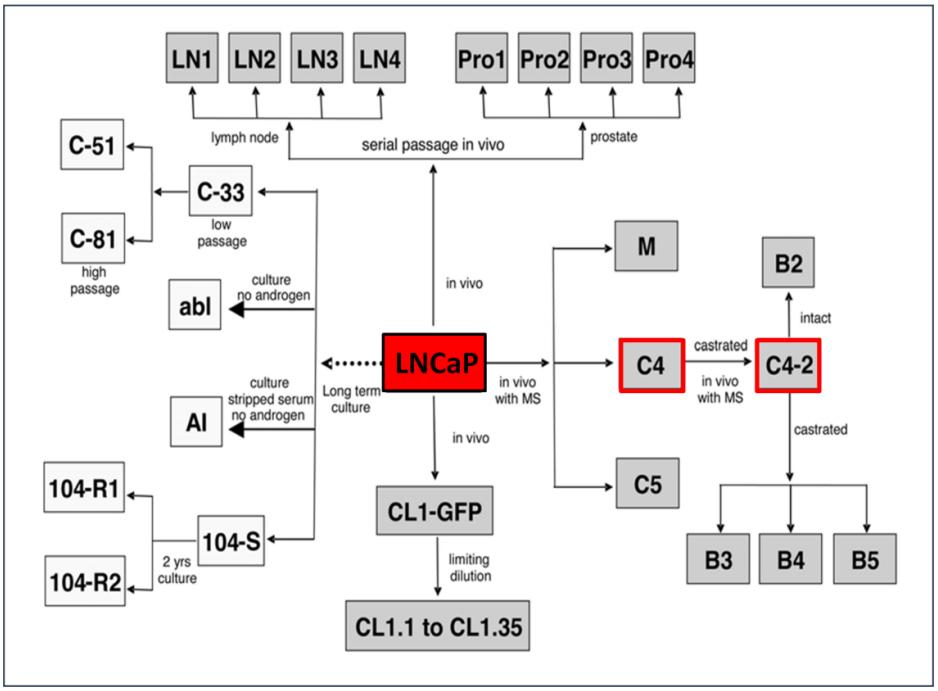


Figure 8 : La lignée LNCaP et ses dérivés.
(SOBEL et SADAR, 2005)

Les lignées LNCaP-Pro1, Pro2, Pro3, Pro4 and Pro5, et LNCaP-LN1, LN2, LN3 and LN4 ont été dérivées de la lignée mère par plusieurs passages intraprostatiques chez la souris et ont été choisies pour leurs capacités métastatiques. Le préfix Pro indique le passage par la prostate et le préfix LN indique le

passage par les ganglions lymphatiques. La capacité métastatique et l'agressivité tumorigénique de ces lignées dérivées augmentent avec le nombre de passages.
Du fait de l'importance de la relation stroma-tumeur pour le développement tumoral, l'équipe de Leland Chung a développé des lignées dérivées à partir de tumeurs chimères obtenues par co-injection chez l'animal de la lignée LNCaP et de fibroblastes d'origine osseuse. Cette équipe a obtenu la lignée M à partir d'animaux intacts et les lignées C4 et C5 à partir de souris castrées. Des études complémentaires sur les lignées LNCaP C-4 androgéno-indépendantes ont permis de produire une autre lignée dérivée (C4-2) qui produit des métastases ganglionnaires et osseuses après implantation sous-cutanée ou orthotopique. Cette nouvelle lignée C4-2 est actuellement beaucoup utilisée dans des modèles précliniques.
Les lignées LNCaP-AI, LNCaP 104-S, LNCaP 104-R1, LNCaP104-R2, AI LNCaP, LNCaP-abl et CL1-GFP sont obtenues par culture à long-terme dans un milieu appauvri en stéroïdes. La lignée CL1-GFP a été transfectée par un cytomégalovirus contenant un vecteur GFP. Ces lignées sont souvent utilisées pour étudier la transition vers un état d'androgéno-indépendance, le rôle du stroma dans la progression tumorale et le processus métastatique. De très nombreuses autres variantes de lignées LNCaP ont été développées (164).

LES LIGNEES MDA-PCA-2A ET MDA-PCA-2B :

Les lignées MDA-PCa-2a et MDA-PCa-2b ont été établies par l'équipe du M.D. Anderson Cancer Center à partir d'une biopsie osseuse d'un même patient de 63 ans atteint de cancer de la prostate résistant à la castration (155). Elles expriment le récepteur des androgènes, secrètent le PSA et sont sensibles à la privation androgénique (*in vitro* et *in vivo*). Chez l'animal, la castration entraîne une régression tumorale (accompagnée d'une baisse du PSA sérique) suivie, dans 30 à 40 % des cas, d'une nouvelle progression signant l'hormono-résistance.
In vitro, ces cellules poussent en sphère et n'atteignent pas la confluence en culture. Le temps de doublement des 2 lignées est différent, les cellules 2b prolifèrant plus rapidement. Les deux lignées sont tumorigéniques chez la souris nude ou SCID sous forme de xénogreffes sous-cutanées et l'utilisation de matrigel augmente le taux de la prise tumorale ainsi que le taux de PSA sérique. Elles sont également tumorigéniques en xénogreffes orthotopiques et intra-osseuses. Ces deux modèles sont très attractifs pour l'étude de la biologie du cancer de la prostate (155) mais leur culture *in vitro* reste délicate.

LA LIGNEE DUCAP

Cette lignée a été obtenue à partir d'un prélèvement autopsique d'une métastase de la dure mère d'un homme de 60 ans atteint d'un CaP résistant à la castration avec des métastases osseuses. La biopsie a été tout d'abord greffée chez la souris SCID puis établie en culture *in vitro*.

Cette lignée exprime l'AR, le PSMA, le PAP, les cytokératines 8 et 18 et secrète le PSA. Une accumulation de la P53 a été observée. Cette lignée est également tumorigénique *in vivo* chez la souris SCID. Le temps de dédoublement de la tumeur chez les souris mâles intactes est de 15 jours et de plus de 50 jours chez les souris mâles castrées, attestant son androgéno-dépendance (165).

LA LIGNEE VCAP

Cette lignée est issue d'une autopsie de métastase osseuse du même patient que la lignée DuCaP d'où son nom VCaP pour *vertebral-cancer of the prostate*. Cette lignée exprime l'AR, le PSMA, le PAP, les cytokératines 8 et 18 et secrète le PSA. Elle est androgéno-sensible *in vitro* et *in vivo*. La particularité de cette lignée est d'exprimer le gène de fusion TMPRSS2-ERG, ce qui fait que cette lignée est aujourd'hui très utilisée (166)(167).

LA LIGNEE ARCAP

Elle est issue d'un liquide d'ascite d'un patient de 83ans atteint d'un CaP métastatique avancé. Elle exprime le AR, le PSA et les CKs 8 et 18 ainsi que certains marqueurs neuro-endocrines (la sérotonine, la bombésine…). Elle forme des tumeurs chez les souris nude mais paradoxalement, les tumeurs prolifèrent plus rapidement chez les souris castrées par rapport à des souris intactes. Cette lignée donne des métastases seulement quand elle est greffée dans la prostate. Les métastases ont été observées au niveau des ganglions, du foie, des reins, du pancréas et au niveau osseux.
La lignée MDA-PCa-1 est issue du même liquide d'ascite que la lignée ARCaP et partage beaucoup de caractéristiques avec elle. *In vitro*, elle est inhibée par les androgènes et activée par les anti-androgènes (164)(168).

II.1.3 LIGNEES CELLULAIRES DERIVEES D'UNE TUMEUR PRIMITIVE

Ces modèles sont très peu nombreux et ils ne représentent pas l'adénocarcinome primaire de la prostate pour plusieurs raisons. Certaines lignées ont été établies après une greffe chez l'animal, ce qui peut changer les caractéristiques de ces lignées humaines. D'autres lignées sont remises en question, elles peuvent être dérivées ou contaminées par d'autres lignées (164).

LA LIGNEE 22RV1

La lignée 22RV1 est une lignée de cellules épithéliales humaines du cancer de la prostate. Elle a été obtenue à partir d'une xénogreffe de cancer de la prostate hormono-indépendant implantée chez la

souris nude (CWR22R). Cette xénogreffe est issue d'un CaP primaire (gleason 9 avec des métastases osseuses). Cette lignée exprime le PSA (ARN) et le ARet les CKs 8 et 18 et constitue un bon modèle pour l'étude du processus métastatique (169).

LA LIGNEE 1013L

Cette lignée a été établie à partir d'une tumeur primaire. Les cellules poussent en sphéroïdes et en suspension. Elle exprime les CKs 5, 7, 8, 18 et 19 mais n'exprime pas le PSA ni le AR. L'implantation chez la souris SCID nécessite du Spongostan® (éponges résorbables de gélatine). Aucune métastase n'a été observée à partir de cette lignée (170) (171).

LES LIGNEES ALVA-31ET PPC1

Les lignées ALVA-31 et PPC1, décrites comme cellules issues d'une tumeur primaire, sont remises en question au vu de leur grande ressemblance avec la lignée PC3: une même délétion homozygote au niveau D10S541 et une même mutation TP53. Cette ressemblance suggère la même origine de ces 3 lignées (164).

LES LIGNEES BM 1604 ET ND-1

Les lignées BM 1604 et ND-1 décrites comme des lignées issues de tumeurs primaires de CaP par prostatectomie ont été identifiées comme dérivées de la lignée DU145 (164).

LA LIGNEE PC-346C.

Cette lignée est établie à partir d'une xénogreffe Rotterdam PC-346. Cette lignée prolifère difficilement dans les milieux pauvres en androgène, elle secrète le PSA et exprime la forme sauvage d'AR (172).

LA LIGNEE BOB ET SA DERIVEE SERBOB

Ces deux lignées ont été obtenues récemment par une biopsie trans-rectale de la prostate d'un patient atteint d'un CRPC.
La lignée Bob est immortalisée spontanément. Elle exprime des niveaux élevés de p53 et des marqueurs de différenciation, y compris la CK 8, la phosphatase acide prostatique et le PSCA (prostate stem cell antigen), mais n'exprime pas le PSA ni le RA. Il s'agit de la première lignée de cellules immortalisées spontanément à partir d'un fragment issu d'une résection trans-urétrale d'un patient avec CRPC. Ces

deux lignées ne poussent pas *in vivo*, ni en xénogreffe S.C. et orthotopique, ni en greffe sur la surrénale (157).

II.1.4 LIGNEES CELLULAIRES IMMORTALISEES

Parmi les lignées cellulaires de CaP disponibles, certaines ont été obtenues par transduction avec des gènes viraux comme l'antigène T de SV40, ou plus récemment avec le gène de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) pour immortaliser les cellules. Les caractéristiques de ces lignées sont résumées dans le tableau 4. Bien que les derniers modèles, transduits par hTERT, reproduisent correctement les caractéristiques de l'adénocarcinome prostatique, ces lignées restent des modèles de CaP artificiels. L'antigène T de SV40 est absent dans l'histoire naturelle du CaP(173).

Lignée	Immortalisation	RA	PSA	Tumorigénicité	Réf.
PNT1 A	T-SV40	-	-	+(matrigel)	(174)
PNT1 B	T-SV40	-	-	+(matrigel)	(174)
PNT2-C2	T-SV40	-	-	ND	(175)
BPH-1	T-SV40	-	-	-	(176)(177)
PWR-1E	AD12SV40	+	+	-	(178)
RC-9/E6E7	HPV-16	+	+	+	(179)
957E/hTERT	hTERT	-	-	ND	(180)
RC-58T	hTERT	+	+	+	(181)
RC165N /hTERT	hTERT	+	-	-	(182)
RC-92a /hTERT	hTERT	+	-	+	(182)
St.Andrews, Scotland	hTERT/ CDK4			ND	(183)

Tableau 4 : Lignées cellulaires immortalisées de cancer de la prostate.

II.2 LES MODELES ANIMAUX

Ces modèles sont essentiels pour l'étude des tumeurs cancéreuses car, contrairement aux modèles *in vitro*, ils conservent certaines caractéristiques physiologiques essentielles pour le développement et la croissance tumorale comme la structure tridimensionnelle, les interactions avec les cellules stromales et l'angiogénèse. De plus, ces modèles sont cruciaux pour l'étude du processus métastatique, particulièrement important dans le cancer de la prostate. Ce processus nécessite plusieurs acteurs biologiques et reste très complexe pour être étudié seulement *in vitro*. Les modèles animaux existants pour le cancer de la prostate peuvent être classés en deux grandes familles: les animaux «porteurs »

servant d'hôte pour des greffes de tumeurs humaines et les animaux qui développent le CaP d'une façon spontanée.

II.2.1 MODELES ORTHOTOPIQUES

Le micro-environnement tumoral joue un rôle très important dans la croissance tumorale, la réponse aux traitements, ainsi que dans le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses. Malgré l'importance et la supériorité des modèles orthotopiques par rapport aux xénogreffes sous-cutanées, ces modèles restent moins utilisés à cause de la difficulté technique de réalisation (chirurgie sous anesthésie, volumes à injecter extrêmement faibles (20µL) et la taille de la prostate de souris).

Des greffes intra-prostatiques ont été effectuées avec les deux lignées les plus utilisés PC3 et LNCaP (184)(185)(186).

Il a été démontré que la lignée LNCaP, qui exige l'utilisation du matrigel pour former des tumeurs en sous-cutané, peut former des tumeurs en intra-prostatique sans matrigel (184). Le modèle orthotopique augmente également la diffusion métastatique des lignées LNCaP, PC3 et ARCaP. Il a été utilisé pour sélectionner des lignées dérivées fortement métastatiques (PC-3–1A, MPC-3–10) ou métastatiques à des organes spécifiques (Pro1, Pro2, Pro3, Pro4).

Néanmoins, ce modèle présente quelques inconvénients, notament la possibilité de fuite des cellules tumorales dans le péritoine après la chirurgie ou au moment de l'injection, le traumatisme du à l'ouverture du péritoine de souris, l'impossibilité de suivre la croissance tumorale des cellules qui n'expriment pas un gène de luminescence ou de fluorescence. Ce modèle prend en compte le micro-environnement tumoral et les caractéristiques histologiques des tumeurs humaines sont relativement bien préservées. Cependant comme dans tous les modèles réalisés chez les animaux immunodéprimés l'inconvénient de ce modèle est l'absence du système immunitaire et l'influence de la physiologie murine.

II.2.2 MODELES DE XENOGREFFES TUMORALES DE CAP HUMAINS

Il s'agit de greffer le matériel tumoral directement chez l'animal. Les xénogreffes les plus pratiquées, sont réalisées chez la souris athymique parce qu''il n'existe pas de modifications majeures des caractéristiques cellulaires des tumeurs transplantées. La majorité des tumeurs humaines conserve la morphologie, le caryotype, les antigènes et les caractéristiques histologiques des tumeurs primitives après xénogreffe. Cependant, ces tumeurs se développent en situation d'immunodéficience si bien que ce qui relève de l'immunité n'est pas pris en compte.

Malgré les avantages de ces modèles, leur utilité reste limitée dans certains processus biologiques complexes, où le passage dans un modèle *in vitro* plus simplifié et contrôlable est nécessaire. De plus, l'utilisation de ces modèles reste très lourde et coûteuse. L'ensemble des séries de xénogreffes tumorales du CaP est résumé dans le tableau 5.

Nom	**Origine**	**Sensibilité aux androgènes**	**PSA**	**RA**
PC-82	Prostate	+	+	+
PC-295	GL	+	+	+
PC-310	Prostate	+	+	+
PC-324	RTUP	-	-	-
PC-329	Prostate	+	+	+
PC-339	RTUP	-	-	-
PC-346	RTUP	+	+	+
PC-346I	PC-346	-	+	Mutant
PC-374	Peau	+	+	+
LuCaP 23.1	GL	+	+	
LuCaP 23.8	GL	+	+	
LuCaP 23.12	Foie	+	+	
LuCaP 35	GL	+	+	+
LAPC-3	AI RTUP	-	+/-	+
LAPC-4	AI LN	+	+	+
LAPC-9	AI Méta Os	+	+	+
CWR22	AD Méta	+	+	Mutant
MDA Pca-31	Foie	ND	+	+
MDA Pca-40	Foie	ND	-	-
MDA Pca-43	Surrénale	ND	+	+
MDA Pca-44	Peau	ND	-	-
MDA Pca-118	Os	-	-	-
PAC-120 HD	Prostate	+	+	+
PAC-120 HID	Prostate	-	+	+
HONDA	Méta tésticulaire	+	-	+

Tableau 5 : Modèles dérivés des implantations directes des tumeurs du CaP humain.
(Adapté de Van Weerden et al. , 2009. **(187)** (RTUP : Résection Trans-Urétrale de la Prostate ; GL : Ganglion Lymphatique)

LA XENOGREFFE PC-82

Le modèle PC-82 a été la première xénogreffe de CaP humain développée. Elle a été établie à partir d'un CaP primitif en 1977. Les xénogreffes sous-cutanées sont des carcinomes moyennement différenciés qui poussent lentement, elles sont androgéno-dépendantes et produisent du PAP et du PSA. Le modèle PC-82 a été très utilisé pour l'étude des mécanismes de la croissance tumorale régulés par les androgènes, l'apoptose et la régulation des récepteurs androgéniques (188).

LA XENOGREFFE HONDA

La xénogreffe Honda a été établie au Japon, à partir d'une métastase testiculaire d'un CaP avancé. Ces tumeurs sont des carcinomes mal différenciés qui poussent en sous-cutané chez la souris. Les tumeurs sont androgéno-dépendantes, produisent du PSA et du PAP et expriment le RA. Les tentatives d'établissement de modèles dérivés androgéno-indépendants se sont soldées par des échecs, ce qui limite l'intérêt de ce modèle pour l'étude de ce phénomène important (189)(190).

LA XENOGREFFE CWR22

La xénogreffe CWR22 a été établie à partir d'une tumeur prostatique primitive. Les tumeurs issues de la co-injection d'une suspension de cellules tumorales et du matrigel chez l'animal sont androgéno-sensibles. Elles secrètent le PSA et expriment des récepteurs du facteur de croissance (erbB1/EGFR, erbB2/neu, erbB3). Ces tumeurs sont sensibles à la castration et certaines progressent vers un état d'androgéno-indépendance (191)(192).

LA SÉRIE DE XÉNOGREFFES LUCAP 23

Cette série de xénogreffes de CaP humain chez la souris athymique à été établie en 1991 à partir de prélèvements métastatiques hépatiques et ganglionnaires chez un patient atteint d'un CaP hormono-réfractaire. Elle est sensible aux androgènes et produit du PSA. Après castration, les tumeurs passent par une période d'involution tumorale suivie par une croissance tumorale androgéno-indépendante. Le temps de doublement est très lent et la croissance tumorale ainsi que le taux d'implantation sont limités chez la souris mâle castrée, et nuls chez la souris femelle. Il existe plusieurs lignées dérivées de cette série (193).

LA SERIE DE L'UNIVERSITE D'ERASMUS (SERIE VAN WEERDEN)

Cette série présente 7 lignées tumorales dérivées de CaP primitifs et métastatiques humains, avec des caractéristiques variées en termes d'hormono-sensibilité, d'expression de PSA et de AR en fonction de chaque lignée dérivée : PC-295, PC-310, PC-324, PC-329, PC-339, PC-346 et PC-374.(194). Le taux de prise tumorale est de 81% et aucune métastase n'a été observée.

LA SERIE DE XENOGREFFES LAPC

Cette série de xénogreffes dérive de prélèvements de différents patients atteints de CaP localement avancé ou métastatique. Les prélèvements chirurgicaux de prostate ou de ganglions tumoraux sont directement co-implantés avec du matrigel en S.C. chez des souris SCID. Les xénogreffes LAPC-3, 4, 5 et 8 expriment le PSA à différents niveaux. LAPC-4 et LAPC-9 expriment la forme sauvage de AR et secrètent un taux élevé de PSA. Ces deux derniers sont sensibles à la castration et peuvent progresser vers un état d'andrigéno-indépendance (195).

LA SÉRIE DE XÉNOGREFFES MDA-PCA

Les deux xénogreffes MDA Pca-31 et 40 sont issues de métastases hépatiques, le MDA Pca-43 d'une métastase surrénalienne et la greffe MDA-Pca-44 est issue d'une métastase cutanée. Deux de ces xénogreffes (31 et 43) expriment le PSA et le AR.
Les deux xénogreffes MDA-PCa-118a et MDA-PCa-118b ont été obtenues à partir de métastases osseuses ostéoblastiques d'un patient atteint d'un cancer de la prostate androgéno-dépendant de haut grade. Elles ont été greffées et maintenues chez la souris SCID avec des passages tous les 60 jours. Ces deux xénogreffes poussent également chez l'animal castré et n'expriment pas le AR ni le PSA (196).

LA XENOGREFFE PAC-120,

Le modèle PAC120 a été obtenu chez la souris nude par transplantation en sous-cutané d'un fragment d'un adénocarcinome prostatique. PAC120 exprime la PAP, le PSA et présente le même immuno-phénotype que la tumeur d'origine. La tumeur croît localement chez l'animal, le taux de prise est proche de 100%. Ce modèle a deux variantes : hormono-dépendant et hormono-indépendant. Le modèle hormono-dépendant ne peut être transplanté ni chez le mâle castré, ni chez la femelle. Sa croissance peut être inhibée par castration chirurgicale ou par administration d'un antagoniste de la LHRH. Ce modèle de cancer prostatique peu différencié offre la possibilité d'étudier les mécanismes de la progression tumorale et de l'échappement hormonal (197)(198).

II.2.3 MODELES DE CAP SPONTANES

Chez le rat

Les carcinomes de prostate spontanés sont rares chez les rongeurs comparée à l'homme. Cependant, certaines souches de rats ont une incidence élevée de néoplasmes prostatiques comme les rats Lobund Wistar qui développent un carcinome prostatique dans 30% des cas. Cette espèce est une des rares espèces qui développe le CaP d'une facon spontanée. Il existe une dizaine de modèles de rats pour étudier le cancer de la prostate (199) :

Le modèle R-3327 Dunning : la tumeur initiale était un adénocarcinome spontané survenu chez un rat de Copenhague (200). Ce modèle a été maintenu *in vivo* et ses tumeurs sont androgéno-sensibles. Il existe aussi des dérivées androgéno-indépendantes. Les tumeurs ont la même histologie que le cancer prostatique humain et elles sont très bien différenciées. Les tumeurs possèdent une activité de 5α-réductase et expriment les récepteurs des androgènes et les récepteurs de la LH-RH. Ce modèle de rat a donné de nombreuses lignées dérivées *in vivo* parmi lesquelles la sous-lignée MAT-Ly-Lu qui produit des métastases dans les ganglions lymphatiques et les poumons (201). Ce modèle récapitule des évènements majeurs de la cancérogenèse prostatique et a été beaucoup utilisé pour étudier l'effet de divers traitements.

Le modèle **Lobund-Wistar**

Ce modèle présente des similitudes avec le cancer de la prostate humain. Les rats développent des cancers prostatiques spontanés avec l'âge (2ans) dans 26% des cas. Les tumeurs se développent au niveau des lobes dorsolatéraux et antérieurs de la prostate ainsi qu'au niveau des vésicules séminales. Les tumeurs métastasent dans les os et sont sous influence hormonale. L'incidence tumorale peut-être augmentée jusqu'à 90% après traitement au méthyl-nitrosourea et à la testostérone. Ce modèle a été utilisé entre autres pour étudier les métastases osseuses et l'effet de certains aliments sur le cancer de la prostate (202)(203).

Le **modèle Noble** de rat est l'unique modèle à développer des cancers de la prostate et du sein après une exposition prolongée aux androgènes et aux œstrogènes. Spontanément, il développe très peu de cancers prostatiques mais le traitement simultané à la testostérone et à l'œstradiol augmente l'incidence tumorale à 73% à 18 mois, et 100% en fin de vie. De façon intéressante, ce traitement induit aussi des dysplasies similaires au PIN chez l'homme. Il existe différentes dérivées de ce modèle associées à une sensibilité ou une résistance aux endrogènes et aux œstrogènes (204).

Le model ACI

Ce modèle est issu d'un croisement entre un male August et une femelle Copenhaguen. Un grand pourcentage des animaux développe spontanément un CaP. Les tumeurs sont sensibles aux androgènes et constituent un modèle important pour étudier les étapes précoces de la carcinogenèse prostatique (205).

Chez le chien

Le chien est l'une des deux espèces non-humaines (avec les rats) qui présente des cancers prostatiques spontanés et fréquents (206). Les chiens développent à la fois de PIN de haut grade et des adénocarcinomes de haut grade. Ces cancers sont cliniquement agressifs et métastasent aux ganglions lymphatiques, aux poumons et aux os. Dans certains cas, on a observé des cancers prostatiques alors que les chiens sont castrés ce qui peut suggérer que ces tumeurs sont indépendantes de la concentration en androgènes circulants.

Le chien représente un modèle qui présente de nombreuses similitudes avec le CaP humain, cependant le nombre de cas et la disponibilité de ces modèles restent un handicap. De plus, il n'existe pas de marqueur prostate-spécifique chez le chien et la manipulation de ces animaux reste coûteuse et difficile. Le chien représente un modèle de choix pour étudier le traitement des cancers prostatiques des patients par thérapie génique.

II.2.4 MODELES TRANSGENIQUES CHEZ LA SOURIS

Au vu du manque de modèles de CaP spontanés chez la souris, des modèles de souris transgéniques mimant certains aspects de la progression naturelle du CaP humain ont été développés. Ceci a été réalisé en contrôlant l'expression de certains gènes clés de la cancérogénèse prostatique.

Les premiers modèles résultaient de l'intégration du gène qui code l'antigène T du virus SV40 sous contrôle d'un promoteur spécifique de la prostate. Ces modèles sont artificiels puisque les effets de l'antigène viral ne sont pas observés naturellement dans le cancer de prostate humain. Les autres modèles résultaient initialement de la modification d'un seul gène connu pour être impliqué dans la cancérogénèse prostatique. Ces derniers ont beaucoup progressé au cours de ces dernières années et résultent aujourd'hui de la modification de plusieurs gènes, ce qui les rapproche encore plus de la maladie humaine. Cependant, même si les nouvelles générations multigéniques des modèles transgéniques miment bien l'initiation et la progression tumorale des phases précoces du CaP, tout en conservant l'intégrité du système immunitaire, ils ne reproduisent généralement pas la dissémination métastatique et ne sont donc pas appropriés pour l'étude des CaP avancés. Il existe également d'autres limites majeures comme la mauvaise reproductibilité des tumeurs dans un même groupe de souris, la faible incidence du cancer et la variabilité du temps d'apparition des tumeurs. Les modèles transgéniques les plus utilisés sont résumés dans le Tableau 6, pour revue (Scott et al., 2004).

Catégorie	Modèle	Transgène ou Knockout
Cycle cellulaire	C3(1)-SV40 TRAMP LPB-Tag 12T10 LPB-Tag 12T5 LPB-Tag 12T7s LPB-Tag 12T7f CR2-SV40 p27 +/-	SV40- Région précoce SV40- Région précoce SV40- Antigène grand T SV40-Antigène grand T SV40-Antigène grand T SV40-Antigène grand T SV40 région précoce Knockout- p27
Facteurs de croissances / voies de signalisation	MT-TGFα PB-ras PB-FGF8b	TGFα de Rat H-ras FGF, isoforme b
Récepteurs	MT-DNIIR	TGFβRII, dominant négatif
Suppresseurs de tumeurs	PTEN +/- *Men1* $^{TSM/1}$	Knockout- PTEN Knockout- *Men1*
Gènes homéobox	Nkx 3.1 -/-	Knockout- Nkx 3.1
Modèles bi-géniques	LPB-Tag 12T-7f × MT-DNIIR MT-TGF α × MTDNIIR Nkx +/- × PTEN +/- PTEN +/- × p27 +/-2 Nkx +/- × PTEN +/- × p27 +/- Pb-ras +/+ × mxil -/-	

Tableau 6 : Modèles de souris transgéniques de la néoplasie prostatique.
Adapté de Scott et al., 2004 **(207)**

II.3 MODELES DE METASTASES OSSEUSES DE CANCER DE LA PROSTATE :

Actuellement, les mécanismes de développement des métastases osseuses du CaP ne sont pas encore totalement élucidés. Pourtant, les métastases osseuses sont la première cause de décès parmi les patients atteints d'un cancer de la prostate et il est important d'avoir des modèles pour mieux les étudier et les cibler. L'obtention de prélèvements de métastases de CaP chez les patients reste difficile et les modèles précliniques existants restent peu nombreux. Les métastases osseuses spontanées de CaP chez l'animal sont des phénomènes rares et ne surviennent généralement que dans les modèles canins. Les modèles actuellement disponibles chez l'animal sont obtenues par injection de cellules tumorales à un animal hôte selon divers protocoles.

II.3.1 L'INJECTION INTRACARDIAQUE

L'injection intracardiaque de cellules tumorales peut provoquer la formation de métastases osseuses dans différentes parties du squelette chez la souris. Les sites métastatiques préférentiels dépendent du

turn-over osseux et de la lignée cellulaire injectée. Lorsque la lignée PC3 est injectée par voie intra-cardiaque, la majorité des animaux développe des métastases osseuses au niveau de la mandibule qui présente un *turn-over* osseux important. Les lésions métastatiques issues des cellules PC3 sont de type purement ostéolytique (208). La lignée LNCaP n'entraîne pas classiquement de métastases osseuses. En revanche, la lignée C4-2 dérivée de LNCaP, entraîne l'apparition de métastases osseuses ostéocondensantes (209). Les cellules tumorales MAT-Ly-Lu R3327 injectées par voie intraveineuse via la veine caudale chez des rats Copenhagen mâles induit une croissance tumorale métastatique dans la région lombaire de la colonne vertébrale. Des activités ostéoclastiques et ostéoblastiques ont été observées dans les vertèbres lombaires envahies. Quand ces cellules sont injectées par voie intracardiaque, on observe 2 à 3 semaines après l'injection une paralysie des membres inférieurs. La paralysie est due à une compression de la moelle épinière par les cellules tumorales d'origine métastatique au niveau du corps vertébral (210).

II.3.2 L'INJECTION INTRAOSSEUSE

L'injection intraosseuse est un des modèles classiquement utilisé pour étudier les métastases osseuses qui restent très difficiles à obtenir avec les injections intracardiaques et les xénogreffes. Les cellules sont généralement inoculées dans la cavité médullaire des os longs (fémurs ou tibias) de souris immuno-déficientes. Bien que ces modèles de cancer de la prostate de l'homme ne reproduisent pas les premières étapes de l'invasion métastatique, ils restent des modèles très précieux pour élucider les étapes ultérieures de cette progression. Une liste des modèles qui peuvent être utilisés dans des études précliniques ciblant l'os est indiquée dans le tableau 7, avec la nature des lésions osseuses qui sont générées.

L'injection intra-osseuse de cellules LNCaP et ses deux lignées dérivées C4-2 et C4-2B chez la souris *nude* entraîne des lésions faiblement ostéoblastiques. Chez la souris SCID, Les lignée MDA PCa2b et LuCaP23 entraînent des tumeurs intra-osseuses avec des lésions ostéoblastiques. En revanche le modèle LuCaP23 pousse chez la souris SCID mais pas chez la souris nude. La lignée PC3 entraîne des lésions ostéolytiques chez la souris nude. Chez le rat, Liepe et coll. ont développé un nouveau modèle en utilisant une injection intraosseuse de cellules MAT-Ly-Lu après avoir foré un trou dans la diaphyse fémorale. Ils ont observé des lésions osseuses ostéoblastiques par évaluation scintigraphique et étude histologique (211). Cependant, ce modèle représente un développement local de la tumeur maligne plutôt qu'une vraie métastase localisée dans l'os après une embolisation vasculaire.

La lignée CWR22 induit des lésions mixtes (ostéolytiques/ostéocondensante), 4 à 5 semaines après injection intra-tibial chez le rat nude.

D'autres modèles sont également mis au point, mais leur utilisation reste limitée comme le modèle de Nemeth et al qui consiste à implanter chez la souris SCID des fragments osseux humains, puis 4

semaines après, à injecter par voie intraveineuse des cellules PC3. Les cellules cancéreuses n'ont pas été détectées au niveau des os murins, en revanche, des lésions métastatiques de type ostéolytiques ont été détectées au niveau des fragments osseux humains xénogreffés. (212)

Un autre modèle développé par Leroy et al. consiste à implanter des fragments de prostate canine à proximité d'un os chez la souris nude. Une réaction ostéocondensante apparaît rapidement, alors qu'elle n'est pas obtenue par la greffe d'autres tissus (213).

Lignée	**Origine**	**Culture *in vitro***	**Mode d' injection**	**Type de lesions osseuses**	**Réf.**
22Rv1	Xénogreffe CWR22	+	SC ; IO ; IC	Mixtes : lytique/blastique	(214)-(215)
ARCaP; $ARCaP_M$	Ascites d'un CRPC métastatique	+	Or ; IC	Ostéolytiques et ostéoblastique	(216)-(217)
C4-2B	LNCaP	+	Or ; SC	Ostéoblastique	(218)
IGR-CaP1	CaP localisé	+	IO ; IC	Mixtes : lytique/blastique	(219)
LAPC-9	Xénogreffe de métastase osseuse	-	IO	Formation osseuse	(220)-(124)
LNCaP	Métastase ganglionnaire	+	IO	Mixtes : lytique/blastique	(218)-(209)
MDA-PCa-2b	Métastase osseuse	+	IO	Ostéoblastique	(155)-(221)-(222)
PC3	Ostéoblastique	+	IO ; IC	Ostéolytiques	(222)-(223)

Tableau 7 : Modèles précliniques de métastases osseuses
(IO : Intra-Osseuse ; IC : Intra-Cardiaque ; Or : Orthotopique ; SC : Sous-Cutanée)

II.4 MODELES DE CULTURES 3D

La culture cellulaire conventionnelle 2D est un modèle simple qui est le plus utilisé. En revanche, elle constitue un modèle idéalisé où toutes les cellules ont accès aux nutriments, à l'oxygène et sont en contact avec les drogues présentes dans le milieu. Cette culture permet d'évaluer de manière préliminaire l'efficacité d'un traitement mais reste éloignée de la réalité biologique complexe d'une tumeur et, par conséquent, des études *in vivo*. En particulier l'hypoxie, n'est pas du tout prise en compte dans la culture *in vitro* classique.

Les sphéroïdes représentent un modèle de complexité intermédiaire entre le modèle *in vitro* 2D et le modèle *in vivo*. Cette culture consiste à cultiver les cellules sur une matrice en agar qui empêche les cellules d'adhérer au support plastique et qui favorise la croissance tridimensionnelle des cellules en

forme de sphères. Les sphéroïdes simulent les micro-métastases ou les micro-régions de grosses tumeurs et sont utilisées pour étudier la biologie des tumeurs ou encore leur réponse à une chimiothérapie (224). Dans le cancer de la prostate, le modèle LNCaP sphéroïde est plus proche des tumeurs que les cultures monocouches. Il a été montré que la croissance cellulaire des sphéroïdes LNCaP diminue, tandis que la production de VEGF augmente. Le taux de PSA dans les surnageants de culture de sphéroïdes augmente avec le temps et diminue avec le traitement anticancéreux (225). L'analyse immunohistochimique des sphéroïdes des lignées DU145 et LNCaP révèle que les cellules de la couche périphérique ont un marquage de Ki-67 fort et que les cellules des couches centrales sont nécrosées tandis que celles de la zone intermédiaire expriment p27 et PARP-1, ce qui suggère un caractère de cellules quiescentes (226). Une autre étude a montré que les cellules LNCaP et Du145 sont plus résistantes aux multi-drogues quand elles sont en culture sphéroide (227). La lignée PC3 a aussi été cultivée en sphéroïde et a été utilisée en co-culture avec des cellules osseuses pour simuler des modèles de métastases osseuses (228). Les deux lignées Bob et SerBob forment des sphéroides en matrigel mais avec un pourcentage (10%) plus faible que la lignée PC3 et la lignée SerBob semble moins organisée que la lignée Bob (157).

Un autre modèle de culture 3D, plus proche des tumeurs que les sphéroïdes, vient de la culture de tissus tumoraux in vitro. Cette technique consiste à mettre en culture des coupes de tissus tumoraux, elle permet de conserver la morphologie cellulaire, l'architecture tumorale (acini), l'hétérogénéité cellulaire, la présence du stroma et une signalisation plus physiologique que dans la culture cellulaire. Les coupes doivent être suffisamment minces (moins de ~ 0,3 mm) pour permettre l'oxygénation et la nutrition de l'intérieur des tissus. Par ailleurs, cette technique peut être utilisée pour imiter la réalité biologique (insuffisance de nutriments, hypoxie, nécrose…), ce qui est important pour étudier certains mécanismes tels que l'induction de l'angiogénèse tumorale et la résistance à la chimiothérapie.
Ces modèles de culture de tissu offrent une approche qui comble le fossé entre la culture cellulaire et les modèles animaux très complexes. L'utilisation accrue de modèles 3D qui imitent les tissus pourrait faciliter la compréhension de la cancérogénèse ainsi que le développement et le dépistage de nouvelles thérapies (229). Cependant, l'utilisation de cette technique reste limitée vu la difficulté d'obtenir du matériel tumoral surtout dans certains types de cancer comme le CaP.

II.5 MODELES DE RESISTANCE A LA CHIMIOTHERAPIE

Malgré le nombre croissant des CaP résistants aux taxanes, très peu de modèles cellulaires et animaux de cancer de la prostate résistants aux taxanes sont disponibles. Les modèles disponibles sont souvent des lignées cellulaires résistantes générées par exposition de la lignée cellulaire parentale à des concentrations croissantes du médicament pendant une longue période. L'établissement de cette

chimiorésistance *in vitro* est un processus relativement long qui dépend de la lignée cellulaire et de la drogue. Plusieurs équipes ont obtenu les lignées PC3, DU145 et LNCaP résistantes au paclitaxel et au docetaxel. Dans certaines études, il existe une résistance croisée entre ces deux molécules. La mise en place d'un modèle animal résistant aux taxanes semble particulièrement difficile. Les modèles utilisés sont généralement des xénogreffes de cellules résistantes *in vitro*, comme la lignée PC-3dR résistante au docetaxel (230).

ARTICLE 1: STEMNESS MARKERS CHARACTERIZE IGR-CAP1, A NEW CELL LINE DERIVED FROM PRIMARY EPITHELIAL PROSTATE CANCER

Chauchereau A, **Al Nakouzi N**, Gaudin C, Le Moulec S, Compagno D, Auger N, Bénard J, Opolon P, Rozet F, Validire P, Fromont G, Fizazi K.

Experimental Cell Research ; 2011

INTRODUCTION:

La mise au point de modèles de laboratoire est d'une importance cruciale pour comprendre la biologie du cancer de la prostate, ainsi que pour évaluer les nouveaux traitements. En effet, s'il est possible d'analyser l'expression de protéines par immunohistochimie à partir des tumeurs ou biopsies incluses en paraffine, les événements de la progression tumorale et les mécanismes de la résistance aux drogues ne peuvent être étudiés que dans des modèles de laboratoire. Le développement de tels modèles est particulièrement difficile et reste à ce jour insuffisant car aucun modèle ne reproduit parfaitement la maladie humaine. Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, ces modèles ne sont pas représentatifs de la variété des phénotypes du CaP, et en particulier de l'adénocarcinome primaire, du fait que la majorité de ces modèles est d'origine métastatique. Les lignées cellulaires les plus appropriées pour l'étude des étapes précoces du CaP sont celles issues des tumeurs primaires de la prostate. Actuellement, il existe seulement trois lignées cellulaires issues de CaP localisé, les lignées E006AA, HH870 et Bob. Cependant, elles ne constituent pas des modèles idéaux. En effet, la lignée E006AA exprime l'AR et le PSA mais son intérêt reste limité puisqu'elle n'est pas tumorigénique chez l'animal. La lignée HH870 n'exprime pas l'AR et le PSA. Une troisième lignée issue d'une tumeur primaire a éte obtenue au moment de notre travail : il s'agit de la lignée Bob qui n'exprime pas l'AR et le PSA et n'est pas tumorigénique chez l'animal. C'est pourquoi, nous avons entrepris d'obtenir, au laboratoire, de nouveaux modèles à partir de la prostate tumorale et obtenu ainsi la lignée IGR-CaP1.

Pour étudier l'utilité et l'originalité de ce modèle nous en avons réalisé la caractérisation *in vitro* et *in vivo*. Nous avons, tout d'abord, déterminé les caractéristiques cellulaires et moléculaires de la lignée IGR-CaP1 naturellement immortalisée, ainsi que celles des clones dérivés de cette lignée par dilution limite. Nous en avons étudié la croissance cellulaire, le profil génomique et les marqueurs épithéliaux et prostatiques. Nous avons également recherché si cette nouvelle lignée exprimait des marqueurs cellules souches cancéreuses.

Une fois la caractérisation de la lignée réalisée *in vitro*, nous avons étudié ses propriétés chez l'animal. En effet, les xénogreffes sont essentielles pour l'étude des tumeurs cancéreuses car, contrairement aux modèles *in vitro*, elles conservent certaines caractéristiques physiologiques essentielles pour le développement et la croissance tumorale comme la structure tridimensionnelle, les interactions avec les

cellules stromales et l'angiogénèse. Les xénogreffes sous-cutanées sont le modèle le plus pratique, elles restent cependant moins adaptées que les greffes intra-prostatiques dans lesquelles le micro-environement est reconstitué, mimant mieux le développement tumoral observé chez l'homme.

Afin de pouvoir suivre la croissance tumorale, évaluer l'effet des traitements et détecter la formation de métastases et micro-métastases dans un modèle orthotopique de cancer de la prostate, nous avons mis au point un modèle de cellules bioluminescentes en intégrant le gène codant pour la luciférase dans le génome des cellules IGR-CaP1. De cette façon, une fois injecté chez l'animal, les cellules tumorales émettent de la lumière en présence de la luciférine. La bioluminescence émise est proportionnelle à la croissance de la tumeur intraprostatique. L'utilisation des cellules luminescentes revêt tout son intérêt dans les modèles animaux puisque cette technique d'imaging *in vivo* permet de quantifier la masse tumorale à partir des greffes orthotopiques et de suivre la réponse à des traitements thérapeutiques, ou de détecter les cellules métastatiques d'une façon simple, rapide et non-invasive chez l'animal vivant.

Nous avons établi des xénogreffes sous cutanées et intraprostatiques à partir de la lignée IGR-CaP1 bioluminescente et nous avons étudié leur capacité à reproduire le phénotype d'adénocarcinome prostatique *in vivo*. Nous avons déterminé les caractéristiques histologiques des tumeurs, leur sensibilité à la castration et leur capacité à induire des métastases spontanées.

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 317 (2011) 262–275

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Stemness markers characterize IGR-CaP1, a new cell line derived from primary epithelial prostate cancer

Anne Chauchereau[a,h,*], *Nader Al Nakouzi*[a,h], *Catherine Gaudin*[a,h], *Sylvestre Le Moulec*[a,h], *Daniel Compagno*[b], *Nathalie Auger*[c,h], *Jean Bénard*[c,h], *Paule Opolon*[d,h], *François Rozet*[e], *Pierre Validire*[f], *Gaëlle Fromont*[g], *Karim Fizazi*[a,h]

[a]*Prostate Cancer Group, INSERM U981, Institut Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France*
[b]*Laboratory of Prostate Cancer, Dep. Química Biológica-University of Buenos-Aires-FCEyN, Buenos-Aires, Argentina*
[c]*Department of Medical Biology and Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France*
[d]*Experimental Pathology Unit of IRCIV, Institut Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France*
[e]*Department of Urology, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, F-75014, France*
[f]*Department of Pathology, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, F-75014, France*
[g]*Department of Pathology, CHU-University of Poitiers, Poitiers, F-86000, France*
[h]*University Paris-Sud 11, France*

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:
Received 12 April 2010
Revised version received
20 September 2010
Accepted 16 October 2010
Available online 23 October 2010

Keywords:
Prostatic neoplasms
Tumor cells cultured
Basal epithelial cells
Tumor stem cells
Gene expression profiling

ABSTRACT

Deciphering molecular pathways involved in the early steps of prostate oncogenesis requires both *in vitro* and *in vivo* models derived from human primary tumors. However the few recognized models of human prostate epithelial cancer originate from metastases. To date, very few models are proposed from primary tumors and immortalizing normal human prostate cells does not recapitulate the natural history of the disease. By culturing human prostate primary tumor cells onto human epithelial extra-cellular matrix, we successfully selected a new prostate cancer cell line, IGR-CaP1, and clonally-derived subclones. IGR-CaP1 cells, that harbor a tetraploid karyotype, high telomerase activity and mutated TP53, rapidly induced subcutaneous xenografts in nude mice. Furthermore, IGR-CaP1 cell lines, all exhibiting negativity for the androgen receptor and PSA, express the specific prostate markers alpha-methylacyl-CoA racemase and a low level of the prostate-specific membrane antigen PSMA, along with the prostate basal epithelial markers CK5 and CK14. More importantly, these clones express high CD44, CD133, and CXCR4 levels associated with high expression of $\alpha 2\beta 1$-integrin and Oct4 which are reported to be prostate cancer stemness markers. RT-PCR data also revealed high activation of the Sonic Hedgehog signalling pathway in these cells. Additionally, the IGR-CaP1 cells possess a 3D sphere-forming ability and a renewal capacity by maintaining their CSC potential after xenografting in mice. As a result, the hormone-independent IGR-CaP1 cellular clones exhibit the original features of both basal prostate

* *Corresponding author.* Prostate Cancer Group, INSERM U981, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif, F-94805, France. Fax: +33 1 42 11 60 94.

E-mail addresses: anne.chauchereau@igr.fr (A. Chauchereau), nader.nakouzi@igr.fr (N. Al Nakouzi), catherine.gaudin@igr.fr (C. Gaudin), sylvestre.lemoulec@gmail.com (S. Le Moulec), danielcompagno@qb.fcen.uba.ar (D. Compagno), nathalie.auger@igr.fr (N. Auger), jean.benard@igr.fr (J. Bénard), paule.opolon@igr.fr (P. Opolon), francois.rozet@imm.fr (F. Rozet), pierre.validire@imm.fr (P. Validire), g.fromont@chu-poitiers.fr (G. Fromont), karim.fizazi@igr.fr (K. Fizazi).

0014-4827/$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.yexcr.2010.10.012

tissue and cancer stemness. Tumorigenic IGR-CaP1 clones constitute invaluable human models for studying prostate cancer progression and drug assessment *in vitro* as well as in animals specifically for developing new therapeutic approaches targeting prostate cancer stem cells.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Prostate cancer is the second leading cause of cancer-related deaths in men in North America and Europe. Nowadays, there is still no cure available for patients with advanced disease especially when hormone independence emerges [1]. Cell cultures established directly from primary tumors from patients are powerful research resources for studying cancer cell biology and for developing new strategies against cancer. However, human prostate cells are known to be one of the most difficult tissues to develop in a continuously growing culture especially while maintaining hormone dependency. Most *in vitro* or xenografted models of prostate cancer have been established from metastases [2,3]. The immortalization of normal human prostate cells, either epithelial or stromal, has been proposed to extensively investigate the early genetic events that give rise to epithelial prostate cancer progression. However, to date, these artificial models have been unable to identify the cells that initiate prostate cancer. Clearly, due to difficulties inherent to *in vitro* culture, models directly derived from primary tumors are still lacking. In spite of huge efforts, only two continuously cultured human primary epithelial prostate cancer cell lines have been established, the E006AA [4] and the HH870 [5] cell lines but they have not been documented so far, except for a recent study of AR signalling in the E006AA cell line [6]. A third human prostate cancer model was recently established *in vitro* from a trans-rectal prostate needle biopsy specimen but it was unable to grow in nude mice [7]. Currently, prostate cancer models, directly derived from primary tumors, enabling both *in vivo* and *in vitro* approaches and representing the early stages of this cancer are still lacking.

Regarding homeostasis of prostate tumor cells, there is mounting evidence that prostate cancer results from a hierarchical model originating from rare cancer stem cells (CSC) that enables tumor maintenance [8]. Based on this model, it has been suggested that androgen-independent stem cells give rise to two types of cells, stem cells and androgen-independent transit-amplifying cells, capable of differentiating into luminal cells. Prostate cancer stem/progenitor cells may exhibit similar characteristics to those of normal stem cells likely localized in the basal cell compartment [9]. Collins et al. [10] first identified and isolated prostate stem cells from primary tumors. It was subsequently shown that these cells express CD44, α2β1-integrin and CD133, normal prostate epithelial stem cell markers [11,12]. Recently, telomerase-immortalized basal prostate epithelial cell (HPET) lines were obtained which provide a constant supply of cells while simultaneously maintaining the differentiation characteristics of the original tissue [13]. Clonally-derived HPET cells reconstitute the original human tumor *in vivo* and differentiate into the three prostate epithelial cell lineages, indicating a common stem/progenitor cell [14]. More recently, prostatic epithelial RC-165N/hTERT cells were obtained which exhibit a stable stem cell phenotype $CD133^+/CD44^+/\alpha2\beta1^+/34\beta E12^+/CK18^+/p63^-/AR^-/PSA^-$ and the ability to differentiate into AR-positive cell types *in vitro* [15,16]. Most of these cancer stem cells were identified using surface markers that recognize their corresponding normal tissue stem and progenitor cells, thus strengthening the resemblance between tumor development and normal prostate organogenesis. Until now, these markers essentially pinpoint cell populations with CSC characteristics.

Here, we describe the establishment and characterization of a new prostate cancer cell line and cell-derived clones from a primary tumor. These cells show phenotypic features of prostate epithelial basal cells, exhibit the original features of prostate tissue and retain cancer stem cell properties. Thus, our new IGR-CaP1 models may help develop new therapeutic approaches that target prostate cancer stem cells.

Materials and methods

Primocultures and cell cultures

After mechanical dissociation of human prostate tumor tissue and counting, cells were seeded on an extracellular matrix (ECM) of human epithelial origin, IGR-XC, and further cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS (foetal bovine serum, Gibco), penicillin-streptomycin antibiotics and fungizone. This human ECM, developed at the *Institut Gustave Roussy*, Villejuif, France (IGR-XC, US patent 7,476,496), prevents anoikis and enables epithelial cells to anchor onto the substrate [17]. Primoculture conditions combined IGR-XC ECM and proline-depleted RPMI medium to prevent fibroblast contamination [18]. The cells were incubated at 37 °C with 5% CO_2 until they reached semi-confluence and were then trypsinized. After maintaining these culture conditions for 20 passages, cells were allowed to grow onto plastic flasks in regular RPMI medium containing 10% FBS and antibiotics. The renowned prostate cancer cell lines LNCaP and PC3 were cultured in RPMI-1640 containing 10% FBS and MDA-PCa-2b cells, as previously described [19]. To re-establish *in vitro* cultures after xenografting into nude mice, xenografted tumors ($n=5$) were collected when they attained 300 mm^3. Tumor cells were dissociated by a 30 min digestion at 37 °C with Collagenase H/DNAse I (Roche) in culture medium, as previously described [20] and plated in 6-well cell culture dishes in classic culture medium. Forty-eight hours after, the medium was replaced by proline-depleted RPMI medium and cells were cultured for 5 passages.

Clinical summary

The prostate primary tumour samples were collected from the Institut Mutualiste Montsouris (Paris, France) from 3 patients in accordance with protocols approved by the local ethics committees. The prostate cancer tissue that yielded the IGR-CaP1 cell line was obtained from a 58-year-old Caucasian French patient who had undergone a radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. At diagnosis, the serum PSA level was 5.6 ng/ml.

Pathological analysis of the prostatectomy specimen revealed a massive bilateral posterior tumor confined to the prostatic capsule which was a moderately-differentiated adenocarcinoma with a Gleason score of 7 [4(70%) + 3(30%)]. The clinical stage assigned was pT2c Nx.

Cell growth kinetics

Cell growth kinetics was determined by counting the number of viable cells at regular intervals. After seeding in triplicate at 4000 cells/well in 12-well plates in normal culture medium or in medium containing 10% charcoal-stripped FBS, cells were trypsinized daily, stained with trypan blue and counted. The doubling time was calculated from the regression equation of the curve. For the hormone-dependent growth assay, cells were seeded at 10 000 cells/well in 96-well plates. After 24 h, the culture medium was replaced with phenol red-free medium containing 10% charcoal-stripped FBS and dihydrotestosterone (DHT) was added or not, at a final concentration of 10^{-9} M. The medium was replaced each day. After 72 h, cell survival was measured with the WST1 test (Roche).

Telomerase assay

Telomerase activity was measured by using the Biomax Telomerase detection kit (Biomax Inc., MD, US) based on a quantitative real-time telomeric repeat amplification protocol, according to the manufacturer's recommendations. Telomerase activity was determined through its ability to synthesize telomeric repeats onto an oligonucleotide substrate in cellular extracts and the resulting extended products were amplified by PCR (35–40 cycles) using the DNA SYBR Green fluorochrome and measured on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Telomerase activity was quantified according to the manufacturer's recommendations against a standard curve that had an R^2 of 0.98.

DNA sequencing for analysis of TP53 mutation

Sequencing was performed from cDNA as previously described [21]. Two different DNA preparations obtained from different cell aliquots showed the same Tp53 mutation.

Karyotype

Metaphases were harvested after a 2.5-h colchicine block. Chromosome spreads were obtained according to previously described techniques [22]. Karyotypes were established on more than 10 metaphases after R-banding according to the standardized human karyotype.

Short tandem repeat DNA typing (STR typing)

Genomic DNA extracted from the cells was prepared using the QIAamp DNA Micro kit (Qiagen) and was quantified using real-time PCR technology. The short tandem repeat (STR) analysis was conducted using the multiplex-PCR-based Identifiler amplification kit (Applied Biosystems) on 1 ng of genomic DNA in which 16 STR loci were simultaneously co-amplified. Automated DNA fragment analysis was performed on an ABI3130xl Genetic Analyser. Fluorescent data were collected and analyzed using GeneMapper 3.2 ID-specific genotyping software (Applied Biosystems). The resulting profile showed the assigned allele values corresponding to the number of repeat units identified for each locus.

In vivo tumorigenicity assay

Six-week-old male athymic nude mice (NC-nu/nu) (Janvier, France) were used in conformity with the Guidelines of the French Government regarding operative procedures and animal care. IGR-CaP1 cells (10^7) were subcutaneously injected into the dorsal side without matrigel. Orthotopic injections were performed, as previously described [23]. Briefly, the prostate of each anesthetized mouse was exposed via a midline laparotomy incision and 10^6 cells in 5 μl PBS were directly injected into the prostate.

Western blot analysis

Western Blot assays were performed on 50 μg of whole cellular lysates. Blots were probed with anti-AR (N-20) or anti-PSA antibody (C-19) from SantaCruz, or anti-Oct4 antibody (Chemicon). Immunoblot analyses were developed using the enhanced chemoluminescence-based detection kit (Pierce).

Flow cytometry

FACS analysis was used to determine differentiation marker expression and to sort cells. For cytoplasmic or nuclear proteins, permeabilization in 0.25% triton X-100 was performed before labelling. The following antibodies were used: anti-human EpCAM-PE (clone EBA-1, Becton Dickinson), PSMA-FITC (clone 107-1A4, MBL medical), CK5/8-FITC (clone 5F173, US-Biological), CK8-FITC (clone B22.1, GeneTex), CK14-FITC (clone 2Q1030, US-Biological), CK18-FITC (abcam), CD24-FITC (clone ML-5, BD pharmingen), CD44-FITC (clone G44-26, BD Biosciences), CD133-APC (AC133, Miltenyi-Biotec), CXCR4-PE (also named CD184-PE, clone 12G5, BD Biosciences), P504S (AMACR) (2A10F3, Santa Cruz). The corresponding isotype control antibodies were included in each staining condition. For indirect labelling, purified mouse IgG2b and rabbit IgG (R&D System) were used as isotype controls and Molecular Probes' Alexa Fluor 488 (1:200) were used as secondary antibodies. Samples were analyzed with the FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson).

TaqMan real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis

Total RNA was extracted from cell lines using the RNeasy Midi kit (Qiagen) and 1 μg of RNA was reversed transcribed using random hexamers (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed with the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 5 μl of 1:20 diluted cDNA in a final volume of 25 μl according to the manufacturer's recommendations. The reference and sequence of PCR primers and probes were designed by Applied Biosystems (see Supplementary Material) and used according to the manufacturer's recommendations. The amount of sample RNA was normalized by amplification of an endogenous control (18S). In each experiment, the relative quantification of the transcripts was derived using the standard curve method. Results obtained in the IGR-CaP1 cells were compared to that found in LNCaP cells.

Immunohistochemistry (IHC)

The different tissue specimens (primary tumors and potentially metastatic organs) from mice were fixed in Finefix (Milestone Medical), and then paraffin sections (4 μ thick) were processed and stained with hematoxylin–eosin–saffranin (HES). Tumor and organ sections were incubated with anti-pan-CK (AE1/AE3/PCK26 (APK), Ventana Medical Systems), anti-p53 (Ventana Medical Systems), anti-PSMA (3E6) or anti-PAP (PASE/4LJ) from Diagnostic BioSystems, anti-Ki67 (Zymed), anti-CK14 (LL001, R&D Systems) antibodies. All sections were analyzed using a Zeiss Axiophot microscope and a SensiCam PCO digital camera. Representative views were taken at 100× magnification.

Immunofluorescence microscopy

Cells were fixed in 4% formaldehyde, washed and then incubated with goat serum solution (1:100) and anti-human α2β1-integrin antibody (BHA2.1, Chemicon) followed by incubation with Alexa-Fluor 488 antibody (Molecular Probes). Nuclei were stained with Dapi vectashield mounting reagent (Vector Laboratories). Images were acquired on a Zeiss Axioplan 2 microscope.

Spheroid soft agar assay

Prostate spheroid cultures were made from IGR-CaP1 cells (P30). Cells were seeded at 10 000 cells/well in 12-well plates in 0.35% agarose in growth medium overlaid on a base of 0.8% agarose. Cultures were fed every 4–5 days for 2 weeks until colonies were formed. The 3D cultures were performed in classic RPMI medium supplemented with FBS. Cells grown as nonadherent spherical clusters were fixed in Finefix (Milestone Medical), collected using the cytoblock kit (Thermo laboratories) and embedded in paraffin. Then paraffin sections (4 μ thick) were processed and stained with HES.

Results

The IGR-CaP1 cell line is a prostate cancer epithelial cell line

In a combination of ECM of human epithelial origin, IGR-XC and medium–which avoids fibroblast overgrowth–primary tumor fragments from three patients with localized disease were seeded and only one tumor fragment, from a 58-year-old prostate cancer patient, generated stabilized tumor cells after 20 subcultures *in vitro*. These cells were spontaneously immortalized since they were able to grow on plastic dishes in classic culture medium while retaining their proliferative capacity in a continuous long-term culture (up to 50 passages). They grew as adherent cells with epithelial cell morphology (Fig. 1A) and expressed the epithelial cell adhesion molecule EpCAM (Fig. 1B) as compared with the isotypic control or EpCAM-negative human fibroblasts IMR90 (not shown). They also stained positively for cytokeratin, as observed in the original tumor (Fig. 1C–D), confirming the epithelial origin of this cell line. The absence of chromogranin A expression in IGR-CaP1 cells led us to rule out the hypothesis of neuroendocrine cells while the lack of the mesenchymal markers STRO-1, CD73 and CD105 (not shown) and proline-depleted medium used to establish the cell line rather suggested that these cells did not correspond to mesenchymal cells either.

IGR-CaP1 cell identification by genomic profiling analyses

To better characterize the cell line, genotyping of the complete Short Tandem Repeat (STR) profile was performed on total DNA from the IGR-CaP1 cell line (Table 1). This technique allowed definitive cell line authentication. The profiles confirmed the complexity of the karyotype (Fig. 2A) and showed the absence of the Y chromosome on the amelogenin locus. We observed the same STR profile between DNA prepared from IGR-CaP1 cells at passages 10 and 50, showing that chromosome alterations were conserved throughout cultures. Since establishing a primary cell culture may generate cellular heterogeneity, we undertook clonal selection from the parental IGR-CaP1 cells by limit dilutions and obtained nine clonally-derived clones. To definitively identify two of them, named 3A11 and 3C11, the STR profile was determined and showed some minor differences compared with that of the parental IGR-CaP1 cell line (Table 1). Allelic changes were observed at two loci vWA and D18S51, for the 3A11 derived clone and at 5 loci D2S1338, D19S433, D18S51, D5S818 and FGA for the 3C11 derived clone.

Karyotypic analysis was performed on the IGR-CaP1 cell line at passage 29 using a conventional R-banding technique. The analysis showed a complex tetraploid karyotype with 86–91 chromosomes, including numerical and structural rearrangements (Fig. 2A). The karyotype was determined to be 86~89 <4n>,XX,+der(X),+der(X),-Y,-Y, der(1)*t*(1;?)(p32;?), add(2)(q3?2), −3,der(3)*t*(3;?)(p10;?), −4, −4, −5, −5, −6, −6,ins(7;?)(p15;?),+8,+8,+11, +11, −13, −13, add(13)(q31), −14, −15, −15,del(18)(q22),del(18(q22),+20,del(20)(q12),+del(20)(q12),+mar inc[cp15].

IGR-CaP1 cells spontaneously express high telomerase activity and show malignant features in vitro

Telomerase, the enzyme responsible for replicating telomeres, is expressed at a low level in most normal tissues and becomes activated during tumorigenesis. As telomerase expression can itself induce immortalization [24], we measured the telomerase activity in IGR-CaP1 cell extracts using a quantitative PCR system targeting telomere extension products. The spontaneously immortalized IGR-CaP1 cells exhibited high telomerase activity compared with normal lymphocytes (PBL) (Fig. 2B). However, this activity was lower than that measured in the PC3 cells derived from a metastatic site.

Since mutations in the tumor suppressor gene *Tp53* are frequently associated with chromosome instability, Tp53 expression was examined in IGR-CaP1 cells. Immunohistochemical analysis showed high Tp53 protein expression in the parental tumor and in the derived cells (Fig. 2C–D). Tp53 expression in the IGR-CaP1 cells (P16) was confirmed by Western Blot analysis with the anti-Tp53 DO-7 antibody (not shown). High Tp53 expression was assumed to correspond to the stabilized mutated *Tp53* gene product. Sequencing did indeed reveal a missense mutation at the nucleotide A377G corresponding to a change at codon Y126C.

Cell growth and kinetics

The IGR-CaP1 cells grew rapidly in classic culture medium conditions with a doubling time of 43 h. Similar cell kinetics were observed in medium containing charcoal-stripped FBS (Fig. 3A). Treatment with DHT had no effect on IGR-CaP1 cell nor

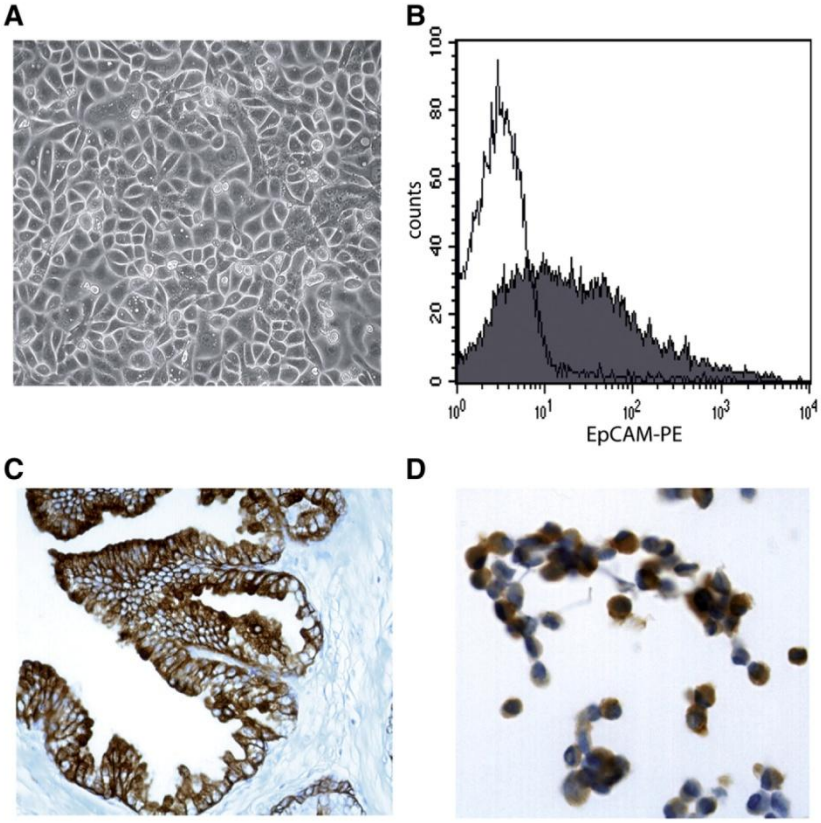


Fig. 1 – Morphology and epithelial features of the IGR-CaP1 cell line. (A) Photomicrograph of the human primary PCa cell line IGR-CaP1 (passage 29) shows typical epithelial morphology. (B) Expression of EpCAM was evaluated by FACS. (C-D) Cytokeratin expression was analyzed by IHC with anti-pan cytokeratin antibody (APK) in the initial tumor (C) and in IGR-CaP1 cells at passage 16 (D).

Table 1 – STR analysis for identification of IGR-CaP1 cells and the two clonally-derived clones 3A11 and 3C11.

Locus ID	IGR-CaP1	3A11 clone	3C11 clone
D8S1179	13–14–15–16–17	13–14–15–16–17	13–14–15–16–17
D21S11	26–30.2	26–30.2	26–30.2
D7S820	9.1–10.1–11.2	9.1–10.1–11.2	9.1–10.1–11.2
CSF1PO	11–14–16	11–14–16	11–14–16
D3S1358	14–15	14–15	14–15
TH01	7–8–9.3	7–8–9.3	7–8–9.3
D13S317	8–10	8–10	8–10
D16S539	11–12–13	11–12–13	11–12–13
D2S1338	17–24–25	17–24–25	17–23–24
D19S433	13–14	13–14	12–13–14
vWA	16–20–21	16––19–22	16–20–21
TPOX	8–10–11	8–10–11	8–10–11
D18S51	14–15–16	15–16	15–16
Amelogenin	X	X	X
D5S818	12–13	12–13	12–13–16.1
FGA	20–21–25–26	20–21–25–26	20–21–24–26

Loci were analyzed using the multiplex-PCR-based Identifier amplification kit (Applied Biosystems), comprising 15 autosomal STR Loci and the sex-chromosome marker amelogenin.

on androgen-independent PC3 cell growth (Fig. 3B). Growth of LNCaP cells was increased through a daily treatment with 10^{-9} M DHT for 3 days to serve as a control.

IGR-CaP1 cells do not express AR or PSA but express other prostate-specific markers

IGR-CaP1 cells did not express androgen receptor protein (AR) or secretory prostate-specific antigen (PSA) as shown by blot analyses (Fig. 3C). The LNCaP and MDA-PCa-2b cells which both express these two prostate markers were used as positive controls while the PC3 cells were used as a negative control. FACS analysis confirmed the absence of PSA and AR in IGR-CaP1 cells, as compared to LNCaP and PC3 cell lines (Supplementary Fig. 1A). Furthermore, in IGR-CaP1 cells neither AR nor PSA were detected at mRNA levels by quantitative RT-PCR analyses (Fig. 3D). AR protein and PSA expression in the IGR-CaP1 cell line contrasted with that observed in the original tumor. The absence of AR and PSA expression in the early passages of the IGR-CaP1 cell line (Supplementary Fig. 1B) suggests that cells expressing AR were lost during the *in vitro* cell culture establishment. It is established that in prostatic epithelium, AR protein and PSA expression is restricted to luminal secretory prostate cells and is not observed in

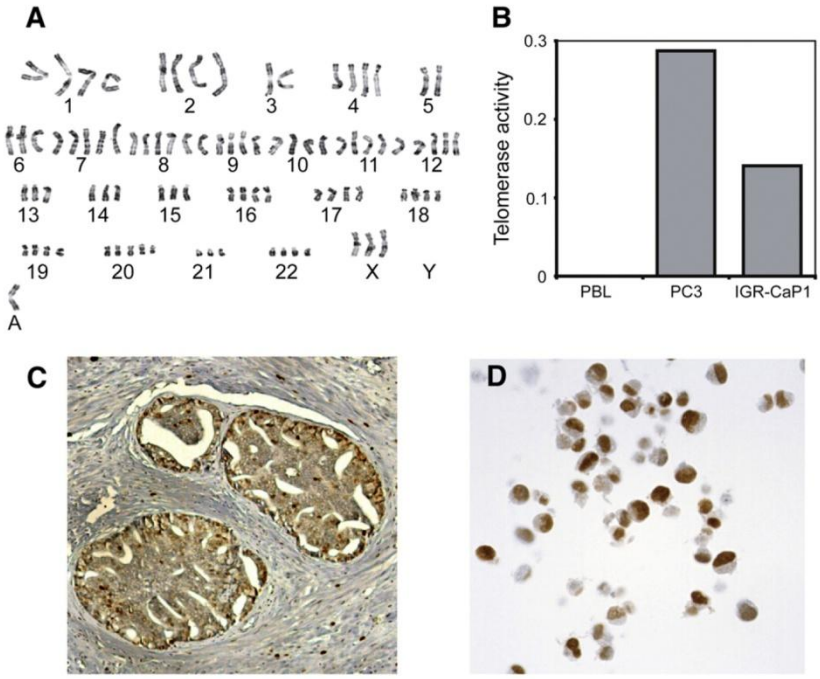


Fig. 2 – Malignancy features of the IGR-CaP1 cell line. (A) Karyotypic analysis of the IGR-CaP1 cell line using a conventional R-banding technique showing a complex tetraploid karyotype with 86-91 chromosomes. (B) Telomerase activity was quantified by quantitative PCR. Telomerase activity of IGR-CaP1 cells was compared to normal lymphocyte cells (PBL). PC3 cells were used as positive controls. (C–D) IHC showing high p53 expression in the initial prostatic tumor (C) and in the IGR-CaP1 cell line (D).

the basal layer cells of the epithelium, suggesting that IGR-CaP1 cells might correspond to basal epithelial prostate cancer cells.

Alpha-methylacyl-CoA-racemase (AMACR/ P504S) is a biomarker for prostate cancer that is strongly expressed in prostate cancer cell lines and tissues independently of androgen receptor expression [25,26]. As measured by FACS analysis, IGR-CaP1 cells expressed AMACR as also observed in LNCaP cells (Fig. 3E) and in PC3 cells (not shown). Like other prostate-specific markers, PSMA, the prostate-specific membrane antigen (also named FOLH1) [27] is expressed only in a small fraction (~2%) of IGR-CaP1 cells, as shown by flow cytometer analysis, compared to LNCaP cells (Fig. 3E). The low level of PSMA expression detected in *in vitro* culture conditions was in accordance with PSMA expression observed in orthotopic xenografts (Fig. 4B).

IGR-CaP1 cells reconstitute prostate adenocarcinoma in mice

To determine tumorigenicity of IGR-CaP1 cells in animals, cells were injected into male nude mice both subcutaneously and orthotopically. Subcutaneous injections of IGR-CaP1 cells resulted in the formation of palpable tumors within a week with 90% of mice (20/22) bearing tumors after 6–8 weeks (Fig. 4A). Orthotopic injection of IGR-CaP1 cells resulted in the formation of intraprostatic tumors (Fig. 4B). In all tumors, HES staining of sections revealed glandular differentiation with acini attesting the presence of adenocarcinoma. Immunohistochemical staining with Ki67 revealed a high proliferation index which was higher in the intraprostatic tumor than in subcutaneous xenografts, indicating more aggressive features in orthotopic tumors (Fig. 4A and B). All the neoplastic cells expressed cytokeratins, as shown with CK14 labelling (Fig. 4A), but none expressed chromogranin A indicating an epithelial phenotype (not shown). In addition, staining for both prostatic acid phosphatase (PAP) and prostate-specific membrane antigen (PSMA) ascertained the prostate origin of the tumor (Fig. 4A and B). Metastases were observed in animals with both intraprostatic and subcutaneous tumors and predominantly in the liver and lung (not shown). Androgen responsiveness was then evaluated *in vivo* by castrating animals ($n=5$), once IGR-CaP1 tumors attained a volume of approximately 300 mm^3. Castration resulted in a slight reduction of tumor progression although the difference was not statistically different (interaction p-value = 0.096) (Supplementary Fig. 2). This suggests that although the androgen receptor was not expressed in epithelial tumor cells, tumor progression was at least partially under androgen control, thus emphasizing the importance of the tumor microenvironment [28]. However, tumor progression in the castrated mice suggested that the epithelial tumor cells might possess specific properties that were contributing to the survival of tumor cells in response to androgen deprivation. Altogether, these data showed that tumors initiated by the IGR-CaP1 cell line recapitulate the characteristics of any initial human prostate cancer in mice.

IGR-CaP1 cells express high levels of basal epithelial prostate markers

To determine the phenotypes of IGR-CaP1 cells, we first examined the expression of the cytokeratin markers CK5, CK8, CK14 and CK18 by cytometry analysis (Fig. 5A). The cytokeratin expression profile of the luminal epithelial LNCaP cell line was used as a control. IGR-CaP1

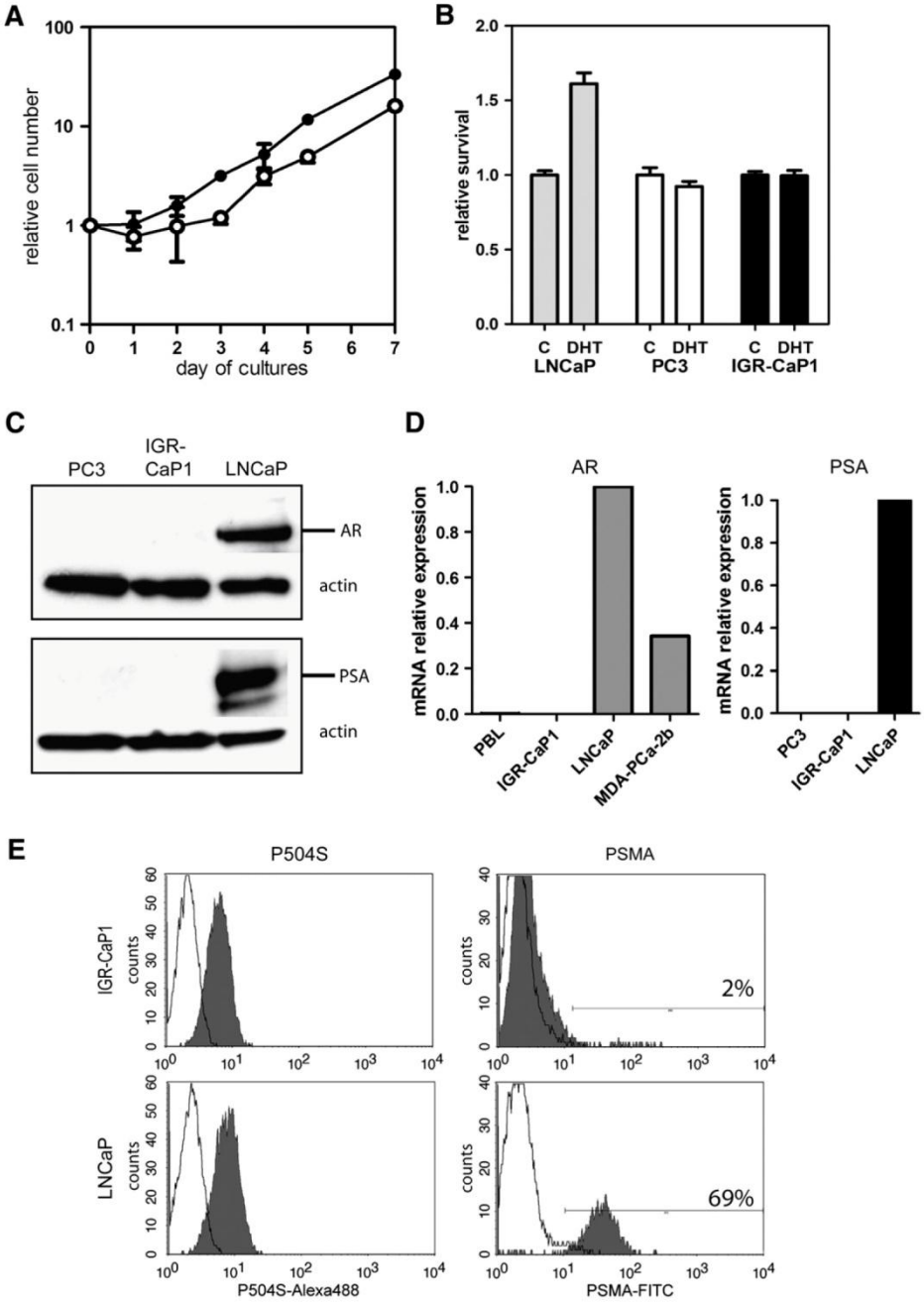


Fig. 3 – Cell growth, kinetics and expression of prostate-specific markers in IGR-CaP1 cells. (A) The growth rate of IGR-CaP1 cells at passage 28 was determined in culture medium supplemented with 10% FBS (●) or with 10% charcoal-stripped FBS (○). (B) The survival of IGR-CaP1, LNCaP and PC3 cells was determined after treatment of 10^{-9} M DHT for 72 h compared to no treatment (C) in medium supplemented with charcoal-stripped FBS. (C) Blot analysis showed no expression neither of AR nor of PSA in IGR-CaP1 cells compared to that found in PC3 and LNCaP cells respectively used as negative and positive controls. (D) The absence of AR and PSA gene expression was confirmed by quantitative RT-PCR analyses when compared with mRNA extracted from MDA-PCa-2b and from LNCaP cells as positive controls. (E) The expression level of the prostate markers P504S (AMACR) and PSMA was evaluated by flow cytometry. LNCaP cells were used as controls.

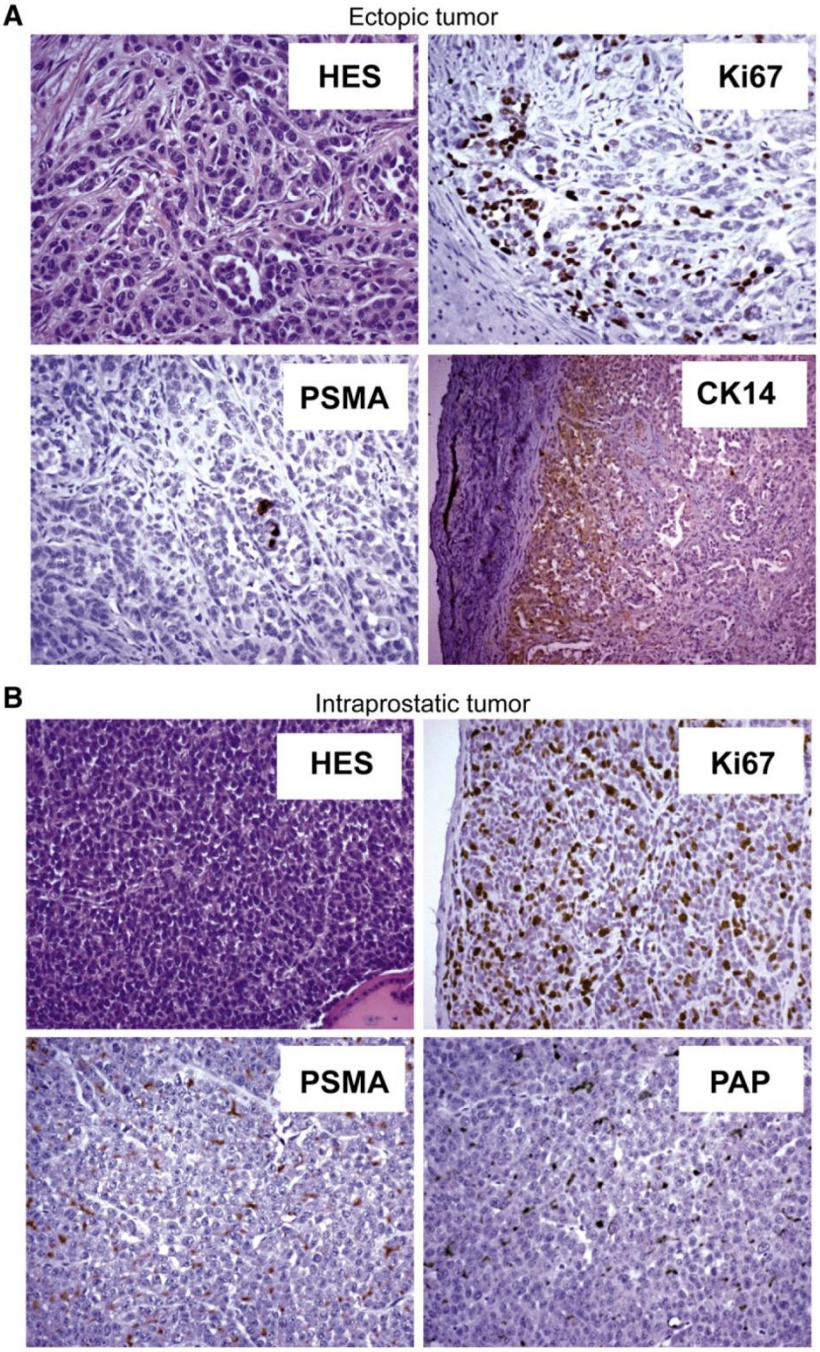


Fig. 4 – IGR-CaP1 cells reconstitute adenocarcinoma in mice. IGR-CaP1 cells were injected into male nude mice both subcutaneously (A) or intraprostatically (B). HES staining of tumor sections revealed glandular differentiation with acini confirming the presence of adenocarcinoma. CK14 attested the epithelial origin of the tumor. Ki67 staining revealed the proliferation index. Markers corresponding to prostatic acid phosphatase (PAP) and the prostate secreted membrane antigen (PSMA) confirmed the prostate origin of the tumor.

cells exhibited strong staining for CK5/8 and CK14 but no staining for CK8. Although adult prostate basal cells have been shown to express p63, we did not detect p63 expression in these cells (not shown). We detected low labelling for the luminal epithelial marker CK18 in IGR-CaP1 cells compared to that observed in LNCaP cells (93% CK18 fluorescence in LNCaP versus 34% in IGR-CaP1 cells). The absence of

CK8 and the low level of CK18 expression indicated the absence of luminal differentiation in cultured IGR-CaP1 cells. Additionally, CK19 expression was detected in early passages of the IGR-CaP1 cell line, but disappeared during *in vitro* passaging and was not detectable in cells at passage 71 (not shown). The two clones 3A11 and 3C11 exhibited roughly the same cytokeratin expression profile. These results as a whole indicate that the IGR-CaP1 cell line displays a cytokeratin profile corresponding to basal epithelial cells. As prostate stem cells have been shown to exist in the basal cell compartment, these data suggested that a small subset of these cells expressing a broad spectrum cytokeratin profile might correspond to progenitor/stem cells.

IGR-CaP1 cells and clonally-derived clones show features of prostate cancer stem cells

Previous studies have suggested that putative prostate progenitor/stem cells are located in the basal layer and express markers of basal cells. As in the normal prostate, the putative stem cell population was shown to be enriched in CD44 and CD133 antigens [11], we first evaluated their expression levels in the IGR-CaP1 cell line by flow cytometry (Fig. 5B). Compared to LNCaP cells in which only a minor fraction expressed CD44, almost all the IGR-CaP1 cells expressed CD44 antigen. CD133 expression was not observed in LNCaP cells. In contrast, we detected two populations in IGR-CaP1 cells, one exhibiting high CD133 expression and the other was CD133-negative. CXCR4, a key molecule in the regulation of the migratory and metastatic properties of cancer cells, may be essential for the progression of the $CD133^+$ prostate cancer stem cells [15]. We found that a large subset of IGR-CaP1 cells expressed the CXCR4 molecule. In addition, we found that all the IGR-CaP1 cells were CD24 positive (Supplementary Fig. 3A). Real-time quantitative RT-PCR confirmed high expression of CD44 in the parental IGR-CaP1 cell line and in the clonally-derived clones 3A11 and 3C11 (mean Ct of 25.8) whereas CD44 gene expression was not detectable in LNCaP cells ($Ct > 40$) (not shown). High expression of CD133 and CXCR4 was also confirmed by RT-PCR performed at different passages (Fig. 5C). The combined biomarker expression after triple-labelling and flow cytometry analysis was evaluated and showed a high fraction of $CD44^+/CD133^+/CXCR4^+$ triple-labelled cells (13% of the population in the parental IGR-CaP1 cells , 23% and 34% in 3A11 and 3C11 clones respectively) (Supplementary Fig. 3B). Furthermore, as it has been postulated that anchorage-independent culture of tumor cells is a useful tool for enriching and characterizing stem cells, we next investigated the clonogenic capacity in a soft agar assay. The results showed that IGR-CaP1 cells were able to form spheroids (~200 μm) in serum-supplemented RPMI medium and HES staining showed glandular-like structures with a lumen (Fig. 5D). These findings suggest that IGR-CaP1 cells possess stem cell-like characteristics. We next investigated the ability of IGR-CaP1 cells to maintain their characteristics after xenografting into animals. Cells were xenografted subcutaneously into nude mice. Subsequently, after 2 months of tumor growth, tumor cells were dissociated by enzymatic digestion and plated in culture dishes in classic culture conditions. After 5 passages of *in vitro* culture, stem cell markers and basal epithelial markers were assessed by FACS analysis. The results in Fig. 5E show that even after xenografting into mice and solid tumor growth, the IGR-CaP1 cells retained the characteristics of prostate basal epithelial cells (CK5 and CK14) and the potential of CSC (CD44, CD133 and CXCR4). In particular, we still observed the same fraction of CD133 positive cells (~50% of the cells). Interestingly, CXCR4 expression was increased in these conditions (75% of CXCR4 positive cells). The small fraction of PSMA positive cells was also conserved. Thus, these results strengthened the value of the IGR-CaP1 model as a model system based on tumor stem cells originating from the basal epithelium.

IGR-CaP1 cells show a stem cell expression signature

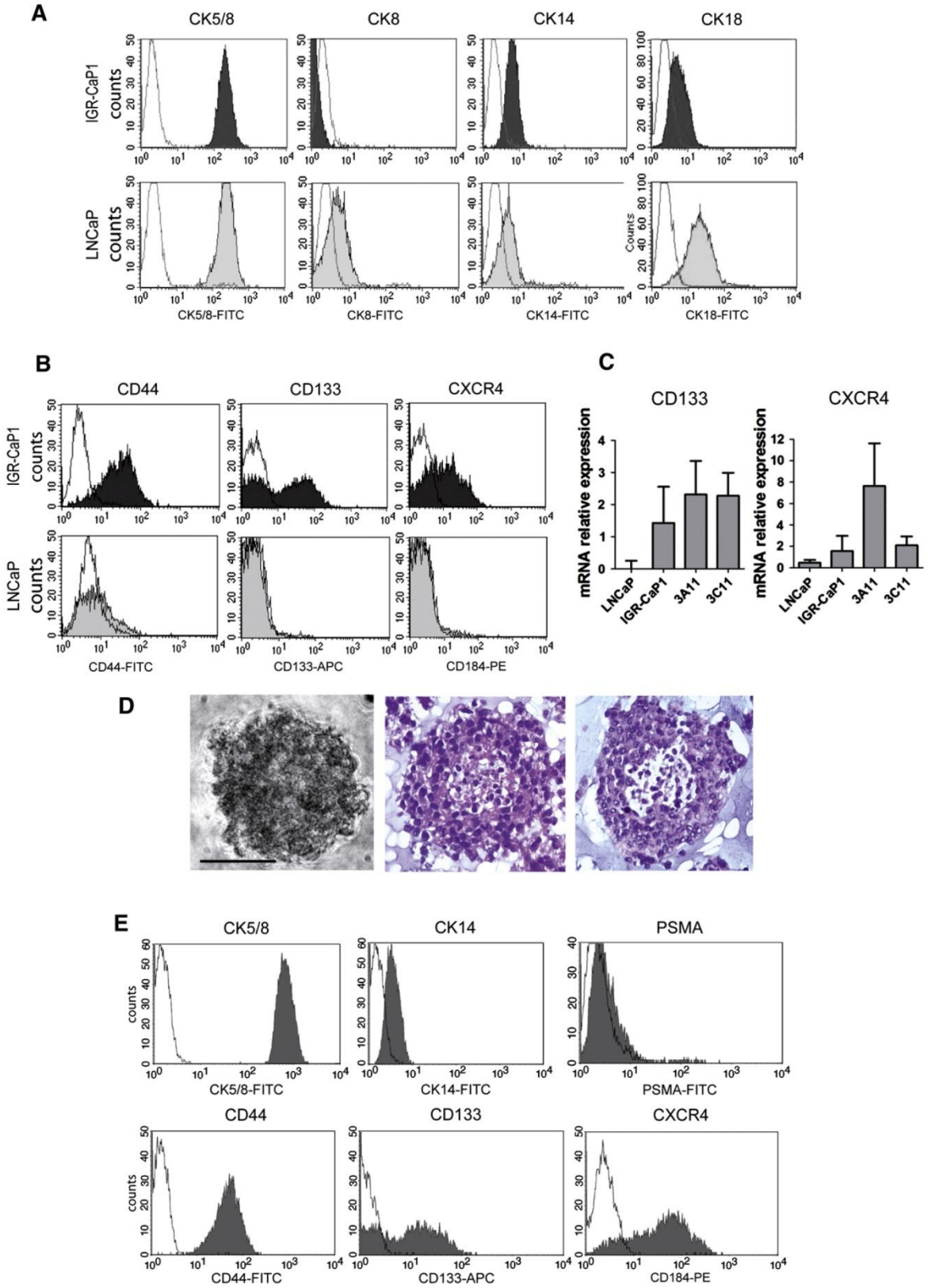
As the $\alpha2\beta1^{hi}/CD133^+$ phenotype is the hallmark of normal prostate epithelial stem cells [11], α2β1-integrin staining of IGR-CaP1 and clonally-derived clones was performed (Fig. 6A). High expression of these phenotypic markers in the IGR-CaP1 cells and the two clones 3A11 and 3C11, suggested the occurrence of a large subset of cells exhibiting the characteristics of stem cells, and possibly corresponding to stem cells.

We then explored whether other signalling pathways involved in stemness could be activated in IGR-CaP1 cells. We investigated Oct4 which was previously reported to be expressed in pluripotent embryonic stem (ES) cells and in hTERT-immortalized HPE (HPET) cells [14,29]. Microarray analysis performed on IGR-CaP1 cells revealed Oct4 gene expression. By using an antibody that exclusively recognizes the Oct-4 (OCT4A) isoform-1, Western Blot analysis confirmed Oct4 expression in IGR-CaP1 cells, unlike that found in LNCaP and PC3 cells used as controls (Fig. 6B). Since the Hedgehog (HH) signalling pathway regulates key functions of stem/progenitor cell self-renewal [30,31], we used real-time RT-PCR to assess its expression in IGR-CaP1 cells compared to the LNCaP cell line. The SHH gene was highly expressed in IGR-CaP1 cells with concomitant expression of GLI1 and GLI2 target gene products. The HH receptor Patched protein PTCH, which normally blocks the pathway, was slightly downregulated in IGR-CaP1 cells (Fig. 6C). Similar results were obtained in the two clones 3A11 and 3C11, except for the GLI2 gene which exhibited higher expression in the 3A11 clone and lower expression in the 3C11 clone.

We then assessed the expression of two other proteins which have been implicated in stem-like cell populations. We observed 4-fold higher expression of NOTCH1 gene in IGR-CaP1 cells compared to LNCaP cells, consistent with previous results showing that Notch gene expression was restricted to basal epithelial cells [32]. In agreement with detection of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 in basal epithelial CD133+ prostate cells [33], IGR-CaP1 cells also expressed a high level of mRNA coding for ABCG2 gene (Fig. 6D). Similar results were obtained in the two clones 3A11 and 3C11.

Discussion

Herein, we describe the establishment and characterization of a new prostate cancer cell line named IGR-CaP1 obtained from a primary prostate cancer. Although cell lines from primary prostate carcinomas are among the most difficult to establish *in vitro*, we took advantage of the natural extracellular matrix (IGR-XC) we recently developed and already used successfully to obtain cell lines derived from human carcinomas of unknown primary [34], to obtain a new cell line derived from a patient with a clinically localized prostate cancer. The IGR-CaP1 cell line was cultured up to passage 50. Nine clones were derived by limiting dilution cloning and two of them,


A
CK5/8
CK8
CK14
CK18
IGR-CaP1 counts
LNCaP counts
CK5/8-FITC
CK8-FITC
CK14-FITC
CK18-FITC
B
CD44
CD133
CXCR4
CD44-FITC
CD133-APC
CD184-PE
C
CD133
CXCR4
mRNA relative expression
LNCaP
IGR-CaP1
3A11
3C11
D
E
CK5/8
CK14
PSMA
CD44
counts
CK5/8-FITC
CK14-FITC
PSMA-FITC
CD44-FITC
CD133-APC
CD184-PE

3A11 and 3C11, were cultured up to passage 10. The complete identification of the new IGR-CaP1 cell line was achieved using STR profiling (Table 1).

The chromosome abnormalities confirmed malignancy in IGR-CaP1 cells which exhibited a tetraploid karyotype. Given the lack of prostate cancer models, telomerase-immortalized human prostate epithelial (HPET) cells provide useful models since they display prostate stem cell properties and also reconstitute the original prostate cancer specimen [14,15,31]. We showed that IGR-CaP1 cells spontaneously elicit high telomerase activity thus attesting the malignant potential of these cells. Undoubtedly, the endogenously hTERT-expressing IGR-CaP1 cells are more relevant to investigate the early steps of prostate oncogenesis because the key regulatory steps involved in telomerase activation in tumorigenesis may be missed in HPET cells. Somatic *Tp53* mutations in primary tumors are associated with prostate cancer progression and a propensity for metastasis [35,36]. In this respect, the missense mutation identified in the IGR-CaP1 cell line at position 126 of the Tp53 correlates with the high Tp53 protein expression found in both of these *in vitro* propagated cells and in the original tumor. It is possible that both properties, tetraploidy and mutated Tp53 expression, played a role in the establishment of the IGR-CaP1 cell line. Indeed, reports supported that tetraploid cells occur as an early step in tumor formation thus, conferring a survival advantage on tumor cells during the *in vitro* process [37]. Tetraploidy might have been maintained due to the presence of a mutated Tp53. Indeed, it has been shown that a "tetraploid checkpoint" is normally controlled by wild-type Tp53 to avoid the proliferation of tetraploid cells [38].

Interestingly, and consistent with the results obtained *in vitro*, the successful engraftment of IGR-CaP1 in nude mice plus their ability to metastasize to the liver and lung, enable us to propose IGR-CaP1 as an invaluable experimental model of PCa. Strikingly, preliminary data obtained 10 weeks after intra-tibia injections of the IGR-CaP1 cells into nude mice, imaged by high-resolution microCT scan, showed both osteoblastic and osteolysis lesions suggesting that these cells induced bone remodelling, as regularly observed in patient bone metastases (Supplementary Fig. 4).

IGR-CaP1 cells do not express AR nor the androgen-regulated gene PSA unlike the original tumor, suggesting a selective survival advantage of AR-negative cells and the loss of differentiated AR-positive cells during the early steps of *in vitro* tumor culture. Consistent with the lack of AR and PSA expression, the IGR-CaP1 cells express the basal epithelial cytokeratins, CK5 and CK14 and did not express the luminal CK8 markers. This is in full agreement with the working hypothesis of the occurrence of a small population of epithelial stem cells in the basal cell layer, giving rise to basal cells and intermediate transit-amplifying cells [31]. As we also detected CK18 expression, albeit at a much lower level, this strongly suggests that IGR-CaP1 cells mainly correspond to basal epithelial cells and that CK18 expression may be attributed to the existence of some intermediate transit-amplifying cells.

Considerable efforts are currently being expended to identify cells at the origin of prostate cancer. A growing body of literature supports that cancer lethality results from the hierarchical expansion of "cancer-initiating cells" or "cancer stem cells" (CSC), which function as stem-like cells to maintain malignant growth [39]. Several potential markers of CSCs have been used to identify putative CSCs in several solid cancers and can potentially be used to isolate and characterize CSCs. One of the major reported CSC markers is CD133 which is a marker for both human normal prostate stem cells and prostate CSC [11]. Other studies showed that putative prostatic stem cells with the $\alpha2\beta1^{hi}/CD44^{+}/CD133^{+}$ phenotype were able to reconstitute prostate-like acini in mice that expressed differentiated cell markers [12]. More recently, co-expression of CXCR4 was demonstrated in $CD133^{+}$ human prostatic epithelial cells immortalized with hTERT [15]. We showed that IGR-CaP1 cells exhibit high expression of cancer stem cell CD44, CD133 markers and CXCR4, and exhibit notably a high proportion (47%) of CD133-expressing cells thus clearly identifying two populations of CD133-positive and CD133-negative cells. Two sub-populations were also observed based on the wide difference in $\alpha2\beta1$-integrin labelling. Therefore, as multiple populations with CSC characteristics may co-exist either in the same cell line or in the same tumor, this strongly suggests that our cell line corresponds to CSC-derived cancer progenitor cells capable of giving rise to clonal expansion. Such an assessment is fully consistent with the conclusions of Campbell and Polyak, as well as Adams and Strasser [40,41] suggesting that although CSCs are a special subset of tumor cells, they still constitute a heterogeneous population with different biological properties.

There are several other signalling pathways including the HH and NOTCH pathways that are so far reported to be involved in the maintenance of stem or progenitor cells of many adult tissues, and also shown to operate in human PCa progression [42–48]. As a matter of fact, Sonic Hedgehog pathway (HH-GLI) activation and high expression of the NOTCH-1 gene suggest that this signalling pathway could be involved in the maintenance of the "CSC-like" population within the IGR-CaP1 cells. Oct-4 expression which was reported in HPET cells [14,16] and seems to play a crucial role in resistance to chemotherapy in lung cancer CD133+ cells [49], is also detected in IGR-CaP1 cells. It is noteworthy that high expression of the BCRP/ABCG2 gene provides an additional stem cell marker in the IGR-CaP1 cells. Taken together, this further suggests that the self-renewal genes including HH, Notch-1, Oct4 and ABCG2, may be implicated in the self-renewal properties of IGR-CaP1 cells.

In conclusion, the IGR-CaP1 cell line is a new model of prostate cancer derived from a primary tumor exhibiting high tumorigenic

Fig. 5 – Basal-type cytokeratin profile and cancer stem cell marker expression. (A) Cytokeratin marker expression was measured in IGR-CaP1 cells by FACS. LNCaP cells were used as controls. (B) The expression level of the stem cell markers CD44, CD133 and CXCR4 (also named CD184) was evaluated by flow cytometry. LNCaP cells were used as controls. (C) CD133 and CXCR4 gene expression levels were measured by QRT-PCR in IGR-CaP1 cells and in the clones 3A11 and 3C11 using a range of passages for the IGR-CaP1 cells (P26, P31, P48 and P64), P7, P8 and P10 for the 3A11 clone and P6, P7 and P9 for the 3C11 clone. Two different samples were used for the control LNCaP cell line. Results are expressed as means ± SD and compared to the LNCaP cells as the reference. (D) Anchorage-independent growth of IGR-CaP1 cells in soft-agar assay showing spheroids grown in RPMI medium. Representative HES-stained section. Scale-bar: 100 μm (E) Re-establishment of the IGR-CaP1 cell line after xenografting into nude mice. Basal cytokeratin profiles, stem cell markers and PSMA expression after engraftment in animals and re-establishment *in vitro* of IGR-CaP1 cells (P5). Results are representative of what was obtained in the 4 newly established cells after mouse engraftment.

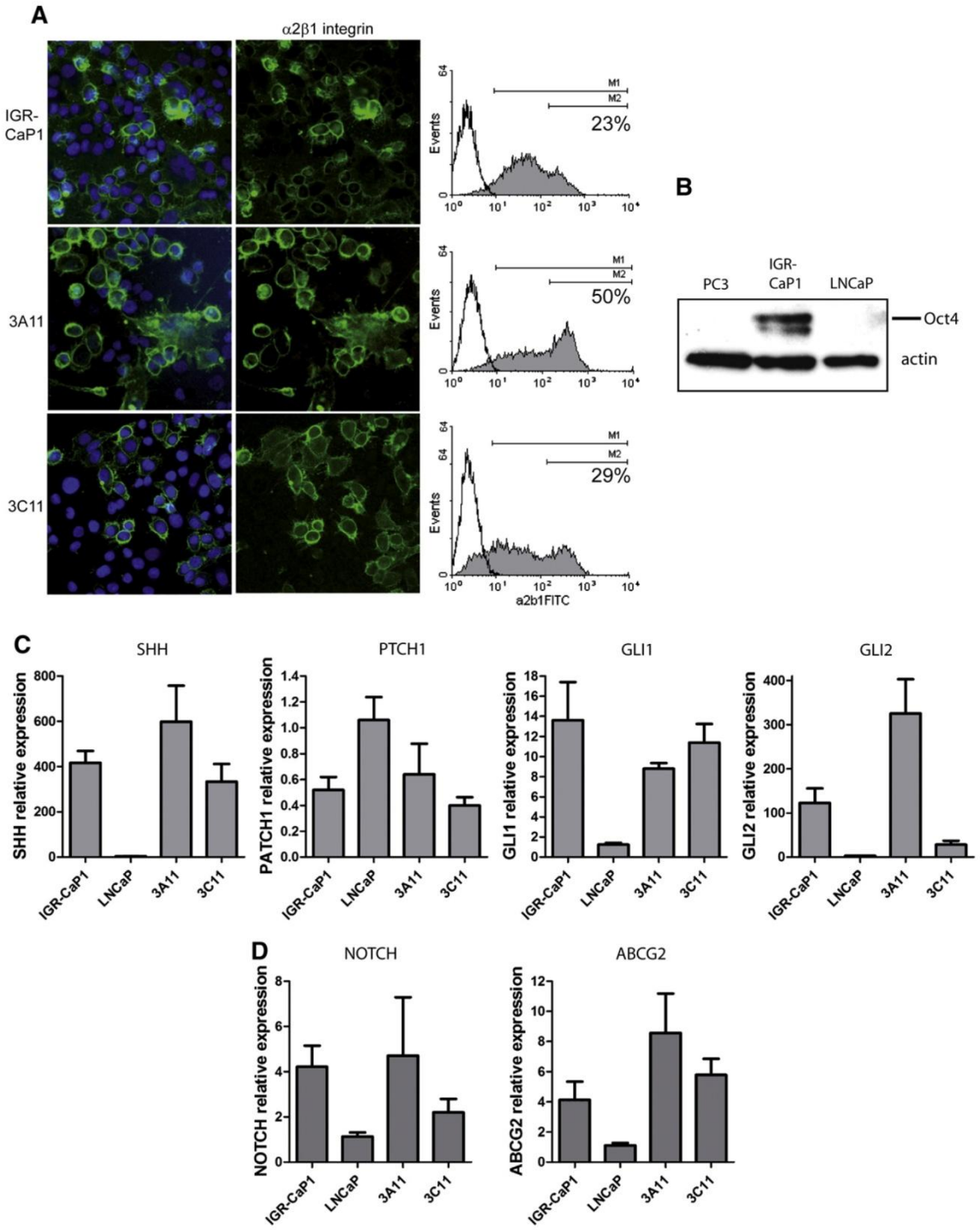


Fig. 6 – Stem cell signalling pathways in IGR-CaP1 cells. (A) α2β1-integrin was measured by immunofluorescence and by FACS in IGR-CaP1 cells and in the 3A11 and 3C11 clones, using anti-VLA-2 antibody. The nuclei were counterstained with Dapi. The fraction of α2β1integrin^{high}-expressing cells was estimated with the M2 marker (B) Oct4 expression was evaluated by blot analysis in IGR-CaP1 cell extracts and compared with that found in PC3 and LNCaP cells. (C and D) QRT-PCR was used to determine the expression level of markers identified as regulators of normal prostate stem/progenitor cells. Multiple passage levels were used as in Fig. 5C. Results are expressed as means ± SEM and compared to the LNCaP cells used as controls.

properties *in vivo*. Spontaneously immortalized, these mutated Tp53 tetraploid cells express hTERT and high-level expression of stem cell markers (CD44, CD133, α2β1-integrin). Additionally, the IGR-CaP1 cells possess additional CSC characteristics, namely a 3D sphere-forming ability and a renewal capacity by maintaining their CSC potential after xenografting into mice. Thus, the IGR-CaP1 cell line derived from a primary tumor represents an experimental model of an aggressive prostate tumor with stem cell properties. Moreover, the stem cell signature provides an invaluable tool for investigating the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiation. It could be used to study new therapeutic strategies both *in vitro* and *in vivo*, namely new therapeutic strategies targeting the stem cell properties of cancer cells.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.yexcr.2010.10.012.

Disclosure statement

This new IGR-CaP1 cell line was the subject of a European patent pending entitled "Prostate cancer cell lines and their use in screening method" deposed on the April 14th, 2009. Biological material has been deposited at the Pasteur Institut (Paris) (CNCM I-4126). The patented material will be available under a Material Transfer Agreement for research use.

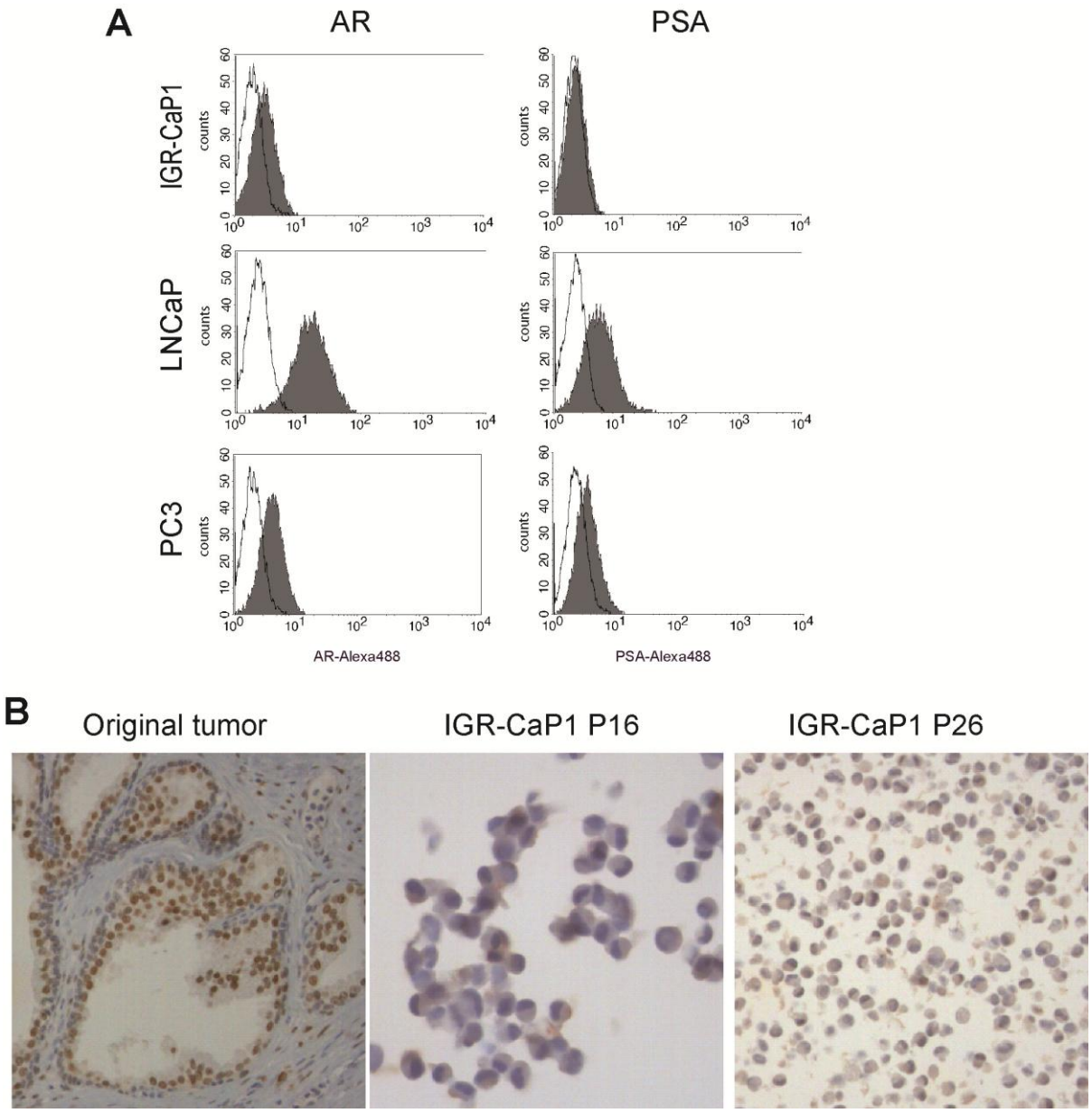
Acknowledgments

We would like to thank E. Connault and F. Tabarin for excellent technical assistance. We also thank gratefully F. Commo for his help in statistical analysis. N.A.N was supported by the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP) and is supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). D.C. is supported by ARTP (France), by the Prostate Cancer Research Fundation (PCRF, UK) and SALES Fundation (Argentina). We also thank L. Saint-Ange for editing.

REFERENCES

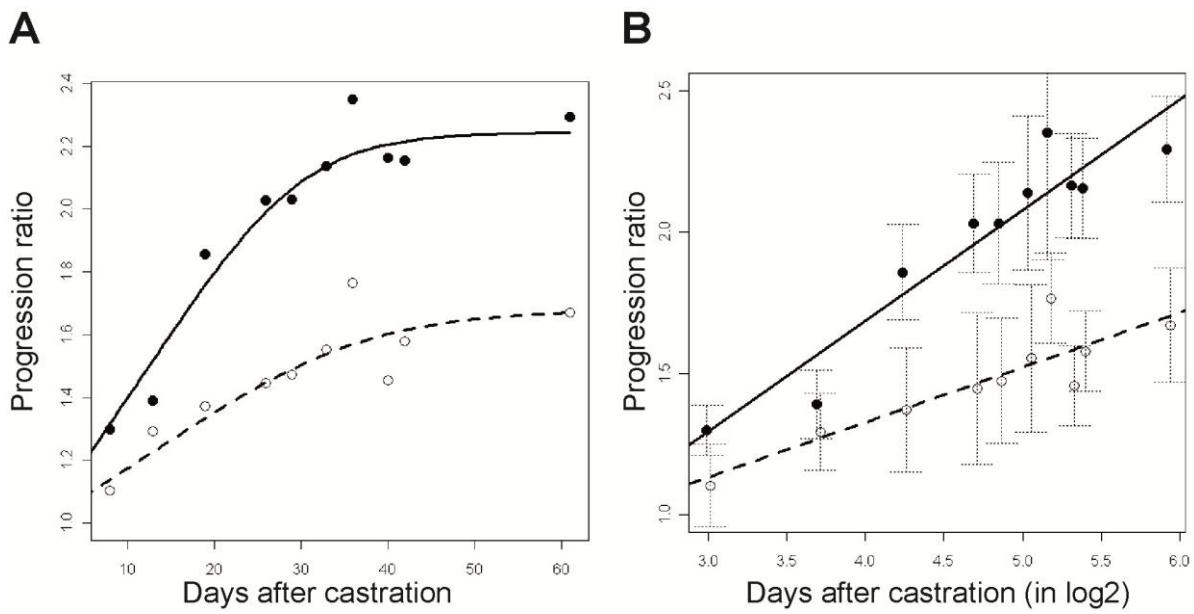
[1] A.M. Lin, E.J. Small, Prostate cancer update: 2007, Curr. Opin. Oncol. 20 (2008) 294–299.
[2] K. Fizazi, N.M. Navone, Preclinical models of prostate cancer, Bull. Cancer 92 (2005) 129–141.
[3] R.E. Sobel, M.D. Sadar, Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines-part 2, J. Urol. 173 (2005) 360–372.
[4] S. Koochekpour, G.A. Maresh, A. Katner, K. Parker-Johnson, T.J. Lee, F.E. Hebert, Y.S. Kao, J. Skinner, W. Rayford, Establishment and characterization of a primary androgen-responsive African-American prostate cancer cell line, E006AA, Prostate 60 (2004) 141–152.
[5] S.R. Selvan, A.N. Cornforth, N.P. Rao, Y.A. Reid, P.M. Schiltz, R.P. Liao, D.T. Price, F.S. Heinemann, R.O. Dillman, Establishment and characterization of a human primary prostate carcinoma cell line, HH870, Prostate 63 (2005) 91–103.
[6] J.M. D'Antonio, D.J. Vander Griend, L. Antony, G. Ndikuyeze, S.L. Dalrymple, S. Koochekpour, J.T. Isaacs, Loss of androgen receptor-dependent growth suppression by prostate cancer cells can occur independently from acquiring oncogenic addiction to androgen receptor signalling, PLoS ONE 5 (2010) e11475.
[7] G. Attard, S. Rizzo, I. Ledaki, J. Clark, A.H. Reid, A. Thompson, V. Khoo, J.S. de Bono, C.S. Cooper, D.L. Hudson, A novel, spontaneously immortalized, human prostate cancer cell line, Bob, offers a unique model for pre-clinical prostate cancer studies, Prostate 69 (2009) 1507–1520.
[8] J.E. Visvader, G.J. Lindeman, Cancer stem cells in solid tumors: accumulating evidence and unresolved questions, Nat. Rev. Cancer 8 (2008) 755–768.
[9] R.A. Taylor, G.P. Risbridger, The path toward identifying prostatic stem cells, Differentiation 76 (2008) 671–681.
[10] A.T. Collins, F.K. Habib, N.J. Maitland, D.E. Neal, Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha (2)beta(1)-integrin expression, J. Cell Sci. 114 (2001) 3865–3872.
[11] G.D. Richardson, C.N. Robson, S.H. Lang, D.E. Neal, N.J. Maitland, A.T. Collins, CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells, J. Cell Sci. 117 (2004) 3539–3545.
[12] A.T. Collins, P.A. Berry, C. Hyde, M.J. Stower, N.J. Maitland, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, Cancer Res. 65 (2005) 10946–10951.
[13] B. Daly-Burns, T.N. Alam, A. Mackay, J. Clark, C.J. Shepherd, S. Rizzo, R. Tatoud, M.J. O'Hare, J.R. Masters, D.L. Hudson, A conditionally immortalized cell line model for the study of human prostatic epithelial cell differentiation, Differentiation 75 (2007) 35–48.
[14] G. Gu, J. Yuan, M. Wills, S. Kasper, Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo, Cancer Res. 67 (2007) 4807–4815.
[15] J. Miki, B. Furusato, H. Li, Y. Gu, H. Takahashi, S. Egawa, I.A. Sesterhenn, D.G. McLeod, S. Srivastava, J.S. Rhim, Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens, Cancer Res. 67 (2007) 3153–3161.
[16] H. Li, J. Zhou, J. Miki, B. Furusato, Y. Gu, S. Srivastava, D.G. McLeod, J.C. Vogel, J.S. Rhim, Telomerase immortalized non-malignant human prostate epithelial cells retain the properties of multipotent stem cells, Exp. Cell Res. 314 (2008) 92–102.
[17] E. Ferrandis, J. Da Silva, G. Riou, J. Bénard, Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mouse, Cancer Res. 54 (1994) 2256–2261.
[18] W.W. Kao, D.J. Prockop, Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell populations, Nature 266 (1977) 63–66.
[19] K. Fizazi, J. Yang, S. Peleg, C.R. Sikes, E.L. Kreimann, D. Daliani, M. Olive, K.A. Raymond, T.J. Janus, C.J. Logothetis, G. Karsenty, N.M. Navone, Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 2587–2597.
[20] Z.P. Pavelic, H.K. Slocum, Y.M. Rustum, P.J. Creaven, N.J. Nowak, C. Karakousis, H. Takita, A. Mittelman, Growth of cell colonies in soft agar from biopsies of different human solid tumors, Cancer Res. 40 (1980) 4151–4158.
[21] M. Eura, K. Chikamatsu, F. Katsura, A. Obata, Y. Sobao, M. Takiguchi, Y. Song, E. Appella, T.L. Whiteside, A.B. DeLeo, A wild-type sequence p53 peptide presented by HLA-A24 induces cytotoxic T lymphocytes that recognize squamous cell carcinomas of the head and neck, Clin. Cancer Res. 6 (2000) 979–986.
[22] J. Couturier, B. Dutrillaux, Conservation of replication chronology of homologous chromosome bands between four species of the genus Cebus and man, Cytogenet. Cell Genet. 29 (1981) 233–240.
[23] K. Fizazi, C.R. Sikes, J. Kim, J. Yang, L.A. Martinez, M.C. Olive, C.J. Logothetis, N.M. Navone, High efficacy of docetaxel with and without androgen deprivation and estramustine in preclinical models of advanced prostate cancer, Anticancer Res. 24 (2004) 2897–2903.

[24] C.M. Counter, W.C. Hahn, W. Wei, S.D. Caddle, R.L. Beijersbergen, P.M. Lansdorp, J.M. Sedivy, R.A. Weinberg, Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization, Proc. Natl Acad. Sci. USA 95 (1998) 14723–14728.
[25] Z. Jiang, B.A. Woda, K.L. Rock, Y. Xu, P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma, Am. J. Surg. Pathol. 25 (2001) 1397–1404.
[26] S. Zha, S. Ferdinandusse, S. Denis, R.J. Wanders, C.M. Ewing, J. Luo, A.M. De Marzo, W.B. Isaacs, Alpha-methylacyl-CoA racemase as an androgen-independent growth modifier in prostate cancer, Cancer Res. 63 (2003) 7365–7376.
[27] M.J. Burger, M.A. Tebay, P.A. Keith, H.M. Samaratunga, J. Clements, M.F. Lavin, R.A. Gardiner, Expression analysis of delta-catenin and prostate-specific membrane antigen: their potential as diagnostic markers for prostate cancer, Int. J. Cancer 100 (2002) 228–237.
[28] L.W. Chung, A. Baseman, V. Assikis, H.E. Zhau HE, Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor Microenvironment, J. Urol. 173 (2005) 10–20.
[29] M. Boiani, H.R. Scholer, Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6 (2005) 872–884.
[30] P.A. Beachy, S.S. Karhadkar, D.M. Berman, Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis, Nature 432 (2004) 324–331.
[31] I.V. Litvinov, D.J. Vander Griend, Y. Xu, L. Antony, S.L. Dalrymple, J.T. Isaacs, Low-calcium serum-free defined medium selects for growth of normal prostatic epithelial stem cells, Cancer Res. 66 (2006) 8598–8607.
[32] J. Shou, S. Ross, H. Koeppen, F.J. de Sauvage, W.Q. Gao, Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis, Cancer Res. 61 (2001) 7291–7297.
[33] L.E. Pascal, A.J. Oudes, T.W. Petersen, Y.A. Goo, L.S. Walashek, L.D. True, A.Y. Liu, Molecular and cellular characterization of ABCG2 in the prostate, BMC Urol. 6 (2007) 6.
[34] D. Lequin, K. Fizazi, S. Toujani, S. Souquère, M.C. Mathieu, P. Hainaut, A. Bernheim, F. Praz, P. Busson, Biological characterization of two xenografts derived from human CUPs (carcinomas of unknown primary), BMC Cancer 7 (2007) 225.
[35] N.M. Navone, P. Troncoso, L.L. Pisters, T.L. Goodrow, J.L. Palmer, W.W. Nichols, A.C. von Eschenbach, C.J. Conti, p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma, J. Natl Cancer Inst. 85 (1993) 1657–1669.
[36] N.M. Navone, M.E. Labate, P. Troncoso, L.L. Pisters, C.J. Conti, A.C. von Eschenbach, C.J. Logothetis, p53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential, J. Urol. 161 (1999) 304–308.
[37] Z. Storchova, C. Kuffer, The consequences of tetraploidy and aneuploidy, J. Cell Sci. 121 (2008) 3859–3866.
[38] P.R. Andreassen, O.D. Lohez, F.B. Lacroix, R.L. Margolis, Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1, Mol. Biol. Cell 12 (2001) 1315–1328.
[39] M.S. Wicha, S. Liu, G. Dontu, Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift, Cancer Res. 66 (2006) 1883–1890.
[40] L.L. Campbell, K. Polyak, Breast tumor heterogeneity: Cancer stem cells or clonal evolution? Cell Cycle 6 (2007) 2332–2338.
[41] J.M. Adams, A. Strasser, Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? Cancer Res. 68 (2008) 4018–4021.
[42] P. Sanchez, A.M. Hernández, B. Stecca, A.J. Kahler, A.M. DeGueme, A. Barrett, M. Beyna, M.W. Datta, S. Datta, A. Ruiz, i Altaba, Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with Sonic Hedgehog-GLI1 signaling, Proc. Natl Acad. Sci. USA 101 (2004) 12561–12566.
[43] S.S. Karhadkar, G.S. Bova, N. Abdallah, S. Dhara, D. Gardner, A. Maitra, J.T. Isaacs, D.M. Berman, P.A. Beachy, Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis, Nature 431 (2004) 707–712.
[44] T. Sheng, C. Li, X. Zhang, S. Chi, N. He, K. Chen, F. McCormick, Z. Gatalica, J. Xie, Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer, Mol. Cancer 3 (2004) 29.
[45] B.Y. Chen, J.Y. Liu, H.H. Chang, C.P. Chang, W.Y. Lo, W.H. Kuo, C.R. Yang, D.P. Lin, Hedgehog is involved in prostate basal cell hyperplasia formation and its progressing towards tumorigenesis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 357 (2007) 1084–1089.
[46] S. Thiyagarajan, N. Bhatia, S. Reagan-Shaw, D. Cozma, A. Thomas-Tikhonenko, N. Ahmad, V.S. Spiegelman, Role of GLI2 transcription factor in growth and tumorigenicity of prostate cells, Cancer Res. 67 (2007) 10642–10646.
[47] M. Zayzafoon, S.A. Abdulkadir, J.M. McDonald, Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines, J. Biol. Chem. 279 (2004) 3662–3670.
[48] N. Scorey, S.P. Fraser, P. Patel, C. Pridgeon, M.J. Dallman, M.B. Djamgoz, Notch signalling and voltage-gated Na1 channel activity in human prostate cancer cells: independent modulation of in vitro motility, Prostate Cancer Prostatic Dis. 9 (2006) 399–406.
[49] Y.C. Chen, H.S. Hsu, Y.W. Chen, T.H. Tsai, C.K. How, C.Y. Wang, S.C. Hung, Y.L. Chang, M.L. Tsai, Y.Y. Lee, H.H. Ku, S.H. Chiou, Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells, PLoS ONE 3 (2008) e2637.



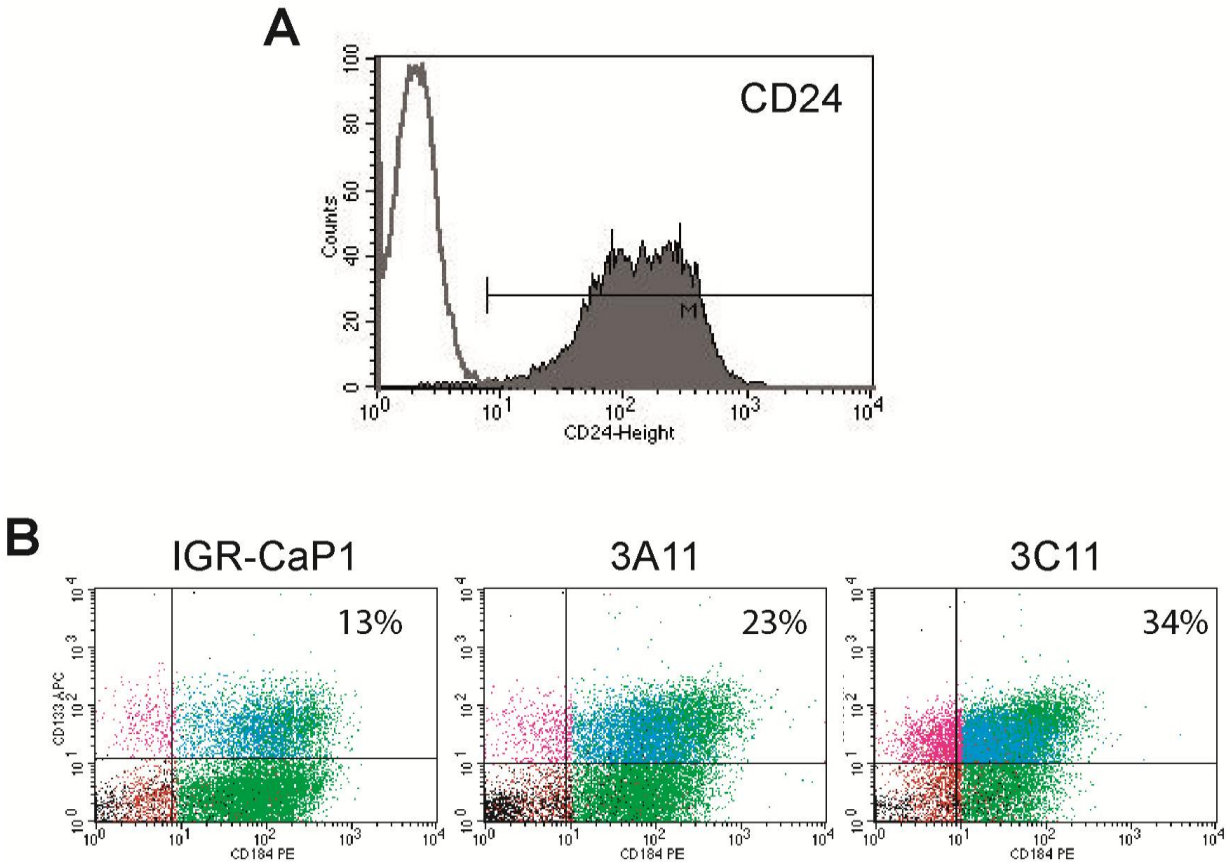
Supplementary Figure 1: Absence of AR and PSA expression in IGR-CaP1 cells

(A) Determination of *in vitro* AR and PSA expression. Protein expression was measured in IGR-CaP1 cells by FACS analysis using the rabbit KLK3 (PSA) (C-19, Santa-Cruz) and rabbit AR (N-20, Santa-Cruz) primary antibodies and Alexa Fluor 488 dye-labelled secondary antibody. LNCaP cells were used as the positive control and PC3 cells were used as the negative control. (B) Comparison of AR expression between the original tumor and the early passages of IGR-CaP1. IHC showing AR expression in the luminal epithelial cells of the initial prostatic tumor and the absence of AR expression in the IGR-CaP1 cell line. Tumor and cell sections were incubated with the anti-AR antibody (N20, Santa Cruz).



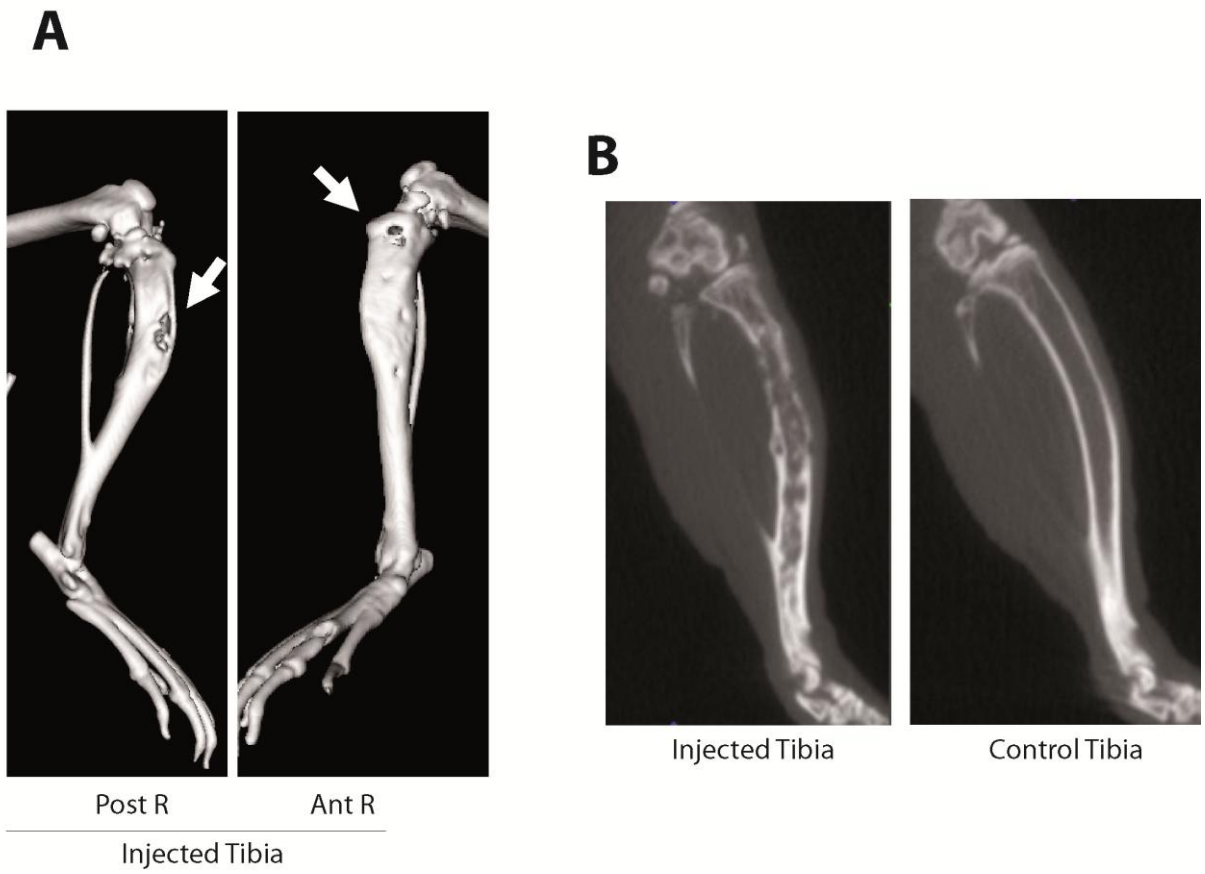
Supplementary Figure 2: Response of IGR-CaP1 tumors to castration.

Tumor progression ratios were determined at different time points for the castrated group (○, n=5) and for the control group (●, n=9), by comparing the tumor volume to the initial volume at day 0 (point before castration) for each experiment, independently. (A) Adjustment of a 5-parameter logistic regression model on the average of the observed values at each time point. (B) Linear regression of progression according to time in log2 (days), with SEM. Adjusted R^2 = 0.8871 for the control group (●), adjusted R^2 = 0.7741 for the castrated group (○). Comparison between the two groups using a general linear model analysis indicated a significant time-dependent effect of castration on progression with a risk of 10% (interaction p value = 0.0959).



Supplementary Figure 3: CSC expression by FACS analyses

(A) CD24 expression in IGR-CaP1 cells. The expression of cytokeratin markers was measured in IGR-CaP1 cells by FACS using the mouse CD24-FITC antibody (Clone ML5, BD Biosciences). All the IGR-CaP1 cells were CD24 positive. (B) Determination of the triple $CD44^+$ $CD133^+$ $CXCR4^+$ -labelled cells. The combination of CD44/CD133/CXCR4 biomarker expression was measured by flow cytometry using CD44-FITC, CD133-APC and CD184-PE (CXCR4-PE), in IGR-CaP1 cells and in the clones 3A11 and 3C11. Triple-color stained cells were sorted with a cell sorter (MoFlo–Dako). Cells were gated on CD44 positive cells (red). The colors corresponding to the different fractions were; $CD44^+CD184^+$ in green, $CD44^+CD133^+$ in pink, $CD44^+CD133^+CD184^+$ in blue. The percentage of the triple-labelled cells is indicated for each cell line.



Supplementary Figure 4: Bone remodelling after direct bone injection of IGR-CaP1 cells

Evaluation of IGR-CaP1-induced bone lesion development using microCT scan. IGR-CaP1 cells ($0.5x10^6$) were injected directly into the tibia of anesthetized nude mice. A microCT scan was assessed 10 weeks post implantation. A. 3D isosurface reconstructions of microCT data on an anterior-posterior view. Arrows show the osteolytic lesions in the injected tibia. B. Longitudinal coronal sections bisecting the injection site. Images are representative of results obtained in 86% (6/7) injected nude mice.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Androgen ablation in nude mice

Surgical castration was used for androgen ablation in 5 mice, 37 days after tumor cell engraftment when tumors attained approximately 300 mm^3. Non-castrated mice (n=9) were used as controls.

TaqMan RT-PCR primer sequences

Taqman PCR primers were purchased from Applied Biosystems. The corresponding reference and known sequence are indicated as follows:

Androgen receptor (AR) , Hs00171172_m1, CTTGCCTGGCTTCCGCAACTTACAC

PSA (KLK3), Hs02576345_m1, TCCGTGACGTGGATTGGTGCTGCAC

Sonic Hedghog (SHH), Hs00179843_m1, GTGAAAGCAGAGAACTCGGTGGCGG

PATCH1 (PTCH1), Hs00970980_m1, TGTGGGTGGAAGTTGGAGGACGAGT

GLI1, Hs00171790_m1, TGTCCCACACCGGTACCACTGTGTC

GLI2, Hs00257977_m1, GAGCTCCGGGCTGTGTCAGTCCAGC

NOTCH1, Hs01062014_m1, AGATATGCAGAACAACAGGGAGGAG

ABCG2, Hs01053790_m1, GAGGCAAATCTTCGTTATTAGATGT

CD133 (PROM1), Hs01009261_m1, TGGTCCAACAGGGCTATCAATCCCT

CXCR4 (CD184), Hs00607978_s1, CATCCTGTCCTGCTATTGCATTATC

For CD44 determination, primers were purchased from MWG Biotech, France. The primer sequences were forward primer: 5’-GCTGAGCCTGGCGCAG-3’; reverse primer: 5’- GTAGCGACCATTTTTCTCCACG-3’ and labelled probe: Fam-CGATTTGAATATAACCTGCCGCTTTGCA-Tamra

ARTICLE 2: REPRODUCING BONE WIDESPREAD OF HUMAN PROSTATE CANCER IN IGR-CAP1 *IN VIVO* MODEL

Nader Al Nakouzi, Olivia Bawa, Alain Le Pape, Stéphanie Lerondel, Catherine Gaudin, Paule Opolon, Patrick Gonin, Karim Fizazi, and Anne Chauchereau

Manuscrit soumis pour publication à *American Journal of Pathology* le 24 juin 2011

INTRODUCTION:

Actuellement, les mécanismes de développement des métastases osseuses du CaP ne sont pas totalement élucidés. Un des obstacles majeurs dans l'étude de la biologie des métastases de CaP a été le nombre limité de modèles animaux qui récapitulent le phénomène métastatique osseux observé chez l'homme. Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre II, la majorité des modèles disponibles ne permet d'étudier que les stades tardifs du processus métastatique osseux et induisent majoritairement des lésions ostéolytiques différentes de celles du CaP humain à fort caractère ostéocondensant ou mixte.

Dans la mesure où nous avons observé que les xénogreffes S.C. et orthotopiques de la lignée IGR-CaP1 induisent des métastases poly-viscérales mais n'entrainent pas l'apparition de métastases osseuses détectables chez la souris nude, nous avons cherché à obtenir des métastases osseuses par injection intra-osseuse directe et par injection dans la circulation sanguine par voie intra-cardiaque. La disponibilité du modèle bioluminescent a été cruciale dans cette étude, nous permettant de suivre la croissance tumorale et de détecter la formation de métastases et micro-métastases dans l'os.

Nous avons observé que les injections intra-osseuses génèrent des masses tumorales intra-osseuses qui persistent plusieurs mois après l'injection. Les injections intracardiaques génèrent des métastases osseuses au niveau des membres inférieurs, la colonne vertébrale et la mandibule. Dans les deux cas, les métastases obtenues sont associées à des lésions ostéoblastiques à la fois radiologiques et histologiques comparables à ce qui est observé chez l'homme.

Nous avons également recherché dans notre modèle l'expression de protéines souvent surexprimées dans les métastases osseuses ou impliqués dans le remodelage osseux du CaP humain. Nous avons étudié par RT-PCR quantitative l'expression de certains gènes au niveau des métastases osseuses obtenues par injection directe et avons établi une signature de gènes fortement exprimés au niveau des métastases osseuses dans le modèle IGR-CaP1. Ces gènes pourraient constituer des cibles thérapeutiques intéressantes pour déterminer les métastases osseuses.

Bone metastasis of human prostate cancer in the IGR-CaP1 in vivo model

Nader AL NAKOUZI[1,5], Olivia BAWA[2,5], Alain LE PAPE[3], Stéphanie LERONDEL[3], Catherine GAUDIN[1,5], Paule OPOLON[2,5], Patrick GONIN[4,5], Karim FIZAZI[1,5], and Anne CHAUCHEREAU[1,5*]

[1]Prostate Cancer Group, INSERM U981, Institut Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France

[2]Experimental Pathology Unit of IRCIV, Institut Gustave Roussy, Villejuif

[3]UPS44 TAAM-CIPA, CNRS, Orléans, F-45071, France

[4]Animal and Veterinary Resources, Institut Gustave Roussy, Villejuif

[5]University Paris-Sud 11, France

* corresponding author

Number of text pages: 20 (word count for the text only: 5058)

Number of figures: 6; Number of tables: 1; Number of supplementary figures: 2

Running head title: IGR-CaP1 is a preclinical model of prostate cancer

Corresponding author: Anne Chauchereau, PhD

Prostate Cancer Group, INSERM U981, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif, F-94805, France

Tel: +33 1 42 11 66 07, Fax: +33 1 42 11 60 94, E-mail: anne.chauchereau@igr.fr

DISCLOSURE STATEMENT

The new IGR-CaP1 cell line was the subject of an international patent pending, entitled "Prostate cancer cell lines and their use in screening method" and deposed on the April 14th, 2009. Biological material has been deposited at the Pasteur Institute (Paris) (CNCM I-4126). The patented material will be available under a Material Transfer Agreement for research use.

ABSTRACT

Bone metastases are the main cause of death from prostate cancer. Animal models are important tools to investigate the pathogenesis of the disease and to develop treatment strategies for bone metastases, but few animal models recapitulate spontaneous clinical bone metastatic spread. In the present study, IGR-CaP1, a new cell line derived from primary prostate cancer, was stably transduced with a luciferase-expressing viral vector to monitor tumor growth in mice using bioluminescence imaging. The IGR-CaP1 tumors grew when subcutaneously injected or when orthotopically implanted, reconstituted the prostate adenocarcinoma with glandular acini-like structures, and could disseminate to the liver and lung. Bone metastases were detected using bioluminescence imaging following direct intratibial or intracardiac injections. Anatomical bone structure assessed using high-resolution computerized tomography (CT) scans showed both lytic and osteoblastic lesions. ^{99m}Tc-MDP micro single-photon emission computed tomography (SPECT) confirmed the mixed nature of the lesions and the intensive bone remodeling. We also identified an expression signature for responsiveness of IGR-CaP1 cells to the bone microenvironment, namely expression of CXCR4, MMP-9, Runx2, osteopontin, OPG and HBB in bone lesions. The IGR-CaP1 cell line is a unique model derived from a primary tumor and can reconstitute human prostate adenocarcinoma in animals and generate bone metastases, providing a novel means for understanding the mechanisms that contribute to bone metastasis and allowing preclinical testing of new therapies.

Abstract word count: 220 words

KEYWORDS

Prostate cancer, bone remodeling, metastasis, mixed bone lesions, xenografted models

INTRODUCTION

Prostate cancer is the most commonly diagnosed cancer in men in the Western world and is the second leading cause of male cancer deaths (1). Prostate cancer has a high propensity to metastasize to bone, and virtually all patients who die from prostate cancer have bone metastases (2). Patients with bone metastases suffer from severe pain, nerve compression syndromes and pathologic fractures. Prostate cancer that has metastasized to bone remains incurable, and in most patients, a fatal outcome is linked to bone metastases rather than to the primary tumor (3). Although bone metastases are particularly difficult to target, the knowledge of tumor progression and metastasis has recently improved with the emergence of new bone-specific therapies. However, the survival benefit of these new bone-specific agents is unclear, and understanding the mechanisms of tumor metastasis remains a challenge. These challenges are obstacles to improving cancer treatment and prognosis.

Under normal conditions, bone undergoes continuous remodeling in a tightly coordinated and balanced process of osteoclast-mediated bone resorption and osteoblast-mediated bone formation. Bone metastasis is mediated by an imbalance between osteoblasts and osteoclasts that is induced by tumor cells (4). Prostate tumor cells in the bone environment begin to secrete several factors associated with bone remodeling in a process called osteomimicry (5). Some of these factors have osteogenic properties, including the bone morphogenetic proteins and endothelin-1. Other factors, such as parathyroid hormone-related protein, trigger inhibition of osteoblast growth. Additional factors indirectly enhance bone production (e.g., transforming growth factor-β), enhance osteosclerosis (e.g., osteoprotegerin (OPG)) or directly initiate osteoclastogenesis (e.g., receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) and RANK ligand (RANKL)). In prostate cancer, bone

metastases are primarily osteoblastic; however, high bone turnover and consequent excessive bone resorption are also characteristic features of the disease (6).

The molecular mechanisms underlying the bone tropism of prostate cancer metastasis remains unclear. This gap in knowledge is partly due to difficulties both in obtaining metastatic tissue from patients and in generating mouse models that display bone metastasis. Preclinical models are needed to investigate this mechanism and to constitute a useful niche for proof of concept in preclinical evaluations of new therapies. The most popular current models are the PC-3, LNCaP, and DU145 cells and their derived sublines. While these cell line models represent a major advance in the field of prostate cancer research, they have several inherent drawbacks. In particular, the multistep development of cancer in xenografts remains far from the physiologic reality because most xenografted tumors and tumor cell lines selectively represent the histology and metastatic patterns of human tumors at an advanced stage. Moreover, few *in vivo* models mimic the natural progression and dissemination of prostate cancer. For example, the PC3 preclinical model generates only osteoclastic lesions (7). Indeed, few models reproduce osteoblastic or mixed osteolytic/blastic lesions when implanted in the bones of immunocompromised mice, corresponding to the most frequent phenotype in patients. To date, these models are limited to the LNCaP-derived C4-2B, LuCaP 23.1, LAPC9, MDA-PCa-2b, and 22Rv1 preclinical models (8-15). Dynamically monitoring the metastatic development with imaging technology, such as bioluminescence imaging (BLI), currently provides a tremendous advantage for studying bone metastases in xenograft models. However, the availability of luciferase-expressing models to achieve the follow-up of bone metastasis development using BLI remains quite limited. Indeed, some of these models cannot be grown in culture as LAPC9 and LuCaP series. Thus, new animal models that more closely mimic the human disease are required

for a better understanding of the molecular mechanisms of prostate cancer bone metastasis and preclinical research.

Unlike many other cell lines that have been obtained from prostate tumor metastases, the IGR-CaP1 cell line was established from a localized epithelial prostate cancer, which makes it a better model to reflect the mechanisms of tumor progression from localized cancer to metastatic disease. In this report, we describe the establishment of the new IGR-CaP1 preclinical model, which can reconstitute human prostate adenocarcinoma in animals. We have engineered these cells to express firefly luciferase for visualizing the development of metastases and showed that this model metastasizes to bone by intratibial injections or by inoculation of cells into the left cardiac ventricle of nude mice. We identified a signature of genes that are highly expressed in tumor cells during the bone remodeling process. Thus, this model provides a novel means for identifying and understanding mechanisms that contribute to bone metastasis and allows for preclinical testing of new anticancer therapies, specifically bone-targeting therapies.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

The human androgen-independent prostate cancer IGR-CaP1 cell line was established in the laboratory from a primary prostate cancer (16). PC3 cell line was purchased from ATCC-LGC (Molsheim, France). IGR-CaP1 and PC3 cells were grown in RPMI medium containing 10% FBS (PAA Laboratories, France) and antibiotics under standard culture conditions.

Retroviral vector production and transduction of IGR-CaP1 cells

To obtain the IGR-CaP1-Luc cells, we employed a retrovirus expressing the luciferase gene (pMEGIX-Luc vector), which was kindly provided by Dr. J.L. Villeval (UMR 1009, Villejuif, France). This retroviral vector carries an expression cassette encoding the firefly luciferase and green fluorescent protein (GFP) genes separated by an internal ribosomal entry site. The Luc-GFP viruses were produced by transient transfection of 293T cells according to standard protocols (17). Briefly, subconfluent 293T cells were cotransfected with 20 µg of the luciferase-expressing plasmid vector, 13 µg of pCMV-Gag-Pol, and 7 µg of pVSVG by calcium phosphate precipitation. After 16 h, the culture medium was changed, and the recombinant retrovirus was harvested 48 h later. For transduction, viruses were added to cells for 24 h. The GFP-positive IGR-CaP1 luciferase-expressing cells were sorted for green fluorescence using a MoFlo cell sorter (Beckman-Coulter) before amplification.

Animal tumor models

All animal experiments were approved by the local Ethics Committee (CEEA IRCIV / IGR n°26, registered with the French Ministry of Research) and were in compliance with Directive EU

63/2010. IGR Animal Resources holds an NIH-DHHS Animal Welfare Insurance (# A5660-01) and is in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Six-week-old male athymic nude mice (NC-nu/nu) were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). IGR-CaP1 cells (10^7) were implanted subcutaneously in the right rear flank region of nude mice without matrigel. For orthotopic injections, IGR-CaP1-Luc cells (10^6) in 20 µl of PBS were injected after exposure into the prostatic lobe at the base of the seminal vesicles through a midline laparotomy incision as previously described (15). Tumor size resulting from subcutaneous xenograft was measured with calipers. The following formula was used to calculate tumor volumes: $V= 0.52xLxl^2$. Bioluminescence imaging was used to follow the tumor growth of intraprostatic tumors. The mice were euthanized, and tumors were excised and measured.

Experimental metastasis model

For the intratibial and intracardiac injections, mice were maintained under isoflurane anesthesia during the injection procedure. A 29-gauge needle was inserted extra-capsulary through the tibial crest, the epiphysis and the growth plate. IGR-CaP1-Luc cells ($5x10^5$ cells in 100 µl PBS) were injected in the bone marrow space of the right tibia. The left tibias were either not injected or injected with PBS alone to serve as controls and to evaluate the effect of injection trauma on bone remodeling. Animals were monitored the day after injection and for 5 weeks after injection of IGR-CaP1-Luc cells. After the mice were sacrificed, the tumors and contra-lateral tibias were harvested. For intracardiac injections, IGR-CaP1-Luc cells ($5x10^5$) were suspended in 100 µl of 5% sterile glucose solution and were injected into the left ventricle using a 29-gauge needle after confirmation of the location of the tip of the needle in the left ventricle as indicated by pulsatile blood flow in the hub of the needle. Animals were monitored the day after injection and for 5 weeks after injection of IGR-CaP1-Luc cells.

Micro X-ray computed tomography (CT)

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and were imaged using a micro CT (CT 120, General Electric). During imaging, 360° X-ray projections were collected in 1° increments (80 kVp; 450 µA; 120 ms exposure time for approximately 25 min total scan time). Projection images were preprocessed and reconstructed into 3-dimensional (3D) volumes (10,243 voxels, 93 µm resolution) on a 4 PC reconstruction cluster using a modified tent-FDK cone beam algorithm (GE reconstruction software). Three-dimensional data were processed and rendered (isosurface/maximum intensity projections) using MicroView (GE Healthcare). Data analysis was performed first on individual slices (axial, coronal, sagittal) and then on 3D reconstructed volumes.

Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)

Methylene diphosphonate (^{99m}Tc-MDP) is a conventional bone scintigraphy agent widely used for functional imaging of bone remodeling that reflects bone blood flow and osteoblastic activity. MDP is tagged with Tc99m to generate ^{99m}Tc-MDP, which selectively concentrates in the bone via its chemical adsorption to the crystalline structure of hydroxyapatite. Mice were injected in the tail vein with 18 MBq ^{99m}Tc-MDP, and images were recorded 60 min after injection. Mice were anesthetized with 1.5-2 % isoflurane in oxygen and were transferred onto the warmed bed of a NanoSPECT/CT (Bioscan, Washington, USA), a small animal imaging system based on multiplexed multi-pinholes technology to preserve both sensitivity and resolution. This device incorporates parallel helical CT scanning. Image acquisition parameters were 24 projections and 30 to 60 s/image, depending upon activity. Dedicated software (InVivoScope 1.39) was used to reconstruct 3D SPECT/CT fusion images and to quantify radioactivity. Image analysis was

performed both qualitatively by comparing the fusion images with bioluminescence and CT data and quantitatively by assessing radioactivity in volumes of interest drawn around tumors in both legs. The results are expressed as percent of injected doses. *P*-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Immunohistochemistry (IHC)

After imaging, the tissue specimens were collected and fixed in Finefix (Milestone Medical, Bergamo, Italy). The fixed skeleton specimens were decalcified with the Sakura TDE 30 decalcifier system (Sakura, Japan) for 30 min to 90 min, according to the type of bone. Decalcified femur, tibia, skull, and the lower half of the spine were embedded in paraffin after tissue processing. All long bones were cut sagittally and along a longitudinal axis through the center of each bone. The spines were cut along an anterior-posterior axis. Skulls were also sagittally dissected from the mid-line. Serial paraffin sections (4 µm thick) were processed and routinely stained with hematoxylin-eosin-safranin (HES). Tumor and organ sections were incubated with anti-Ki67 (clone SP6, Thermo Scientific), mouse monoclonal anti-vimentin (clone V9, Dako), mouse monoclonal anti-PSAP (PASE/4LJ) (Diagnostic BioSystems), rabbit polyclonal anti-P504S/AMACR (Diagnostic BioSystems), rat anti-mouse CD34 antibody (1:20; Hycult Biotechnology), mouse monoclonal anti-Runx2 (27-K, Santa Cruz), or rabbit polyclonal anti-MMP-9 (Cell Signaling) antibodies. Immunostaining was visualized with various secondary antibodies according to the species of the primary antibody using rabbit or mouse PowerVision Kit (ImmunoVision Technologies, Burlingame, CA). Immunohistological signals were finally revealed with the peroxidase/diaminobenzidine chromogenic substrate. All sections were analyzed using a Zeiss Axiophot microscope, and images were acquired with a SensiCam PCO digital camera.

Bioluminescence imaging

Mice were injected intraperitonealy with D-luciferin potassium salt (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) (15 mg/ml in sterile water) 15 min prior to being imaged. The mice were anesthetized with 2% isoflurane and were imaged in dorsal and ventral positions using an IVIS 50 cooled charge-coupled device camera system (Caliper Life Sciences) to monitor tumor growth and metastases dissemination. After acquiring a gray-scale photograph, a bioluminescent image was obtained with a 12-cm field of view, a binning (resolution) factor of 8, and a 1/*f* stop and open filter. Regions of interest (ROIs) were defined manually (using a standard area in each case), and signal intensities were calculated with Living Image software (Caliper Life Sciences) and expressed as photons per second. Background photon flux was defined from a ROI drawn over a control.

TaqMan Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Analysis

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to confirm expression of bone metastasis specific markers in intratibial-injected mice. Total RNA was extracted from bone tissues using the TriReagent protocol (Invitrogen), and 5 µg of RNA was reversed transcribed using random hexamers (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed with the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 5 µl of 1:20 diluted cDNA in a final volume of 25 µl according to the manufacturer's recommendations. The primer/probe sets were obtained from Applied Biosystems (HBB: Hs00758889_s1; TNFRSF11B/OPG: Hs00900358_m1; SPP1/osteopontin: Hs00959010_m1; CXCR4: Hs00607978_s1) and were used according to the manufacturer's recommendations. The amount of sample RNA was normalized to the amplification of an internal human control (GAPDH-435293E, Applied Biosystems). In each experiment, the relative quantification of the

Bioluminescence imaging

Mice were injected intaprostatically with D-luciferin potassium salt (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) (15 mg/ml in sterile water) 15 min prior to being imaged. The mice were anesthetized with 2% isoflurane and were imaged in dorsal and ventral positions using an IVIS 50 cooled charge-coupled device camera system (Caliper Life Sciences) to monitor tumor growth and metastases dissemination. After acquiring a gray-scale photograph, a bioluminescent image was obtained with a 12-cm field of view, a binning (resolution) factor of 8, and a 1/*f* stop and open filter. Regions of interest (ROIs) were defined manually (using a standard area in each case), and signal intensities were calculated with Living Image software (Caliper Life Sciences) and expressed as photons per second. Background photon flux was defined from a ROI drawn over a control.

TaqMan Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Analysis

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to confirm expression of bone metastasis specific markers in intratibial-injected mice. Total RNA was extracted from bone tissues using the TriReagent protocol (Invitrogen), and 5 µg of RNA was reversed transcribed using random hexamers (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed with the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 5 µl of 1:20 diluted cDNA in a final volume of 25 µl according to the manufacturer's recommendations. The primer/probe sets were obtained from Applied Biosystems (HBB: Hs00758889_s1; TNFRSF11B/OPG: Hs00900358_m1; SPP1/osteopontin: Hs00959010_m1; CXCR4: Hs00607978_s1) and were used according to the manufacturer's recommendations. The amount of sample RNA was normalized to the amplification of an internal human control (GAPDH-435293E, Applied Biosystems). In each experiment, the relative quantification of the

transcripts was derived using the ddCT method and was expressed relative to the Universal Human Reference RNA (Agilent Technologies, Massy, France). The results were compared to the results from total RNA extracted from a subcutaneous xenograft.

RESULTS

Time-course progression of IGR-CaP1 tumors

Tumors grew after either subcutaneous injection (Figure 1A) or injection of suspended IGR-CaP1 cells into the prostate (Figure 1B) of athymic nude mice. Subcutaneous xenografts were palpable two weeks after injection, with a tumor take of 100% (20 mice). Tumors started to grow at week 3; tumors of ~300 mm^3 were obtained after 6 weeks, and they reached a maximum size of ~500 mm^3 after 15 weeks. No mortality was observed up to 15 weeks after injection.

In an effort to specifically follow the tumor growth noninvasively via BLI, we generated a luciferase- and GFP-expressing IGR-CaP1 cell line by retroviral transduction. Forty-eight hours after transduction, GFP-positive cells were sorted and amplified. GFP-positive, luciferase-expressing cells were inoculated into the prostate of nude mice (n=9), and tumor growth was followed over 40 weeks using BLI. The tumor take was 84% (28/33 mice). The mice were scanned every 3-4 weeks. Prostate tumors were confirmed after excision from the euthanized animal at the end of the experiment. In a group of 9 implanted mice, we observed a slow increase in bioluminescence activity that was significant 9 weeks after inoculation and reached a plateau after 30 weeks (Figure 1B). At 40 weeks after engraftment in the prostate, the tumor size reached ~500 mm^3. Whereas the IGR-CaP1 cells grew quickly *in vitro*, the tumor growth rate was slower in the animals, especially in orthotopically implanted tumors. This situation most closely reflects the slow clinical progression of prostate cancer.

Reconstitution of prostate adenocarcinoma

PC3 cells are the most commonly used prostate cancer model able to mimic bone metastases (18). These cells produce highly tumorigenic non-differentiated tumors by 4 weeks when injected subcutaneously. Compared to PC3 cells with inconspicuous stromal regions, the IGR-CaP1 cells produce more differentiated tumors with glandular acini-like structures suggestive of adenocarcinoma (Figure 2A). After direct injection of IGR-CaP1 cells into the prostate, orthotopic tumors were relatively undifferentiated but retained acinar structures and abundant stroma, exhibiting areas of poorly differentiated carcinoma with a high Gleason score (Figure 2B). The endothelial cell marker CD34 was used to determine microvessel density of the tumor (19). As shown using CD34 immunohistochemical staining, the IGR-CaP1 tumors were highly vascularized. The CD34 labeling was heterogeneous and mostly localized in the stromal areas (Figure 2B). The tumorigenicity of IGR-CaP1 tumors was confirmed by strong expression of the Ki67 proliferation marker and the vimentin invasion marker. Labeling of epithelial cells with the prostate markers corresponding to P504S/AMACR and prostatic acid phosphates (PAP) confirmed the prostate origin of the tumor (Figure 2B). Taken together, the IGR-CaP1 tumors recapitulated the characteristics of prostate adenocarcinoma with a microenvironment similar to its human counterpart.

IGR-CaP1 metastases spread to soft organs

IGR-CaP1 cells formed tumors with 84-100% incidence when administered either subcutaneously or orthotopically to intact or castrated athymic male mice (16). Although detected at low frequency, both subcutaneously and orthotopically injected IGR-CaP1 cells disseminated to distant organs, such as liver (20%, 2/10 mice), lung (20%, 2/10 mice), and the kidney and peritoneal cavity (40%, 4/10 mice) and were confirmed histologically. Spontaneous bone

metastases were not detected using either classical dissection or BLI. Figure 3 shows a large metastasis found in the liver with a weak expression of the prostate marker P504S and strong expression of vimentin. A small metastasis in the lung with high vimentin expression is also shown. Because the matrix metalloproteinase (MMP)-9 is critical for the formation of the metastatic niche (20), we assessed MMP-9 expression in IGR-CaP1 metastases. As shown in Figure 3, we observed high expression of MMP-9 in the liver metastasis. Thus, this result is consistent with previous data showing that increased expression of MMP-9 is associated with higher grade local prostate cancer, disease recurrence, and metastatic prostate cancer (21; 22).

Intensive bone remodeling after direct injection into bone

Bone is the main site of metastases of prostate cancer. Compared with lesions observed in lung or breast cancer, prostate cancer bone metastases are mainly osteoblastic. However, high bone turnover and consequent excess bone resorption are also characteristic features (23). We evaluated the ability of the luciferase-expressing IGR-CaP1 cells to generate bone metastases using BLI and high resolution CT. We did not detect spontaneous metastases in bone from subcutaneous or orthotopic IGR-CaP1 xenografts. However, following direct intraosseous implantation of luciferase-expressing IGR-CaP1 cells into the tibia, we observed major bone lesions 10 weeks after injection in 86% of mice (6/7), visualized with 3D isosurface renderings from CT scan (Figure 4A, left). Study of the individual slices confirmed bone remodeling in the injected tibias compared to control tibias (Figure 4A, right). Indeed, the sagittal views consistently showed both lytic lesions in the cortical bone and osteoblastic lesions in the trabecular bone. SPECT using radionuclides is used to investigate bone metastases in prostate cancer patients and provides detailed information about the anatomy and physiological state of the bone. Bone SPECT with ^{99m}Tc-MDP is the initial method of choice to detect skeletal

metastases in cancer patients (24). ^{99m}Tc-MDP accumulates in the bone by chemical adsorption and incorporation into the hydroxyapatite structure (25). The uptake of ^{99m}Tc-MDP was investigated after direct injection of IGR-CaP1 cells in the tibia and confirmed the mixed nature of the lesions and the intensive bone remodeling, with enhanced osteoblastic activity as indicated by a ~5-fold increase in ^{99m}Tc-MDP fixation in injected tibia versus control tibia (P=0.0013) (Figure 4B). Histological examination showed a massive invasion of cortical bone with tumor cells in the injected tibia compared to the control tibia as confirmed by HES- and trichrome-stained sections (Figure 4C). Vimentin-stained sections confirmed the presence of the tumor cells within the bone. The mixed bone lesions were confirmed by the presence of both bone-resorbing osteoclasts on the surface of newly deposited bone (Supplementary Figure 1A, 1B) and the border of small osteoblasts lining bone trabeculae (Supplementary Figure 1C, 1D). These results are in contrast with the widely used PC3 preclinical model, which shows exclusively osteolytic activity after bone injection (7; 11; 12). Thus, the IGR-CaP1 cells were able to generate bone metastases that closely resemble, at the bioimaging and histopathologic level, prostate tumor bone metastases that are commonly encountered clinically.

IGR-CaP1 bone metastases

We examined the ability of luciferase-expressing IGR-CaP1 cells to metastasize to bone using direct intracardiac injection of tumor cells through the left cardiac ventricle in nude mice. This approach models the hematogenous dissemination of cancer cells and allows examination of the process of metastatic colonization at various organ sites. After their initial adhesion at the distant organ site, the disseminated tumor cells must proliferate sufficiently to be detectable by BLI. The bioluminescence was evaluated 5 weeks after inoculation. We evaluated the ability of the tumor cells to generate bone metastases using BLI, CT scan and ^{99m}Tc-MDP SPECT. Only those mice

that showed BLI signals at 5 weeks (5/9 mice) were selected for CT scan and SPECT evaluation. Bioluminescence imaging revealed metastatic colonization in bone, mostly in the mandible, femur, tibia, and vertebral column. Representative mice (Figure 5A) show the different localization of luminescence. The modification of the bone structure in the mandible was observed using CT scan (Figure 5B, left), and uptake of ^{99m}Tc-MDP revealed a 2-fold increase in bone remodeling activity in the altered side of the mandible (Figure 5B, right). Histological analysis confirmed the invasion of tumor cells in the mandible, the hind limb and the vertebral column (Figure 5C). The osteoblastic activity of IGR-CaP1 cells was clearly evidenced in the hind limb, showing large regions of newly woven bone. Osteoclastic activity was evidenced by the presence of osteoclasts (Supplementary Figure 2). All IGR-CaP1 tumor cells retained high expression of vimentin in the bone metastases. In total, all mice injected with luciferase-expressing IGR-CaP1 cells that were imaged showed metastases in bone. Thus, the IGR-CaP1 cells showed a high rate of colonization in bone 5 weeks after intracardiac injection. Taken together, these results indicate that intracardiac inoculation of luciferase-expressing IGR-CaP1 cells is a relevant model for studying homing of prostate cancer cells and is a rare model that can target mixed osteolytic/osteoblastic bone metastases.

Specific human bone metastasis signature in IGR-CaP1 bone metastases

Once established in bone, tumor cells interact with the bone microenvironment in a reciprocal fashion via cytokine mediators to form osteoblastic, osteolytic or mixed lytic/blastic lesions. We determined the expression of several genes that are frequently associated with bone metastases in breast and prostate cancers to evaluate the relevance of IGR-CaP1 as a model of human prostate cancer bone metastases. Gene expression was determined using real-time quantitative RT-PCR on total RNA directly extracted from IGR-CaP1-injected and control tibias of nude mice and

from a xenografted tumor control. Although the amount of total human RNA was quite low, we were able to detect an increased gene expression of the human hemoglobin B (HBB), human osteopontin (SPP1), and human OPG genes in IGR-CaP1-injected tibia compared to control tibia and tumor (Table I). These genes are upregulated in metastatic prostate cancer samples (26-28). Because the CXCR4/CXCL12 signaling pathway plays a pivotal role in the process of distant site metastasis and because we have previously shown that the IGR-CaP1 cells expressed CXCR4 (16), we also measured the expression of the CXCR4 gene in IGR-CaP1-injected bone and tumors using RT-PCR. Indeed, we observed a high expression level of CXCR4 gene in bone lesions (Table I). Given the essential role of the transcription factor Runx2 in osteogenesis and bone metastasis (29; 30), we assessed the expression level of Runx2 in our IGR-CaP1 mouse model using an immunohistochemical approach. Because Runx2 directly activates the transcription of genes encoding enzymes such as MMP-9, we also measured using immunohistochemistry the expression of MMP-9 in intraprostatic tumors and bone metastases. We observed a high expression level of Runx2 and MMP-9 proteins in both intraprostatic IGR-CaP1 tumors and bone metastases (Figure 6).

Taken together, these results show that IGR-CaP1 bone metastases express a bone metastasis gene signature (Runx2, CXCR4, MMP-9, HBB, SPP1 and OPG) in response to the bone microenvironment. Based on the essential role of Runx2 in bone metastasis, our results suggest that Runx2 may influence both osteoblastic and osteoclastic activities at the tumor-bone interface by modulating target genes.

DISCUSSION

In the present study, we utilized the new prostate cell line IGR-CaP1, which was derived from primary epithelial prostate cancer that had been previously characterized *in vitro* (16). These cells correspond to androgen-independent basal epithelial prostate cancer cells that exhibit high levels of cancer stem cell markers, namely CD44, CD133 and CXCR4. The experiments presented here detail the IGR-CaP1 animal model. IGR-CaP1 tumors grew in nude mice that were either subcutaneously injected or orthotopically implanted. The growth rate was relatively slow, with a tumor volume of ~300 mm^3 at 6 weeks following subcutaneous implantation. In contrast with the androgen-independent PC3 model, the IGR-CaP1 tumors exhibited glandular acini-like structures and were highly vascularized with abundant stroma, closely resembling the prostate adenocarcinoma. We observed expression of prostate-specific markers P504S and PSAP, confirming the prostate origin of the intraprostatic tumors. Expression of vimentin, which is seen both in primary tumors and metastases, revealed the invasive potential of the tumor cells. Transduction of these cells with a luciferase- and GFP-expressing retrovirus allowed the detection of spontaneous metastases in liver, lung, and/or peritoneum, albeit at a low frequency. Bioluminescence imaging was used to follow the tumor growth of IGR-CaP1 cells injected into the prostate, bone or heart.

Skeletal metastases comprise the major localization of metastatic spread in prostate cancer. In contrast to most metastatic skeletal lesions, which are primarily osteolytic in nature, prostate cancer metastases to bone are generally considered to be osteoblastic and are characterized by deposition of dense sclerotic bone. The study of the molecular mechanisms underlying the development of osteoblastic lesions requires cellular models that can generate osteoblastic lesions

in animal models. However, there are few animal models that recapitulate spontaneous clinical bone metastases. Among them, the widely used androgen-independent PC3 model, for which luciferase-expressing versions are available, generates pure osteoclastic bone lesions. The fact that bone lesions generated by PC3 cells do not include osteoblastic activity is an obvious limitation of this model. Other models showing osteoblastic or mixed lytic/blastic lesions when implanted in the bones of immunocompromised mice, in particular the LAPC9 and C4-2B models, have been used to study the complex interactions among the tumor cells and the bone microenvironment (9; 10; 31; 32). However, the study of the metastatic spread in preclinical models using bioluminescence is limited to the genetically modified luciferase-expressing 22RV1 cell line, which generates osteoblastic lesions (13; 14). The IGR-CaP1 model, derived from a primary prostate cancer, generates mixed lytic/osteoblastic bone lesions and thus provides a new model of androgen-independent metastatic prostate cancer that closely mimics the bone metastases of patients. Bone lesions and large new bone deposits were confirmed using both CT and quantitative SPECT imaging modalities. Osteolytic activity was confirmed by the presence of osteoclasts in the bone lesions. Since the bone lesions derived experimentally after intratibial implantation model may not exhibit the same biological activity as bone metastases, intracardiac inoculation of IGR-CaP1 cells was performed and was shown to generate bone lesions with a mixed pattern. The IGR-CaP1 preclinical model is therefore a unique model obtained from a primary prostate tumor that generates bone metastasis. The establishment of a bioluminescent version of this model provides a valuable tool for the study of both intraprostatic progression and bone metastatic spread.

Recently, Müller et al. have shown that chemokine receptors are critical in determining the metastatic destination of tumor cells (33). CXCR4 is a well-known chemokine receptor that can

trigger metastasis in a variety of cancers (34; 35), including prostate cancer (36; 37). We showed previously using FACS analysis that the IGR-CaP1 cells expressed a high level of CXCR4 protein (16). This finding is suggestive of the propensity of IGR-CaP1 cells to metastasize to bone. In our model, expression of CXCR4 was indeed increased after engraftment in mice and subsequent *in vitro* culture re-establishment. Previous studies have shown that CXCR4 expression correlates with the promotion of metastasis in prostate tumors (37), but contradictory results were obtained regarding the detection of CXCR4 in prostate primary tumors and metastases. These conflicting results may be due to the use of different CXCR4-directed antibodies. We were unable to detect any relevant signals by immunohistochemistry of CXCR4 in bone metastases, which may be attributed either to the low quality of available antibodies or to the decalcification procedure. However, we detected a high level of CXCR4 gene expression in human tumor cells after direct-bone injection (Table I), suggesting that the attachment of primary tumor cells to basement membranes could be enhanced by CXCR4 signaling. Additionally, MMPs have been reported to facilitate cancer cell invasion and metastasis through degradation of the surrounding extracellular matrix proteins. MMP expression was increased in malignant breast and prostate cancer cells, and MMP-2 and MMP-9 in particular have been associated with poor prognosis (38). Recent results suggested that MMPs could be downstream targets of CXCR4-mediated signaling (39; 40). Because we observed high levels of MMP-9 protein in IGR-CaP1 tumors and bone metastases, our results suggest that MMP-9 expression may be regulated by CXCR4 expression in our model.

Once established in bone, crosstalk between tumor cells and the bone microenvironment causes impairment in the remodeling process, causing metastatic tumor cells to secrete factors that stimulate osteoclast-mediated bone destruction. Osteoblasts are also intimately involved in the

regulation of osteoclast differentiation via RANKL and OPG expression. The mechanism through which IGR-CaP1 cells produces mixed osteoblastic/lytic lesions is not currently defined. However, our results suggest that the increased expression of OPG and osteopontin may lead to an overall inhibition of osteoclast activity, resulting in a shift of bone remodeling toward osteoblastic activity and mineralization of the bone. The role of the HBB is unclear, but gene expression profiles of prostate cancer comparing expression levels between metastatic and primary tumor samples showed increased HBB expression in metastases (28).

Runx2, a protein previously known for its master regulatory roles in the chondro-osteoblast lineage, is now emerging as a pro-metastatic transcription factor that may control multiple aspects of metastasis. Runx2 is expressed in androgen-independent PC3 cells (41). A recent study reports that Runx2 intervenes as a key regulator of events associated with prostate cancer metastatic bone disease by promoting activation of metastatic target genes including VEGF, osteopontin, MMPs and survivin (42). The high expression levels of Runx2 in bone metastases in the IGR-CaP1 preclinical model suggest that Runx2 could be implicated in the regulation of osteopontin and MMP-9. As was previously described in human prostate cancer tissues, we observed immunohistochemical expression of Runx2 in aggressive intraprostatic tumors and bone metastases. Our results suggest that the Runx2-mediated pathway may be implicated in the osteoblastic properties of the IGR-CaP1 bone lesions.

This paper describes a new preclinical model of prostate cancer in immunocompromised mice that reproduces the widespread bone metastasis with mixed osteolytic/blastic lesions that is often observed in patients. Dynamic monitoring was used to follow the metastatic dissemination using non-invasive bioluminescence, CT and quantitative SPECT imaging modalities. We also

provided an expression signature for the responsiveness of prostate cancer IGR-CaP1 cells to the bone microenvironment, namely CXCR4, MMP-9, Runx2, osteopontin, OPG and HBB expression, suggesting that a combination of therapeutic approaches for targeting both osteoblasts and osteoclasts may be beneficial in limiting the progression of established bone metastasis. Therefore, the IGR-CaP1 model is one of the few suitable models for preclinical studies providing osteoslerotic bone changes and for *in vitro* studies in tissue culture and 3D spheroids. The upregulation of the proteins corresponding to the bone metastasis signature suggests potential targets for reversing bone metastasis; these mechanisms could be studied using the IGR-CaP1 preclinical model to elucidate drug targets with potential clinical relevance.

ACKNOWLEDGMENTS

NAN was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Mutuelle Bleue. We thank J.L. Villeval, J.P. Morgenstern and X. Xiong for the kind gift of the luciferase-GFP expression retroviral vector. We kindly thank J. Sobilo and S. Retif for technical help and G. Reveillon for his help with the CT and SPECT quantifications. We also thank F. Commo for his help with the statistical analysis.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010, 60: 277-300

2. Cheville JC, Tindall D, Boelter C, Jenkins R, Lohse CM, Pankratz VS, Sebo TJ, Davis B, Blute ML. Metastatic prostate carcinoma to bone: clinical and pathologic features associated with cancer-specific survival. Cancer 2002, 95: 1028-1036

3. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. Nat Rev Cancer 2002, 2: 584-593

4. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med 2004, 350: 1655-1664

5. Koeneman KS, Yeung F, Chung LW. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. Prostate 1999, 39: 246-261

6. Seibel MJ. Clinical use of markers of bone turnover in metastatic bone disease. Nat Clin Pract Oncol 2005, 2: 504-517

7. Nemeth JA, Yousif R, Herzog M, Che M, Upadhyay J, Shekarriz B, Bhagat S, Mullins C, Fridman R, Cher ML. Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis. J Natl Cancer Inst 2002, 94: 17-25

8. Wu TT, Sikes RA, Cui Q, Thalmann GN, Kao C, Murphy CF, Yang H, Zhau HE, Balian G, Chung LW. Establishing human prostate cancer cell xenografts in bone: induction of

osteoblastic reaction by prostate-specific antigen-producing tumors in athymic and SCID/bg mice using LNCaP and lineage-derived metastatic sublines. Int J Cancer 1998, 77: 887-894

9. Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. Cancer Res 2005, 65: 7554-7560

10. Hsu WK, Virk MS, Feeley BT, Stout DB, Chatziioannou AF, Lieberman JR. Characterization of osteolytic, osteoblastic, and mixed lesions in a prostate cancer mouse model using 18F-FDG and 18F-fluoride PET/CT. J Nucl Med 2008, 49: 414-421

11. Corey E, Quinn JE, Bladou F, Brown LG, Roudier MP, Brown JM, Buhler KR, Vessella RL. Establishment and characterization of osseous prostate cancer models: intra-tibial injection of human prostate cancer cells. Prostate 2002, 52: 20-33

12. Lee Y-P, Schwarz EM, Davies M, Jo M, Gates J, Zhang X, Wu J, Lieberman JR. Use of zoledronate to treat osteoblastic versus osteolytic lesions in a severe-combined-immunodeficient mouse model. Cancer Res 2002, 62: 5564-5570

13. Henry MD, Silva MD, Wen S, Siebert E, Solin E, Chandra S, Worland PJ. Spiculated periosteal response induced by intraosseous injection of 22Rv1 prostate cancer cells resembles subset of bone metastases in prostate cancer patients. Prostate 2005, 65: 347-354

14. Drake JM, Gabriel CL, Henry MD. Assessing tumor growth and distribution in a model of prostate cancer metastasis using bioluminescence imaging. Clin Exp Metastasis 2005, 22: 674-684

15. Fizazi K, Sikes CR, Kim J, Yang J, Martinez LA, Olive MC, Logothetis CJ, Navone NM. High efficacy of docetaxel with and without androgen deprivation and estramustine in preclinical models of advanced prostate cancer. Anticancer Res 2004, 24 :2897-2903

16. Chauchereau A, Al Nakouzi N, Gaudin C, Le Moulec S, Compagno D, Auger N, Bénard J, Opolon P, Rozet F, Validire P, Fromont G, Fizazi K. Stemness markers characterize IGR-CaP1, a new cell line derived from primary epithelial prostate cancer. Exp Cell Res 2011 , 317: 262-275

17. Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. Nucleic Acids Res 1990, 18: 3587-3596

18. Singh AS, Figg WD. In vivo models of prostate cancer metastasis to bone. J Urol 2005, 174: 820-826

19. Rössler J, Monnet Y, Farace F, Opolon P, Daudigeos-Dubus E, Bourredjem A, Vassal G, Geoerger B. The selective VEGFR1-3 inhibitor axitinib (AG-013736) shows antitumor activity in human neuroblastoma xenografts. Int J Cancer 2011, 128: 2748-2758

20. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell 2010, 141: 52-67

21. Zhang L, Shi J, Feng J, Klocker H, Lee C, Zhang J. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis 2004, 7: 327-332

22. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Têtu B. Matrix metalloproteinase 9 is associated with Gleason score in prostate cancer but not with prognosis. Hum Pathol 2010, 41: 1694-1701

23. Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Wang Y, Yoneda T. Tumor-derived platelet-derived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer. Cancer Res 2002, 62: 917-923

24. Uematsu T, Yuen S, Yukisawa S, Aramaki T, Morimoto N, Endo M, Furukawa H, Uchida Y, Watanabe J. Comparison of FDG PET and SPECT for detection of bone metastases in breast cancer. AJR Am J Roentgenol 2005, 184: 1266-1273

25. Kanishi D. 99mTc-MDP accumulation mechanisms in bone. Oral Surg. Oral Med Oral Pathol 1993, 75: 239-246

26. Lin DL, Tarnowski CP, Zhang J, Dai J, Rohn E, Patel AH, Morris MD, Keller ET. Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes in vitro. Prostate 2001, 47: 212-221

27. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. Cancer 2006, 107: 289-298

28. Chandran UR, Ma C, Dhir R, Bisceglia M, Lyons-Weiler M, Liang W, Michalopoulos G, Becich M, Monzon FA. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. BMC Cancer 2007, 7: 64

36. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. Cancer Res 2002, 62: 1832-1837

37. Sun Y-X, Schneider A, Jung Y, Wang J, Dai J, Wang J, Cook K, Osman NI, Koh-Paige AJ, Shim H, Pienta KJ, Keller ET, McCauley LK, Taichman RS. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. J Bone Miner Res 200, 20: 318-329

38. Chabottaux V, Noel A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. Clin Exp Metastasis 2007, 24: 647-656

39. Yu T, Wu Y, Helman JI, Wen Y, Wang C, Li L. CXCR4 promotes oral squamous cell carcinoma migration and invasion through inducing expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK signaling pathway. Mol Cancer Res 2011, 9: 161-172

40. Wang Q, Diao X, Sun J, Chen Z. Regulation of VEGF, MMP-9, and metastasis by CXCR4 in a prostate cancer cell line. Cell Biol Int 2011, In press

41. Yeung F, Law WK, Yeh C-H, Westendorf JJ, Zhang Y, Wang R, Kao C, Chung LWK. Regulation of human osteocalcin promoter in hormone-independent human prostate cancer cells. J Biol Chem 2002; 277: 2468-2476

42. Akech J, Wixted JJ, Bedard K, van der Deen M, Hussain S, Guise TA, van Wijnen AJ, Stein JL, Languino LR, Altieri DC, Pratap J, Keller E, Stein GS, Lian JB. Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. Oncogene 2010, 29 :811-821

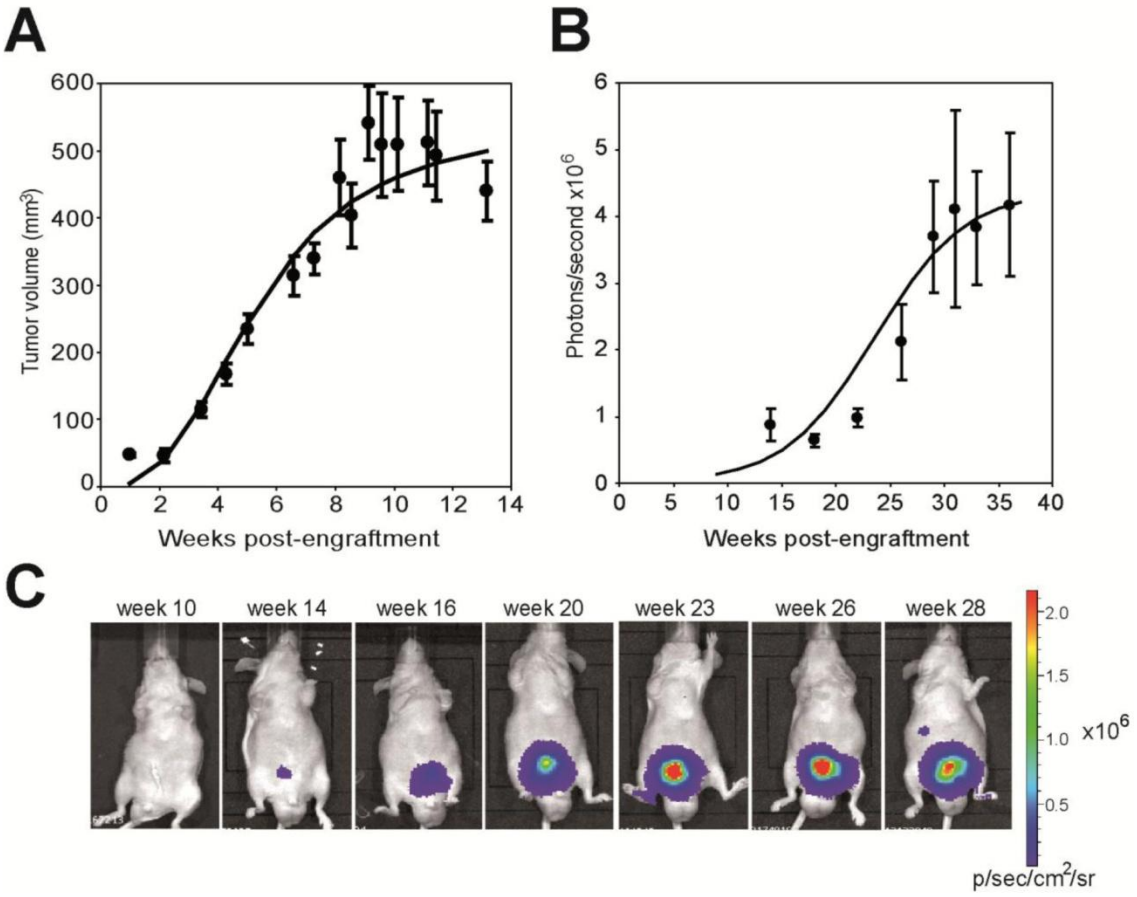


Figure 1: Progression of IGR-CaP1 tumors in animals
A. Tumor progression of subcutaneously implanted IGR-CaP1 cells in male nu/nu mice. IGR-CaP1 cells ($10x10^6$) were injected subcutaneously into the dorsal region of male nu/nu mice (n=20). Tumor growth was monitored weekly using caliper measurement. The results are expressed as median ± SEM. The curves correspond to the adjustment of a logistic regression model on the average of the observed values at each time point. B. Bioluminescent imaging time course of orthotopically inoculated GFP- and luciferase-expressing IGR-CaP1 cells. Tumor growth was monitored using an IVIS 50 bioluminescence imaging system. BLI demonstrates the progression of IGR-CaP1 tumors in the prostate of male nu/nu mice. Nine mice were imaged monthly to monitor tumor growth. The results are expressed as the mean ± SEM. The curves correspond to the adjustment of the logistic regression model on the average of the observed values at each time point. C. A representative mouse with intraprostatic tumor monitored by BLI.

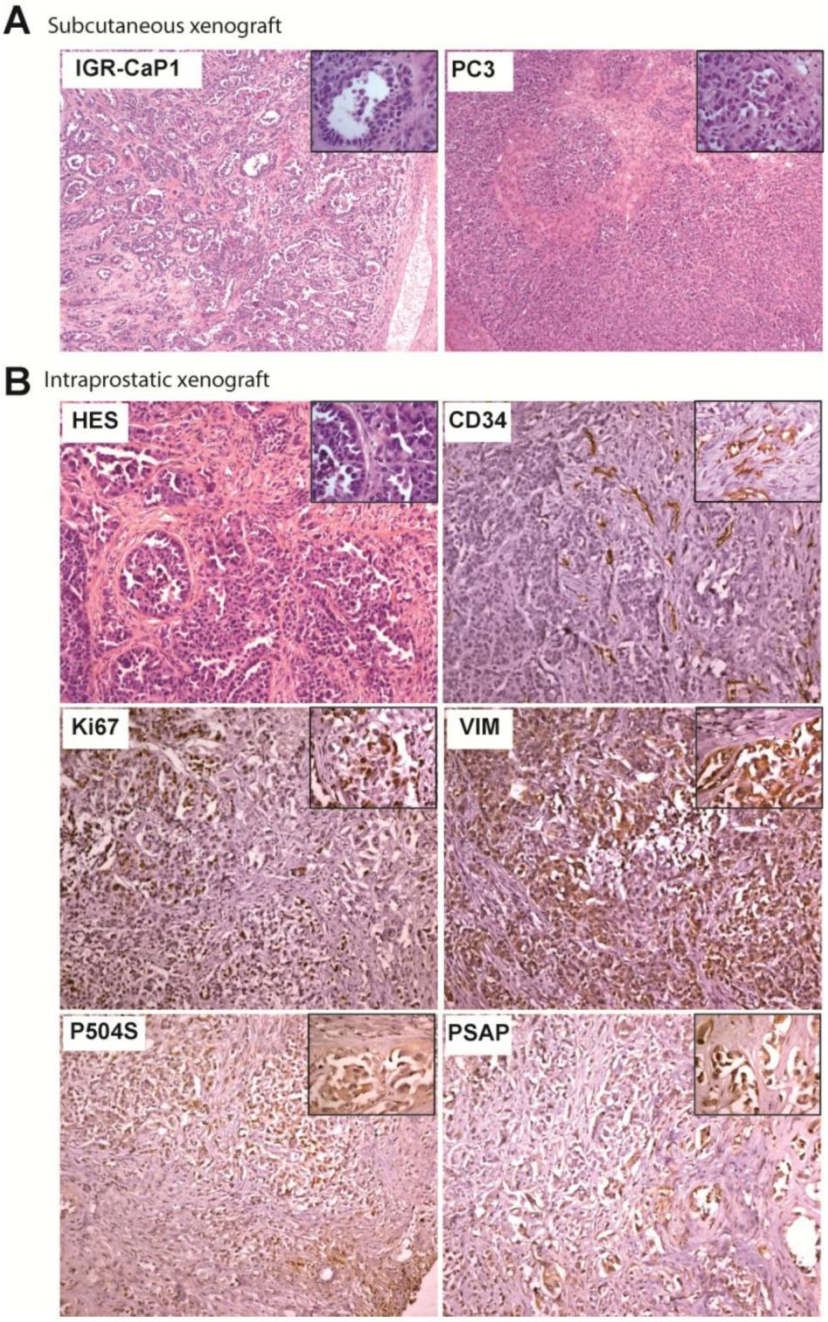


Figure 2: IGR-CaP1 tumors reconstitute prostate adenocarcinoma
IGR-CaP1 cells were injected into male nude mice both subcutaneously (A) or intraprostatically (B). Magnification 50x, insert 400x. A. Comparison of HES staining of tumor sections between IGR-CaP1 and PC3 tumors revealed a glandular differentiation with acini in IGR-CaP1 tumor that is absent in PC3 tumors. B. HES staining of tumor sections of orthotopically implanted IGR-CaP1 cells showed more undifferentiated tumors with abundant stroma. Immunohistochemical staining of the endothelial cell marker CD34 showed a high microvessel density within the stromal regions. Ki67 staining revealed a high proliferation index. Vimentin (VIM) revealed the invasive potential of the tumor. Markers corresponding to prostatic acid phosphatase (PSAP) and AMACR (P504S) confirmed the prostate origin of the tumor. Magnification 100x, inserts 400x.

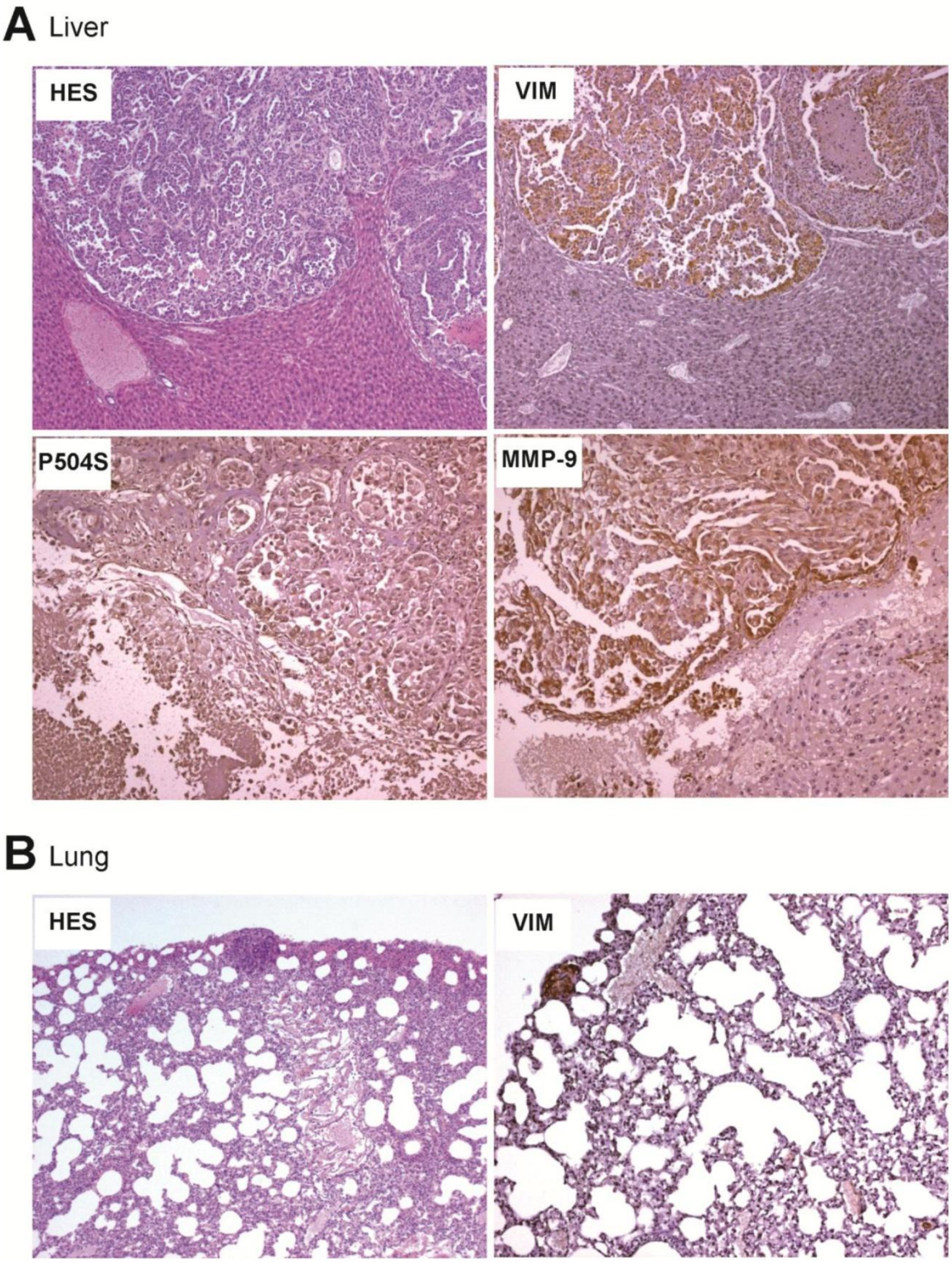


Figure 3: IGR-CaP1 tumors spontaneously disseminate to soft organs
Spontaneous metastases were observed in several organs, as illustrated in the liver (A) and the lung (B). Metastases showed conserved expression of invasive markers vimentin (VIM) and MMP-9. The prostate marker P504S was also conserved in the metastases. Magnification 100x (A), 50x (B).

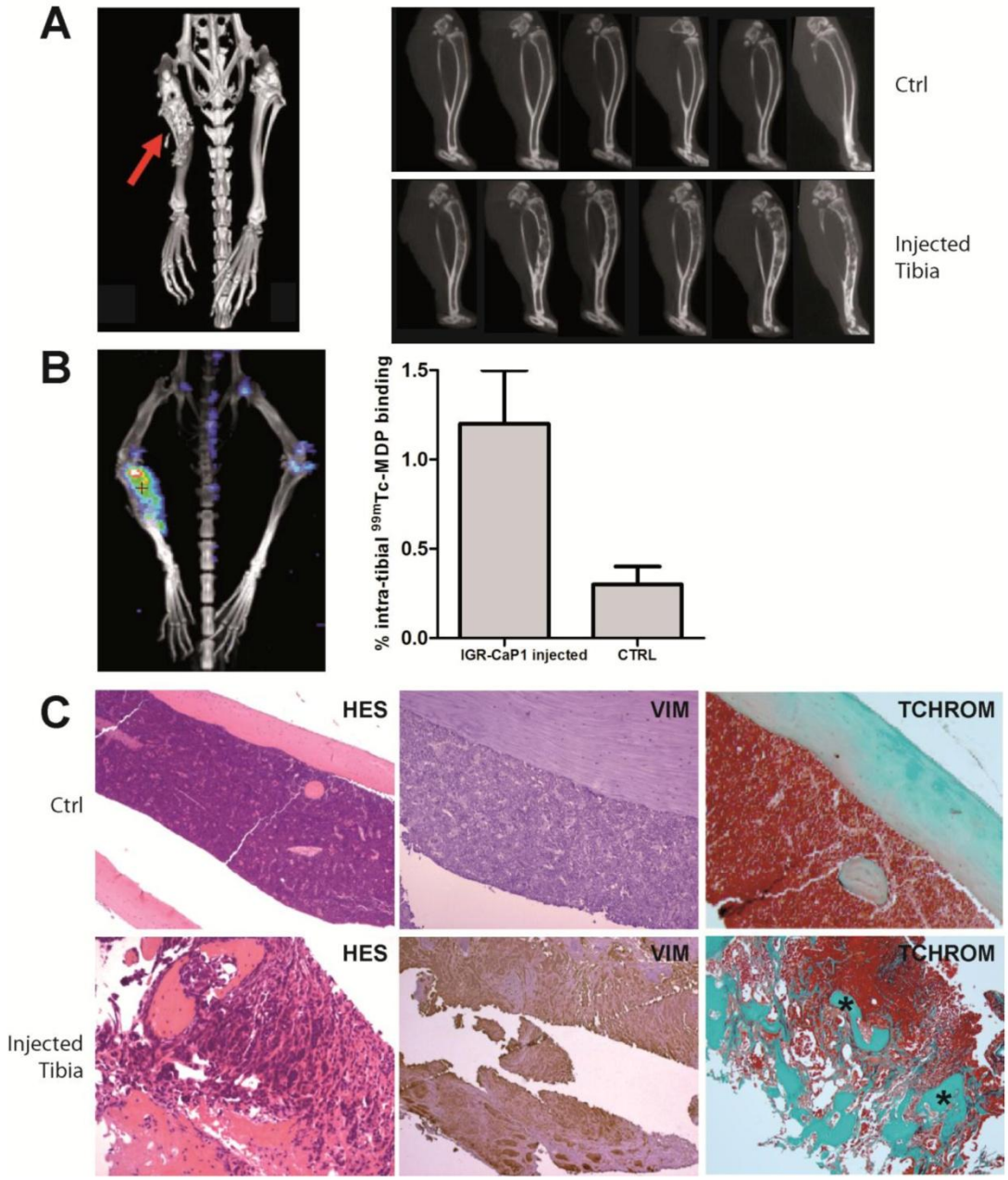


Figure 4: High levels of bone remodeling after direct injection of IGR-CaP1 cells into bone

IGR-CaP1 cells ($0.5x10^6$) were injected into the bone marrow of the mice. Massive bone remodeling (arrow) was observed by CT 5 weeks after injection of IGR-CaP1 cells in the injected tibia compared to the control tibia in 86% of mice and showed both osteolytic and osteoblastic activities (A). The intense bone remodeling was confirmed by measuring the incorporation of ^{99m}Tc-MDP into the bone, as measured using SPECT (B). A quantitative comparison of the % of incorporation between the injected tibia vs. control tibia is shown (n=6, p-value=0.016). Comparison of the injected tibia versus the control tibia by immunohistochemical staining is shown in (C). HES staining and Masson blue trichrome staining showed the remodeling within the bone marrow, visualizing newly synthetized osteoid (*). Expression of the invasive marker vimentin (VIM) was found both within the primary tumor and the metastases. Magnification 100x.

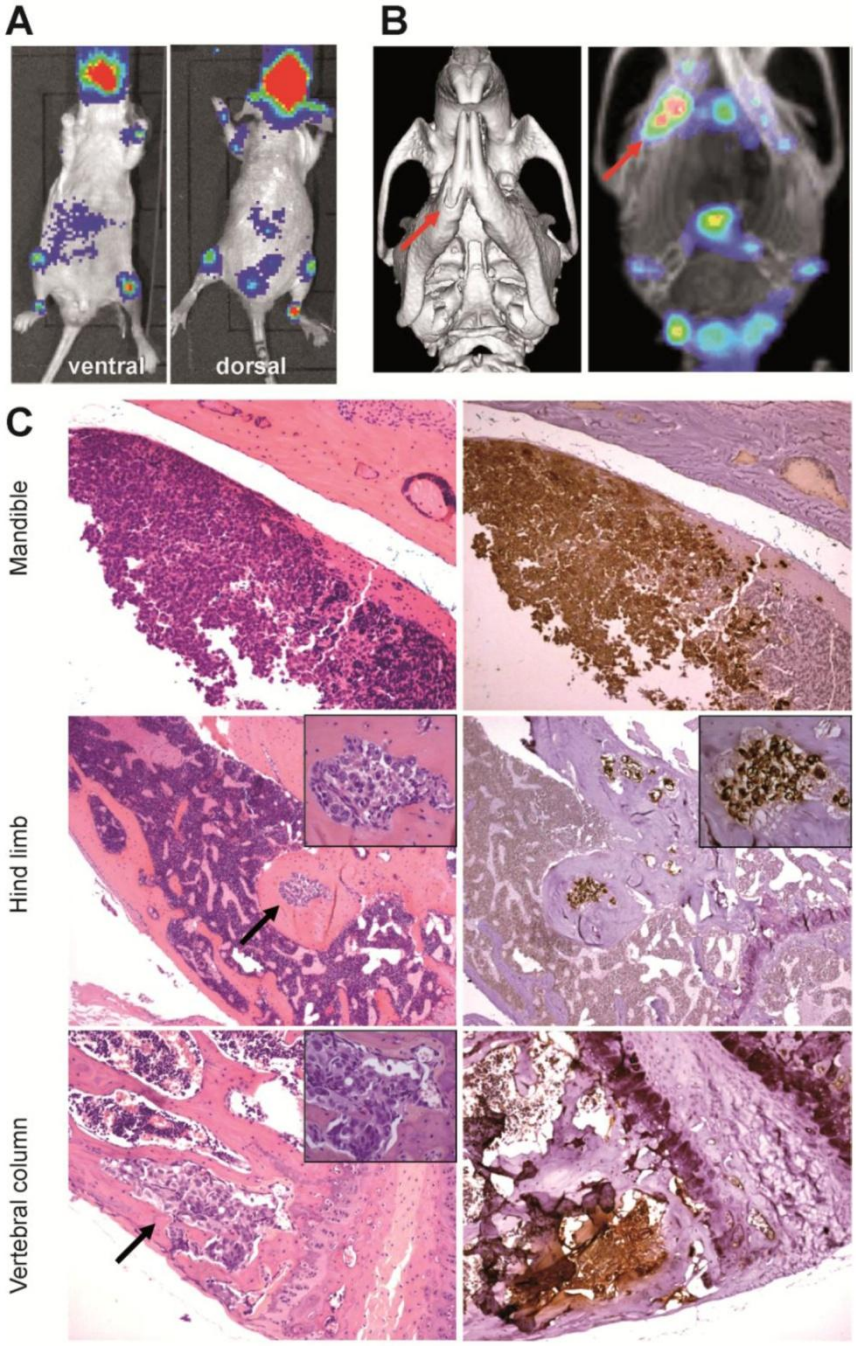


Figure 5: IGR-CaP1 cells generate bone metastases after intracardiac injections
IGR-CaP1 cells ($5x10^5$) were injected into the left cardiac ventricle. Multiple bone metastases were observed using bioluminescence imaging 5 weeks after injection (A). A representative mouse showed the bone localization of metastases. CT scan acquisition and the incorporation of ^{99m}Tc-MDP measured with SPECT confirmed the presence of bone metastases in the mandible (B). Histological staining of decalcified bone sections confirmed the presence of bone lesions (C, left). As shown with intratibial injection, metastases in limb were osteoblastic. All bone metastases showed intense vimentin (VIM) expression (C, right). Magnification 50x, insert 400x. The arrows showed the metastases.

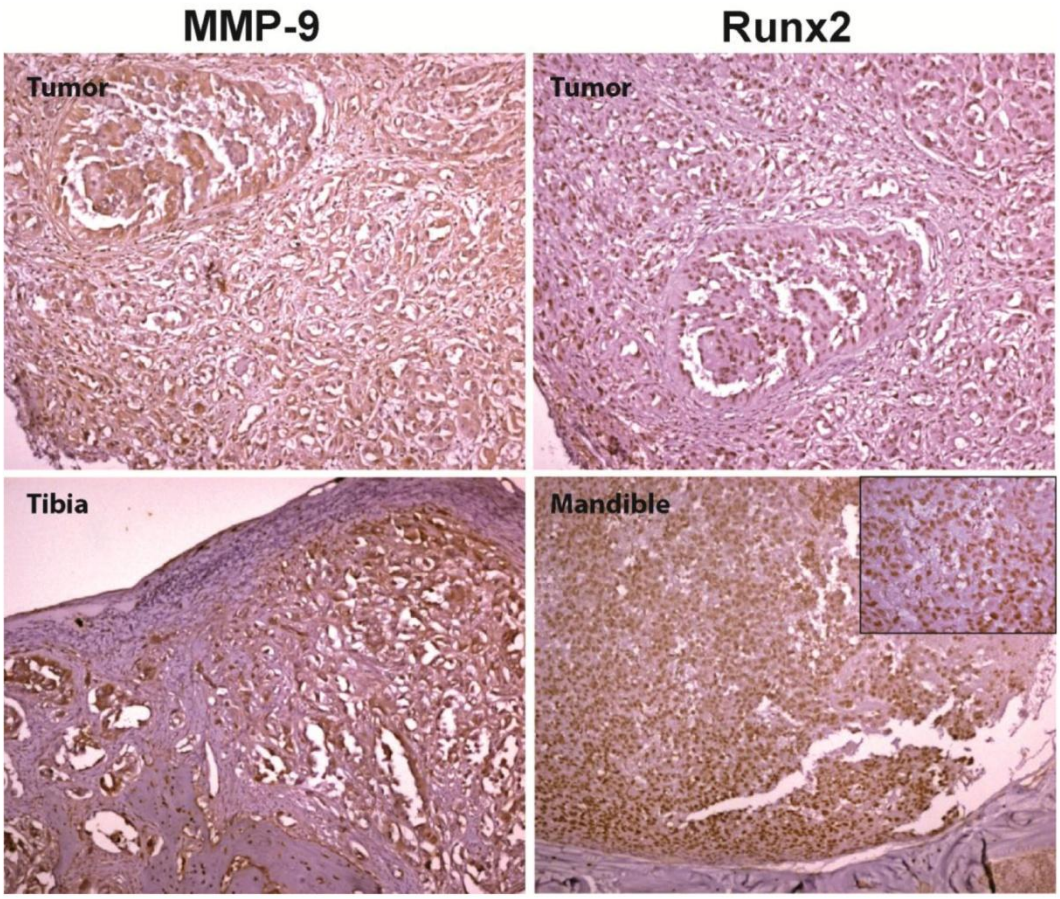
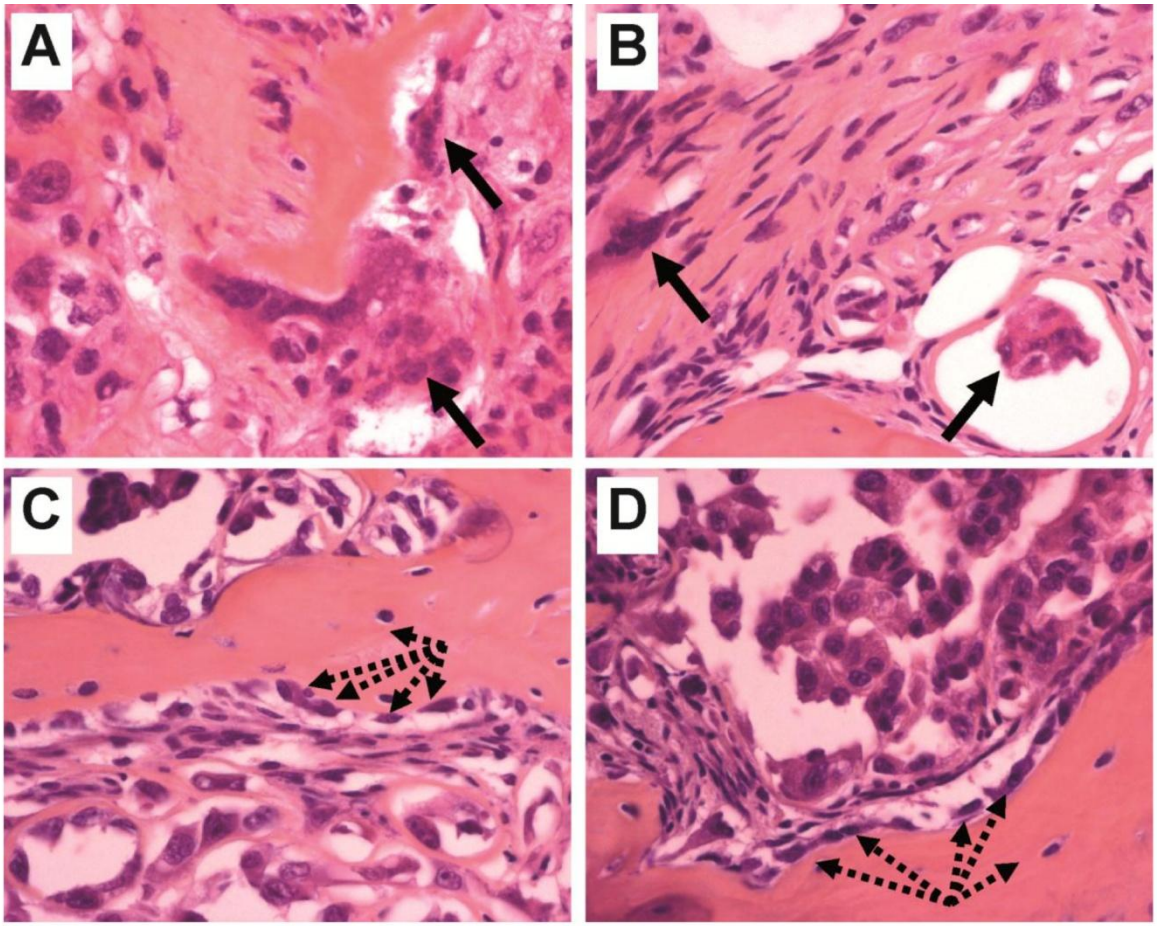


Figure 6: The IGR-CaP1 model expresses Runx2 and MMP-9
Immunohistochemical staining showing expression of intracellular MMP-9 and nuclear Runx2 in either intraprostatic tumors (upper figures) or decalcified bone sections (lower figures). Magnification 100x, insert 400x.

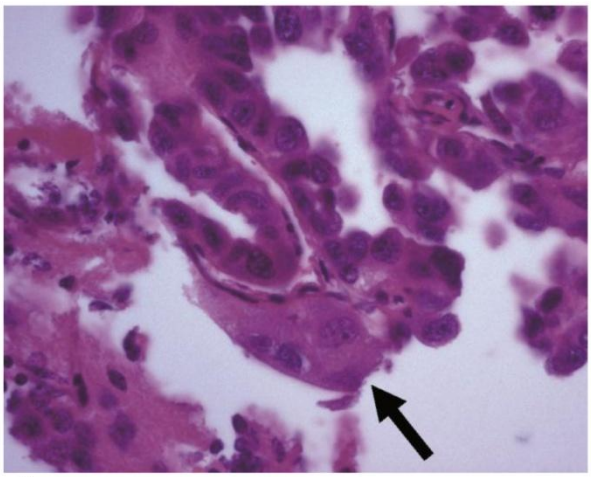
	S.C. Tumor	Bone tumor 1	Bone tumor 2
Hemoglobin B (HBB)	2	4608	61690
Osteopontin (SPP1)	4	97	795
OPG (TNFRSF11B)	0	21	281
CXCR4	12	484	2551

Table I: Relative expression of specific human bone metastasis genes in bone lesions

The relative expression of human gene transcripts was determined using real-time quantitative RT-PCR. The results were expressed relative to the expression determined by using the universal primer in IGR-CaP1 injected tibia and an IGR-CaP1 xenografted tumor.



Supplementary Figure 1
HES staining of the bone lesions obtained after a direct injection into the tibia showing bone remodeling. (A) and (B): Osteoclasts (arrows); (C) and (D): Osteoblasts (arrows).



Supplementary Figure 2
HES staining of the bone lesions obtained after injection of tumor cells into the left ventricle. The arrows show the presence of osteoblasts in the bone lesions.

Autres caractéristiques moléculaires de la lignée IGR-CaP1

1- Gène de fusion TMPRSS2/ERG

La mise en évidence récente de gènes de fusion TMPRSS2/ERG dans une majorité de cancers de la prostate représente une véritable révolution dans la connaissance biologique de ces tumeurs. La détermination du statut TMPRSS2/ERG dans les modèles précliniques de CaP est essentielle pour comprendre le rôle de cette translocation dans la progression tumorale. Seulement deux lignées expriment cette translocation: il s'agit des lignées V-CaP et H660. Nous avons utilisé la technique de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) et montré que la lignée IGR-CaP1 ne présente pas ce gène de fusion (Figure 9).

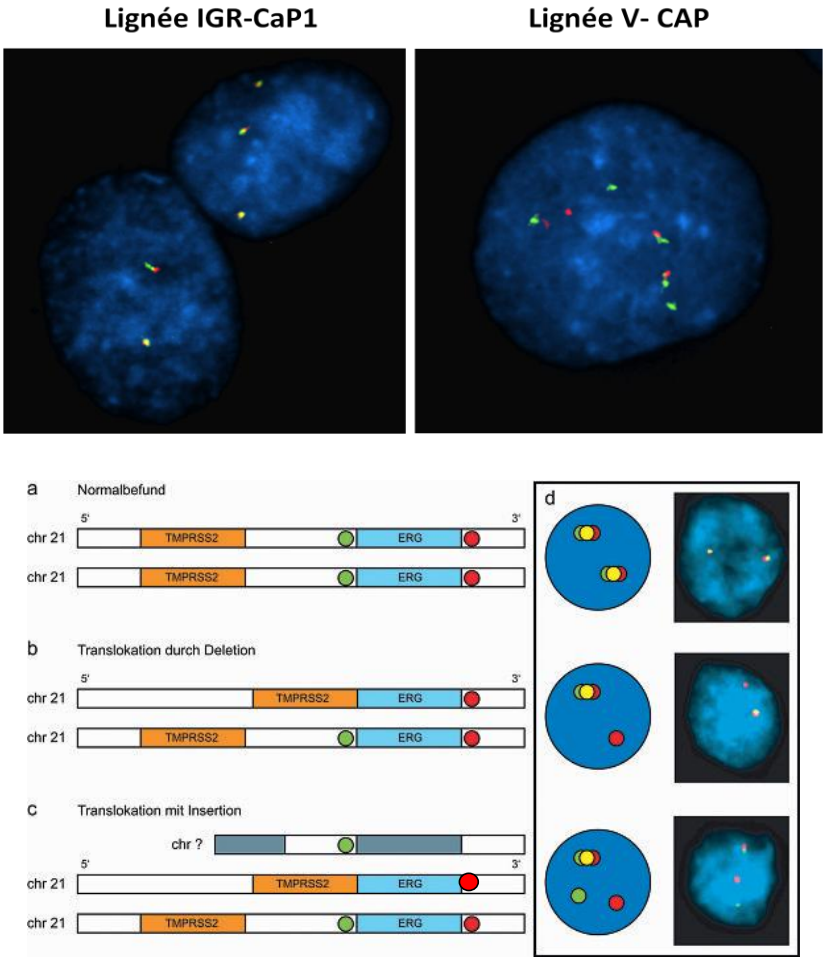


Figure 9 : Recherche de la présence du gène de fusion TMPRSS2/ERG dans la lignée IGR-CaP1. Technique de FISH : La colocation des signaux rouges et verts (signal jaune) montre qu'il n'y a pas de translocation dans la lignée IGR-CaP1. Le gène de fusion est présent dans les VCaP avec perte de la colocalisation des deux signaux (contrôle positif). Shéma explicatif sur l'emplacement des signaux d'après Mertz, highlights 2010 : pathologie

2- Autres mutations retrouvées dans la lignée IGR-CaP1

Nous avons également identifié des mutations dans la lignée IGR-CaP1 notamment les mutations au niveau de gènes codants pour les protéines p53 et PTEN, connues pour être impliquées dans la carcinogénèse de la prostate. Dans le tableau 8 nous avons décrit d'autres mutations sur des gènes fréquemment mutés dans les cancers.

La perte fonctionnelle des protéines PTEN et p53 sont des phénomènes fréquents dans le CaP qui contribue à la progression tumorale. La perte simultanée de PTEN et de l'activité p53 augmente le pouvoir prolifératif des cellules tumorales et empêche l'activation de l'apoptose.

La protéine PI3K kinase (PIK3 CA) représente l'un des oncogènes les plus modifiés dans les cancers humains. Elle est utilisée comme un marqueur de diagnostic et comme cible thérapeutique. Les mutations PIK3 CA sont le sujet de plusieurs études sur les cancers du sein et colorectal. Ces mutations ont été reportées dans le cancer de la prostate mais les études de ces mutations dans le CaP restent limitées. Aucune mutation PIK3 CA n'a été décrite jusqu'à présent dans les lignées de CaP. Les modèles qui expriment des mutations des deux gènes PIK3 CA et PTEN sont très rares. La perturbation de ces deux gènes semble être impliquée dans la résistance aux traitements (cetuximab) dans le cancer colorectal (231) et il apparaît que ces mutations PIK3 CA/PTEN sont en corrélation négative avec la réponse à ce traitement.

FLT3 est une autre kinase que l'on retrouve mutée dans les leucémies agressives. La mutation que nous avons identifiée n'a pas été décrite. Notch1 est un récepteur membranaire qui joue un rôle dans plusieurs processus du développement et qui pourrait être impliqué dans la fonction cellules souches cancéreuses (CSC). Une étude récente montre que le polymorphisme G388R du gène FGFR4 qu'on retrouve dans la lignée IGR-CaP1 est lié au risque de CaP surtout dans la population européenne. A l'heure actuelle, nous n'avons pas investigué davantage le rôle biologique de ces mutations.

Gène	Mutation en NTP	Mutation / acides aminés	Référence de la mutation
Tp53	A377G	Y126C	var-044716
PIK3CA	A3207G	NON-STOP 1069 (+4aa)	Non décrite
PTEN	A464G	Y155C C 950-953	var-026263 non décrite
NOTCH1	G6856A	V2286I	rs61751489
FLT3	C1601G	P534R	Non décrite
FGFR4	G1162A	G388R	rs351855

Tableau 8 : Mutations retrouvées dans la lignée IGR-CaP1

DISCUSSION

Le traitement des CaP est en constante évolution. Chaque année, de nouveaux médicaments et combinaisons thérapeutiques sont proposés pour des essais cliniques. Pour développer et sélectionner les meilleurs traitements, les modèles précliniques sont indispensables. Cependant, le modèle idéal de CaP n'existe pas car aucun modèle ne reproduit complètement l'histoire de la maladie. Il est donc indispensable d'augmenter le nombre et la diversité des modèles expérimentaux de CaP. Plus ces modèles seront pertinents, plus nous progresserons dans la compréhension de l'évolution de cette maladie et dans la découverte de traitements, notamment pour les formes métastatiques incurables.

Dans le premier article, nous avons décrit l'établissement et la caractérisation d'une nouvelle lignée cellulaire de CaP issue d'un adénocarcinome prostatique primaire. L'obtention d'un tel modèle est très rare et difficile. Après plusieurs tentatives, nous avons obtenu cette lignée grâce à l'utilisation d'une matrice extracellulaire humaine (IGR-XC) établie par docteur Jean Bénard à l'IGR. Notre lignée de type épithélial basal est spontanément immortalisée, elle a un temps de doublement relativement court, elle prolifère normalement à des faibles densités en culture et en monocouche, ce qui fait d'elle un outil facile d'utilisation pour les études in vitro.

La lignée IGR-CaP1 n'exprime pas le AR et le PSA contrairement à la tumeur d'origine. Il est possible que les cellules de la tumeur qui expriment le AR aient été perdues lors de la culture et que nous ayons sélectionné les cellules qui n'expriment pas le AR. L'absence d'expression du PSA et du AR dans les xénogreffes et *in vitro*, et la capacité d'IGR-CaP1 à pousser chez les souris mâles castrées ainsi que dans des milieux appauvris en androgènes montrent que cette lignée est androgéno-indépendante. Cependant, on remarque que la croissance tumorale est légèrement réduite après castration, ce qui suggère une influence du stroma sur ces cellules tumorales. En effet, le compartiment cellulaire du stroma se compose de fibroblastes, de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales. Les fibroblastes et les cellules musculaires lisses expriment le AR et survivent à la castration (28). Les facteurs de croissances produits par le stroma interviennent dans la différenciation prostatique, dans la prolifération ou l'inhibition de la croissance cellulaire (232). Le stroma produit notamment les facteurs FGF7 et 10 qui stimulent directement la prolifération des cellules épithéliales. Enfin, même si la lignée IGR-CaP1 n'exprime pas le AR, il est possible qu'elle exprime d'autres gènes régulés par les androgènes.

Bien que la lignée IGR-CaP1 n'exprime pas le AR et le PSA, nous avons démontré qu'elle exprime faiblement d'autres marqueurs prostatiques tels que l'AMACR, le PSMA ou la PAP qui attestent de son origine prostatique. Nous avons également identifié d'autres caractéristiques moléculaires de la lignée IGR-CaP1 qui sont fréquemment trouvées dans les CaP. En effet, nous avons montré que la lignée IGR-CaP1 est une lignée tétraploïde qui exprime une p53 mutée. Une surexpression de la p53 associée à une altération du gène est fréquente dans les CRPC (233). La tétraploïdie est décrite comme un phénomène précoce de l'oncogénèse prostatique et peut conférer un avantage de survie *in vitro* pour les cellules

tumorales. Normalement, la protéine p53 sauvage joue un rôle très important dans les points de contrôle et empêche la prolifération des cellules tétraploïdes. Il est possible que la mutation de la p53 dans la lignée IGR-CaP1 ait autorisé la prolifération des cellules tétraploïdes.
Dans la mesure où la lignée IGR-CaP1 exprime de façon importante plusieurs marqueurs CSC (CD44, CD133, CXCR4 et α2β1-integrin), forme des sphéroïdes en culture tridimensionnelle et a la capacité à pousser *in vitro* après passage chez la souris tout en conservant l'expression de ces marqueurs CSC, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette lignée pourrait représenter une lignée de cellules progénitrices issues de CSC. D'autres expérimentations complémentaires sont cependant nécessaires pour renforcer cette hypothèse, notamment des expériences de différenciation après greffes sous le sinus rénal de l'animal pour étudier les capacités de la lignée à se différencier en différents types cellulaires. La compréhension des phénomènes biologiques qui régule les CSC pourrait avoir des conséquences importantes en clinique. La perspective de thérapies ciblant spécifiquement les CSC offre dès lors de nouveaux espoirs dans le traitement contre le cancer de la prostate en association avec les thérapies classiques. C'est pourquoi, il est important de disposer de modèles de laboratoire proche des CSC comme la lignée IGR-CaP1.

La lignée IGR-CaP1 est fortement tumorigénique chez la souris nude en greffe sous-cutanée et en orthotopique. Contrairement à la lignée PC3, les xénogreffes issues de la lignée IGR-CaP1 présentent un phénotype glandulaire avec formation d'acini, elles sont aussi très vascularisées, et riches en stroma. Elles conservent les antigènes et les caractéristiques histologiques d'un adénocarcinome prostatique. Les xénogreffes intra-prostatiques semblent être plus agressives que les xénogreffes sous cutanées (tumeurs plus indifférenciées et expression forte du Ki 67), ceci pourrait s'expliquer par l'influence de l'environnement tumoral notamment par l'influence des androgènes. Par ailleurs, La croissance des xénogreffes de la lignée IGR-CaP1 est relativement lente notamment en intra-prostatique, ce qui permet des études de processus longs comme la résistance aux traitements ou le processus métastatique.
Les xénogreffes S.C. et intra-prostatiques chez la souris nude induisent des métastases spontanées, un phénomène très rare et recherché dans les modèles de cancer de la prostate. En revanche, ces métastases viscérales sont peu fréquentes et aucune métastase osseuse spontanée n'a été détectée. L'absence de détection de métastases osseuses spontanées pourrait être dûe à la petite taille de ces micrométastases impossibles à détecter en bioluminescence, surtout en présence de forts signaux de la tumeur primaire et de métastases viscérales. On pourrait envisager, pour palier ce problème, d'établir un vecteur viral contenant le gène de la luciférase sous contrôle d'un promoteur spécifique de l'os comme l'ostéocalcine, l'ostéopontine, ou RUNX2. Cette méthode nécessite une mise au point afin de trouver le promoteur le plus exprimé dans l'os et le moins exprimé au niveau des tumeurs primaires.

Le site métastatique préférentiel du CaP humain est l'os. Ces lésions sont de nature ostéoblastiques ou mixtes. L'obtention d'un modèle préclinique de métastases osseuses de CaP qui reproduise le processus métastatique naturel reste une priorité pour mieux comprendre ce mécanisme et palier le manque

thérapeutique. Le nombre de modèles qui induisent des métastases osseuses spontanées est très limité. La lignée PC3 androgéno-indépendante qui exprime le gène de la luciférase induit des métastases osseuses de nature purement ostéolytique. Les lignées LAPC9 et C4-2B induisent des lésions ostéoblastiques ou mixtes quand elles sont injectées dans l'os. Ces deux modèles permettent l'étude des interactions entre les cellules tumorales et le micro-environnement osseux mais ne permettent pas l'étude de la dissémination cellulaire et ne sont pas bioluminescentes. Le seul modèle qui semble actuellement adapté puisqu'il induit des lésions ostéoblastiques.et qui exprime le gène de la luciférase est la lignée 22RV1.

La lignée IGR-CaP1 induit des métastases osseuses avec des lésions mixtes après injection intra-cardiaque et quand elle est injectée directement dans l'os. Ces résultats ont été confirmés par une scintigraphie osseuse et par CT-scan. L'activité ostéolytique a été prouvée par la présence d'ostéoclastes au niveau des lésions. Ce modèle constitue donc un outil potentiellement intéressant pour étudier les mécanismes métastatiques et rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

CHAPITRE III : LES TRAITEMENTS DU CANCER DE LA PROSTATE

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I, le cancer de la prostate implique plusieurs anomalies moléculaires et génétiques qui évoluent et s'accumulent au cours de la progression de la maladie. De ce fait, le traitement du CaP est différent selon le stade du cancer, son statut d'androgéno-dépendance et son évolution potentielle. Les traitements proposés peuvent être de type curatif (radical) quand le cancer est encore localisé ou palliatif dans le cas d'un cancer évolué ou métastatique. Dans le chapitre suivant seront developpés les principes des différents traitements disponibles et leurs recommandations dans le traitement du CaP.

III.1 LES OPTIONS THERAPEUTIQUES:

La Chirurgie :

La prostatectomie radicale est le traitement le plus ancien des cancers de la prostate à un stade localisé. Cette intervention a pour but de réaliser l'exérèse de l'ensemble de la prostate, des vésicules séminales et d'une partie des canaux déférents. Elle est généralement associée à un curage ganglionnaire ilio-obturateur permettant de préciser la stadification. En effet, en cas de curage positif, l'intervention ne sera pas pratiquée. La mortalité observée suite à cette intervention est quasi nulle (< 1 %). Les complications de la prostatectomie radicale sont essentiellement l'impuissance et l'incontinence urinaire. Une impuissance sexuelle est très souvent constatée après la prostatectomie radicale dont l'incidence varie avec de nombreux facteurs, en particulier l'âge et la possibilité de conserver les nerfs érecteurs (en moyenne 70 à 100 % d'impuissance). Enfin, la complication la plus grave est celle de la récidive locale due à une tumeur résiduelle.

La radiothérapie :

En radiothérapie externe, les doses délivrées sont classiquement de 66-70 Gy/33-35 fractions et pendant 5-7 semaines au niveau de la prostate. La radiothérapie peut être utilisée en postopératoire, soit à titre adjuvant, soit lors d'une récidive locale diagnostiquée au toucher rectal, ou devant une élévation du PSA. La mortalité est nulle et les complications locales sont essentiellement de type de sténose de l'urètre, la rectite. Un risque d'incontinence urinaire est également parfois observé. Dans 40 à 60% des cas, il peut apparaître une impuissance sexuelle qui s'installe progressivement en quelques années. Les différentes séries publiées sont très contradictoires, il semble qu'il existe un haut risque de dysérections comparable à celui de la prostatectomie radicale.

La curiethérapie

La curiethérapie consiste à implanter des grains d'iode radioactif (140 Gy) dans la prostate tumorale, sous contrôle échographique. Son indication est réservée à des formes de bon pronostic (T<2b, Gleason < 6, PSA < 10ng/ml), avec un volume prostatique de moins de 60cm3. Les effets secondaires sont retardés de quelques semaines, et consistent en des difficultés mictionnelles et des douleurs pelviennes. Les risques d'incontinence sont très faibles et seulement 20 à 30% des patients présentent une impuissance séquellaire.

L'Hormonothérapie

Le traitement hormonal est basé sur le fait que le cancer de la prostate est androgénodépendant dans 80 % des cas et cliniquement sensible au sevrage androgénique. La diminution de l'action des androgènes peut être obtenue par plusieurs procédés qui sont décrit ci-dessous.

La pulpectomie

Cette intervention chirurgicale consiste à retirer la pulpe du testicule afin de supprimer la sécrétion endocrine du testicule (95 % de la testostérone circulante). Il s'ensuit une élévation secondaire de la LH-RH et de la LH et un risque d'impuissance qui est très élevé.

La castration chimique: les analogues de la LH-RH et/ou les anti-androgènes périphériques

Les analogues de la LH-RH sont administrés par voie parentérale pour inhiber la synthèse de testostérone par les testicules. La testostérone est transformée en dihydrotestostérone (DHT) qui se lie au AR dans la cellule prostatique. La stimulation en continue de l'axe hypothalamo-hypophysaire par les analogues de la LH-RH provoque une inhibition de la synthèse de testostérone. En début du traitement, il se produit une élévation transitoire de LH et de la testostérone, ce phénomène est appelé Flare-up. Il peut être contrôlé par l'utilisation concomittante d'anti-androgènes périphériques (per os) afin d'éviter une flambée évolutive du cancer prostatique.

Les anti-androgènes périphériques de type stéroïdiens ou non stéroïdiens, agissent directement au niveau du récepteur d'androgène. Ces anti-androgènes réalisent une compétition réversible avec la DHT au niveau du domaine de liaison du ligand du récepteur dans les cellules androgéno-sensibles. Les antiandrogènes (stéroïdiens ou non) sont parfois utilisés conjointement aux analogues de la LH-RH pour obtenir un blocage androgénique complet.

Bien que le cancer de la prostate soit sensible à l'hormonothérapie et que celle-ci permet généralement de contrôler la maladie pendant quelques années, dans la majorité des cas, un phénomène d'échappement se produit en moyenne 2 à 3 ans après le début de l'hormonothérapie. On considère qu'une élévation du PSA confirmée par trois prélèvements successifs chez un patient sous hormonothérapie signe un échappement et une résistance à la castration. L'apparition de nouvelles

lésions sous hormonothérapie est également un argument indiscutable de progression. Cet échappement résulte de la sélection de clones résistants à la castration qui préexistaient à l'hormonothérapie ou qui sont apparus au cours de celle-ci. Les options thérapeutiques pour un patient atteint de cancer de la prostate résistant à la castration étaient limitées jusqu'a l'apparition de la nouvelle génération d'hormonothérapie.

Les œstrogènes bloquent la sécrétion de la LH-RH et de la LH au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse supprimant ainsi la sécrétion de testostérone par les testicules. Cependant, ils sont responsables de complications cardiovasculaires sévères.

Nouvelle génération d'hormonothérapie

Recement, De nouveaux traitements qui interviennent au stade du CaP résistant à la castration (CRPC) sont en cours d'évaluation clinique ou viennent d'obtenir leur AMM, comme l'Abiratérone, le MDV3100, et le TAK-700.

L'abiratérone acétate est un inhibiteur de la biosynthèse des androgènes; elle inhibe le cytochrome P450-c17 (CYP17) qui assure l'activité 17 alpha-hydroxylase et 17,20 lyase. Cette activité enzymatique est présente au niveau des testicules, de la corticosurrénale et des tumeurs prostatiques. L'inhibition de CYP17 va provoquer un arrêt ou une chute de la biosynthèse des androgènes, testostérone et dihydrotestostérone et aussi du cortisol.

Les résultats d'une analyse lors d'une étude de phase 3 randomisée et contrôlée contre placebo, la COU-AA-301, ont démontré que les patients traités par l'acétate d'abiratérone et de la prednisone après échappement au docetaxel, connaissaient une amélioration significative de leur taux de survie global par rapport aux patients traités par prednisolone et par placebo. Cette étude à été menée sur 1195 patients atteints d'un cancer de la prostate résistant à la castration, après échec d'une chimiothérapie à base de docétaxel.Une nouvelle étude de phase III comparant l'abiratérone acétate / prednisone à la prednisolone / placebo menée sur 1000 patients atteint d'un CRPC avant une chimiothérapie par docetaxel est en cours.

Le MDV3100 est un antagoniste du récepteur aux androgènes qui bloque la fixation des androgènes sur le AR, empêchant la translocation nucléaire du complexe androgène/AR et le recrutement de coactivateurs. Son affinité pour le AR est très supérieure à celle du bicalutamide. Il n'a pas d'effet agoniste, au contraire des antiandrogènes habituels. Cette molécule a fait le sujet de deux études de phase 3 dont l'analyse est en cours.

Le TAK-700 (Orteronel®) est un inhibiteur sélectif non stéroidien de la synthèse des androgènes (inhibiteur sélectif du cytochrome P (CYP 17). Après des résultats prometteurs de phase 2, une phase 3 a été lancée aux Etats-Unis au 2ème trimestre 2011.

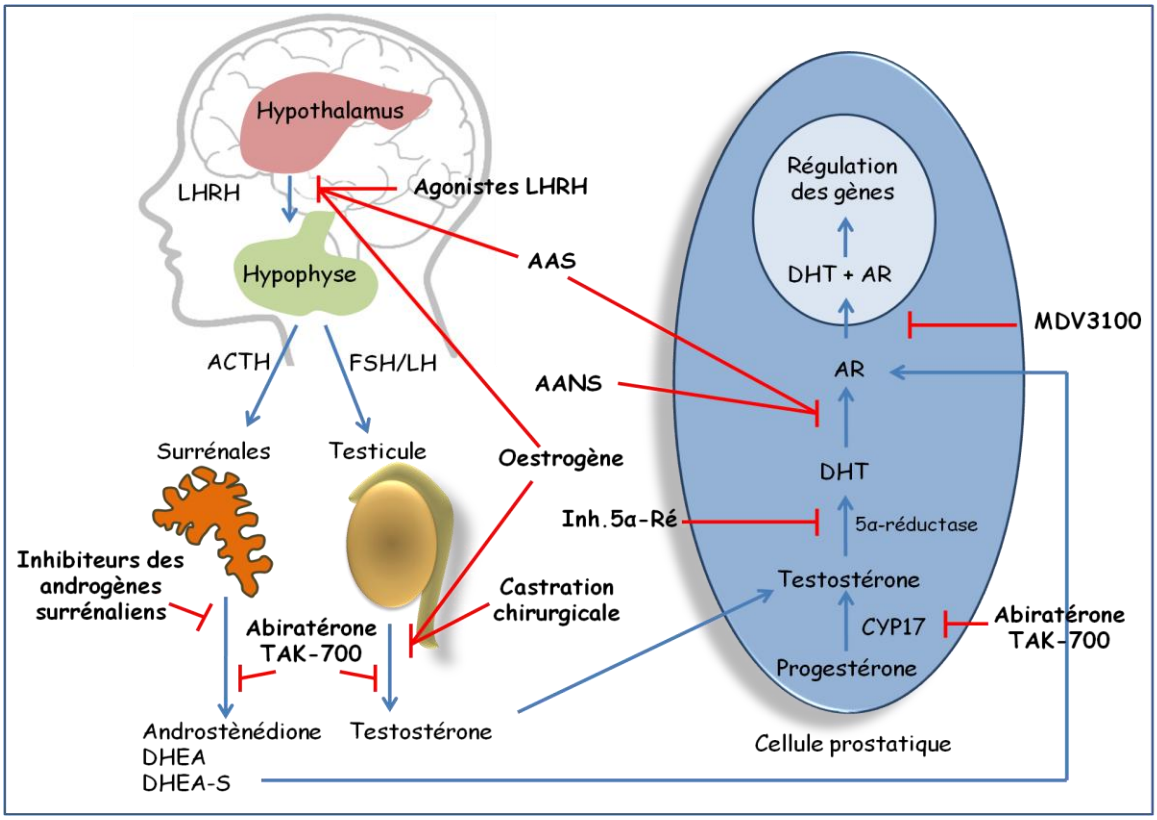


Figure 10 : Mécanismes de la régulation endocrinienne et localisation de l'effet des hormonothérapies.
(AAS : Anti-Androgène Stéroïdiens ; AANS : Anti-Androgène non Stéroïdiens) (Adapté de Massard et Fizazi, 2011)

III.2 LES INDICATIONS THERAPEUTIQUES :

Le traitement du cancer de la prostate dépend d'une série de facteurs, principalement le stade de la tumeur, le degré de différentiation, la valeur du PSA et l'âge du patient. Il existe des recommandations de traitement qui sont basées sur la stadification TNM de la tumeur, l'âge du patient et son espérance de vie. Le tableau 8 résume les principales options thérapeutiques. Un cancer de la prostate localisé est généralement traité par prostatectomie chirurgicale, ou par radiothérapie externe. L'hormonothérapie combinée à la radiothérapie est le traitement standard des cancers localisés à haut risque et l'hormonothérapie seule est utilisée en première ligne dans le CaP métastatique. La chimiothérapie est utilisée en traitement standard quand le CaP devient résistant à la castration.

Stade		Recommandations thérapeutiques
Localisé	T1-T2 N0-NX, M0	Surveillance Prostatectomie radicale Radiothérapie curiethérapie
Localement avancé	T3-T4 N0-NX, M0	Prostatectomie radicale Radiothérapie + hormonothérapie Hormonothérapie seule
métastatique	T1-T4 N1, M0-M1	Hormonothérapie
Echappement hormonal		Chimiothérapie (docetaxel)
CRPC résistant au docetaxel		- Re-introduction du docetaxel en monothérapie / en combinaison (patients répondeurs en1ère ligne) - Traitement en deuxième ligne : Cabazitaxel Abiratérone MDV3100 et TAK700 (en essai)

Tableau 9 : Recommandations thérapeutiques selon le stade du cancer de la prostate.

III.3 LA CHIMIOTHERAPIE

Au cours de ces dernières années, l'utilisation de protocoles moins toxiques ainsi que l'apparition de critères d'évaluation plus pertinents ont modifié la place de la chimiothérapie dans les cancers de la prostate, particulièrement le CRPC. Plusieurs études cliniques ont évalué le rôle de la chimiothérapie administrée en monothérapie ou en combinaison. Par rapport à d'autres maladies cancéreuses telles que le cancer du sein, le cancer de la prostate est une maladie relativement chimiorésistante, néanmoins, des résultats encourageants ont été obtenus au cours de ces dernières années. Un bénéfice clinique en faveur de la chimiothérapie dans les CRPC a été obtenu avec l'estramustine et le docetaxel. Des réponses moins intéressantes en termes d'efficacité et de toxicité ont été obtenues avec la doxorubicine, l'etoposide et la cyclophosphamide.

III.3.1 PRINCIPE DE LA CHIMIOTHERAPIE

Les agents anticancéreux inhibent la prolifération cellulaire (inhibition des mitoses) et entrainent la mort cellulaire. La plupart des médicaments atteignent la cellule cancéreuse engagée dans le cycle cellulaire. La chimiothérapie est d'autant plus efficace que les cellules ont une haute fréquence de réplication. Les tumeurs peu proliférantes seront donc moins sensibles. A l'inverse, les tissus sains très actifs (moelle osseuse, tube digestif, phanères, muqueuse, peau) seront atteints facilement. Les agents anticancéreux se caractérisent par leurs propriétés cytotoxiques. Toutes les drogues ont une toxicité hématologique plus ou moins forte, et une toxicité non hématologique. Le tableau 10 présente les principaux médicaments aujourd'hui utilisés en chimiothérapie anti-cancéreuse. Ils y sont classés suivant leur mécanisme d'action (Figure 11).

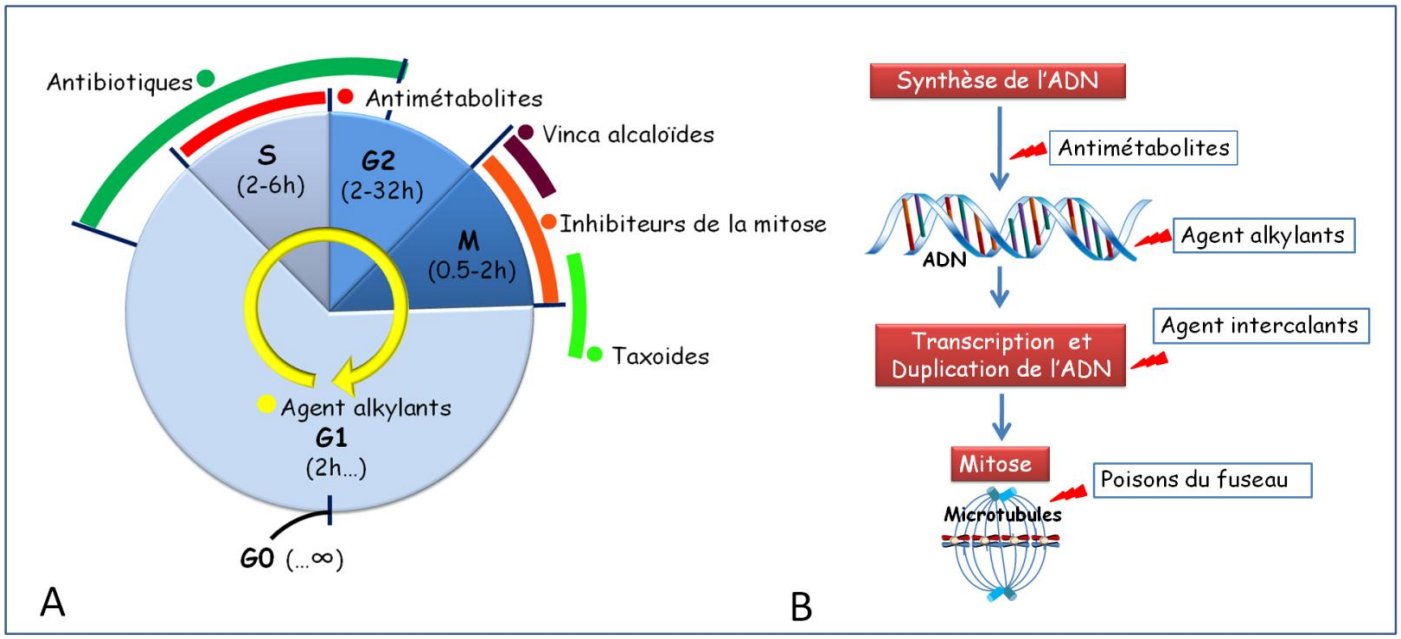


Figure 11 : Mode d'action des agents anticancéreux cytotoxiques.
A-Point d'impact des agents anticancéreux au niveau du cycle cellulaire. B-Cibles au niveau de la cellule.

Poisons du fuseau / inhibiteurs mitotiques (Phase M)	**Assemblage des microtubules**	***Vinca alkaloides*** (Vinblastine, Vincristine, Vinflunine, Vindesine, Vinorelbine)	
	Assemblage des microtubules	***Taxanes*** (Paclitaxel, Docetaxel, Cabazitaxel,) · ***Epothilones*** (Ixabepilone)	
Inhibiteur de la réplication de l'ADN	**Precurseus de l'ADN / Antimetabolites (Phase S)**	**Acide folique**	- *Inhibiteurs de la dihydrofolate réductase* (Aminopterine, Methotrexate, Pemetrexed) - *Inhibiteurs de la thymidylate synthase* (Raltitrexed, Pemetrexede)
		Purine	-*Inhibiteur de l'adénosine désaminase* (Pentostatin) -*Inhibiteurs des ribonucléotide réductases* (Cladribine, Clofarabine, Fludarabine) - *Thiopurine* (Thioguanine, Mercaptopurine)
		Pyrimidine	- *Inhibiteurs de la thymidylate synthase* (Fluorouracil, Capecitabine, Tegafur, Carmofur, Floxuridine) - *Inhibiteur de l'ADN polymérase* (Cytarabine) - *Inhibiteurs de la Ribonucléotide Réductase* (Gemcitabine) - *Agent hypométhylant* (Azacitidine, Decitabine)
		Déoxyribonucléotide	-*Inhibiteurs de la Ribonucléotide Réductase* (Hydroxyurée)
	Inhibiteur de la topoisomérase (phase S)	**I**	- *Dérivés de la Camptothécine* (Camptothécine, Topotécan, Irinotécan, Rubitécan, Bélotécan)
		II	- *Épipodophyllotoxines* (Etoposide, Teniposide)
		II + Intercalant	-*Anthracyclines* (Aclarubicine, Daunorubicine, Doxorubicine, Epirubicine, Idarubicine, Amrubicine, Pirarubicine, Valrubicine, Zorubicine) · - *Anthracenediones* (Mitoxantrone, Pixantrone)
	Pontage de l'ADN	**Agents alkylants**	- *Moutarde à l'azote:* Cyclophosphamide (Ifosfamide, Trofosfamide) · Chlorambucil (Melphalan, Prednimustine) · Bendamustine · Uramustine · Estramustine - *Nitrosourées:* Carmustine · Lomustine (Semustine) · Fotemustine · Nimustine · Ranimustine · Streptozocin - *Sulfonates d'alkyle:* Busulfan (Mannosulfan, Treosulfan) - *Aziridines:* Carboquone · ThioTEPA · Triaziquone · Triéthylène Mélamine
		Alkylant-like	- *Sel de platine* (Carboplatine, Cisplatine, Nedaplatine, Oxaliplatine, tétranitrate de triplatine, Satraplatine)
		Non classique	- *Hydrazines* (Procarbazine) - *Triazenes* (Dacarbazine, Temozolomide) · Altretamine · Mitobronitol
		Agent intercalants	Streptomyces (Actinomycin, Bleomycin, Mitomycin, Plicamycin)

Tableau 10 : Classification des agents anticancéreux cytotoxiques.
(En rouge les molécules utilisées dans la CaP)

III.3.2 LES CLASSES DES AGENTS ANTICANCEREUX

LES INTERCALANTS

Ces molécules ont un mécanisme d'action complexe, elles s'intercalent entre 2 paires de bases et perturbent la structure hélicoïdale de l'ADN, empêchant ainsi sa réplication et sa transcription. Les anthracyclines agissent avec l'ADN comme des agents intercalants mais favorisent par ailleurs la formation de radicaux libres toxiques (superoxydes). Le "chef de file" des molécules de la famille des antracyclines est la doxorubicine. La doxorubicine, l'épirubicine et la mitoxantrone ont été utilisées dans le traitement des tumeurs solides notamment le CaP et des hémopathies malignes. C'est la toxicité cardiaque qui est limitante, pouvant survenir jusqu'à plusieurs années après l'arrêt du traitement. En raison de son caractère moins cardiotoxique par rapport aux anthracyclines, La Novantrone® (Mitoxantrone) a été étudiée dans les cancers de la prostate. Sa toxicité est principalement hématologique. Cette molécule a montré un bénéfice clinique significatif sur la douleur par rapport à un traitement par corticothérapie seule.

LES ALKYLANTS

Les alkylants agissent en formant des ponts chimiques entre deux sites d'un même brin d'ADN ou de deux brins d'ADN voisins. Ces ponts vont gêner la réplication de l'ADN. Ils comprennent plusieurs groupes : les oxazophorines et les sels de platine. En terme de taux de réponse, ils sont peu attractifs pour le CRPC et surtout toxiques chez les sujets âgés. On trouve dans cette famille de molécules, les Oxazophorines qui comprennent la cyclophosphamide (Endoxan ®) et l'ifosfamide (Holoxan®), les sels de platine avec le cisplatine® et le carboplatine (Paraplatine®). Dans le CaP, l'agent alkylant utilisé est l'estramustine. L'association de cette molécule au docetaxel est le traitement de référence dans le stade métastatique résistant à la castration. L'estramustine possède un effet synergique avec le docetaxel et elle peut interférer avec les mécanismes de résistance.

LES ANTIMETABOLITES

Les antimétabolites se substituent à des acides aminés ou à des nucléotides. Ce sont des agents phase-dépendants, spécifiques de la phase S. Par ce biais, ils empêchent les synthèses nucléotidiques, et, secondairement, la synthèse des chromosomes, rendant la mitose impossible. Ils peuvent également intervenir sur les systèmes enzymatiques responsables de l'incorporation des acides aminés et des différents précurseurs comme le 5 Fluoro-Uracile (5FU) qui est métabolisé dans la cellule en un dérivé

actif inhibant la thymidilate synthétase, et donc la synthèse des pyrimidines. Son utilisation dans le CaP n'est pas recommandée.

LES INHIBITEURS DES TOPO-ISOMERASES

Les topoisomérases régulent les enroulements de la double hélice d'ADN afin de permettre sa réplication correcte (234). Elles assurent leur fonction en réalisant des coupures réversibles dans la double hélice après avoir formé des liaisons covalentes à l'ADN. Deux classes de topoisomérases (I et II) sont distinguées d'après le nombre de brins d'ADN qu'elles clivent lors de leur activité catalytique.

Les inhibiteurs de topoisomérase I

La camptothécine (extrait des écorces de l'arbre *Camptotheca acuminata)* est le premier poison agissant sur la topoisomérase I à avoir été découvert (235). Elle agit en stabilisant le complexe covalent topoisomérase I-ADN et inhibe ainsi la réplication de l'ADN induisant un blocage des cellules en phase S et finalement la mort de ces cellules. Le Topotécan et l'Irinotécan, deux dérivés hémisynthétiques de la camptothécine, sont des inhibiteurs puissants de la topoisomérase I, plus solubles dans l'eau que leur analogue naturel. Ils sont utilisés pour le traitement de plusieurs tumeurs solides (236).

Les inhibiteurs de topoisomérase II

L'étoposide, un des premiers agents ciblant la topoisomérase II, est dérivé de la podophyllotoxine issue des racines de *Podophyllum peltatum.* Il est par exemple utilisé dans le traitement de cancers du poumon, du testicule ou de glioblastomes.

Agents intercalants : Ces molécules s'intercalent dans la double hélice d'ADN entre 2 bases adjacentes au niveau du complexe topoisomérase II-ADN et stabilisent les coupures double-brins. Ils provoquent des troubles de la replication et de la transcription de l'ADN (G1- G2) ainsi que la formation de radicaux libres et de lésions membranaires.

Les Anthracyclines : Les anthracyclines sont d'origine fongique. Ils s'intercalent entre les brins de DNA et l'hydrolysent à la manière des nucléases et peuvent également entraîner des altérations membranaires. Leur activité pharmacologique provient de réactions d'oxydoréduction avec formation d'intermédiaire semiquinone par gain d'un électron cédé par le NADPH et génération d'eau oxygénée, H2O2, de radicaux libres oxygène et ·OH. Les principales anthracyclines sont la daunorubicine, la doxorubicine, l'épirubicine, la zorubicine, l'aclarubicine, la pirarubicine et l'idarubicine.

Les Anthracénediones : Les anthracénediones sont des analogues des anthracyclines qui ont ete developpes pour diminuer les effets secondaires des anthracyclines comme la cardiotoxicite (237). Tout comme pour les anthracyclines, les acides nucleiques constituent la cible premiere des anthracenediones par intercalation, ou liaison non covalente. Ces molecules

sont aussi connues pour inhiber la proliferation et la synthese de macromolecules (via l'inhibition des topoisomerases) dans plusieurs lignees tumorales (238). Parmi les inhibiteurs de la topoisomérase la mitoxantrone fait partie de l'arsenal thérappeutique du cancer de la prostate échappant au docetaxel.

LES POISONS DU FUSEAU MITOTIQUE

Ils agissent en inhibant la polymérisation (vinca-alcaloïdes) ou la dépolymérisation (taxanes) de la tubuline empêchant la dynamique du fuseau mitotique,

Les vinca-alcaloïdes (anciennement appelés alcaloïdes de la pervenche) sont des antimitotiques qui agissent en empêchant la formation du fuseau chromatique préalable à la mitose (239). La famille des Taxoides, ou taxanes est constituée principalement de trois molécules : le paclitaxel, le docetaxel et le Cabazitaxel. Le docetaxel est, depuis 2004, le traitement standard utilisé en 1ère ligne pour le CRPC métastatique et récemment, le Cabazitaxel est devenu un des traitements standards en 2ème ligne pour le CRPC métastatique en post-Taxotère. (Cette famille est développée dans le chapitre suivant).

CHAPITRE IV : LES TAXANES

Le traitement de référence des cancers de la prostate métastatiques est l'hormonothérapie. Cependant, la majorité des patients progresse vers un stade hormono-résistant. On dit alors que le cancer est résistant à la castration (CRPC). Une amélioration de la survie globale a été obtenue grâce aux taxanes, plus précisément le docetaxel qui est devenu depuis 2004 le traitement de référence du CRPC. Récemment, le Cabazitaxel, issu d'une nouvelle génération de taxanes, a démontré une amélioration significative de la survie globale en deuxième ligne dans les CRPC résistants au docetaxel. Dans ce chapitre, nous détaillerons les trois principaux agents de la famille des taxanes, leur cible, et leur mode d'action.

IV.1 HISTORIQUE

Le TAXOL® (paclitaxel) et le TAXOTERE® (docetaxel) sont 2 molécules antinéoplasiques appartenant à la famille chimique des taxanes. Identifié en 1971, le paclitaxel, extrait de l'écorce d'if (Taxus brevifolia) (240) a montré une importante activité cytotoxique contre différentes tumeurs murines et humaines. Son mécanisme d'action a été découvert en 1979, définissant une nouvelle classe d'agents cytotoxiques: les taxanes (241). Il a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis en 1992 comme chimiothérapie anti-cancéreuse de référence dans le cancer de l'ovaire avancé (242). Il est utilisé aux USA depuis 1992 et commercialisé en France depuis 1994. Il est indiqué dans le traitement initial du cancer du sein localement avancé ou métastatique en association avec une anthracycline ou le trastuzumab. Il est indiqué en association au cisplatine dans le cancer de l'ovaire et le cancer bronchique non à petites cellules.

IV.2 LE DOCETAXEL

Le docetaxel est un taxoïde de seconde génération. C'est un dérivé hémi-synthétique d'un précurseur isolé des feuilles de l'if d'Europe *(Taxus baccata)*, le 1O-déacétyl-baccatine III, synthétisé en 1986 par l'Institut Français de Chimie des Substances Naturelles en collaboration avec le Centre National de la Recherche Scientifique. Le docetaxel montre une activité antitumorale sur des lignées cellulaires murines de leucémie et de fibrosarcome ainsi que sur des lignées cellulaires humaines de cancer du sein, du colon et de la vessie. Le docetaxel est commercialisé en Europe depuis juillet 1995 sous le nom de Taxotère® par le laboratoire Sanofi-Aventis.

Le Paclitaxel et le docetaxel se ressemblent par leurs structures et leur mécanisme d'action, mais ils diffèrent sur plusieurs aspects. Ils y exercent notamment des effets différents au niveau de la polymérisation de la tubuline. Le docetaxel apparaît plus actif dans l'inhibition de la dépolymérisation.

Sur des données précliniques, le docetaxel a démontré un index thérapeutique plus important que le paclitaxel.

En Europe, le docetaxel possède plusieurs indications: traitement adjuvant ou métastatique des cancers du sein, des cancers bronchiques non à petites cellules non résécables localement avancés ou métastatiques, des cancers de la prostate hormonorésistants, ainsi que des cancers gastriques localement avancés ou métastatiques. Dans les cancers gastriques localement avancés ou métastatiques, il est indiqué en association au cisplatine et au 5FU (243). Dans le cancer du sein métastatique, il est prescrit en monothérapie ou en association à une anthracycline, en première ligne ou deuxième ligne métastatique, chez les patientes qui n'ont pas reçu de traitement antérieur à base d'anthracycline (244). Le docetaxel est prescrit en monothérapie ou en association avec la capécitabine chez les patientes résistantes aux anthracyclines ou en rechute après un traitement par une anthracycline (245). Il est indiqué en monothérapie en deuxième ligne après échec à un traitement à base de sel de platine (246) ou en association à un sel de platine en première ligne dans les cancers bronchiques non à petites cellules (247). Dans les cancers de la prostate hormono-résistants, il est indiqué en association à la prednisone (248). Par ailleurs, il est utilisé en association avec l'Estramustine dans le CaP métastatique (249).

IV.3 LE CABAZITAXEL

Le Cabazitaxel est la dernière génération de taxanes. Cette molécule hémi-synthétique est un dérivé « dimethyloxy » du docetaxel. Contrairement à son prédécesseur, cette molécule a la capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique (250). Le cabazitaxel a été comparé au docetaxel sur plusieurs lignées cellulaires humaines et murines. Les deux molécules semblent avoir la même efficacité sur les cellules sensibles au docetaxel. En revanche, le cabazitaxel a une efficacité supérieure sur les cellules résistantes à la doxorubicine, la vincristine, la vinblastine, le docétaxel et le paclitaxel, ainsi que sur les cellules surexprimant la P-gp (251).

Dans les cellules du cancer du côlon CaCo-2 surexprimant la P-gp, le cabazitaxel est plus efficace que le docetaxel. De plus, *in vivo*, chez la souris *nude* portant des xénogreffes (HCT-116 colon, A549 poumon, MIA PaCa-2 pancréas et Du-145 CaP), cette molécule semble avoir une activité antitumorale supérieure à celle du docetaxel. En revanche, même si cette molécule a un effet anti-tumoral sur la tumeur murine de mélanome B16/TXT résistance au docetaxel acquise *in vivo*, son activité reste limitée sur les deux modèles Calc18/ TXT and P338/VCR qui expriment le gène codant pour ABCB1/Mdr-1(251).

Le cabazitaxel est prometteur pour les cancers chimiorésistants, en particulier les cancers de la prostate dont le traitement de référence est le docetaxel. Récemment, les résultats de l'étude TROPIC de phase III qui compare l'association du cabazitaxel et de la prednisone, au principe actif mitoxantrone associé à

la prednisone, montrent que l'association cabazitaxel-prednisone améliore significativement la survie globale et la survie sans progression chez des patients atteints d'un CRPC en progression malgré une chimiothérapie antérieure à base de docétaxel ». Cependant, malgré le bénéfice de survie, la majorité des patients finit par progresser sous traitement. De plus, les effets secondaires de cette molécule, particulièrement la neutropénie, restent un facteur limitant (81,7 %) (252). Une étude comparative du cabazitaxel et du docetaxel en première ligne dans le traitement du CRPC n'a pas encore été proposée.

IV.4 LES MICROTUBULES : CIBLES DES TAXANES

Les microtubules (MTs) sont des composants du cytosquelette. Ils affectent un grand nombre de fonctions cellulaires vitales et déterminent la forme de la cellule. Ils constituent le squelette des cils et des flagelles et jouent un rôle important dans le guidage et le transport de matériaux intracellulaires, la sécrétion d'hormones, le transport de granules et l'accrochage de récepteurs à la membrane. Ils ont une fonction capitale dans la formation du fuseau mitotique permettant les mouvements des chromosomes lors de la mitose vers les deux pôles avant la division cellulaire (253). Ceci fait des MTs une cible thérapeutique potentiellement pertinente des traitements anticancéreux.

IV.4.1 LES MICROTUBULES : STRUCTURE ET DYNAMIQUE

Les microtubules sont des filaments dynamiques présent au sein de la cellule sous deux formes en équilibre : la forme monomérique, soluble et dispersée dans le cytoplasme (la tubuline) ou la forme polymérique, insoluble et organisée en filaments (les microtubules).

LA TUBULINE :

Il existe sept familles de tubuline : α, β, γ, δ, ε, ζ et η. Les plus étudiées sont les tubulines α, β et γ présentes chez tous les eucaryotes (254). Seules les formes α et β sont constitutives des MTs. Les autres formes sont associées aux MTs ou ont des fonctions servant aux MTs. Les tubulines α, β possèdent environ 450 aa et un poids moléculaire apparent de 50 kDa. Elles sont codées par plusieurs gènes et subissent des modifications post-traductionnelles.

La structure des tubulines α et β sont très proches. Elles sont constitueés de trois domaines fonctionnels (239) (Figure 12A) :

● Un domaine N-Terminal formé de 6 feuillets β (S1-S6) et 6 hélices (H1-H6), impliqué dans la liaison au (GDP/GTP).

● Un domaine central formé de 4 feuillets β (S7, S10) et 3 hélices (H8 –H10) impliqué dans l'interaction entre les deux monomères α et β pour former les protofilaments.

● Un domaine C-terminal constitué de 2 hélices α antiparallèles (H11 et H12) formant un domaine d'interaction avec les MAPs (*microtuble associated proteins*) tel que les protéines tau, MAP2, stathmin, Kinesin 7, KSP (*kinesin spindle protein*) (239)(255).

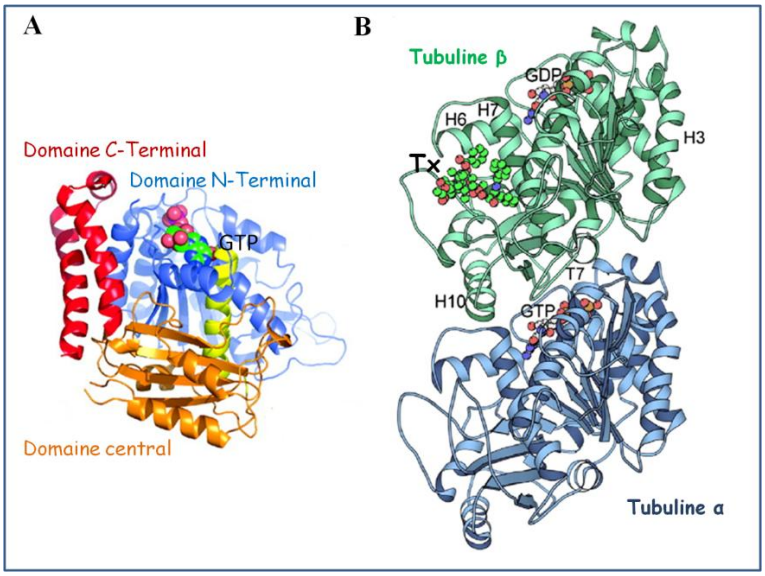


Figure 12 : Structure de la tubuline
A-Structure d'un monomère de tubuline.
B-Structure du dimère α-βtubuline et site de liaison des taxanes (Tx).

Les tubulines α et β s'assemblent par une liaison de faible énergie très stable pour former un dimère, capable de lier deux molécules de GTP : l'une est non-échangeable et non-hydrolysable en GDP et se situe au niveau de la sous unité α, l'autre est échangeable et hydrolysable en GDP et phosphate inorganique et se situe au niveau de la sous unité β (256). La structure du dimère de tubuline α et β se divise classiquement en trois parties : une partie amino-terminale contenant le site de liaison échangeable du GTP, une partie intermédiaire possédant le site de liaison du taxol et une partie carboxy-terminale qui expose les résidus carboxy-terminaux de l'α-tubuline (257)(258) (Figure 12B).

LES MICROTUBULES

Les microtubules sont des tubes creux d'un diamètre d'environ 25 nm, d'une lumière de 10 nm et d'une longueur variable pouvant dépasser plusieurs centaines de microns. La paroi du microtubule est formée de 13 protofilaments protéiques disposés en couronne (255)(259) résultant de la polymérisation d'hétérodimères de tubuline, lui-même composé des deux sous-unités α et β (260)(261).
Les protofilaments s'assemblent tout d'abord latéralement pour former des feuillets, puis se replient progressivement sur eux-mêmes autour d'un cœur central creux procurant au microtubule sa forme

tubulaire caractéristique. Les microtubules prennent souvent naissance au niveau des centres de nucléation situés dans la région centrale de la cellule d'ou ils irradient vers la périphérie.

Ils sont constamment en état dynamique de polymérisation et dépolymérisation (262). L'équilibre qui gère la polymérisation des microtubules est appelé instabilité dynamique. Au cours de ce processus, les microtubules subissent des périodes de transition très rapides entre croissance et rétrécissement, dues respectivement à l'association et la dissociation des dimères de tubuline aux extrémités des protofilaments. La transition d'une phase de croissance à un rétrécissement s'appelle une « catastrophe », l'inverse un « sauvetage » (263). La demi-vie moyenne d'un microtubule varie de 20 secondes à 10 minutes dans une cellule animale selon qu'elle est en division ou non. L'apport énergétique nécessaire pour l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation provient de l'hydrolyse du GTP. La molécule de GTP se lie à la sous-unité β d'un doublet de tubuline, cette liaison provoque l'hydrolyse de la molécule de GTP en GDP (260)(264).

Le microtubule est une structure polaire, dont l'une des extrémités croît environ trois fois plus vite que l'autre. Les extrémités de MTs à croissance lente proches du centre de nucléation sont désignées (-), celles qui en sont éloignées à croissance rapide sont désignées comme les extrémités (+) (261)(265). Lors de la polymérisation d'un microtubule, les doublets de tubuline s'ajoutent à son extrémité (+) pour permettre l'hydrolyse du GTP qu'ils portent, présentant ainsi une coiffe de GTP sur l'extrémité du microtubule. Cette coiffe de tubuline-GTP favorisera l'élongation de l'extrémité (+) par addition de nouvelles sous-unités. L'extrémité (–) du microtubule ne possèdant pas de coiffe tubuline-GTP est donc le siège d'une dépolymérisation continuelle (266)(267).

Cette instabilité dynamique est une caractéristique essentielle des microtubules, une perturbation de ce mécanisme conduit au blocage de la cellule dans l'une des phases de sa réplication, et peut aboutir à l'apoptose. Différents effecteurs permettent de contrôler le comportement de cette dynamique, notament les protéines stabilisatrices MAPs tel que MAP-2 (268) MAP/tau et MAP4. En général, la phosphorylation de ces protéines aboutit à leur dissociation des microtubules et/ou de la tubuline entraînant une instabilité des MTs (264).

Les protéines Kinases tel que la protéine Cdc2 qui contrôle la localisation des centromères (269), ou encore les protéines ERK et JNK qui contrôlent la migration cellulaire (270).

Les phosphatases qui régulent les MAPs comme les protéines PP1et PP2A(271).

Les protéines déstabilisatrices comme MCAK (Mammalian Centrosome-associated Kinesin (272) et l'oncoproteine 18/stathmin. La stathmin contrôle le fuseau mitotique en se liant aux extrémités des microtubules augmentant ainsi la catastrophe (264)(273).

MICROTUBULES ET MITOSE

La dynamique des microtubules et leur capacité à se polymériser et se dépolymériser est essentielle à la division cellulaire. *In vivo*, l'extrémité (-) des microtubules moins dynamique que l'extrémité (+), est généralement attachée au niveau des MTOCs (MicroTubule Organizing Centers) qui constituent les

sites de nucléation majeurs des microtubules (274)(275). Les Mts se polymérisent à partir du MTOC et forment des structures stables nécessaires pour le transport des vésicules et des protéines.

En prophase, la dynamique de l'extrémité (+) des microtubules est augmentée (276) et s'accompagne d'une augmentation de la nucléation de nouveaux microtubules entrainant la réorganisation du cytosquelette microtubulaire et l'établissement d'un fuseau bipolaire (277). Durant la prométaphase, les kinétochores se forment au niveau des centromères et l'extrémité (+) de certains microtubules du fuseau mitotique se prolonge et capture les chromosomes en s'accrochant aux kinétochores des chromatides sœurs (search and capture).

Pendant la métaphase, après la formation de la plaque équatoriale, les tensions subies par les kinétochores des chromosomes s'équilibrent progressivement et inhibent le point de contrôle du cycle cellulaire déclenchant ainsi le début de l'anaphase.

Durant l'anaphase, les chromatides sœurs se séparent brutalement après le clivage de la cohésine par la séparase. Elles se déplacent alors en direction du pôle sur les microtubules kinétochoriens qui se raccourcissent au fur et à mesure de la progression du kinétochore. Les microtubules polaires s'allongent, et les pôles du fuseau mitotique s'éloignent l'un de l'autre entraînant avec eux les chromatides. En télophase, les microtubules kinétochoriens disparaissent pour permettre la cytocinèse et la génération de deux cellules filles. Les différentes étapes de la dynamique des microtubules au cours de la mitose sont résumées dans la figure 13.

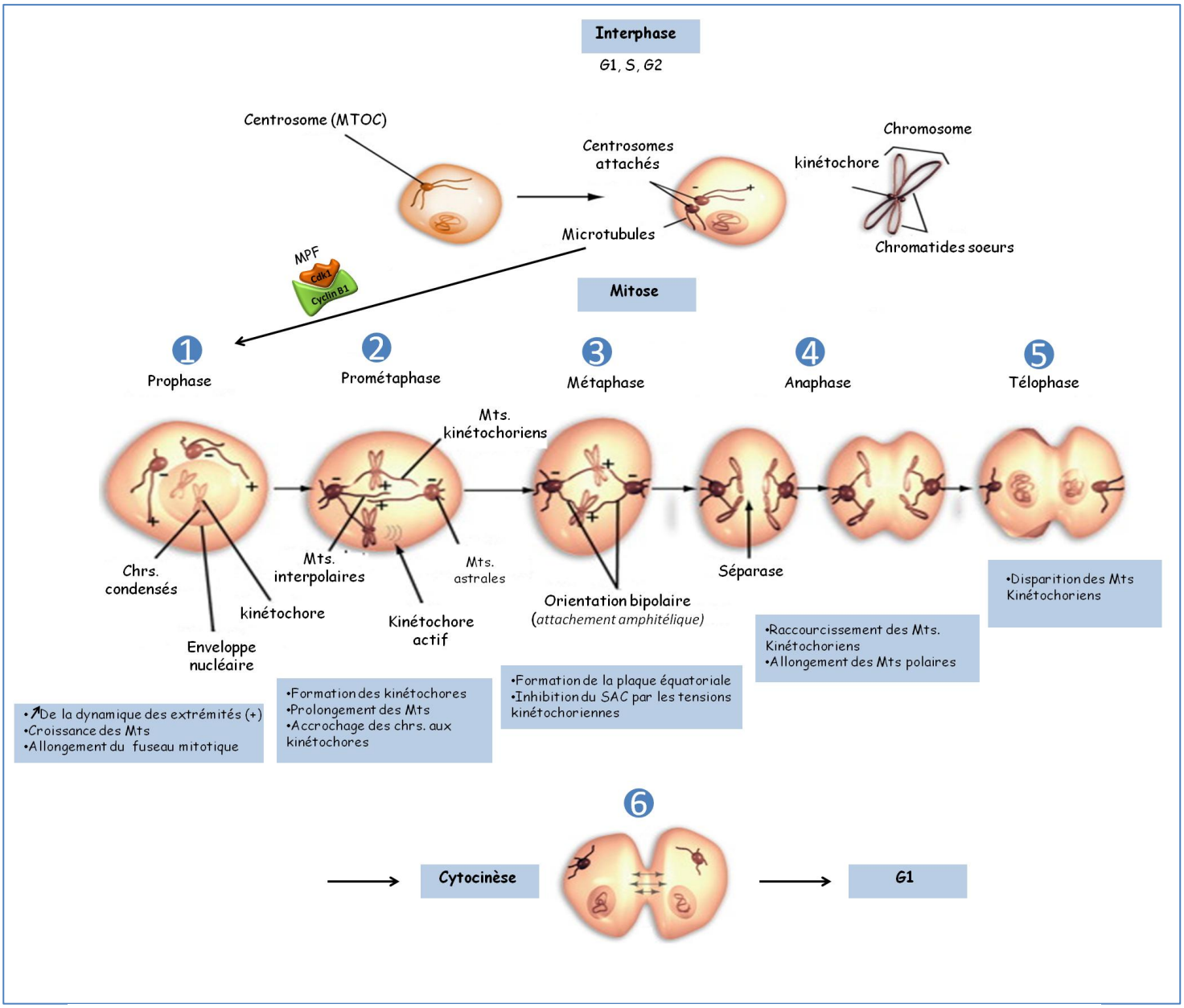


Figure 13 : Représentation schématique de la dynamique des microtubules (Mts) au cours de la mitose.

(Adapté de McGrogan et al., 2008)

IV.5 MECANISME D'ACTION DES TAXANES AU NIVEAU DES MICROTUBULES DU FUSEAU MITOTIQUE

Les poisons du fuseau connus avant 1979 (colchicine, alcaloïdes de la pervenche) ont un mécanisme d'action qui favorise la dépolymérisation des microtubules en tubuline. Le mode d'action des taxanes est différent, ils agissent en favorisant la stabilité et l'assemblage des microtubules et en inhibant leur dépolymérisation. Cela conduit à une diminution forte de la tubuline libre et à l'interruption de la mitose et de la réplication cellulaire, responsable d'un effet cytotoxique (278).

Le site de liaison des taxanes est situé au niveau de la β-tubuline (a.a 217-233) (279). C'est une région hydrophobe qui permet au paclitaxel de se lier aux protéines par des liaisons hydrogène et des contacts hydrophobes avec les hélices H1, H6 et H7 (280).

Les taxanes modifient l'équilibre microtubule-tubuline, favorisent l'assemblage de la tubuline en microtubules stables et inhibent leur dépolymérisation conduisant à une forte diminution de la tubuline libre.

Le paclitaxel induit la formation de microtubules plus étroits (22 nm de diamètre) limités à 12 protofilaments. Ces MTs se disposent de manière anarchique et se forment de manière continuelle, empêchant ainsi la construction du fuseau mitotique nécessaire à la bonne réplication de la cellule. Il provoque également la formation d'un nombre excessif d'asters du fuseau anormaux.

Le docétaxel agit sur le même site récepteur du microtubule que le paclitaxel, avec une affinité plus forte (281). Il est actif essentiellement au cours de la phase S du cycle cellulaire. Contrairement au paclitaxel, la fixation du docetaxel aux microtubules ne modifie pas le nombre de protofilaments. Le docétaxel pénètre dans les cellules à des concentrations élevées et y persiste pendant une durée prolongée. *In vivo*, l'activité du docetaxel est indépendante des modalités d'administration.

Les études réalisées *in vitro* ont montré que l'effet cytotoxique des taxanes (paclitaxel et docetaxel) dépendait du temps et de la concentration. Ces drogues ont un effet antiprolifératif important avec quatre fois plus de cytotoxicité pour le docetaxel (282).

L'étude de cytotoxicité du paclitaxel réalisée *in vitro* sur les lignées cellulaires HeLa, MCF7 et A549 par des tests de clonogénicité et de calcul d'IC50 a montré que la dose nécessaire pour obtenir une cytotoxicité de 50% (IC50) était comprise entre 2.5 et 7.5 nM. L'augmentation de la dose, jusqu'à plus que 50 nM, n'induit pas plus de cytotoxicité. En revanche, le prolongement du temps d'exposition à la drogue de 24 à 72h augmente la cytotoxicité de 5 à 200 fois. Dans les cellules HeLa, il a été observé que le paclitaxel induit des mitoses aberrantes avec des fuseaux mitotiques multipolaires donnant des cellules aneuploïdes. Une forte concentration de paclitaxel bloque les cellules en mitose et induit l'apoptose (283).

La même étude effectuée avec le docetaxel sur des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire SKOV-3, CAOV-3 et UTOC-1 a montré que l'IC50 du docetaxel est comprise entre 0.23 et 2.3 nM, soit une IC50 dix fois inférieure à celle du paclitaxel (284). Le docetaxel induit l'arrêt mitotique, l'aneuploïdie et

l'apoptose. De plus, il a été montré dans les cellules MCF7 et PC3 que le docetaxel est 10 à 100 fois plus puissant sur la phosphorylation de Bcl2 que le paclitaxel, ce qui pourrait expliquer son efficacité supérieure à celle du paclitaxel (285).

IV.6 LA REPONSE CELLULAIRE AUX ANTI-MITOTIQUES

Les cellules traitées par des anti-mitotiques peuvent entrer en arrêt mitotique d'une manière durable ou chronique jusqu'à la dégradation de la drogue. Cela permet aux cellules de survivre et de continuer à se diviser comme cellules diploïdes. En outre, certaines cellules engagées dans le cycle cellulaire sortent de la mitose sans passer par l'anaphase et la cytocinèse, se transformant ainsi en cellules tétraploïdes (4n) et multinucléées, sans ségrégation chromosomique (286). Le destin de ces cellules est complexe, elles peuvent mourir au moment de la mitose suite à l'arrêt mitotique. D'autres échappent à la mitose et meurent par apoptose ou sénescence en phase G1 ou en interphase. Certaines s'adaptent et continuent à se diviser en tant que cellules tétraploïdes.
La détermination du mode de mort cellulaire induite par un médicament anti-tumoral est assez complexe. Elle tient compte de plusieurs facteurs tels que le type de cellule, le fond génétique de la cellule, le type de dommages et la dose de drogue utilisée. L'apoptose n'est pas la seule forme de mort cellulaire en réponse aux taxanes. Il existe un autre processus de mort cellulaire appelé la catastrophe mitotique (287)(288). En général, les cancers hématologiques sont souvent sensibles à l'induction de l'apoptose. En revanche, pour la plupart des tumeurs solides présentant fréquemment une protéine p53 non fonctionnelle, la voie de mort cellulaire est la catastrophe mitotique.

Récemment, il a été montré dans le cancer du sein que le docetaxel pourrait avoir un double mécanisme selon la concentration utilisée: il induirait la nécrose à de faibles doses et l'apoptose à de fortes doses (289). Les fortes concentrations (100nM) permettent de stabiliser les microtubules en induisant une activation prolongée du point de contrôle (Spindle-Assembly Checkpoint), suivi par un échappement (mitotic slipage) et une multinucléation. Par contre, à de faibles concentrations (2-4nM), le docetaxel modifie la dynamique des microtubules sans les stabiliser. Dans le cancer du sein, le point de contrôle est activé de façon transitoire. Cette activation n'étant pas assez forte pour empêcher la ségrégation des chromosomes, les descendants sont aneuploïdes. Les causes de l'aneuploïdie sont multiples: un fuseau mitotique multipolaire, une aberration au niveau de la cytokinèse, une suramplification des centrosomes, un dérèglement au niveau de la cohésine des chromosomes, un attachement des chromosomes aux fuseaux, ou l'inefficacité du checkpoint (290).

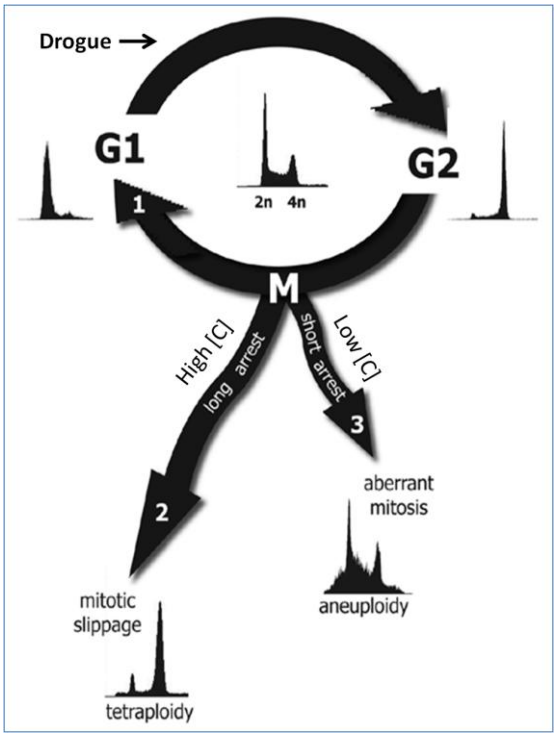


Figure 14 : Sortie de la mitose après traitement par docetaxel

(Adapté de Hernandez et al., 2007)

Le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle (G1 (2n), S, G2 (4n), M), dépend de la concentration de la drogue. Les cellules qui ne reçoivent pas la drogue sortent de la mitose et recommencent un nouveau cycle. Au contraire, les cellules qui reçoivent le docetaxel subissent un long ou court arrêt au niveau de la mitose selon la concentration de la drogue. Les profils du cycle cellulaire sont obtenus après marquage à l'iodure de propidium.

IV.6.1 LA CATASTROPHE MITOTIQUE (MC)

La catastrophe mitotique (MC) est une forme particulière de la mort cellulaire ayant lieu pendant la mitose et plus spécifiquement en métaphase. Elle peut être induite par un dommage à l'ADN, par des agents perturbant la dynamique des microtubules, par des irradiations ou par la fusion de cellules asynchrones, à condition que le point de contrôle soit défaillant.

Dans le cas d'une cellule normale, une aberration au niveau du fuseau mitotique active le point de contrôle (spindle assembly checkpoint), et la transition métaphase/anaphase est retardée afin de réparer correctement les lésions et de s'assurer de la bonne séparation du matériel génétique. Le cas échéant, cette cellule entre en apoptose.

Si le point de contrôle de G2/M est défaillant, la cellule entre en mitose de façon prématurée avant que la réplication de l'ADN ne soit complète et/ou avant que la réparation de l'ADN ne soit terminée, et ce, sans entrer en apoptose. Dans ce cas, les cellules pourraient continuer la mitose au delà de la métaphase malgré la persistance de lésions sévères: une duplication centrosomique aberrante (cellules polycentrosomiques), une mitose multipolaire, une mauvaise ségrégation des chromosomes

(aneuploidie) ou une micronucléation. Cette hétérogénéité cellulaire se manifeste par une anisocytose (hétérogénéité de taille des cellules) et une anisocaryose (hétérogénéité au niveau du ratio noyau/cytoplasme). Pour éviter cela, la cellule va s'autodétruire lors de la mitose par catastrophe mitotique. Plusieurs exemples dans la littérature montrent qu'une perturbation de la mitose déclenche la catastrophe mitotique. Ces mutations sont de différents types comme la perte du facteur de transcription FoxM1 qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la ségrégation chromosomique et la mitose (291). La perturbation de l'attachement de la survivin, de MAD2 et de RCC1 aux chromosomes entraine la formation d'un fuseau mitotique défectueux (292). La perturbation de l'expression des protéines associées aux microtubules (MAPs) comme OP18, XKCM1 et MCAK essentielles pour la formation du fuseau mitotique et l'attachement des chromosomes (293), et de la Polo-like kinase 1 (PLK1) (294). Il a également été montré qu'un dominant négatif de la PLK1 induit la MC dans les cellules HeLa (295).

Il est important de bien différencier l'apoptose de la catastrophe mitotique car même si les signes morphologiques et biochimiques sont proches, ils correspondent cependant à deux mécanismes différents (Figure 15). La catastrophe mitotique a lieu uniquement pendant la mitose, suite à l'accumulation de lésions persistantes, où la cellule échappe aux différents points de contrôle du cycle cellulaire (principalement G2/M).

Une des caractéristiques morphologiques de la MC est la formation de cellules géantes et polynuclées (296), à chromosomes non condensés, ce qui la différencie de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie. La formation de ces cellules géantes peut être expliquée par plusieurs mécanismes : une division cellulaire anormale, une fusion des cellules filles après la mitose ou la conjonction des deux mécanismes. Ceci a été montré dans les cellules HeLa irradiées qui donnent naissance à des cellules filles binucléés (297). La division cellulaire multiple aboutit ainsi à des cellules géantes. D'un point de vue biochimique, ce type de mort cellulaire est indépendant de p53. Bien que différente de l'apoptose, la catastrophe mitotique peut impliquer l'activation de la machinerie apoptotique incluant la perméabilisation mitochondriale à savoir, la perte du potentiel membranaire, la libération dans le cytoplasme du cytochrome et de AIF (Apoptosis Inducing Factor), l'activation des caspases ainsi que la fragmentation de l'ADN (288)(298).

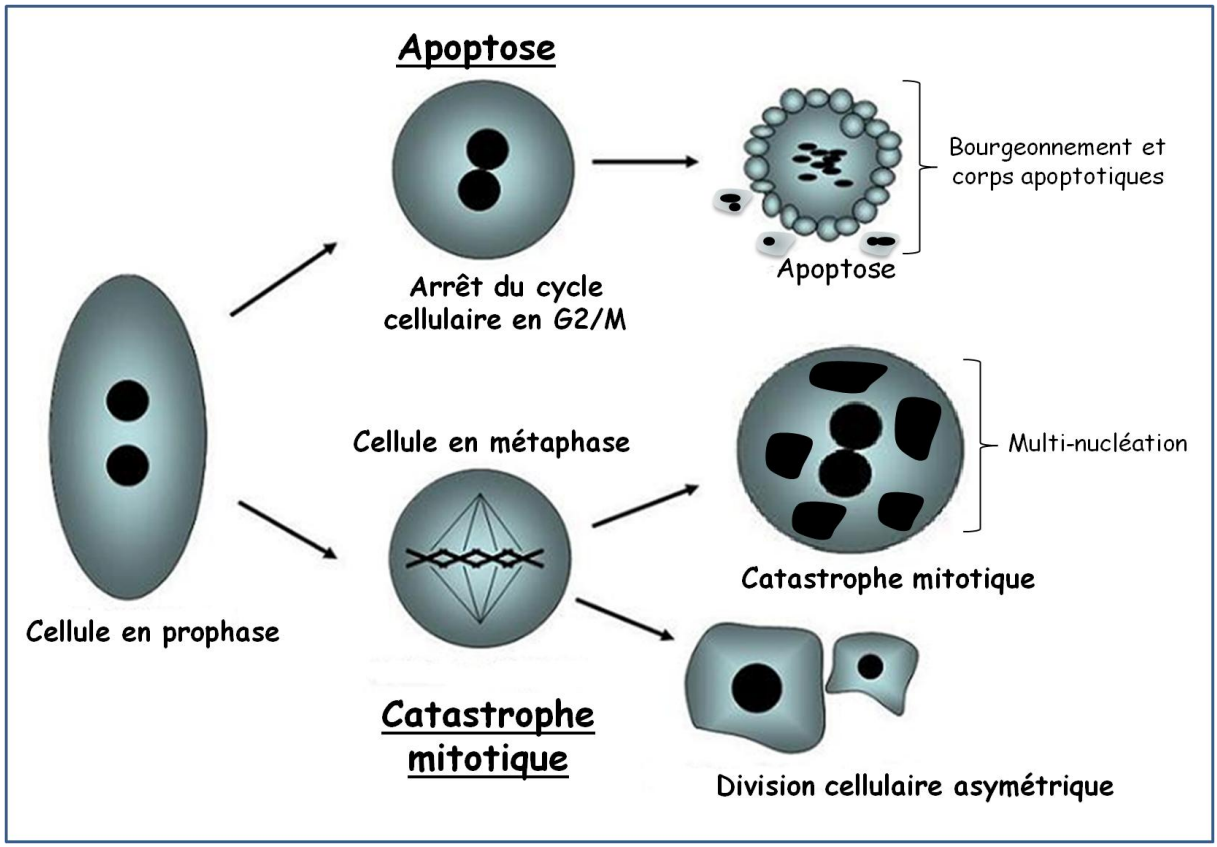


Figure 15 : Modes de mort cellulaire en réponse aux taxanes.

CHAPITRE V : LES MECANISMES DE RESISTANCES AUX TAXANES ET LES PROTEINES IMPLIQUEES

Un des obstacles majeurs de la chimiothérapie est le développement de mécanismes de résistance par les cellules tumorales. La résistance est un mécanisme complexe et multifactoriel, elle peut être naturelle (intrinsèque) ou acquise après exposition à la chimiothérapie (extrinsèque).

La résistance naturelle peut être due à des cellules tumorales non sensibles à la drogue, à une drogue insuffisamment sélective par rapport aux tissus sains ou bien à une mauvaise diffusion de la drogue. La diffusion de la drogue dépend du micro-environnement tumoral et des paramètres de pharmacocinétique/pharmacodynamie : absorption, distribution (désorganisation du réseau vasculaire), élimination de la drogue. La modification de l'un de ces paramètres modifiera la concentration adéquate de la drogue au niveau de la cible.

Une tumeur initialement sensible à une chimiothérapie peut devenir progressivement résistante. Cette résistance acquise dépend de plusieurs facteurs : l'hétérogénéité tumorale, la sélection de clones naturellement résistants et l'instabilité génétique des tumeurs (mutations spontanées, translocations de gènes, amplification de gènes). Ce chapitre détaille les mécanismes impliqués dans la résistance aux taxanes, le schéma ci-dessous récapitule ces différents mécanismes (Figure 16).

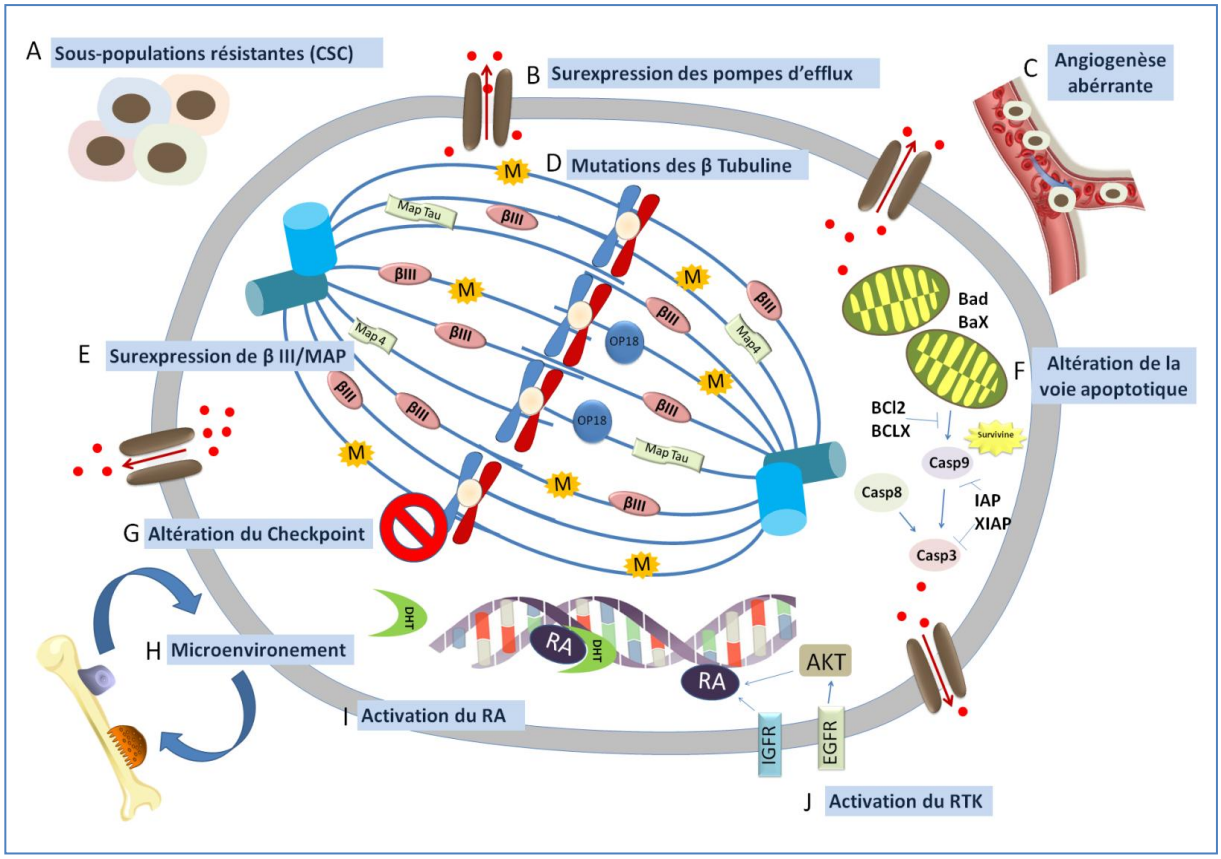


Figure 16 : Schéma récapitulatif représentant les différents mécanismes de résistances aux taxanes dans le CaP.

V.1 MECANISMES GENERAUX DE LA RESISTANCE :

V.1.1 DISTRIBUTION DE LA DROGUE

Dans les tumeurs solides comme le CaP, les drogues sont délivrées à la tumeur par le système vasculaire. Elles doivent ensuite infiltrer la matrice extracellulaire pour atteindre les cellules à une concentration suffisante pour être toxiques (299). Les cellules tumorales secrètent des facteurs de croissance angiogéniques pour stimuler le développement des vaisseaux sanguins à partir de ceux des tissus adjacents sains (300).

Dans les tumeurs les vaisseaux sanguins sont désorganisés, leur structure ainsi que le flux sanguins sont modifiés aboutissant à une diminution de l'apport en nutriments et en oxygène au niveau de la tumeur (301). Dans le CaP, qui présente souvent des régions d'hypoxie, la désorganisation des vaisseaux sanguins affaiblit également la distribution des drogues qui doivent pénétrer dans les tissus tumoraux par diffusion ou par convection (302). La désorganisation du drainage du système lymphatique nuit également à la distribution des médicaments (303). L'hypoxie et le mauvais apport en nutriments conduisent à une prolifération plus lente, et donc à une résistance aux drogues qui ciblent la mitose et à une sélection de clones à phénotype malin. Il a été montré dans le CaP que le facteur de transcription HIF1α activé en condition d'hypoxie, induit l'expression des protéines impliquées dans la survie et la métastase (304).

V.1.2 HETEROGENEITE DE LA TUMEUR

Le cancer de la prostate, comme d'autres tumeurs cancéreuses, contient plusieurs sous-populations cellulaires avec des capacités prolifératives différentes. Il est possible que ces différentes populations possèdent des capacités multiples à résister aux drogues. Les cellules souches cancéreuses ont été identifiées sur la base de l'expression des marqueurs de cellules souches CD44, CD133, et l'α2β1intégrine. Il a été montré que les CSC représentent 0.1% des cellules tumorales dans le CaP. On pense que ces cellules, qui ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier, pourraient être responsables de la résistance aux traitements, ou de phénomènes de récidive après traitement (305).

Par ailleurs, il a été observé une différenciation neuroendocrine des cellules de CaP sous privation androgénique rendant les cellules plus résistantes aux traitements. En effet, il a été montré que les cellules neuroendocrines sécrètent des neuropeptides comme la sérotonine et la bombesin qui stimulent la prolifération des cellules tumorales adjacentes et la progression tumorale (306).

V.1.3 MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

L'environnement cellulaire est aussi important que les cellules tumorales dans le mécanisme de résistance. Une des causes principales de l'échappement aux traitements est la persistance d'une tumeur résiduelle après traitement. On pense que les cellules tumorales qui échappent aux traitements sont nichées généralement dans un micro-environnement protecteur. Elles acquièrent par la suite une résistance moléculaire aux traitements et deviennent insensibles. La résistance due au micro-environnement peut être induite par deux types de signaux, d'une part des signaux solubles comme les cytokines, les chimokines et les facteurs de croissances secrétés par le stroma tumoral d'autre part des signaux d'adhésion engendrés par la liaison des intégrines des cellules tumorales aux fibroblastes du stroma et aux composantes de la matrice extra cellulaire (laminine, fibronectine et collagène) (307). Dans le CaP, il est possible que la résistance aux drogues soit due à une sécrétion paracrine de l'IL6 et du CXCL12/SDF-1 ainsi qu'à l'adhésion des cellules tumorales à la matrice extra cellulaire (307).
Les conditions micro-environnementales sont absentes dans les cultures cellulaires classiques où les cellules sont dispersées. Il a été montré dans les cellules murines EMT-6, que des cellules sensibles en condition de culture classique peuvent s'avérer résistantes dans les cultures en sphéroïde où le micro-environnement est le mieux préservé (308). Dans les métastases osseuses du CaP, les cellules tumorales, la matrice extracellulaire ainsi que les cellules osseuses produisent différentes molécules (comme l'endothéline 1 et la CCL2) qui stimulent la prolifération et la survie des cellules tumorales. Il a également été montré que la CCL2 est induite par la chimiothérapie et peut protéger les cellules du LNCaP, et du LAPC4 des effets toxiques du docetaxel par l'activation de la voie PI3K/AKT(309).
Récemment, il a été montré que l'activation de récepteur de l'endothéline 1 (ET_AR) est impliquée dans la résistance aux traitements dans le cancer de l'ovaire (310).

V.2 MECANISMES DE RESISTANCE INTRACELLULAIRE

V.2.1 LES MUTATIONS DE LA BETA TUBULINE

Les mutations de la β-tubuline modifient la dynamique et la stabilité des microtubules (311) ainsi que les sites de liaison des agents anti-mitotiques comme le paclitaxel (312). La majorité de ces mutations a été retrouvée au niveau de l'isotype HM40-β1-tubuline (312). Certaines lignées cellulaires s'adaptent aux agents anti-mitotiques en acquérant une mutation au niveau de la β-tubuline pour empêcher la liaison du paclitaxel aux microtubules(313)(314).
Après une longue exposition au paclitaxel et à l'épothilone, les lignées de cancer de l'ovaire fortement résistantes au paclitaxel (1A9-PTX10 et 1A9-PTX22) montrent généralement une perte de

l'hétérozygotie (LOH) de la β-tubuline sauvage. D'autres travaux effectués dans le cancer du poumon à non petites cellules, ont montré que les mutations de la β-tubuline trouvées chez les patients altèrent la dynamique des MTs et non pas l'affinité de la drogue vis-à-vis son site de liaison (315). Cabral et al, ont rapporté dans une lignée cellulaire de hamster que certains mutants résistants dépendent du paclitaxel (316). En l'absence de la drogue, les cellules sont incapables de compléter la polymérisation des microtubules et de former le fuseau mitotique. Elles ne progressent plus dans la mitose, deviennent géantes et polynucléées. Par contre, en présence du paclitaxel, les cellules cyclent normalement (317). *In vitro*, des mutations de la β-tubuline au niveau de la leucine (L 215) dans la région H6-H7 ont été retrouvées, ces mutations sont proches du site de liaison du paclitaxel (318). Sale et al. ont suggéré que la mutation de la β-tubuline dans la lignée de cancer de l'ovaire 1A9 est une conséquence de l'inactivation de la p53 dans cette lignée (319). En effet, l'inactivation de p53 empêche l'expression de hMSH2 (mismatch repair gene) ce qui augmente la fréquence des mutations de la β-tubuline (320). Dans une étude portant sur 49 patients atteints d'un cancer du poumon à non petites cellules, 19 patients présentent une mutation de la β-tubuline et majoritairement au niveau de l'exon 4. Aucun de ces patients n'a répondu au traitement par paclitaxel. En revanche, 39% des patients sans mutation ont partiellement ou complètement répondu au traitement avec une amélioration survie (10 mois contre 3 mois p=0.0001) (315). D'autres études montrent que les mutations β-tubuline sont rares dans le cancer du sein. Récemment, Hara et al. ont montré que la mutation F270I de la β1-tubuline est associée à la résistance au docetaxel dans une lignée de cancer de la prostate dérivée de la lignée LNCaP-hr et résistante au docetaxel (321). Cette mutation n'a pas été retrouvée jusqu'à présent dans les tumeurs du CaP.

V.2.2 LES ISOTYPES DE LA BETA TUBULINE

Il existe chez l'homme, sept isotypes de β-tubuline avec une distribution variable suivant les tissus (312). Leurs structures sont différentes au niveau des acides aminés de la région C-terminale (322), qui correspond au domaine d'interaction avec les protéines associées aux microtubules MAPs (323). L'isoforme βIII-tubuline est moins stable que les autres isotypes β-tubuline avec une tendance accrue de dépolymérisation. *In vitro*, il a été montré que les microtubules composés uniquement de la βIII-tubuline présentent un plus grand dynamisme, et ont un taux d'échange des dimères de tubuline avec les extrémités des microtubules plus élevé (324). C'est pourquoi la composition en isotypes des MTs a un effet sur leur dynamique et leur stabilisation par les taxanes. Des concentrations plus élevées de paclitaxel sont nécessaires pour stabiliser les microtubules formés de βIII-tubuline ou βIV-tubuline (325).

Dans le cancer du sein, il a été rapporté que l'expression de la β1 et β3-tubuline est associée à une mauvaise réponse au docetaxel. En effet, seulement 15% des tumeurs qui expriment un taux élevé d'ARNm de la β1-tubuline et β3-tubuline répondent au docetaxel, alors que 50% des tumeurs qui expriment fortement une seule des deux isotypes répondent et que 75% des tumeurs qui expriment

faiblement les deux isotypes répondent à la drogue (326). Dans le cancer de l'ovaire, il a été montré *in vitro* une corrélation entre l'expression de la β1 et β3-tubuline et la résistance au paclitaxel (327). Par contre, dans une étude *in vivo* réalisée sur 12 xénogreffes de cancer de l'ovaire obtenues à partir de biopsies de patients avant et après traitement par paclitaxel, la corrélation entre la résistance et l'expression de la β1 et β3-tubuline n'a pas été observée (328). Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (NSCLC), un haut niveau d'expression de β3-tubuline a été corrélé avec une moindre réponse ou une survie plus courte chez les patients présentant un NSCLC avancé traité par taxanes et vinorelbine (329). Dans une autre étude de phase III randomisée, comparant l'association carboplatine-paclitaxel à d'autres combinaisons, une survie sans progression plus faible a été observée chez les patients présentant une forte expression de la β3-tubuline au niveau des tumeurs comparativement à ceux qui montraient une expression faible (330). Une étude rétrospective confirme ces résultats en montrant un meilleur taux de réponse chez des patients traités par cisplatine-paclitaxel associé à une faible expression de la β3-tubuline (331). Une association entre l'expression de la β3-tubuline et la résistance au docetaxel a également été rapportée dans une série de cancer du pancréas (332). L'ensemble de ces résultats suggère que l'hyper-expression de la β3-tubuline dans certains types de cancers peut être un facteur de résistance aux taxanes. La β3-tubuline pourrait être utilisée comme un marqueur de résistance aux taxanes afin d'orienter le choix de la chimiothérapie vers un protocole sans taxanes.

En revanche, dans le cancer de la prostate, il existe peu de données concernant l'expression des isotypes de tubuline. L'isotype le plus exprimé est la βIV-tubuline (333). Cependant, l'expression de la β3-tubuline a été corrélée avec le mauvais pronostic et la résistance aux traitements. Une étude réalisée sur 28 biopsies de CaP localement avancé a montré que l'expression de la βIII-tubuline augmente après traitement par docetaxel dans les cancers de la prostate localement avancés (334). De plus, cette protéine joue un rôle dans la différenciation neuroendocrine des CaP, cette dernière est associée avec la chimiorésistance (335). Bien que la β3-tubuline soit corrélé avec le score de Gleason et le mauvais pronostic dans les CaP, aucune association entre la β3-tubuline et la résistance aux taxanes dans les CaP n'a été démontrée (335). Au contraire, Ranganathan et al montrent que la surexpression de la β3-tubuline dans des cellules de cancer de la prostate d'une façon stable n'a aucun effet sur la sensibilité des cellules au paclitaxel (336). En outre, plusieurs études suggèrent que l'expression de la β3-tubuline n'est pas seulement associée à la résistance aux taxanes mais à plusieurs genre d'anticancéreux (337)(338)(331). Pour finir, les données actuelles obtenues dans le CaP concernant la corrélation entre la résistance aux taxanes et la surexpression des isotypes de tubuline sont contradictoires et méritent une validation sur une grande série.

V.2.3 LES PROTEINES ASSOCIEES AUX MICROTUBULES (MAPS)

Il est important de distinguer les véritables protéines associées aux microtubules (MAPs) des simples partenaires des microtubules. Les protéines que l'on peut appeler MAPs régulent la dynamique des microtubules en interagissant avec les dimères de tubuline et les microtubules. Ainsi, elles influencent la sensibilité des cellules aux drogues inhibitrices des microtubules comme les taxanes. La famille des MAP contient les MAP1A, MAP1B, MAP2, MAP4 et MAPT/tau. Il s'agit de protéines stabilisatrices du réseau de microtubules (339)(340). Chaque protéine peut être exprimée sous la forme de plusieurs isoformes. La protéine MAPT/tau existe sous 6 isoformes différents obtenus par épissage alternatif ou par des modifications post-traductionnelles.

LA PROTEINE MAPT/TAU

La protéine MAPT/tau lie les microtubules par l'intermédiaire de motifs répétés, notés R1 à R4, présents dans leur région C-terminale. Il y a 3 isoformes 3R et 3 isoformes 4R. La protéine MAPT/tau est essentiellement exprimée dans le cerveau. Elle est connue pour ses effets activateurs de la polymérisation et stabilisateurs des microtubules qui dépendent du nombre de zones répétées. Les isoformes 4R ont une puissance de stabilisation des microtubules supérieure aux isoformes 3R. La protéine MAPT/tau se lie longitudinalement sur la surface intérieure et extérieure des microtubules, entre deux dimères de tubuline adjacents sur les protofilaments (Figure 17). Elle peut se lier également au site spécifique du paclitaxel. La liaison de MAPT/tau aux microtubules est différente selon la présence ou l'absence de paclitaxel. En l'absence de paclitaxel, MAPT/tau se lie fortement aux microtubules et se dissocie lentement, alors qu'en présence de la drogue elle se lie modérément aux microtubules et se dissocie rapidement. Quand la concentration de MAPT/tau est faible au moment de la polymérisation, la stabilisation des microtubules par le paclitaxel est meilleure.

Dans le cancer gastrique, une étude sur un petit nombre de biopsies montre que les 6 patients qui expriment faiblement MAPT/tau ont une meilleure réponse au paclitaxel. Cependant, 2 des 14 patients avec un niveau élevé de MAPT/tau ont eu la même réponse clinique (341). Dans le cancer du sein, il a été montré par immunohistochimie qu'une faible expression de MAPT est associée à une meilleure réponse au paclitaxel, et qu'une forte expression de MAPT/tau est associée à un cancer résiduel et une résistance au paclitaxel. Cependant, dans cette même étude la moitié des patients avec un faible taux d'expression de MAPT/tau est résistante au paclitaxel (342). André et al ont montré qu'une faible expression de l'ARNm de MAPT/tau permet de prédire la réponse au paclitaxel dans le cancer de sein ER+ (343). Ces résultats montrent que la résistance est multifactorielle et ne peut pas être prédite par l'expression seule de MAPT/tau. De plus, l'étude de l'expression de MAPT/tau est très complexe du fait des multiples isoformes de la protéine qui contient elle-même plusieurs sites de phosphorylation (342).

Actuellement aucune étude dans le cancer de la prostate n'a montré de corrélation entre l'expression de MAPT/tau et la réponse aux taxanes.

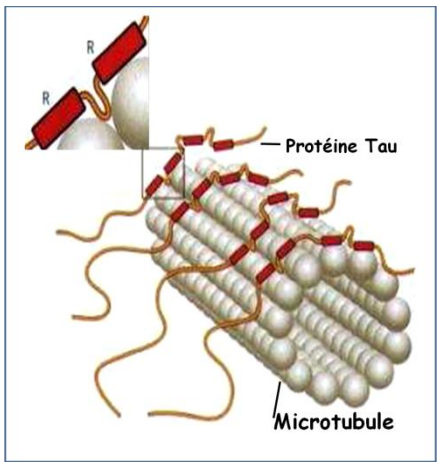


Figure 17 : Stabilisation des microtubules par la protéine MAPT/tau.

MAP4

MAP4 qui est exprimée d'une façon ubiquitaire dans toutes les cellules, stabilise les microtubules par augmentation du sauvetage (voir page 65). Sa fonction dans la régulation des microtubules au cours de la mitose est contrôlée par phosphorylation. Une fois phosphorylée la protéine MAP4 inactive se détache des MTs, permettant la poursuite de la mitose. Ces données suggèrent que l'inactivation de MAP4 augmente la dynamique des MTs et peut influencer la réponse aux taxanes. Dans des lignées de cancer de l'ovaire résistantes au paclitaxel (1A9PTX 10 et 22) la protéine MAP4 reste attachée aux MTs (344). Les études *in vitro* montrent que la surexpression de MAP4 augmente la polymérisation des microtubules, augmente la résistance au paclitaxel et est associée à une protéine p53 mutée (345) (346). Aucune donnée n'est actuellement disponible sur MAP4 et docetaxel dans le cancer de la prostate.

LA STATHMINE (OP18)

La statmine est exprimée d'une façon ubiquitaire dans toutes les cellules. Elle déstabilise les MTs pendant l'interphase et la mitose. *In vitro*, elle intervient dans la formation du fuseau mitotique, se lie au MTs et augmente la catastrophe (transition d'une phase de croissance à un rétrécissement) sur les deux extrémités des microtubules. Ainsi une dérégulation de la Stathmine perturbe le fuseau mitotique et induit la résistance aux taxanes. Plusieurs protéines kinases comme la Cdk1 et la famille PAKs (p21-associated kinases) sont capables de phosphoryler la Stathmine pour empêcher sa liaison aux tubulines. L'expression de la Stathmine sous la forme non phosphorylée perturbe le checkpoint du fuseau mitotique et induit un arrêt du cycle en mitose, ce qui peut déclencher une résistance au paclitaxel. La

Stathmine est surexprimée dans plusieurs types de cancer, y compris le CaP. Elle peut être une cible thérapeutique importante (347). La surexpression de la stathmine été trouvée dans le cancer du sein et la leucémie, elle diminue la polymérisation et induit la résistance au paclitaxel (348). De plus, il a été montré qu'une extinction de son expression par ARN interférance rétablit la sensibilité au paclitaxel (349).

Dans le CaP, un taux élevé de Stathmine dans des lignées de cellules cancéreuses a été corrélé avec leur capacité proliférative et leur phénotype malin. L'expression de Stathmine a été proposée comme marqueur de pronostic dans le CaP (350). *In vitro,* la transfection de la lignée LNCaP avec un vecteur adénoviral contenant un ribozyme anti-Stathmine réduit la prolifération et la clonogénicité des cellules suite à un traitement par le taxol (351).

V.2.4 LA RESISTANCE DE TYPE MULTIDROGUES (MDR)

Le mécanisme de résistance par activation des pompes d'efflux des drogues est impliqué dans l'échec de différents agents chimiothérapeutiques. Ce mécanisme est lié à l'expression des protéines de la famille ABC (ATP binding cassette). La protéine la plus étudiée de cette famille est la P-gp1 (*Permeability Glycoprotein*) codée par le gène ABCB1/Mdr-1 localisé sur le chromosome 7. La P-gp1 est une glycoprotéine trans-membranaire de 170 kDa, formant une pompe qui favorise l'extrusion des xénobiotiques entraînant une diminution de la concentration des médicaments à l'intérieur de la cellule. Quand une drogue se lie à la P-gp, l'hydrolyse de molécules d'ATP entraine un changement de la conformation de la pompe et provoque le relargage de la drogue dans l'espace extracellulaire. La P-gp peut se lier à une grande variété de molécules hydrophobes comme le paclitaxel et le docétaxel (352) et intervient dans le phénomène de résistance croisée *in vitro*. La surexpression ectopique de la P-gp dans des cellules sensibles aux drogues les rend résistantes. Une étude réalisée sur 60 lignées cellulaires du NCI montre que les cellules qui expriment moins la Mdr-1 sont les plus sensibles au paclitaxel.

Il a été montré dans le cancer du poumon (NSCLC) et de l'ovaire que l'expression de la P-gp est corrélée avec la résistance au paclitaxel. Une étude de Trock et al. rapporte que l'expression de la P-gp observée dans 41 % des cancers du sein est associée à un risque d'échec thérapeutique trois fois plus élevé par rapport aux tumeurs n'exprimant pas la protéine. Ce risque est encore plus fort si l'expression de la P-gp est détectée après chimiothérapie (353). Au contraire, dans une autre étude portant sur le cancer du sein, aucune relation entre l'expression de la P-gp et la réponse au paclitaxel ou au docetaxel n'a été mise en évidence. *In vitro*, il a été montré dans des lignées de cancer du sein (MCF7/Adr) et du poumon (PC-6/PTX) surexprimant la P-gp, que la résistance au paclitaxel et au docetaxel était réversible.

Dans le cancer de la prostate, la forte expression de la protéine ABCB1/MDR1 se corrèle avec une tumeur de haut grade et un mauvais pronostic (354). Au contraire, d'autres travaux publiés par

Makarovsky *et al.* ont montré que la résistance au docetaxel dans des lignées PC3 et DU 145 n'est pas liée à la P-gp membranaire (355).

L'ensemble des données rapportées suggèrent une implication majeure de la P-gp dans la résistance aux taxanes. Cette protéine pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante. La possibilité de réversion de cette résistance en bloquant le site de liaison aux drogues par d'autres agents a été démontrée *in vitro*. Malheureusement, les différents agents utilisés à ce jour n'ont guère montré d'avantages spécifiques en clinique, en effet s'ils améliorent la biodisponibilité in situ des médicaments, c'est au prix d'une toxicité majorée sur les tissus sains et d'une clairance réduite (356).

V.2.5 LES PROTEINES IMPLIQUEES DANS L'APOPTOSE

La mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques est le plus souvent de type apoptotique, aussi bien dans les cellules tumorales que dans les cellules normales (357). La sensibilité à la chimiothérapie peut être liée à la capacité des cellules à mettre en jeu les mécanismes apoptotiques en réponse aux lésions provoquées. En ce sens, les altérations du programme d'apoptose peuvent être responsables de la chimiorésistance.

L'apoptose peut être initiée par deux voies alternatives: soit par les récepteurs de mort à la surface cellulaire (voie extrinsèque), soit par voie mitochondriale (voie intrinsèque). Dans les deux voies, l'induction de l'apoptose conduit à l'activation de caspases initiatrices qui activeront à leur tour des caspases effectrices (Figure 18).

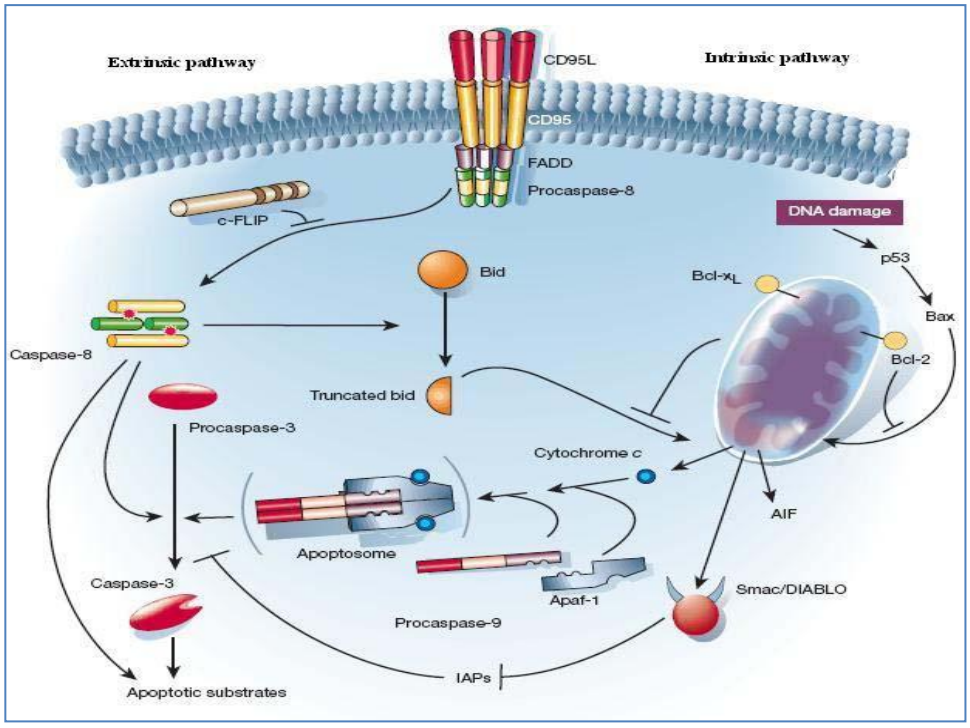


Figure 18 : Représentation schématique des deux voies majeures de l'apoptose. D'après Hengartner, et al., 2000.

LA VOIE EXTRINSEQUE DE L'APOPTOSE OU DES RECEPTEURS DITS «A DOMAINE DE MORT» :

La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par la fixation d'un ligand extracellulaire de la famille du TNF (FasL, TNF, TRAIL) à son récepteur à la surface cellulaire (tel que Fas, TNFR ou TRAIL-R). La fixation du ligand spécifique conduit au regroupement des récepteurs à la surface cellulaire et permet l'amplification du signal apoptotique (358). Le récepteur change de conformation au niveau intracellulaire, expose les domaines de mort DD et DED (Death Effector Domain) pour former un complexe oligomérique de mort appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex). Le DISC recrutera et activera les caspases initiatrices 8 via la molécule adaptatrice FADD, (Fas-Associated Death Domain protein) avec laquelle elles interagissent *via* les domaines DED, entraînant ainsi leur auto-activation (359) (360). La caspase-8 peut alors cliver directement la caspase-3 et conduire à l'apoptose. Cette voie apoptotique possède des régulateurs négatifs comme la protéine FLIP (FLICE-like inhibitory protein) qui est un homologue de la caspase-8 dépourvu de site catalytique mais qui contient deux DEDs. Lorsque FLIP(s) est surexprimée (par exemple dans les cellules cancéreuses), elle agit comme un inhibiteur de la caspase 8 par compétition sur le site de recrutement de la caspase 8 au niveau du DISC grâce à son domaine DED (361). La down-régulation de FLIP par ARN interférent restaure la sensiblité à l'apoptose médiée par la chimiothérapie dans la lignée cellulaire de cancer colorectal CRC (362).

LA VOIE INTRINSEQUE DE L'APOPTOSE

L'élément central de la voie intrinsèque de l'apoptose est la mitochondrie. Sa perméabilisation induit l'activation des caspases (363) et la libération des facteurs apoptogènes sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2 (364). En effet, les protéines Bcl-2 contrôlent la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale externe (OMM) en libérant des facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c, SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases)/DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis (IAP)-Binding protein with Low pI), AIF (Apoptosis Inducing Factor), EndoG (Endonuclease G) et OMI/HTRA2 (High-Temperature-Requirement protein A2) (365). Le cytochrome c, se fixe sur APAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) pour l'activer et forme un complexe appelé apoptosome. Le complexe ainsi formé déclenche une cascade d'activation des caspases qui commence par l'activation de la caspase 9, puis des caspases 3 et 7 (366). Même si elle est recrutée par l'apoptosome, la caspase 9 peut encore être inhibée par les membres de la famille des IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins)* comme la survivin et le XIAP (X chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) (367). Le complexe SMAC/DIABLO exerce un contrôle de la libération de la caspase des protéines IAPs, et assure une activation complète de l'apoptosome (365).

LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2

Bcl-2 est le chef de file d'une famille de protéines dont certaines sont anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ou A1), tandis que d'autres sont pro-apoptotiques (Bcl-xS, Bax, Bak ou Bad…). La concentration relative des protéines pro-apoptotiques versus celle des protéines anti-apoptotiques détermine le destin des cellules entre survie et apoptose. Les interactions entre ces protéines jouent manifestement un rôle central dans le contrôle du processus apoptotique. La protéine Bcl-2 localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, semble contrôler la libération de cytochrome c dans le cytosol et l'activation des caspases effectrices. La protéine Bcl2 est considérée comme le gardien de l'intégrité des microtubules. Sa phosphorylation spécifique au niveau de la sérine S70 est considérée comme un point de contrôle de la mitose. Il a été montré que la surexpression de Bcl-2 induit une résistance à la plupart des agents cytotoxiques, constituant un des mécanismes les plus efficaces de résistance multiple aux drogues. Les drogues antimitotiques induisent l'inactivation de Bcl-2 par phosphorylation. En effet, le paclitaxel provoque la phosphorylation de Bcl-2 au niveau de la serine S70, S87 et la thréonine T69 ce qui induit un arrêt mitotique.

En clinique, dans le cancer du sein les tumeurs présentant une augmentation de la phosphorylation de Bcl2 sont plus sensibles au paclitaxel et au docetaxel par rapport aux tumeurs qui ont un faible taux de phosphorylation de Bcl-2. La surexpression d'autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme la protéine Mcl-1, est également corrélée à une résistance à la chimiothérapie (368). Les cancers de la prostate hormono-résistants surexpriment souvent Bcl-2 même si la tumeur primaire ne l'exprimait pas avant l'hormono-résistance. Haldar et al ont montré dans les lignées cellulaires de CaP que les cellules qui expriment Bcl-2 sont plus sensibles au taxol que celles qui ne l'expriment pas. Le traitement par le taxol des cellules déficientes en Bcl-2 n'induit pas l'apoptose (369). Dans une étude réalisée sur des tumeurs de patients CRPC, il a été montré que l'expression de Bcl-2 indique une meilleure réponse et une meilleure survie pour les patients ayant reçu un traitement à base de taxanes (370). Cette équipe suggère que Bcl-2 pourrait être un biomarqueur de sensibilité aux taxanes dans les CRPC.

Inversement, les protéines pro-apoptotiques telles que Bak augmentent la sensibilité de certaines lignées céllulaires à l'apoptose induite par l'étoposide, le 5-FU et le taxol. Des mutations de Bax, autre protéine pro-apoptotique de cette famille, ont récemment été identifiées dans 20 % des lignées de cellules leucémiques et de carcinomes coliques. Ces mutations, en entraînant une perte de fonction de la protéine, pourraient être un facteur de chimiorésistance (371). Cependant dans le cancer de la prostate, les mutations de Bak et Bax sont rares (370).

LES PROTEINES INHIBITRICES DE L'APOPTOSE (IAPS)

Les protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAPs (*Inhibitor of Apotosis Protein*) constituent une famille de protéines anti-apoptotiques (hILP2, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP, NAIP, Survivin et Apollon). Toutes les protéines de cette famille possèdent une ou plusieurs répétitions d'un domaine hautement conservé appelé BIR (*Baculovirus IAP Repeat*). Les IAPs protègent les cellules contre une activation anormale des caspases en se fixant directement sur celles-ci. C'est un système de protection cellulaire contre les dommages et la mort inappropriée de la cellule (372). La Survivine (BIRC5) est une petite protéine de 16,5 kDa. Dans les cellules normales, l'expression de la Survivine est indétectable en phase G1, apparaît en phase S, puis culmine en phase G2/M en relation directe avec sa fonction de régulateur mitotique (Figure 19). Dans les cellules tumorales, la Survivine est exprimée de manière aberrante indépendamment du cycle cellulaire, leur procurant un avantage de croissance (mitose et survie) (373). Le domaine BIR de la Survivine lui permet de former des homodimères et d'interagir avec plusieurs partenaires moléculaires impliqués eux-mêmes dans le contrôle de l'apoptose. La Survivine favorise l'activité anti-apoptotique de XIAP, en protégeant le complexe survivine/XIAP de sa dégradation par le protéasome (374). La Survivine neutralise également Smac, un inhibiteur de XIAP libéré par la mitochondrie au cours de l'apoptose (375). Il a également été montré dans les cellules tumorales que la Survivine force la transition G1/S en l'absence de facteurs de croissance, bloque l'apoptose mitochondriale par la stabilisation de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, inhibe la libération de Smac et AIF, et celle des caspases 3, 7 et 9 (376). Il a été montré dans des modèles cellulaires de CaP que la surexpression de la survivine augmente la résistance au taxol (377). Chez les patients, l'expression aberrante de la Survivine est corrélée à la résistance au taxol dans les carcinomes ovariens (378). Elle est également associée à une résistance aux traitements hormonaux dans les cancers du sein et de la prostate (379)(380). L'inhibition de la Survivine par des inhibiteurs mitotiques comme l'oxaliplatine augmente la réponse aux taxanes dans le cancer du côlon (381). Une étude récente de 2011 montre que l'inhibition de la survivine par un oligonucléotide anti-sens nommé LY2181308 augmente l'effet des taxanes en particulier le docetaxel *in vitro* et *in vivo*. Cette molécule est actuellement en essai clinique de phase II en combinaison avec le docetaxel dans le cancer de la prostate (382).

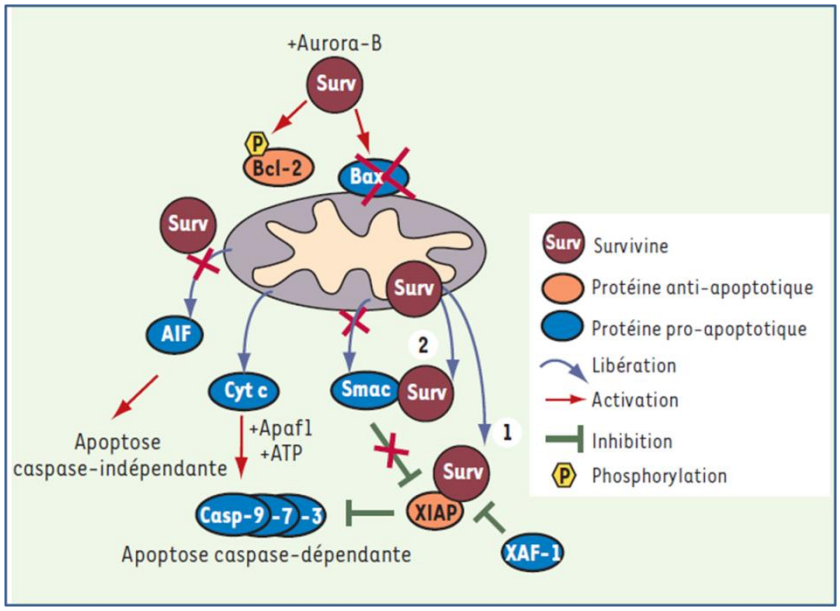


Figure 19 : Rôle de la survivine dans le blocage de l'apoptose mitochondriale.

En amont de la mitochondrie, la Survivine forme un complexe avec une kinase (Aurora B) et stabilise Bcl-2 par phosphorylation. Au niveau de la mitochondrie, elle empêche la libération de Smac et AIF impliqués dans l'apoptose caspase-dépendante et indépendante respectivement. En aval de la mitochondrie, la Survivine inhibe les caspases 3, 7 et 9. D'après Romagnoli et al, 2008.

LES VOIES DE SIGNALISATION INDUISANT L'APOPTOSE

Les taxanes peuvent activer plusieurs voies de signalisation pour induire l'apoptose :

- La voie JNK/SAPK : Pendant la phase G2/M du cycle cellulaire, le paclitaxel active la protéine kinase JNK (383) qui phosphoryle et inactive la protéine anti-apoptotique Bcl-2 pour induire l'apoptose (384).

- La voie Raf/MEK/ERK : Les taxanes activent également la voie de survie Raf/MEK/ERK qui contrôle plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose. L'activation de cette voie aboutit à la phosphorylation et l'inactivation des protéines pro-apoptotiques (Bim, Bad et Bax) et anti-apoptotiques (Bcl2 et Bcl-xl) les empêchant ainsi d'interagir avec leurs partenaires dans le processus apoptotique (385).

- La voie PI3k/Akt : la signalisation PI3K/Akt est une voie pro-proliférative et anti-apoptotique impliquée dans la croissance cellulaire, la survie et le cycle cellulaire (386)(387). Cette voie est activée par la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) après phosphorylation du PIP2 membranaire conduisant à la formation du PIP3. Le lipide membranaire PIP3 permet le recrutement à la membrane plasmique de nombreuses enzymes à domaine PH (Pleckstrin Homology) dont la sérine-thréonine kinase Akt. Une fois que la kinase AKT est activée (phosphorylation par pdK1), elle phosphoryle à son tour les protéines Bim, Bad et la caspase 9, inhibant ainsi leurs effets pro-apoptotiques (385). L'activité de la kinase Akt est souvent dérégulée dans les cancers et joue probablement un rôle dans la résistance à la chimiothérapie (387). Dans différentes lignées cellulaires de cancer de l'ovaire, une augmentation de l'activation de cette voie semble être liée à la résistance au paclitaxel (388). L'implication d'Akt dans la

réponse aux taxanes est confortée par le fait que l'inhibition de la voie PI3k/AKT (*in vivo* et *in vitro*) sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose induite par le paclitaxel (389). Une des protéines qui contrôle cette voie est la protéine PTEN. Elle est connue pour contrôler négativement la voie PI3K/AKT via son action sur le PIP3 (390). La surexpression de PTEN inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans différentes lignées cellulaires (391). Dans les CaP, on observe de façon assez fréquente une perte de PTEN (392). La surexpression des kinases de la voie PI3k/AKT associée à une sous expression de PTEN pourrait être impliqués dans la résistance aux inhibiteurs des microtubules (390).

LE NF-KB

Le facteur de transcription NF-KB, constitué de deux sous-unités p50 et p65, est impliqué dans la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose. L'activation de NFKB est contrôlée par un inhibiteur IKB qui retient NFKB dans le cytoplasme. Quand la kinase IKK phosphoryle IKB, NFKB peut alors être transloqué dans le noyau où il active la transcription de plusieurs gènes cibles, induisant l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques telles que la Bcl2, Bcl-xl et c-FLIP (393), et la prolifération cellulaire. *In vitro*, il a été montré dans plusieurs types de cellules cancéreuses que NFKB est surexprimé suite à une chimiothérapie pour réduire l'apoptose induite par le traitement (394). Il a également été montré que l'inhibition de NFKB sensibilise les cellules au paclitaxel dans le cancer de l'ovaire (395). De façon contradictoire, d'autres études suggèrent un rôle pro-apoptotique du NFKB dans l'apoptose induite par le paclitaxel (396).

CHAPITRE VI : LA MITOSE ET LA RESISTANCE AUX TAXANES

En réponse aux taxanes, une cellule normale s'arrête en mitose (M), activent les points de contrôle du cycle cellulaire (checkpoint) et entre en catastrophe mitotique. Cependant, malgré les anomalies acquises les cellules tumorales résistantes aux taxanes réussissent à poursuivre la mitose et à échapper aux points de contrôle du cycle cellulaire. L'échappement au blocage du cycle cellulaire induit par les taxanes peut se faire à des différentes phases de la mitose. Il est donc nécessaire de connaitre les acteurs du cycle cellulaire et le processus mitotique pour pouvoir comprendre les mécanismes de la résistance aux taxanes.

VI.1 LA PHASE M, DEROULEMENT ET ACTEURS

VI.1.1 LE MPF (M-PHASE PROMOTING FACTOR)

Le MPF est un hétérodimère protéique (Cdk1/Cycline B) induisant l'entrée en phase M (397). L'activation de la sous-unité catalytique de la Cdk1, nécessite son association à une cycline qui sert de sous-unité régulatrice (cycline B). La fonction et les substrats de la Cdk1 dépendent de la cycline à laquelle elle est associée. De cette façon, la Cdk1 peut contrôler des phases différentes du cycle en fonction des cyclines avec lesquelles elle s'associe. La cycline B est synthétisée progressivement à partir de la phase S, elle s'accumule dans la cellule puis s'associe aux sous-unités libres de la CdK1. Parmi les trois types de cycline B (B1, B2 et B3) présentes chez les mammifères, c'est principalement la cycline B1 qui est impliquée dans la transition G2/M.

Une fois formé, le complexe MPF est régulé par différentes phosphorylations. Il subit une phosphorylation activatrice de sa sous-unité catalytique sur la thréonine 161 de la Cdk1 par la kinase CAK (Cdk Activating Kinase ; Cdk7/Cycline H), lui permettant de se lier à ses substrats (398)(399). Cependant, l'activation par la CAK n'est pas suffisante pour activer le MPF. Les kinases Wee1 et Myt1 maintiennent le MPF nouvellement formé inactif suite à la phosphorylation inhibitrice de Cdk1 au niveau des deux résidus thréonine 14 et tyrosine 15. Les phosphorylations inhibitrices de Cdk1 s'effectuent au fur et à mesure que le MPF se forme pendant les phases S et G2. Les deux kinases Wee1 et Myt1 ont plus d'affinité pour le MPF que pour la sous-unité Cdk1 seule (400). Un stock de complexe MPF inactif (Cdk1/Cycline B1 phosphorylé en Thr 161, Thr 14 et Tyr 15) est constitué à partir de la phase S, correspondant au pré-MPF dont l'activation va déclencher la transition G2/M.

VI.1.2 LES TRANSITIONS G2/M ET PROPHASE/METAPHASE :

Quatre étapes sont nécessaires et responsables de l'activation du pré-MPF pour faire rentrer la cellule en mitose :

1. L'inactivation des kinases inhibitrices Wee1 et Myt1 par les kinases PKB/AKT et p90RSK.
2. Parallèlement, déphosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de la Cdk1 par la protéine phosphatase Cdc25C. En s'opposant ainsi à l'activité inhibitrice de Wee1 et Myt1, la phosphatase Cdc25C déclenche l'entrée en mitose. La Cdc25C est activée à la fois par PLK1 et par une boucle d'auto-activation du MPF (401)(402). De plus, le MPF est capable d'inactiver sa kinase inhibitrice Wee1 par phosphorylation.
3. Phosphorylation de la cycline B par diverses kinases, étape indispensable à l'interaction entre Cdc25C et Cdk1, et donc à l'activation du MPF.
4. Migration du MPF phosphorylé dans le noyau où il peut interagir avec la plupart de ses substrats.

L'activité du MPF déclenche de profonds remaniements cellulaires et marque l'entrée en mitose. Parmi les protéines cibles du MPF, certaines se trouvent dans le noyau comme les lamines ou les condensines. Les condensines sont impliquées dans la condensation des chromosomes. La phosphorylation des lamines nucléaires par le MPF provoque la rupture de l'enveloppe nucléaire en prométaphase (403). D'autres substrats du MPF sont cytoplasmiques comme les protéines associées aux microtubules qui permettent l'assemblage du fuseau mitotique et d'autres protéines liant les microtubules.

En début de mitose, le MPF participe à l'activation du complexe APC (*Anaphase Promoting Complex)* qui intervient lui-même dans la dégradation des protéines par le protéasome (voir en détail ci-après) (404). Pour maintenir l'activation du MPF, une quantité suffisante de Cdc25C active est essentielle. Au début de la mitose et jusqu'à la transition métaphase/anaphase, la protéine LZTS1 se lie à la Cdc25C pour empêcher sa protéolyse (405). En l'absence de LZTS1, la Cdc25C est dégradée par le protéasome dès le début de l'activation de l'APC. Une faible quantité de Cdc25C ne suffit plus pour activer les MPF par déphosphorylation des Cdk1. Cette chute d'activité du MPF déclenche une transition métaphase/anaphase prématurée. Ce mécanisme identifié par Vecchione et al. en 2007 (406) n'est pas encore totalement élucidé aujourd'hui. Le LZTS1 est un facteur important pour assurer le bon déroulement de la mitose, il régule notament l'activité de la CdK1 via l'activité de Cdc25C. Il est important de noter que LZTS1 n'intervient pas dans le déclenchement de l'entrée en mitose et que son inactivation n'est pas létale (407).

VI.1.3 L'APC « ANAPHASE PROMOTING COMPLEX »

L'APC ou cyclosome, est un complexe d'au moins 11 sous-unités (408), qui présente une activité de type ubiquitine ligase lorsqu'il s'associe avec la Cdc20 (409)(410).

La progression dynamique de la mitose s'effectue grâce à la dégradation, ubiquitine-dépendante par le protéasome de nombreuses protéines telles que les cyclines, au fur et à mesure de la progression du processus mitotique. Le complexe APC participe à ce mécanisme dynamique de par son activité E3-ligase. Une fois poly-ubiquitinées, les protéines mitotiques sont protéolysées par le protéasome 26S. L'APC est lui-même activé en début de mitose suite à une phosphorylation par le MPF. L'activation de l'activité ubiquitine-ligase de l'APC fait intervenir successivement les deux sous-unités activatrices Cdc20 et Cdh1. La protéine Cdc20 intervient à partir de la métaphase, puis est dégradée au fur et à mesure de la progression mitotique. Elle est remplacée par la suite par la protéine Cdh1 qui active à son tour le complexe APC jusqu'à la fin de la phase G1 (411).

VI.1.4 LA TRANSITION METAPHASE/ANAPHASE

Après la réplication, les chromatides homologues restent associées grâce à des complexes protéiques appelés de cohésines. Les cohésines sont constituées de quatre sous-unités: deux grandes sous-unités appartenant à la famille des SMC (Structural Maintenance of Chromosomes), SMC1 et SMC3, et deux protéines Scc1 et Scc3.

Le complexe APC/Cdc20 a pour rôle principal d'assurer la séparation des chromatides sœurs et donc la transition métaphase/anaphase. En métaphase, la cohésine est phosphorylée par la kinase Plk1 (**P**olo-**l**ike Kinase 1) au niveau de la sous-unité Scc1, et devient alors sensible à la dégradation protéolytique.

En début d'anaphase, la cohésine est détruite par une protéase de la famille des caspases, la séparase, permettant la séparation des chromatides. Ces dernières sont tirées vers les pôles du fuseau mitotique par les microtubules, au niveau des kinétochores. La sécurine, un des substrats du complexe APC/Cdc20, est associée à la séparase et la maintient inactive. En fin de métaphase, le complexe APC/Cdc20 ubiquitinyle spécifiquement la sécurine provoquant sa dégradation. La séparase se libère et s'active par autoclivage et phosphorylation pour déclencher la protéolyse des cohésines.

L'inhibition du MPF est indispensable pour la transition métaphase/anaphase et pour la sortie de la mitose. Le complexe MPF (Cdk1/Cycline B) en activant l'APC contribue à sa propre inhibition puisque la cycline B contient un site de dégradation par l'APC, la destruction de la cycline B provoque une chute d'activité du MPF. Cette inhibition permet également la disparition du fuseau mitotique à la fin de l'anaphase B, le déclenchement de la cytokinèse et la transition vers la phase G1.

VI.1.5 LA TRANSITION ANAPHASE/TELOPHASE

La transition anaphase/télophase dépend du « mitotic exit network », un groupe de protéines qui permet l'activation de la phosphatase Cdc14. Cette phosphatase déphosphoryle et active Cdh1, ce qui contre-balançe la phosphorylation et l'inactivation par le complexe MPF (Cdk1/ cycline B), Cdh1 peut alors se lier à l'APC. À partir de l'anaphase, des complexes APC/Cdh1 actifs se forment et ubiquitinylent la protéine Cdc20. Ces complexes actifs induisent également la destruction sélective de certains substrats permettant ainsi le passage en télophase et l'achèvement de la mitose. Le complexe APC/Cdh1 reste actif jusqu'à la fin de la phase G1 quand le Cdh1 est de nouveau phosphorylé et se sépare de l'APC. L'APC est alors inactivé et le restera durant toute l'interphase, il sera réactivé au prochain cycle de division lors de la mitose.

VI.2 LES POINTS DE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE

La prolifération des cellules eucaryotes est strictement contrôlée. La perte de ce contrôle peut conduire à la mort cellulaire ou à une multiplication cellulaire anarchique caractéristique de l'état cancéreux. Parmi les systèmes de régulation, on retrouve les checkpoints ou mécanismes de surveillance du cycle cellulaire qui contrôlent l'accomplissement préalable d'événements cellulaires nécessaires pour les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire. En cas de mauvais déroulement du cycle cellulaire, l'activation des checkpoints entraîne l'inhibition de la progression du cycle cellulaire jusqu'à réparation. Si la réparation n'est pas effectuée, le processus de mort cellulaire est déclenché. Dans la cellule eucaryote il existe trois "checkpoints" : le checkpoint de la phase G1, le checkpoint de la transition G2 /M et le check point du fuseau mitotique appelé SAC "Spindle Assembly Checkpoint ". Chez l'homme, les défauts des checkpoints sont considérés comme des points critiques dans l'apparition, l'évolution et la résistance des tumeurs (412).

VI.2.1 LE POINT DE CONTROLE DE LA PHASE G1

La décision d'entrer (ou non) dans le cycle cellulaire est prise en phase G1. Le point de restriction de la phase G1 contrôle la taille et l'état physiologique de la cellule, il surveille l'environnement. Si les stimuli de croissance ne sont pas appropriés ou insuffisants, la progression du cycle s'arrête en attendant des conditions cellulaires adéquates, sinon la cellule déclenche son programme d'apoptose. Par exemple, dans le cas du mécanisme d'inhibition de contact, les molécules d'adhésion induites par les contacts cellules-cellules réduisent la prolifération cellulaire et provoque l'arrêt des cellules en phase G1 et le retour à l'état de quiescence (G0).

VI.2.2 LE POINT DE CONTROLE DE LA TRANSITION G2/M

Au niveau de ce checkpoint, deux types de processus assurent la surveillance de la transition G2/M, un premier processus rapide impliquant la phosphorylation de Cdc25, et un second mécanisme plus lent impliquant la protéine p53.

Dans le processus rapide, le point de surveillance G2/M contrôle l'activité du complexe kinasique CDK1-Cycline B, par l'intermédiaire des phosphatases Cdc25B et Cdc25C. Ce mécanisme se met en place en réponse aux dommages de l'ADN. Les kinases Chk1 et Chk2 phosphorylent Cdc25C sur la sérine 216, ce qui permet l'interaction entre Cdc25C et la protéine 14-3-3σ et la séquestration de Cdc25C dans le cytoplasme. La localisation cytoplasmique de Cdc25C empêche l'activation du complexe nucléaire MPF (Cdk1-Cycline B) et bloque le cycle cellulaire en G2 (413)(414). Les kinases ATM/ATR peuvent également phosphoryler la kinase PLK1 par le biais des kinases Chk1 et 2, et empêcher ainsi l'activation de Cdc25C (415)(416). A la suite de lésions de l'ADN, la kinase Wee1 activée, hyperphosphoryle la Cdk1 sur son résidu tyrosine en position 15 pour la rendre inactive (417).

La réponse rapide peut également être due à une séquestration des complexes Cdk1/cycline B dans le cytoplasme de cellules portant des lésions de l'ADN. Cela a pour conséquence d'empêcher la phosphorylation des substrats nucléaires impliqués dans la transition G2/M. La phosphatase Cdc25B joue également un rôle dans ce point de contrôle par son implication dans l'activation du MPF. En réponse aux dommages de l'ADN, l'activité de la kinase Aurora A est inhibée (418), et le Cdc25B au niveau des centrosomes ne peut plus être activé (419).

La protéine p53 communément qualifié de " le gardien du génome", joue un rôle dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire qui sont des phases de contrôle de l'intégrité de l'ADN. La protéine p53 n'est pas nécessaire pour l'étape de blocage en phase G2, mais elle joue un rôle dans le maintien de cet arrêt en bloquant l'activité du complexe MPF (cycline B /Cdk1)(420). La protéine p53 agit aussi sur d'autres protéines kinases pour freiner la progression du cycle et favoriser l'apoptose des cellules. En effet, elle active la protéine p21Cip1/Waf1 qui elle-même inhibe directement la kinase Cdk1(421). Elle induit l'activation de la protéine Gadd45 qui bloque également l'activité de la kinase Cdk1(420), elle peut aussi réprimer directement l'expression des gènes Cdk1 et de la cycline B1 dont les promoteurs contiennent un site régulateur de la p53 (420).

VI.2.3 LE POINT DE CONTROLE DU FUSEAU MITOTIQUE « SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT »

Les cellules possèdent un mécanisme de surveillance spécifique de la transition Métaphase/Anaphase.

En effet, au niveau du « spindle assembly checkpoint », le complexe de surveillance vérifie l'attachement correct des chromosomes métaphasiques et leur alignement sur la plaque métaphasique

afin d'éviter des évènements d'aneuploïdie. Dans le cas où l'alignement des chromosomes et l'assemblage du fuseau mitotique n'ont pas été correctement accomplis lors de la métaphase, ce point de contrôle permet à la cellule de retarder l'entrée en anaphase jusqu'à ce que ces conditions soient remplies. Il fait intervenir plusieurs protéines responsables de la production de signaux inhibiteurs vis à vis d'APC/Cdc20, notament les protéines Mad1 et Mad2, Bub1, Bub3 et BubR1, la kinase Mps1 et CENP-E.
Lorsque les chromosomes sont bien condensés en prophase et prométaphase, un complexe multiprotéique formé de protéines activatrices du « spindle checkpoint » (Bub1, Bub3, BubR1, Mps1 Mad1 et Mad2) s'associe aux kinétochores libres. Quand ces derniers s'attachent de façon stable au fuseau mitotique, le complexe protéique se dissocie. Un kinétochore mal attaché au fuseau mitotique envoie un signal pour empêcher l'activation du complexe APC/Cdc20.

La kinase Mps1 participe à l'assemblage du checkpoint du fuseau mitotique. Elle interagit avec la kinase Bub1, et forme un complexe avec la CENP-E, une protéine de la famille des kinésines. Les deux kinases Mps1 et BubR1 régulent par phosphorylation la protéine CENP-E qui s'associe aux chromosomes lorsque l'enveloppe nucléaire se rompt. A son tour, la kinase Bub1 est régulée par la protéine Mad1 qui va recruter et activer la protéine Mad2. Les protéines Mad2 et Bub1 participent à la détection de l'occupation des kinétochores, alors que les protéines Bub3 et BubR1 sont plutôt sensibles à la tension exercée par le fuseau de microtubules sur les kinétochores.

Dans le cas où les kinétochores ne sont pas liés aux microtubules du fuseau en prométaphase et métaphase, la Mad2 lie les kinétochores libres via la protéine Mad1, ce qui entraîne l'assemblage d'une forme active tétramèrique de Mad2 (422). Cette forme tétramérique se lie à la Cdc20 du complexe APC/Cdc20 et l'inhibe, empêchant la destruction de la sécurine et la séparation prématurée des chromatides sœurs (422). L'interaction Mad2/cdc20 semble être régulée par les kinases appartenant aux familles Bub, Plk1, Aurora, et par la protéine survivine.

Une fois tous les chromosomes correctement accrochés de façon bipolaire aux microtubules kinétochoriens et alignés sur la plaque équatoriale, la forme active de la Mad2 cesse d'être produite. Le complexe de surveillance se retire des kinétochores et la Mad2 libère la Cdc20 permettant l'action du complexe APC/Cdc20 et le passage en anaphase. Le MCC (Mitotic Checkpoint Complex) est un autre facteur inhibiteur d'APC/Cdc20 plus puissant que la protéine Mad2 composé de BubR1, Bub1, Mad2 et Cdc20 (423).

VI.3 LES PROTEINES DE LA PROGRESSION MITOTIQUE ET DES CHECKPOINTS IMPLIQUEES DANS LA RESISTANCE AUX TAXANES

Les chapitres précédents ont illustré les relations complexes qui existent entre les différents acteurs des points de contrôle du cycle cellulaire. Il est cependant nécessaire de connaitre ces mécanismes pour tenter d'identifier les acteurs de la résistance aux taxanes.

VI.3.1 LES PROTEINES DE SAC «SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT »

Le « spindle assembly checkpoint » joue un rôle très important dans la prévention de l'instabilité génétique et dans la cancérogénèse. La délétion homozygote des protéines du checkpoint mitotique comme Mad2, BubR1et Bub3 augmente l'instabilité génétique et le développement tumoral (424) (425). *In vitro*, l'altération de ces protéines inhibe le SAC et augmente la résistance des cellules aux anti-mitotiques comme le paclitaxel, la vincristine et le nocodazole. Chez l'homme, une perturbation du SAC aboutit à une instabilité génétique et à une aneuploïdie. Elle a été retrouvée dans différents types de cancers tels que le sein, le poumon ou encore le côlon.

Dans les cancers colorectaux, il a été montré que l'instabilité génétique et un SAC défectueux sont associés à la résistance aux taxanes. La sous-expression partielle ou complète de Mad1 ou de Mad2 dans des lignées cellulaires de cancer du côlon provoque une résistance au nocodazole (déstabilisateur des MTs). Dans le cas des stabilisateurs des MTs, comme le paclitaxel, c'est la sous-expression de Mad2 et pas de Mad1 qui conduit à une résistance (426).

Ces résultats suggèrent que dans le cas déstabilisateur des MTs, les deux protéines Mad1 et Mad 2 sont indispensables pour déclencher l'apoptose, tandis que pour le paclitaxel seule Mad2 suffit. La Cdk1 joue également un rôle important dans la mort cellulaire induite par le paclitaxel. Dans la lignée du cancer du sein MCF7, la suppression des protéines Mad2 et BUBR1 réduit l'activité de la cdk1 et induit une résistance au paclitaxel (427). Dans le CaP, la diminution de l'expression de Mad2 est corrélée à une augmentation de score de gleason (428). A l'heure actuelle, il n'existe pas de résultats publiés concernant le rôle des protéines du SAC et la résistance aux taxanes dans le CaP.

VI.3.2 SURVIVINE, AURORA KINASES A ET B

Ces trois protéines jouent un rôle dans la dynamique des MTs et dans la formation du fuseau mitotique : la survivine est surexprimée dans une grande variété de cancers (429). Elle est localisée à 20% dans le noyau contre 80% dans le cytoplasme associée au MTs (430). Sa phosphorylation est contrôlée par la

Cdk1 et la kinase Aurora B. La Survivin et la Aurora B sont indispensables pour déclencher le SAC suite à un traitement par le paclitaxel (431)(432). Dans les lignées cellulaires NIH3T3 (fibroblaste de souris) et U2OS (ostéosarcome), la sousexpression de la Survivine par ARN interférent entraine un détachement prématuré des protéines BURB1 et MAD2 des kinétochores provoquant une inhibition de la réponse au paclitaxel (431).

L'Aurora A est une kinase localisée au niveau des centrosomes. Un défaut d'expression de cette kinase est associé à un dysfonctionnement du SAC et à une résistance aux paclitaxel et docetaxel. Une surexpression d'Aurora A prolonge la mitose et permet la sortie de la mitose des cellules aberrantes. Elle phosphoryle également la p53 (433). Dans les cancers du sein ER négatif, un taux élevé d'ARNm Aurora A est associé à une faible réponse au docetaxel (33%), contre 83% de réponse dans les cancers à faible taux d'ARNm de la Aurora A (434).

VI.3.3 LA PROTEINE P53

Comme nous l'avons vu précédemment, la p53 joue un rôle primordial dans les points de contrôle et dans l'apoptose (358). La protéine p53 est mutée dans 50% des cancers en général (435) et, en particulier dans 10-30% des cancers de la prostate (436)(437). Le rôle de la p53 dans la résistance aux taxanes a fait l'objet de plusieurs études. Certains travaux montrent que l'apoptose induite par le paclitaxel est indépendante de la p53 (438)(439). D'autres rapportent qu'une diminution de l'activité de la p53 augmente la sensibilité au paclitaxel en induisant l'arrêt de la mitose et l'apoptose (440)(441).

Quant à son implication dans la réponse aux taxanes, des travaux contradictoires ont été publiés. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer comment des mutations de la p53 peuvent augmenter la sensibilité aux taxanes. Il a été montré que la p53 mutée augmente l'activité de MAP4, ce qui accroit la polymérisation des MTCs et, par conséquent la sensibilité au paclitaxel (345). De plus, une mutation de la p53 permet aux cellules de franchir plus rapidement les checkpoints des phases G1 et S, atteignant plus rapidement la mitose où les taxanes agissent (442). D'autres études montrent qu'une mutation de la p53 induit une résistance aux taxanes, la p53 mutée ne pouvant plus suractiver la protéine pro-apoptotique Bax. Suivant cette hypothèse, p53 réduit l'apoptose induit par les taxanes et augmente la résistance (443). Il a également été montré que les mutations de la p53 perturbent le bon déroulement du SAC induisant une résistance aux taxanes (444).

Les mêmes contradictions sont trouvées en recherche clinique. Dans le cancer de l'ovaire, il a été montré que le paclitaxel est plus efficace dans les tumeurs p53 mutée par rapport à celles exprimant la forme sauvage non mutée (445). Ces résultats on été contredits par d'autres études. En particulier, dans le cancer du sein où il a été rapporté que les tumeurs exprimant la forme sauvage de la p53 sont insensibles au paclitaxel (446).

Finalement, l'ensemble des résultats sur le rôle de la p53 dans la résistance aux taxanes sont contradictoires et restent ambigus. Il faut se rappeler qu'il existe une grande variété de mutations de la p53, pouvant avoir des conséquences différentes.

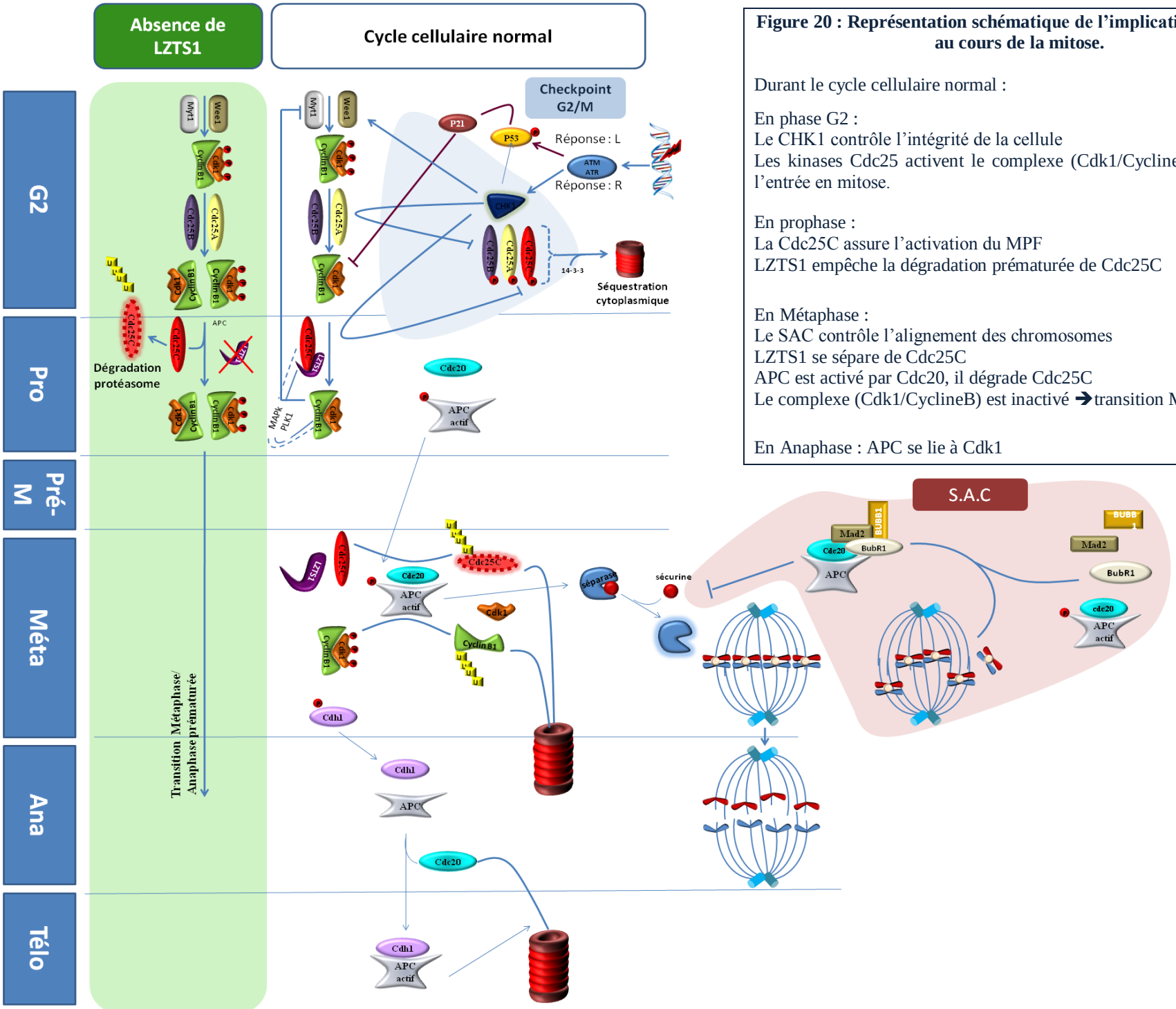


Figure 20 : Représentation schématique de l'implication de LZTS1 au cours de la mitose.

Durant le cycle cellulaire normal :

En phase G2 :
Le CHK1 contrôle l'intégrité de la cellule
Les kinases Cdc25 activent le complexe (Cdk1/CyclineB) permettant l'entrée en mitose.

En prophase :
La Cdc25C assure l'activation du MPF
LZTS1 empêche la dégradation prématurée de Cdc25C

En Métaphase :
Le SAC contrôle l'alignement des chromosomes
LZTS1 se sépare de Cdc25C
APC est activé par Cdc20, il dégrade Cdc25C
Le complexe (Cdk1/CyclineB) est inactivé ➔transition Méta/Ana

En Anaphase : APC se lie à Cdk1

RESULTAT 3 : RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA RESISTANCE AU DOCETAXEL DANS LE CANCER DE LA PROSTATE

Actuellement, seulement 5% des cancers de la prostate sont diagnostiqués d'emblée au stade métastatique. On sait que parmi les cancers de la prostate localisés à haut risque de rechute, plus de la moitié va rechuter avec notamment des localisations métastatiques. Depuis 2004, quand le cancer de la prostate devient hormonorésistant, le traitement de référence est une chimiothérapie par docetaxel. En effet, son efficacité a été démontrée pour la première fois dans les deux essais cliniques TAX 327 et SWOG 99-16, avec un gain de survie. Le docetaxel est devenu aujourd'hui un traitement de référence des cancers de la prostate métastatiques hormono-résistants. Cependant, malgré le bénéfice de survie procuré par cette molécule, celle-ci présente une certaine toxicité et presque la moitié des patients traités par le docetaxel développe une résistance à la chimiothérapie, soit d'emblée, soit de façon secondaire. Actuellement, il est impossible d'identifier, avant l'initiation du traitement, les patients qui vont présenter une résistance au docetaxel. Il apparaît donc important d'identifier les patients qui vont répondre à la chimiothérapie, en recherchant les événements moléculaires associés avec le développement d'une résistance au docetaxel.

Nous avons évoqué dans les chapitres V et VI que plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la résistance aux taxanes, cependant des résultats contradictoires ont parfois été obtenus et aucunes des pistes étudiées n'a encore débouché sur l'utilisation en clinique d'un biomarqueur prédictif de la réponse. A forciori, dans le cancer de la prostate où le docetaxel a été introduit plus tardivement, il n'existe aucun biomarqueur prédictif de la réponse au docetaxel validé chez l'homme dans le cadre d'essais thérapeutiques.

Notre projet consiste à identifier les protéines impliquées dans le mécanisme de résistance au docetaxel dans le CaP et à identifier des biomarqueurs de réponse au traitement. Nous avons choisi d'aborder cette question en partant de modèles cellulaires résistants au docetaxel puis en tentant de valider les biomarqueurs candidats dans les biopsies humaines. Dans l'essai clinique de phase III GETUG12 qui compare un traitement combiné d'hormonothérapie à une chimiothérapie versus une hormonothérapie seule chez les patients atteints d'un cancer de la prostate localisé à haut risque, les échantillons obtenus devraient nous permettre la validation finale de ces biomarqueurs prédicteurs.

RESULTATS PREALABLES

Etablissement de modèles cellulaires de CaP résistants au Docetaxel

Malgré l'importance de comprendre la résistance aux taxanes, très peu de modèles de résistance sont disponibles. L'établissement de modèles cellulaires résistants est relativement long et difficile. Cependant, quelques équipes ont obtenu des lignées PC3, DU145 et LNCaP résistantes au paclitaxel et au docetaxel jusqu'à des doses de 10nM de docetaxel. La première étape de ce projet a permis l'obtention de clones résistants au docetaxel *in vitro*. Pour cela, nous avons mis en œuvre une sélection de clones résistants sous pression pharmacologique dans plusieurs modèles cellulaires et obtenu à ce jour trois lignées résistantes au docetaxel : LNCaP-R, PC3-R et IGR-CaP1-R.

- La lignée IGR-CaP1 résistante à des fortes doses de 5, 12, 25, 50, 100, 200 et 1000nM de docetaxel.
- La lignée LNCaP résistante aux doses de 0.5, 2.5, 5, 12nM de docetaxel
- La lignée PC3 résistante aux doses de 0.5, 2.5, 5, 12nM de docetaxel

Parmi ces trois lignées, nous avons observé que seule la lignée IGR-CaP1 est capable d'acquérir une résistance à des fortes doses de docetaxel de façon irréversible. Les clones résistants issus des deux autres lignées redeviennent sensibles au docetaxel quand ils sont cultivés pendant plusieurs passages en absence de la drogue. Nous avons également tenté d'obtenir des clones résistants au docetaxel à partir des deux lignées V-CaP et MDA-PCa-2b, mais nos efforts se sont soldés par un échec.
Nous nous sommes assurés que le modèles IGR-CaP1 était effectivement résistant à la drogue par des mesures du cycle cellulaire et des tests de survie. (Voir article 3, SupFig1)

Recherche des protéines impliquées dans la résistance au docetaxel :

1. Vérification des marqueurs décrits dans la littérature

Dans un premier temps, nous avons analysé par Western Blot et/ou par RT-PCR dans nos modèles cellulaires résistants au docetaxel, l'expression des marqueurs déjà décrits dans la littérature comme biomarqueurs potentiels de résistance à la chimiothérapie: MDR1, Tubuline β3, Clusterine, STAT1, Survivine, Tau et Bcl2. L'expression de l'oncogène PTEN dont la perte est un facteur de mauvais pronostic lequel pourrait intervenir dans la résistance a également été analysé (Figure 21). A

l'exception de MDR1, l'expression de ces protéines ne semble pas être significativement différente entre les lignées sensibles et les clones résistants correspondants.

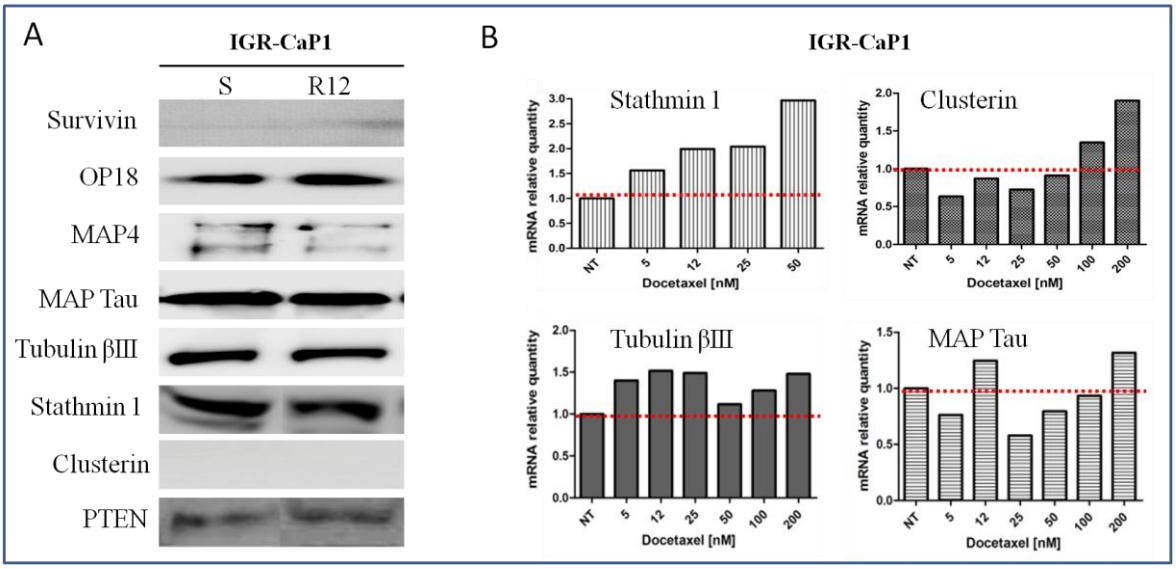


Figure 21 : Expression des gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux taxanes
L'expression des gènes est étudiée par western blot (A) et RT-PCR quantitative (B), dans les lignées cellulaires IGR-CaP1-S et R-12.

La β3-tubuline a fait l'objet de plusieurs études récentes concernant la résistance aux taxanes. Dans les cellules IGR-CaP1, cette protéine est fortement exprimée. Nous n'avons pas observé de variation d'expression entre les cellules sensibles et résistantes (R12, R100). Le traitement des cellules par le docetaxel n'affecte pas non plus son expression (Figure 22). Même si les données de la littérature présentent la surexpression de la β3-tubuline comme un mécanisme de résistance aux taxanes, cette surexpression n'est pas suffisante pour expliquer les bases moléculaires de la résistance dans notre lignée IGR-CaP1. Il est néanmoins possible que la modification d'expression de la β3-tubuline corresponde à un phénomène précoce mais mineur. La même expérience réalisée dans la lignée LNCaP (sensible et résistante) a montré des résultats similaires.

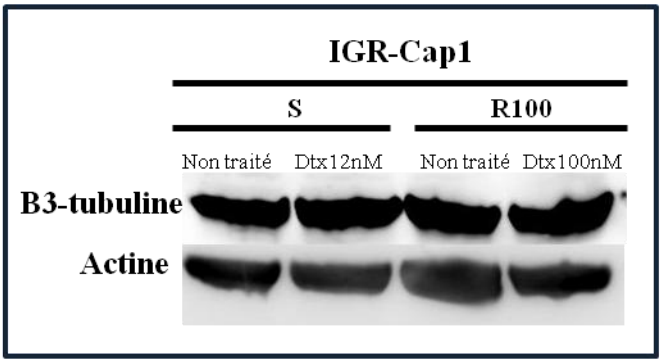


Figure 22 : Comparaison de l'expression de la β3-tubuline entre les lignées IGR-CaP1-S et R100 avec et sans Dtx

Identification de nouveaux candidats par analyse génomique (Micro-Array) :

Les clones IGR-CaP1 résistants à des doses croissantes de docetaxel (5, 12, 25, 50, 100 et 200nM) ont été utilisés pour réaliser une étude génomique globale par microarray (Puces Agilent 44K). Cette étude compare le profil d'expression des gènes des différents clones résistants à la lignée sensible. Cette analyse nous a permis d'identifier une signature d'expression génique de 209 gènes dont l'expression est modifiée significativement dans les cellules résistantes à la drogue (Fold change >2 pour toutes les doses et $p<10^{-10}$).

La lignée IGR-CaP1 résistante a été obtenue plus rapidement que les deux autres lignées, elle semble avoir un mécanisme de résistance différent (irréversible et à des forte doses). Dans ce travail de thèse j'ai choisi de me focalisé sur la signature microarray de cette lignée. Nous avons analysé les résultats obtenus avec le logiciel d'analyse *Ingenuity pathway (IPA)* qui permet d'identifier des réseaux de gènes d'intérêt. Dans cette signature, nous retrouvons des modifications d'expression de gènes situés au niveau du chromosome 8p (voir article 3) souvent perdus dans les cancers, ainsi que des gènes impliqués dans différents processus cellulaires.

Les résultats de l'analyse génomique ont été validés par RT-PCR quantitative et par western blot sur un sous-groupe de 35 gènes. Nous avons utilisé ces résultats de génomique pour identifier des gènes et des voies de signalisation associés à un phénotype résistant ou sensible, et sélectionné les gènes candidats les plus pertinents (Tableau 11).

Molécule de transport	Voie wnt/βcat	Voie de détoxification	Cycle cellulaire	Apoptose	Autre
ABCB1	WNT5A	AHR	CDKN1C	GALNT14	RPIP9
TAP1	SFRP1	NQO1	LZTS1	BIRC3	TFPI2
SLC1A3	SHISA3	GST1	CCPG1	TNF	PURG
SLC16A12	JAG1	CYP1A1			ADAMTS1
SLC39A8	FZD8				SOX9
SLC22A2					CXCR4
SLC12A3					
SLC3A1					
SLC16A10					

Tableau 11 : Liste des gènes sélectionnés de la signature du transcriptome

Les gènes sélectionés correspondent à des critères de surexpression ou sousexpression. Parmi cette liste, certains gènes sont décrits dans la littérature comme étant impliquées dans la résistance aux drogues ou associés à un mauvais pronostic. D'autre ont été identifiés dans des voies de régulation selon notre analyse réalisée avec le logiciel *Ingenuity*. Pour certains de ces gènes candidats, il n'existe encore aucune donnée bibliographique ni aucun outil moléculaire (notamment aucun anticorps spécifique).

Parmi les gènes retrouvés dans notre signature, nous ne retrouvons pas de modification du gène codant pour la β3-tubuline dans la signature, mais nous retrouvons une forte surexpression du gène ABCB1 (Fold-change = 15,8) comme déjà décrit dans la littérature. Ce gène fait partie des 10 gènes les plus surexprimés de notre signature et se trouve très fortement surexprimé dans les cellules résistantes au docetaxel. Nous avons confirmé ces résultats sur des échantillons indépendants et validé à la fois par RT-PCR et par Western blot. Nous avons également observé une surexpression de ces gènes dans les préparations d'ARN réalisées à partir des cellules LNCaP et PC3 résistantes au docetaxel. Nos données s'accordent avec les données de la littérature décrivant l'implication de la surexpression d'ABCB1 dans la résistance aux taxanes. Il a été montré que les cancers de la prostate de haut grade qui sont résistants aux drogues surexpriment le gène ABCB1 et sont de mauvais pronostic (354). Cependant, il a été décrit que l'expression de ABCB1 en réponse au traitement est un phénomène observé majoritairement *in vitro*. L'utilisation d'inhibiteur pharmacologique de MDR1 s'est révélée très décevante en clinique.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la résistance n'était pas exclusivement due à la surexpression des pompes d'efflux. La validation fonctionnelle de cette protéine par si-RNA ou par des inhibiteurs spécifiques (la cyclosporine A) ne re-sensibilise pas totalement la lignée IGR-CaP-R100 au docetaxel. Nous avons observé en présence de siARN que la lignée IGR-CaP1-R100 depleté en ABCB1 conserve une IC50=50nM versus 0.34nM pour la lignée IGR-CaP1 sensible. (Voir article 3 Sup.data)

Parmi les gènes présents dans nos signatures génomiques, nous nous sommes en particulier intéressés à un gène impliqué dans le cycle cellulaire : le gène LZTS1 (*leucine zipper putative tumor suppressor 1*)
La protéine LZTS1 (596-aa, 67 kDa) a été identifiée en 2001 comme suppresseur de tumeur. Elle appartient à une famille de protéines constituée de trois membres (Lzts1, Lzts2 et Lzts3) qui contiennent des domaines Leucine-zippe. Nous nous sommes focalisés sur cette protéine que nous trouvons sous-exprimée dans nos modèles de cellules IGR-CaP1 résistantes au docetaxel.
Plusieurs raisons ont motivé le choix de LZTS1 :

1. Le gène LZTS1 est situé au niveau du petit bras du chromosome 8 (8p21.3–22). Les anomalies du chromosome 8p sont fréquentes dans les cancers et notamment dans le cancer de la prostate. Cette région contient plusieurs gènes suppresseurs de tumeur (447) et est fréquemment perdue dans des cancers du sein, du poumon, de la prostate ou de la vessie. Ces pertes sont associées à un risque plus élevé de rechute (448) et jouent aussi un rôle dans la résistance aux taxanes dans le cancer du sein en néoadjuvant (449). Nous avons émis l'hypothèse que cette région chromosomique pourrait également être impliquée dans la résistance dans le cas du cancer de la prostate.
2. FEZ1/LZTS1 est une protéine exprimée dans les tissus normaux et très souvent sous-exprimée dans les tumeurs (450) comme cela a été observé par immunohistochimie dans plusieurs types de cancers. Des résultats obtenus sur 88 tumeurs gastriques (451) montrent une sous-expression de LZTS1 dans 44,3% des tumeurs qui est corrélée à un stade disséminé. Dans le cas du mélanome uvéal (452) ou du cancer du sein (453), il a été montré que la diminution de l'expression de LZTS1 est corrélée au pouvoir métastatique. Cette diminution d'expression de la protéine semble être régulée par la méthylation du promoteur du gène LZTS1 dans le cancer du sein. Les tumeurs qui métastasent rapidement sous-expriment LZTS1. Enfin, différentes études suggèrent que LZTS1 est souvent peu ou pas exprimé dans les tumeurs par rapport au tissu sain (44% des cancers gastriques et 68% des cancers bronchiques). Plusieurs autres études associent la perte de LZTS1 à un grade élevé et un facteur de mauvais pronostic. En effet, sur 103 cancers du poumon on observe une tendance à une meilleure survie si LZTS1 est fortement exprimé (454). Peu de données sont disponibles dans le cancer de la prostate, cependant l'étude de Hawkins suggère que la perte de LZTS1 est associée à un risque plus élevé de cancer de la prostate (455).

3. LZTS1 est un suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. L'invalidation du gène LZTS1 provoque chez la souris des tumeurs spontanées et induites (406). La réexpression de LZTS1 dans les cellules cancéreuses (cancer de la prostate, cancer du sein) aboutit à une diminution de la tumorigénicité et de la prolifération, ainsi qu'à une accumulation de ces cellules au stade G2/M du cycle cellulaire (406). Vecchione et al, montrent que les cellules LZTS1-/- semblent avoir une mitose plus rapide que les cellules sauvages. Cette rapidité semble avoir lieu au niveau de la prophase et semble être due à la faible activité du complexe MPF (Cyclin B1/Cdk1) (406). Comme nous l'avons vu dans le chapitre VI, la sortie prématurée de la mitose due à la faible activité du MPF est souvent accompagnée de chromosomes retardataires ou incorrectement divisés et à des aneuploïdies. Dans cette même étude, il a été montré que LZTS1 agit sur la Cdc25C responsable de l'activation de la CDK1. En effet, LZTS1 stabilise la CDC25C pendant la prophase et empêche sa dégradation prématurée par le protéasome assurant l'activité du MPF. Les données de la littérature montrent que LZTS1 est essentiellement un garant de la durée de la mitose plutôt que de l'entrée en mitose.

En conclusion, LZTS1 joue un rôle fondamental dans la régulation mitotique et son absence peut induire des glissements mitotiques et des échappements aux checkpoints mitotiques. Il a été suggéré par vecchione et al. que la sous-expression de LZTS1 pourrait intervenir dans le mécanisme de la résistance au docetaxel. En effet, le docetaxel bloque le fuseau mitotique et altère la pro-métaphase. L'absence de LZTS1, pourraient permettre à la cellule de poursuivre une mitose malgré les anomalies chromosomiques (450). L'article 3 décrit l'implication de LZTS1 dans le mécanisme de résistance au docetaxel dans notre modèle cellulaire de cancer de la prostate.

ARTICLE 3: LOSS OF THE CELL CYCLE REGULATOR LZTS1 IN DOCETAXEL-RESISTANT PROSTATE CANCER CELLS

Nader AL NAKOUZI[1,5], Frédéric COMMO[1,5], Catherine GAUDIN[1,5], Shanna RAJPAR[1,5], Sandra LEJUSTE[1,5], Philippe DESSEN[2,5], Philippe VIELH[1,3,5], Karim FIZAZI[1,4,5] and Anne CHAUCHEREAU[1,5]*

[1]Prostate Cancer Group, INSERM U981, Institut Gustave Roussy, Villejuif, F-94805, France

[2]INSERM U985,, Institut Gustave Roussy, Villejuif

[3]Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif

[4]Department of Medicine, Institut Gustave Roussy, Villejuif

[5]University Paris-Sud 11, Orsay, F-91405, France

* corresponding author

MANUSCRIT EN PREPARATION

Running head title: Role of LZTS1 in the mechanism of docetaxel-resistance

Corresponding author: Anne Chauchereau, PhD

Prostate Cancer Group, INSERM U981, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif, F-94805, France

Tel: +33 1 42 11 66 07, Fax: +33 1 42 11 60 94, E-mail: anne.chauchereau@igr.fr

ABSTRACT

Docetaxel is used as a standard treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. However, a large subset of patients develops resistance by mechanisms that remain largely unknown. It is thus important to define the relevant pathways implicated in docetaxel-resistance and validate predictive biomarkers that will allow approaches of personalized treatment. In this aim, we established resistant IGR-CaP1 prostate cancer cell lines to different doses of docetaxel (IGR-CaP1-R cell lines) and investigated gene expression profiles by microarray analyses. We generated a signature of 112 genes potentially implicated in docetaxel-resistance whose expression is highly modified (Fold change ≥ 5). Among these genes, significant modification of expression was observed among cell cycle components in the resistant cells. Hence, we focused on the role of the cell cycle regulator LZTS1 located on chromosome 8p which was under-expressed in all our docetaxel-resistant models. LZTS1 extinction was confirmed at the RNA and protein levels. DNA methylation analysis revealed a stretch of 20 highly methylated CpGs in the region encompassing the exon 1 of LZTS1 promoter in the docetaxel-resistant cells suggesting the existence of an epigenetic regulation of LZTS1 expression in the resistant cells. By using siRNA strategy, we found evidence that LZTS1 plays an important role in the acquisition of the resistant phenotype. In addition, immunohistochemical staining showed that LZTS1 protein was absent or down-regulated in 33% (9/27) of diagnostic biopsies obtained in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. This heterogeneous labeling suggests that LZTS1 might constitute a predictive biomarker of response to docetaxel chemotherapy. Furthermore, as Cdc25C is a LZTS1 partner in the mitosis regulation, we observed that targeting of Cdc25C with the pharmacological Cdc25C inhibitor NSC 663284 specifically killed the docetaxel-resistant cells. These results strongly suggest that Cdc25C plays a role in docetaxel resistance and that Cdc25C might be a therapeutic target to overcome docetaxel resistance. Altogether our findings identify an important role of LZTS1 in developing docetaxel resistance in prostate cancer through its role in regulating phosphatase Cdc25C.

INTRODUCTION

Prostate cancer is one of the most prevalent malignancies affecting men worldwide. Actually, it is the most frequent cancer in the United-States and Western countries and is a major cause of cancer death and morbidity. In the past few years, clinical studies have highlighted the value of chemotherapy in metastatic prostate cancer. Docetaxel-based chemotherapy benefit in castration-resistant prostate cancer was demonstrated for the first time in 2004 with an increase of overall survival in two phase III clinical trials, TAX 327 and SWOG 99-16 (1,2). Today, docetaxel is the only standard in first line therapy for these patients. However, there is no evidence of docetaxel efficiency in treatment of localized prostate cancer with high risk of relapse and, as such, several clinical trials are ongoing to assess this indication. Docetaxel, a member of taxane family, is an anticancer drug binding to the β-subunit of tubulin in microtubules. It promotes polymerization and inhibits depolymerization of microtubules, disrupting their dynamic, and resulting in the arrest of tumor cells growing at G_2-M phase and so triggering cell apoptosis (3). However, in spite of the survival benefit provided by this molecule, about half of patients develop drug resistance. Intrinsic or acquired drug resistance remains the main obstacle for patient care. A pivotal strategy for the development of new drugs to overcome drug resistance mechanisms relies on the elucidation of resistance mechanisms and on identifying biological markers of response to docetaxel allowing to select patients who will benefit from taxane-based chemotherapy.

Considerable efforts have been made to explore the fundamental bases of docetaxel-resistance and to develop predictive biomarkers. Several studies highlighted the complex combination of gene expression pattern changes enabling resistance to docetaxel (4-6). To date, while multiple aspects of resistance have been explored, few have been successfully manipulated in the clinical setting. The most widely studied biomarkers to predict taxane-response include overexpression of class III β-tubulin (TUBB3), microtubule-associated protein tau (MAPT), efflux pumps (ABCB1/Mdr1) and breast cancer 1 early onset (BRCA1). However, data from most of the large studies are controversial and none of these biomarkers are relevant in clinical routine.

In this study, we attempted to identify and validate a new potential biomarker which can predict the response to docetaxel-therapy. For this aim, we developed a series of docetaxel-resistant derivatives of the androgen-independent prostate cancer cell line IGR-CaP1 (7) and performed a broad gene expression profiling using cDNA microarray analysis. Gene expression profiling of these docetaxel-resistant cells revealed sets of docetaxel inducible and constitutively expressed genes associated with major cancer pathways, such as cell cycle, cell growth, survival and proliferation, metabolism, and maintenance of cytoskeleton. These cellular processes often contributed to drug resistance and our study identified a set of candidate genes managing this phenotype. This gene expression profiling demonstrated the complex mechanisms mediating resistance to docetaxel. We at first focused our study on the cell cycle regulator Lzts1. The LZTS1 gene, mapping to human chromosome 8p22, encodes a 596 amino acid protein previously described as a tumor suppressor (8). Chromosomal

deletions encompassing LZTS1 are frequently observed in a variety of human cancers including breast (9), lung (10), gastric (11), prostate (12), melanoma (13) and bladder (14) cancers. In breast cancer, methylation has been identified as a possible mechanism for its loss of function in tumors (9). Earlier studies clearly showed that Lzts1 has a physiological role in cell cycle regulation. During the M phase, Lzts1 contributes to the maintenance of high levels of Cdk1 activity to prevent chromosomes missegregation by regulating the activity of Cdc25C (15). As a result, Lzts1 specifically regulates the transition through mitosis. In mice, absence of Lzts1 results in accelerated mitotic progression, improper chromosome segregation and, eventually, in increased incidence of both spontaneous and carcinogen-induced cancer formation (15). By using the siRNA knock-down strategy, we demonstrated the relevance of Lzts1 in cell cycle control of docetaxel-resistant cells and provided encouragements for the development of Cdc25C-targeting strategies to overcome docetaxel resistance.

Materials and Methods

Cell culture and selection of docetaxel-resistant clones

The human prostate cell line IGRCaP-1 was maintained in RPMI1640 medium complemented with 10% FBS and antibiotics. Docetaxel-resistant clones were selected by culturing cells in docetaxel in a dose-escalation manner. Initial culture was 0.5nM docetaxel. Cellular clones surviving in the presence of 0.5nM docetaxel were maintained in culture during 4 passages, and then the concentration of docetaxel was increased to 2.5nM and subsequently to 12nM, 25nM, 50nM, 100nM and 200nM. The same selection methodology was followed with sequential increases in docetaxel concentration. Once cells were freely dividing in each dose of docetaxel mediums, these were considered as resistant. Labelled IGR-CaP1-R clones were obtained surviving in medium containing respectively 2.5nM, 5nM, 12nM, 25nM, 50nM, 100nM and 200nM Docetaxel. All the cell cultures were maintained at 70% confluency and medium was changed every 48 h. The docetaxel (TAXOTERE®) was kindly provided by Sanofi-Aventis (France) as injection concentrate and was diluted in PBS buffer before use.

Cell Cycle analysis

Effects of treatments on the stages of the cell cycle were determined using the PI staining technique. Briefly, parental and Docetaxel-resistant IGR-CaP1 cells were grown in flasks at a density of $4x10^6$ cells. After allowing for overnight attachment, cells were treated or not with appropriate concentration of docetaxel. Cells were incubated for 48 hr then collected by trypsinization, making sure to include the floating cells. After washing in PBS, cells were fixed and permeabilized using cold ethanol at 70%. Cells were treated with 20µg DNAse-free RNAse for 30 min and stained with 100µg propidium iodide (PI) for 30 min. Then, the percentage of cells in G1, S, G2, M, and subG1 phases were analyzed with FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson).

Total RNA Preparation and Reverse Transcription

Total RNA from parental and docetaxel-resistant IGR-CaP1 cells was isolated using TriReagent (Sigma-Aldrich) and purified with RNeasy Micro Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocols. Quality of RNA preparation, based on the RNA Integrity Number (RIN), was assessed using the Agilent RNA 6000 Nano Kit as developed on the Agilent 2100 Bioanalyzer device (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). All specimens included in this study displayed a RIN of 10. RNA samples were frozen in nuclease-free water (Qiagen).

Oligo Microarray Technology

Parental and resistant-cell line total RNAs were directly compared using Agilent oligonucleotide dual-color technology, running dye-swap and duplicate experiments. Total RNA from the parental IGR-CaP1 cell line without treatment was used as the RNA reference. Total RNA from IGR-CaP1 cells resistant to treatment with 5nM, 12nM, 25nM 50nM, 100nM, and 200nM of docetaxel respectively,

were used as samples. Probe synthesis and labeling were performed by Agilent's Low Fluorescent Low input Linear Amplification Kit. Hybridization was performed on the Agilent 4x44K Human 1A (G4112F) long (60-bp) oligonucleotide microarrays (Agilent Technologies) by using reagents and protocols provided by the manufacturer. Feature extraction software provided by Agilent (Version A.9.5.3.1) was used to quantify the intensity of fluorescent images and to normalize results using the linear and lowess normalization method. Primary analysis was performed by using Resolver software (version 7.1) (Rosetta Laboratories, Milan) to identify genes differentially expressed between parental and resistant cell lines with an absolute fold change > 2 and p-value < 10^{-10}. Using this procedure for each of the 6 combined experiments, a list of 244 probes (207 genes) was extracted and was considered as a signature of genes potentially implicated in resistance to docetaxel. These genes were sorted out by the mean of the fold change observed respectively for the 6 doses of resistance towards Docetaxel. The list of the mostly modified genes (fold change > 5 and P value < 10^{-10}) is shown in supplementary Table I.

Real-time quantitative RT-PCR

Real-time quantitative RT-PCR was performed using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The same procedure was applied from the total RNA used in the microarray analysis and for independent RNA samples. PCR primers and probe for the selected target genes were designed by Applied Biosystems and used according to the manufacturer's recommendations. The amount of sample RNA was normalized by the amplification of an endogenous control (18S). The relative quantification of the transcripts was derived by using the ddCT method (Applied Biosystems User Bulletin 2, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System).

Genomic DNA extraction and bisulphite modification

Genomic DNA was isolated from cells using the QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany). Genomic DNA samples were bisulfite-modified using CpGenome DNA Modification Kit (Chemicon, temecula, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. One microgram of genomic DNA was treated with bisulfite, which converts unmethylated cytosines to uracils, whereas methylated cytosines are resistant to modification. The bisulphite modification of DNA CpGenome Universal Methylated DNA (Chemicon) and human genomic DNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA) were used as positive and negative controls, respectively.

Bisulfite Sequencing Analysis.

To analyse the CpG methylation status of LZTS1 promoter, primers were designed that do not discriminate between methylated and unmethylated alleles overlapping 2 regions 1-1573 (1573bp) and 49023-49994 (971 bp) covering the exon 1 and 2 respectively of the LZTS1 gene (sequences available under request). PCR reaction was carried out in a 50 μl mixture containing 0.2 mM each dNTP, 1.5 mM or 3 mM MgCl2, 400 nM of each primer, 80 ng of bisulfite-treated DNA and 1 U GoTaq

Hot Start Polymerase (Promega). The PCR cycling profile consisted of an initial denaturating step at 95°C for 2 min, followed by 4 cycles of 94°C for 30 sec, 62°C for 30 sec and 72°C for 30 sec; 38 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec; and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were run in 1 % agarose gel with appropriate size markers. PCR products were purified using Sephadex G-50 (Amersham Biosciences, Cleveland, OH, USA) and then directly sequenced using the BigDye Term v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing reactions were purified enzymatically using ExoSAP-IT (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA) and were run on an ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems). The collected data were analysed using SeqScape analysis software (Applied Biosystems). The methylation status of CpG islands was determined by direct sequencing of both strands and by estimation of the relative peak height of the PCR products

Transfection with siRNA and Western blot analysis

Parental or resistant IGR-CaP1 cells at ~50% confluence were cultured in six-well plates and transiently transfected with siRNA. For RNA interference assays, specific synthetic RNA oligonucleotides targeting the chosen genes and negative control were purchased from InVitrogen. Transfections were carried out using lipofectamine RNAi Max (Invitrogen). Forty hours or 72h after transfection, the cells were used for drug treatment or cell survival assay as mentioned in the legend of the figures. Whole cell extracts were prepared in RIPA buffer with protease inhibitors (Roche). Western Blot assays were performed on 40µg of whole cellular lysates. Blots were probed with anti-LZTS1 (C-20), anti-CHK1 (G-4) and anti-Cdc25c (C-20) antibodies from Santa-Cruz Biotechnology, anti-phospho S216 Cdc25c antibody from Cell signalling, anti-phospho S317 CHK1 antibody from Abcam, anti-GAPDH antibody from Millipore or anti-β-actin antibody from Sigma. Immunoblot analyses were developed using the enhanced chemoluminescence-based detection kit (Pierce).

Cell viability assays

Cells were seeded into 96-well plates prior to a 24 h treatment with increasing docetaxel concentrations. The sensitivity of the cells was determined using the WST1 reagent (Roche) according to manufacturer's instructions. Cell viability in the treated plates was compared with that measured in untreated cells to calculate the surviving fraction. The proportion p_i of survival cells at dose i was first estimated from absorbencies as follow:

$p_i = \frac{D_i - T_0}{Ctrl - T_0}$ where D_i is the absorbance at dose i, T_0 is the absorbance at t = 0, and Ctrl is the absorbance in the untreated control cells.

The dose-response curve and IC50 were then estimated with a 5-parameters logistic regression, as previously described (16).

Clonogenic assays

Cell survival was evaluated using a standard colony forming assay. One thousand–5,000 cells/well were plated onto 10 cm plates 48 h after transfection and prior to a 24h chemotherapeutic treatment. Eight to 10 days later, the plates were stained (Cristal violet, Sigma-Aldrich) and the colonies were counted. The response of siNT transfected cells was used as a control.

Immunofluorescence microscopy

For centrosome analysis, cells were plated on a glass-slide in 6-well plates and grown for 2 days. After 3 washes for 5 min in PHEM buffer (45mM Pipes, 45mM Hepes, 5mM MgCl2, 10mM EGTA, pH 6.9), cells were fixed in methanol at -20°C for 3 min. After 3 more washes in PHEM buffer, cells were washed once in PBS and blocked in anti-goat serum (1:100). To immunostain the centrosomes and p53, the slides were incubated for one hour with the monoclonal anti-γ-tubulin (1:1000) (GTU-88, Sigma) antibody. After washing with PBS, cells were further incubated with an anti-mouse Alexa 488-conjugated (Molecular Probes) secondary antibodies (1/400) for 30 min at room temperature. Nuclei were stained with Dapi vectashield mounting reagent (Vector Laboratories). For the determination of the polynucleation, cells were fixed in 4% formaldehyde, washed and then nuclei were stained with Dapi Vectashield mounting reagent (Vector Laboratories). Images were acquired on Zeiss Axioplan 2 microscope.

Clinical characteristics of biopsy samples

The study included 27 patients. All patients received first line docetaxel-based chemotherapy for castration resistant prostate cancer between 2001 and 2010. Clinical and biological data were collected retrospectively at the diagnosis. PSA level was collected before docetaxel and at 3 months of treatment.

Patients' characteristics at diagnosis	
Age (mean)	64 [51-74]
PSA ng/ml (mean)	81 [4.37-3840]
Clinical stage	
N0 and M0	
N1 or M1	17/27 (63%)
Gleason score	
≤7	12/16 (44.4%)
>7	15/16 (55.6%)

Immunohistochemistry

Formalin fixed paraffin-embedded specimens were obtained and immunostaining was performed on the initial prostatic biopsies. LZTS1 immunostaining was performed on 4µm sections from paraffin-embedded tissue. Sections were deparaffinised and rehydrated in citrate-buffer pH 6, for 30 min at 98°C cleared and antigens were retrieved by microwave irradiations. Endogenous peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxidase (peroxydase blocking solution, DAKO) and then washed in phosphate-buffer solution. The primary anti-LZTS1 rabbit polyclonal antibody (Sigma prestige antibody) was incubated (1:500) for 1 h at room temperature. The sections were then incubated with secondary antibody Envision (DAKO) for 45 min and the signal was developed by using DAB chromogen (DAKO) as substrate for 10 min.

Lzts**1 scoring**

Slides were evaluated by an independent anatomo-pathologist blinded to the docetaxel response. Lzts1 staining was scored as negative, weak, moderate and strong according to proportion of stained tumor cells (Negative <2%, weak 2-50%, moderate 51-95% and strong > 95%). Staining intensity in vessel served as an internal positive control. For the statistical analysis, moderate and strong staining for Lzts1 was considered as positive expression.

RESULTS

Establishment of docetaxel-resistant cell lines

To generate a framework for studies of docetaxel activity against prostate cancer cells, we have developed a series of docetaxel-resistant derivatives of the previously described IGR-CaP1 cell line (7).The docetaxel-resistant cell line was designated as IGR-CaP1-R. The drug-resistant cells were produced by periodically exposing proliferating IGR-CaP1 cultures to a pharmaceutical pressure with increasing dose of doxetaxel. We obtained six IGR-CaP1-R cell lines which were resistant to increasing doses of drug (5nM; 12nM; 25nM, 50nM; 100nM; 200nM respectively). The sensitivity for docetaxel of the parental IGR-CaP1 and drug-resistant cells were compared by WST-1 cell proliferation assay with increasing dose of docetaxel. The IC50 value for the resistant cells increased from 24nM for IGR-CaP1-R5 cells, to 100nM for IGR-CaP1-R50 to 148nM for IGR-CaP1-R100 compared to 0.34nM in parental IGR-CaP1 cells, thus showing a ~400 fold higher level of docetaxel resistance in the IGR-CaP1-R100 derivative compared to parental cells (Fig1A). In IGR-CaP1 cells, docetaxel induced delayed cell death via mitotic catastrophe evident by profound multinucleation, polycentrosome and formation of giant cells (Fig1C). Drug-resistant cells emerged from the profoundly multinucleated cells. The process of asymmetric cell division when viable mononucleated descendants arised from multinucleated progenitors has previously been described in various cancers and serves as a mechanism for tumor cell survival and a promoter of tumor progression. Importantly, in all the IGR-CaP1-R subclones, docetaxel-resistance was maintained in the presence of drug without inducing multinucleation and cell death. The resistance of cells was confirmed by cell cycle analysis showing that, contrarily to the parental cell line, the resistant IGR-CaP1-R100 cells are not blocked in the G2/M phases of the cell cycle (Fig1B), and do not present multinucleated and polycentrosome phenotype (Fig1C.)

The docetaxel-resistant IGR-CaP1-R100 cells grew more slowly than the parental cells (Supplementary Fig.1A). The growth rate of IGR-CaP1-R100 was ~2 fold higher than that of the parental cells (45h versus 23h in the parental cells). There was no significant morphological difference between the parental and the IGR-CaP1-R100 cells (Supplementary Fig.1B). Cell survival assay showed that after a treatment with 12nM docetaxel, all IGR-CaP1 cells died in 2 week. In contrast, the IGR-CaP1-R100 cells showed a reduced ability to make colonies but the all the resulting clones were able to survive to a treatment with 12nM docetaxel (Supplementary Fig.1C).

Inhibition of LZTS1 gene expression in docetaxel-resistant IGR-CaP1-R cells

A microarray analysis was performed to compare the expression profiles of genes in the six docetaxel-resistant IGR-CaP1 cell lines (IGR-CaP1-R5, -R12, -R25, -R50, -R100 and R200 respectively) to that of the parental IGR-CaP1 cell line. This analysis led to the identification of a list of 244 probes associated with a phenotype resistant to all concentrations of Docetaxel (dye-swap analysis, 2D clustering with $p<10^{-10}$, genes with a fold change > 2). In this signature, 112 genes were highly

modified (mean fold change ≥ 5) in the resistant cells with 46 genes highly over-expressed and 66 genes highly under-expressed in the resistant cell lines (Supplementary Tables I and II).

To verify variations in gene expression detected in the microarrays, we selected a panel of 35 genes with varying expression profiles for real-time quantitative RT-PCR validation. The level of gene expression determined by RT-PCR confirmed the microarray data, either on the same samples used for the microarray (training set) or on independent samples (validation set). Spearman test showed a high correlation between the two analyses (rho=0.938, n=21) (Supplementary Fig.2). Based on the literature and Ingenuity® Pathways analysis, we identified biologically closely related gene clusters that included regulation of cell death/apoptosis, cell cycle, cell growth/proliferation, extracellular matrix/adhesion, cytoskeleton, microtubules, response to stress/chemical stimulus, receptors, signal transduction and transcription, transporters and metabolic processes and a group of other genes without known associations. This gene expression signature highlighted the complex mechanism mediating resistance to docetaxel.

According to previous analyses, chromosome 8p loss, chromosome 8q gain and TMPRSS2-ERG gene fusion are the major genetic alterations in prostate cancer. A recent study showed by analysing the copy-number alterations that the cluster including deletions on chromosome 8p was associated with a high probability of biochemical recurrence of primary tumors than the cluster including chromosomes 7 gains (17). Indeed, a study on breast cancer tumors showed that patterns of genomic alterations detected by aCGH differ between responders and non-responders to taxane-based chemotherapy, suggesting that aberrations in chromosome 8 may contribute to the resistance to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer (18). We hypothesized that alterations on chromosomes 7 and 8 may contribute to response to specific treatments and searched in our model, whether modifications of the expression of genes located in these aberrations might be responsible for resistance mechanism. When analysing the chromosome location of genes identified in our gene expression signature, we found that the majority of genes located in chromosome 7 were amplified (Table I and Supplementary Table I). As expected, the ABCB1 gene encoding the Mdr1/P-gp1 efflux pomp was highly expressed in our docetaxel-resistant cells (mean Fold Change = 15.8). In contrast, numerous genes were under-expressed in the resistant cells in the chromosome 8p, namely in the region 8p21-22 (Table I and Supplementary Table II). As LZTS1 previously described as a tumor suppressor gene, was shown to be implicated in cell cycle and was found under-expressed in bad prognosis breast cancers, we next investigated the functional role of LZTS1 in the mechanism of docetaxel resistance.

Considering the high expression level of the ABCB1 gene encoding the Mdr1/P-gp1 efflux pomp on microarray analysis, the RT-PCR assay realized on independent samples confirmed these data (Supplementary Fig. 3A and 3B). Overexpression of ABCB1 was also confirmed at the protein level (Supplementary Fig. 3C). As overexpression of the Mdr1/P-gp1 efflux pomp is one of the most described mechanisms of resistance, we first assessed the role of the ABCB1/Mdr1 protein on the resistant phenotype by the use of siRNA. We showed that ABCB1-depleted resistant IGR-CaP1-R100

cells exhibited only a modest sensitivity towards docetaxel compared to the R100 resistant cells (IC_{50}=54nM in the absence of ABCB1 compared to IC_{50}=79nM in the presence of ABCB1). Thus, these results suggested that the activation of efflux pomp were not sufficient to establish the docetaxel resistant phenotype of the IGR-CaP1-R100 cells.

Our prior microarray-based analysis comparing resistant IGR-CaP1-R and parental IGR-CaP1 cell lines showed that LZTS1 was one of the genes differentially expressed on the chromosome 8p. LZTS1 is down-regulated in resistant cell lines proportionally to the resistance level (Fig 2A.) with a mean fold change of -6.0. We validated the accuracy of the microarray expression levels of LZTS1 for IGR-CaP-R cell lines using quantitative RT-PCR, as we observed a highly significant reduction in LZTS1 mRNA expression in all the resistant IGR-CaP1-R cells (80% of reduction) (Fig 2B). We showed that decrease in mRNA expression was correlated to a complete loss of LZTS1 protein level in the resistant cells (Fig 2C). We verified that LZTS1 down-regulation was conserved even in the presence of docetaxel at 100nM for 48h (Fig 2D). Thus, LZTS1 protein extinction seemed to correspond to a stable resistance phenotype established in the resistant IGR-CaP1-R100 cells. LZTS1 protein expression was maintained at the same level in the parental IGR-CaP-1 cells even in the presence or absence of drug treatment.
Previous studies reported that LZTS1 is frequently down-regulated in several solid tumors (9-11,14). Hypermethylation of a CpG island in the LZTS1 promoter appeared to be frequently methylated in both cell lines and tumors. It has been proposed that promoter methylation could be responsible for the reduced expression of LZTS1 in breast cancer cells (9). To test this hypothesis, promoter methylation of LZTS1 gene was analyzed after a bisulfite-treatment of genomic DNA extract from parental and resistant IGR-CaP1 cells. We first evaluated the methylation of CpGs located on a region encompassing the second exon, surrounding the transcription start site (region 2), as previously described by Chen et al., 2008. Surprisingly, we found 32 methylation CpGs in this region, which were highly methylated in both the parental and the resistant R100 cell lines (Figure 2E and Supplementary Table III). As a non-coding exon has been described in the 5' region of the promoter, we next analyzed the methylation of CpGs located on the region 1 encompassing the first exon and found a high difference in methylation level on 20 CpGs in resistant cells compared to the parental one (Figure 2E and Supplementary Table III). Methylation of CpG islands in exon 1 was clearly increased in IGR-CaP1-R100 cancer cell lines, thus suggesting that extinction of LZTS1 protein in the docetaxel-resistant cells might result of an epigenetic methylation of the LZTS1 promoter.

Lzts1 down-regulation enhances the drug resistance of IGR-CaP1 cells to docetaxel

The functional role of Lzts1 in docetaxel-resistance was assessed in the parental IGR-CaP1 cell line, using siRNA specifically targeting LZTS1. As shown in Fig. 3A, Lzts1 expression was totally abrogated in IGR-CaP1 cells 48 hours after siLZTS1 transfection. The specificity of silencing was attested by using a GAPDH-targeting siRNA as a positive control. To assess the effect of LZTS1 depletion on the

proliferation and cellular growth properties of IGR-CaP1 cells, WST-1 and colony-forming assays were performed comparing siLZTS1-transfected cells to cells transfected with a non-targeted siRNA (siNT). The growth curves showed that siLZTS1-transfected cells had a significant increase in proliferation ability than siNT-transfected cells (Fig. 3B). When treated with 1.1nM docetaxel, siLZTS1-transfected cells exhibited a significantly enhanced resistance to docetaxel as compared with siNT-transfected cells. According to this experiment, the level of resistance to docetaxel was higher in siLZTS1-transfected IGR-CaP1 cells than in the NT-transfected IGR-CaP1 cells. In addition, the number of colonies was lower in siLZTS1-transfected cells than in siNT-transfected cells in colony-forming assay. However, after a treatment with 12nM docetaxel, we still observed some colonies in siLZTS1-depleted cells (n=3.7 ± 1.5) (Fig 3C). Thus, this experiment provided evidence that LZTS1-knockdown significantly decrease colony formation ability but suggested that once established in culture, the cells were more resistant to drug. The dose-response curves with increasing doses of docetaxel showed a significant upward shift in IC_{50} values in siLZTS1-transfected IGR-CaP1 cells (IC_{50}=1.1nM) compared to siNT-transfected cells (IC_{50}=0.53nM) (Fig 3D). Furthermore, LZTS1-depleted cells failed to properly arrest in prometaphase and LZTS1-depleted cells displayed a lower fraction of abnormal mitotic figures compared to siNT-transfected cells (Fig. 3E). Flow-cytometry analyses showed that in LZTS1-depleted cells, low dose of docetaxel (12nM) induced less apoptosis and higher dose of docetaxel (100nM) led to a reduction in the G2/M blockage and an increase of the G1 cell fraction. Together, these results suggested that silencing of LZTS1 in parental IGR-CaP1 cells led to a measurable gain of docetaxel resistance in these cells.

Heterogeneity in Lzts1 protein expression in human tumors from docetaxel-treated patients with metastatic prostate cancer

Immunohistochemical studies of primary tumors indicated that Lzts1 protein expression in cancer cells is absent or markedly reduced in many different cancers compared with non-cancerous tissue. Preliminary clinical data showed an overall ~60% of different primary tumors with loss or reduction of Lzts1 protein expression in cancer cells (19). We investigated the usefulness of Lzts1 as a potential predictive biomarker for response to docetaxel by examining Lzts1 expression in the initial prostatic biopsies of metastatic prostate cancer patients treated with docetaxel chemotherapy. Representative paraffin sections showing high cytoplasmic expression (C, E) and negative expression (D, F) of Lzts1 in epithelial tumor cells were shown in Fig 4. Immunostaining for Lzts1 showed that only 9/27 patients (33.3%) had a negative expression of Lzts1 (negative or weak staining). Although the small size of the tumor set did not permit to correlate the expression of Lzts1 with the docetaxel response, our results showing that Lzts1 was expressed in a majority of prostate tumors (66.7%) were in contrast with previous reports. Heterogeneity of Lzts1 immunostainings suggested that Lzts1 expression might be monitored in prostate tumors as prognostic or predictive biomarker. A larger series of patients should be tested to know if Lzts1 expression may help to select patient who respond to docetaxel-based chemotherapy.

Implication of the cell cycle partners of Lzts1 in the docetaxel-resistance mechanism

Lzts1 is involved in the regulation of cell growth. This protein contributes to the maintenance of high levels of Cdk1 activity during M phase, preventing chromosomes missegregation. Lzts1 binds the Cdk1 phosphatase Cdc25C and stabilizes it by protecting it from proteasomal degradation (15). Partial or complete loss of Lzts1 downregulates Cdc25C and inhibits Cdk1 activity during mitosis, leading to premature transition from metaphase to anaphase. Chk1 is another important cell cycle regulator which inhibits Cdc25C through serine-216 phosphorylation causing G2/M arrest in response to a genotoxic stress (20,21).

As Lzts1 might interact with these two cell cycle components, we determined the level of Cdc25C and Chk1 in Lzts1-depleted IGR-CaP1 cells. As shown in Fig.5A, the extinction of Lzts1 protein expression in the IGR-CaP1 cells triggered a simultaneous decrease in Cdc25C and Chk1 protein expression respectively. Neither the phosphorylated-Ser(216) form of Cdc25C nor the phosphorylated form of Chk1 were affected by Lzts1 depletion. Accordingly to that observed with siLzts1, the absence of Chk1 activation by docetaxel was also observed in resistant IGR-CaP1-R100 cells, contrarily to that observed in the parental IGR-CaP1 cells (Fig.5A, right). This result suggests that Cdc25C and Chk1 might be implicated with Lzts1 in the mechanism of docetaxel resistance.

To verify whether Cdc25C deregulation was implicated in docetaxel-resistance, we used the Cdc25C inhibitor NSC 663284 (22,23). IGR-CaP1 cells were treated with NSC 663284 for 1 hour, then washed and exposed to docetaxel for 48 hours. In absence of docetaxel, no effect of NSC was observed on cell morphology. In contrast, we observed that the fraction of abnormal mitotic nuclei induced by docetaxel was strongly decreased in the presence of NSC compared to mock control (Fig5B). Interestingly, flow cytometry analysis showed that the resistant IGR-CaP1-R100 cells were much more sensitive to NSC, showing a massive cell death in NSC-treated IGR-CaP1-R100 cells (89%) compared to 3% in NSC-treated parental cells (Fig. 5C). The strong cytotoxic effect of NSC inhibitor on docetaxel-resistant cells was confirmed by the NSC dose-response curves which showed a ~8 fold higher response in the IGR-CaP1-R100 cells compared to the parental IGR-CaP1cells. The IC_{50} values for NSC were determined as IC_{50}=1.39µM in resistant cells and IC_{50}=10.84µM in normal cells (Fig5D). These results provided strong evidences that Cdc25C plays a role in docetaxel resistance and suggested that Cdc25C might be a therapeutic target to overcome docetaxel resistance.

DISCUSSION

Docetaxel is the only cytotoxic agent that consistently improves survival of metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC). Until recently, the search for predictive biomarkers to select patient who are responding to the drug has been disappointing. A greater understanding of resistance pathways is needed to both predict resistance early in the course of treatment and to ultimately manipulate this resistance and improve outcome. In the era of personalised cancer therapy, significant treatment advances have occurred through a better understanding of cytotoxic resistance and the heterogeneity among patients with the same disease.

In order to elucidate the mechanisms of docetaxel-resistance, we established several docetaxel-resistant clones from the IGR-CaP1 cell line. This cell line derived from primary epithelial prostate cancer has been previously characterized (7). The drug-resistant clones are resistant to increasing docetaxel concentrations and consist in an accurate tool to decipher docetaxel resistance-mechanisms and to identify new therapeutic targets. In this study, a comparison of transcript profiles between docetaxel-resistant IGR-CaP1-R and parental cell line revealed a robust modification in the transcription level of 112 genes that are potentially implicated in docetaxel-resistance. Notably, we found a high up-regulation of ABCB1/MDR1 gene encoding the P-glycoprotein (P-gp) in all resistant clones. Many studies in solid cancers have previously reported the activation of multidrug resistance through the overexpression of the P-gp in taxane resistance (5,24-26). However, this efflux pomp appears to be variably related to chemotherapy resistance in prostate cancer cell lines, as it was not overexpress in chemoresistant PC-3 cells whereas overexpression of P-gp was reported in resistant DU145 cells, where P-gp inhibition restored chemo-sensitivity (27,28). Aberrant Mdr1 expression has been reported in many cancer types, including prostate cancers, and contributes significantly to treatment failure (4). A recent study of 140 primary prostate tumour samples of different stages/grades before drug therapy has shown high levels of Mdr1 expression to be correlated with tumour grade, clinical stage, residual tumour and relapse, suggesting that Mdr1 expression may be involved in prostate cancer progression and metastasis (29). But to date, although many efforts to overcome Mdr1/P-gp have been made using several reversal agents in clinical trials, results were disappointing (30). As we confirmed the high over-expression of MDR1/P-gp at the protein level in the resistant IGR-CaP1-R cells, we investigated the effect of the selective extinction of this efflux pomp and shown that the P-gp down-regulation in the docetaxel-resistant cells does not completely restore the docetaxel sensitivity. This result suggests that even if the efflux pumps are implicated in the early response of cells in order to overcome the drug-treatment, other stable mechanisms are activated to procure a long term resistance. Thus we focused our efforts on the search for a novel pathway of docetaxel-induced resistance in prostate cancer, in order to identify potential resistance biomarkers and new therapeutic targets.

Modifications in the expression of genes located on the short arm of chromosome 8 are common in a wide range of epithelial malignancies including prostate cancer. In our signature, we found 6 genes highly modified located within this region. In many cancers, deletion of chromosome 8p12-22 and DNA hypermethylation of this region are associated with a more aggressive tumor phenotype, tumor progression and more rapid appearance of metastases. Among these 6 genes, LZTS1 was strongly linked to cell cycle regulation. The cytotoxicity of taxane-based chemotherapy has previously been shown to occur in part through perturbation of cell cycle and mitotic checkpoint (5). The primary molecular function of docetaxel is to bind and disrupt microtubules depolymerization. As a part of the cell stress-response mechanism, the disruption of microtubule dynamics is sensed by microtubule interacting proteins, which in turns activate the spindle assembly checkpoint inducing cell death. In our study, we identify Lzts1 as a potential modifier of docetaxel-resistance. We report that LZTS1 gene is under-expressed in resistant IGR-CaP1-R cell lines and that its depletion results in a resistance phenotype. Furthermore, we identified a stretch of methylated sites in the Lzts1 promoter in the region covering the first exon which could correspond to the epigenetic mechanism of LZTS1 gene extinction. By using siRNA strategy, we showed that depletion of Lzts1 protein in IGR-CaP1 cell line increases IC_{50} value towards docetaxel, reduces the mitotic catastrophe rate (i.e. polynucleated cell number) induced by docetaxel and allows the survival of several clones after docetaxel treatment. This provides compelling evidence that reduction in Lzts1 expression is likely to influence docetaxel-resistance. Lzts1 protein has been shown to associate with microtubule components and to interact with the mitotic kinase Cdk1 at late S-G2/M stage of the cell cycle (15). Anti-sense against Lzts1 has been shown to reduce active cdk1 levels indicating that Lzts1 may be involved in stabilizing the Cdk1–cyclinB1 complex in late S-G2/M. In this case, inactivation of Lzts1 could lead to early exit from M phase and reduced control of proliferation (31). Therefore, we suggest that, in absence of Lzts1, abnormal cells induced by docetaxel treatment are able to escape the checkpoint, are less arrested in mitosis and do not show features of mitotic catastrophe (Fig. 3E-F). As Lzts1 seems to be an important actor in the molecular mechanism of docetaxel resistance, the expression of Lzts1 in human prostate tumors was investigated. Our preliminary immunohistochemical study based on a small cohort does not show a correlation between Lzts1 expression and docetaxel-response but the heterogeneity in Lzts1 staining in prostate tumors suggests that it might be a biomarker. A larger number of patients should be included in such a study to obtain clear evidence about whether Lzts1 is able to predict docetaxel-resistance.

Lzts1 has been shown to function, at least in part, as a mitotic regulator. Here, we reported for the first time that Lzts1 depletion can confer docetaxel-resistance by regulation of two cell cycle actors Chk1 and Cdc25C. The depletion of LZTS1 reduces the expression of Chk1 and Cdc25C. The exact molecular mechanism of how Lzts1, Chk1 and Cdc25C interact with each other is not fully understood and needs to be further investigated. Consistently with our results, it was recently reported that Chk1 is required to sustain mitotic arrest during treatment with taxol, and that Chk1-deficient cells exhibit

increased resistance to taxol (32). Cdc25C belongs to a family of three conserved dual specificity phosphatases that regulate cyclin-dependent kinases. While the role of Cdc25A and Cdc25B in cancer is well established, Cdc25C is overexpressed in only few cancers and has mostly been shown to play a role in prostate cancer (33,34). Furthermore, it was shown that MEFs lacking Lzts1 display enhanced mitotic degradation of Cdc25C, impaired Cdk1 activation, accelerated mitotic progression and chromosomal instability (15). In this study, we showed that the inhibition of Cdc25c by a pharmacological inhibitor had a strong cytotoxic effect on docetaxel-resistant cells which was not observed in docetaxel-sensitive counterparts, strongly suggesting that Cdc25C might be a therapeutic target to overcome docetaxel resistance.

Finally, in this study, we show that Lzts1 could be a docetaxel-resistance biomarker and Cdc25C could be an efficient target to treat tumors with docetaxel-resistance. The efficiency of therapeutic strategies combining docetaxel and Cdc25C inhibitory agents needs to be further investigated.

ACKNOWLEDMENTS

NAN was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Mutuelle Bleue. This work was supported by PAIR prostate grant n° 2010-1-PRO-03 from the National Institute for Cancer (INCA), ARC and the Ligue contre le Cancer. We gratefully thank Catherine Richon for her technical help in microarray study, Patrick Saulnier for his help and advices in the determination of LZTS1 gene methylation and Maya Jeitany for immunofluorescence study of centrosomes.

REFERENCES

1. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. N. Engl. J. Med. 2004 oct 7;351(15):1513-1520.
2. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N. Engl. J. Med. 2004 oct 7;351(15):1502-1512.
3. Mackler NJ, Pienta KJ. Drug insight: Use of docetaxel in prostate and urothelial cancers. Nat Clin Pract Urol. 2005 févr;2(2):92-100; quiz 1 p following 112.
4. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. Annu. Rev. Med. 2002;53:615-627.
5. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. Biochim. Biophys. Acta. 2008 avr;1785(2):96-132.
6. Desarnaud F, Geck P, Parkin C, Carpinito G, Makarovskiy AN. Gene expression profiling of the androgen independent prostate cancer cells demonstrates complex mechanisms mediating resistance to docetaxel. Cancer Biol. Ther. 2011 janv 15;11(2):204-212.
7. Chauchereau A, Al Nakouzi N, Gaudin C, Le Moulec S, Compagno D, Auger N, et al. Stemness markers characterize IGR-CaP1, a new cell line derived from primary epithelial prostate cancer. Exp. Cell Res. 2011 févr 1;317(3):262-275.
8. Cabeza-Arvelaiz Y, Sepulveda JL, Lebovitz RM, Thompson TC, Chinault AC. Functional identification of LZTS1 as a candidate prostate tumor suppressor gene on human chromosome 8p22. Oncogene. 2001 juill 12;20(31):4169-4179.
9. Chen L, Zhu Z, Sun X, Dong X-Y, Wei J, Gu F, et al. Down-regulation of tumor suppressor gene FEZ1/LZTS1 in breast carcinoma involves promoter methylation and associates with metastasis. Breast Cancer Res. Treat. 2009 août;116(3):471-478.
10. Nonaka D, Fabbri A, Roz L, Mariani L, Vecchione A, Moore GW, et al. Reduced FEZ1/LZTS1 expression and outcome prediction in lung cancer. Cancer Res. 2005 févr 15;65(4):1207-1212.
11. Vecchione A, Ishii H, Shiao YH, Trapasso F, Rugge M, Tamburrino JF, et al. Fez1/lzts1 alterations in gastric carcinoma. Clin. Cancer Res. 2001 juin;7(6):1546-1552.
12. Ishii H, Baffa R, Numata SI, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, et al. The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999 mars 30;96(7):3928-3933.
13. Onken MD, Worley LA, Harbour JW. A metastasis modifier locus on human chromosome 8p in uveal melanoma identified by integrative genomic analysis. Clin. Cancer Res. 2008 juin 15;14(12):3737-3745.
14. Vecchione A, Ishii H, Baldassarre G, Bassi P, Trapasso F, Alder H, et al. FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells. Am. J. Pathol. 2002 avr;160(4):1345-1352.
15. Vecchione A, Baldassarre G, Ishii H, Nicoloso MS, Belletti B, Petrocca F, et al. Fez1/Lzts1 absence impairs Cdk1/Cdc25C interaction during mitosis and predisposes mice to cancer development. Cancer Cell. 2007 mars;11(3):275-289.

16. Gottschalk PG, Dunn JR. The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. Anal. Biochem. 2005 août 1;343(1):54-65.

17. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell. 2010 juill 13;18(1):11-22.

18. Han S, Park K, Shin E, Kim H-J, Kim JY, Kim JY, et al. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. Oncol. Rep. 2010 juill;24(1):121-128.

19. Vecchione A, Croce CM, Baldassarre G. Fez1/Lzts1 a new mitotic regulator implicated in cancer development. Cell Div. 2007;2:24.

20. Zhou B-BS, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. Nat. Rev. Cancer. 2004 mars;4(3):216-225.

21. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. Science. 1997 sept 5;277(5331):1501-1505.

22. Chao J-I, Kuo P-C, Hsu T-S. Down-regulation of survivin in nitric oxide-induced cell growth inhibition and apoptosis of the human lung carcinoma cells. J. Biol. Chem. 2004 mai 7;279(19):20267-20276.

23. Han Y, Shen H, Carr BI, Wipf P, Lazo JS, Pan S-shu. NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1-dependent and -independent cytotoxicity of potent quinone Cdc25 phosphatase inhibitors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004 avr;309(1):64-70.

24. Ferlini C, Distefano M, Pignatelli F, Lin S, Riva A, Bombardelli E, et al. Antitumour activity of novel taxanes that act at the same time as cytotoxic agents and P-glycoprotein inhibitors. Br. J. Cancer. 2000 déc;83(12):1762-1768.

25. Vredenburg MR, Ojima I, Veith J, Pera P, Kee K, Cabral F, et al. Effects of orally active taxanes on P-glycoprotein modulation and colon and breast carcinoma drug resistance. J. Natl. Cancer Inst. 2001 août 15;93(16):1234-1245.

26. Moxley KM, McMeekin DS. Endometrial carcinoma: a review of chemotherapy, drug resistance, and the search for new agents. Oncologist. 2010;15(10):1026-1033.

27. Makarovskiy AN, Siryaporn E, Hixson DC, Akerley W. Survival of docetaxel-resistant prostate cancer cells in vitro depends on phenotype alterations and continuity of drug exposure. Cell. Mol. Life Sci. 2002 juill;59(7):1198-1211.

28. Takeda M, Mizokami A, Mamiya K, Li YQ, Zhang J, Keller ET, et al. The establishment of two paclitaxel-resistant prostate cancer cell lines and the mechanisms of paclitaxel resistance with two cell lines. Prostate. 2007 juin 15;67(9):955-967.

29. Hao J, Chen H, Madigan MC, Cozzi PJ, Beretov J, Xiao W, et al. Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDR1 and monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression. Br. J. Cancer. 2010 sept 28;103(7):1008-1018.

30. Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. Curr Drug Targets. 2006 juill;7(7):861-879.

31. Ishii H, Vecchione A, Murakumo Y, Baldassarre G, Numata S, Trapasso F, et al. FEZ1/LZTS1 gene at 8p22 suppresses cancer cell growth and regulates mitosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001 août 28;98(18):10374-10379.

32. Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC, et al. Chk1 is required for spindle checkpoint function. Dev. Cell. 2007 févr;12(2):247-260.

33. Ozen M, Ittmann M. Increased expression and activity of CDC25C phosphatase and an alternatively spliced variant in prostate cancer. Clin. Cancer Res. 2005 juill 1;11(13):4701-4706.

34. Lavecchia A, Di Giovanni C, Novellino E. Inhibitors of Cdc25 phosphatases as anticancer agents: a patent review. Expert Opin Ther Pat. 2010 mars;20(3):405-425.

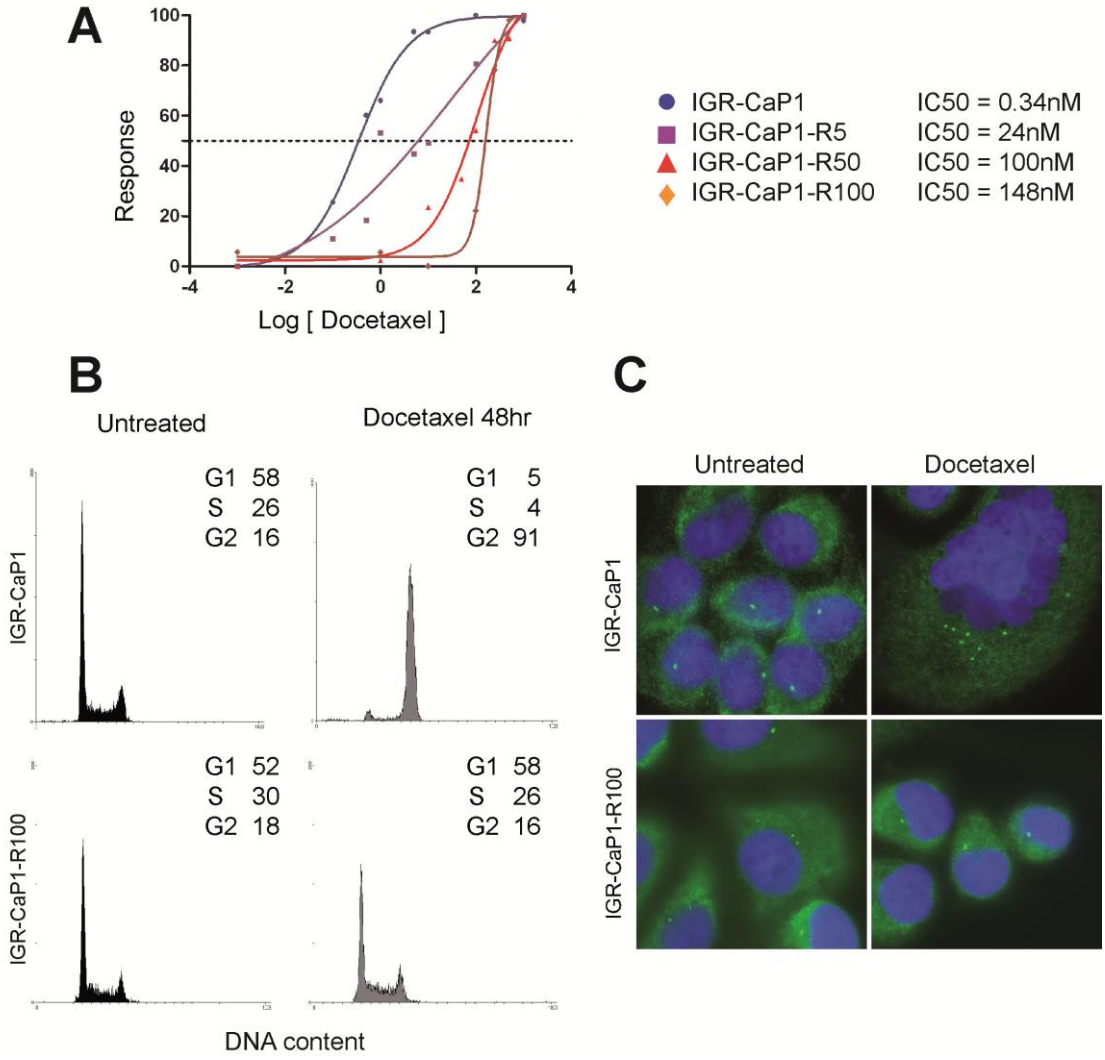


Figure 1: Establishment of docetaxel-resistant cell lines
A: Parental and resistant IGR-CaP1 cell lines were exposed to increasing concentration of docetaxel for 48h and cell survival was determined as described in Material and Methods. The dose-response curves showed the difference in relative resistance to docetaxel in drug-resistance IGR-CaP1-R5 (■) (IC_{50}=24nM), IGR-CaP1-R50 (▲) (IC_{50}=100nM) and IGR-CaP1-R100 cells (♦) (IC_{50}=148nM) compared to parental IGR-CaP1 cells (●) (IC_{50}=0.34nM). **B:** Representative cell cycle distributions of parental IGR-CaP1 and drug-resistant IGR-CaP1-R100 cells in the absence (untreated) or presence of 100nM of Docetaxel for 48h. X-axis: propidium iodide nucleic acid stain (DNA content); Y-axis: cell number per channel (counts). The percentage of cells in the different stages of the cycle is indicated. **C:** The immunofluorescence for γ-tubulin (green) showed the centrosomes (dot). Nuclei were counterstained with Dapi (blue). In the presence of docetaxel, the parental IGR-CaP1 cells showed mutinucleation and multiple centrosome. In contrast, drug-resistant IGR-CaP1-R100 cells exhibited a normal nucleus and a pair of centrosomes.

Seq ID	Name	Sequence description	Accession #	Location	F Change
Chromosome 8					
1204228	LZTS1	leucine zipper, putative tumor suppressor 1	NM_021020	chr 8p22	-6.0
1225255	LOC100293208	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein		chr 8p21.3	-6.6
1234677	PNOC	prepronociceptin	NM_006228	chr 8p21	-6.1
1210304	PURG	purine-rich element binding protein G	NM_013357	chr 8p11	17.5
1211111	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	NM_003012	chr 8p11.21	6.0
1218589	PLAT	plasminogen activator, tissue	NM_000930	chr 8p12	-14.0
Chromosome 7					
1235563	THSD7A	thrombospondin, type I, domain containing 7A	NM_015204	7p21.3	-13.6
1219599	AHR	aryl hydrocarbon receptor	NM_001621	7p21.1	6.8
1229184	ITGB8	integrin, beta 8	NM_002214	7p21.1	8.0
1221692	AQP1	aquaporin 1	NM_198098	7p14.3	7.1
1220124	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_000598	7p12.3	7.1
1198572	SUN3	Sad1 and UNC84 domain containing 1	NM_001030019	7p12.3	-5.8
1205171	RUNDC3B	RUN domain containing, isoform abc	NM_138290	7q21.12	33.0
1232941	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	NM_006528	7q21.3	34.6
1205224	GNG11	guanine nucleotide binding protein	NM_004126	7q21.3	7.7
1209185	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	NM_000927	7q21.11	15.8
1216607	ADAM22	ADAM metallopeptidase domain 22	NP_068369	7q21.12	5.2

Table 1: List of genes belonging to the 112 genes signature located of chromosome 7 and 8p

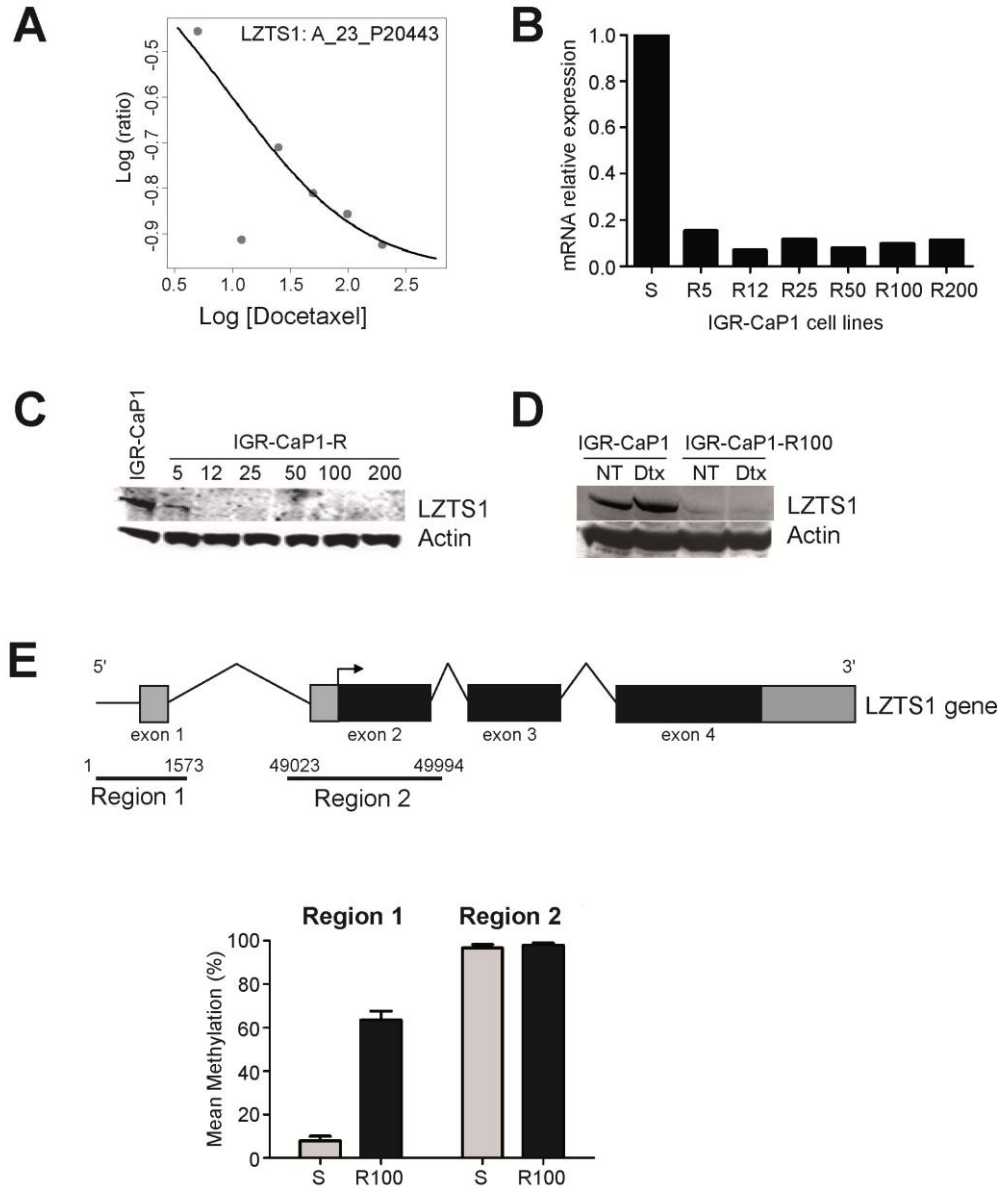


Figure 2: Inhibition of LZTS1 gene expression in docetaxel-resistant IGR-CaP1-R cells
A: Determination of LZTS1 gene expression in the microarray analysis. A dose-dependent inhibition of LZTS1 gene expression is observed with a 5P-logistic regression. **B:** Real-time quantitative RT-PCR confirmed microarray data and showed a high decrease of LZTS1 gene expression in the resistant cell lines. **C:** Whole cell extracts of parental and of the drug-resistant cells were subjected to immunoblotting with antibodies which specifically recognize LZTS1 or actin (monitored as a loading control). **D:** Immunoblot was realized as in C, after a 48h treatment of cells with 100nM of docetaxel (Dtx) or without treatment (NT). **E:** Representative scheme of the larger form of the LZTS1 gene (LZTS1-001, total length 58999 nucleotides, transcript ID: ENST00000381569). The two regions of interest were indicated. The region 1 encompasses the sequence encoding exon 1 (601-824), the region 2 encompasses the sequence encoding the exon 2 (49284-49727). The comparison of the mean methylation identified at 20 CpGs in region 1 and at 32 CpGs in region 2 was showed in parental IGR-CaP1 cells (S) and in docetaxel-resistant IGR-CaP1-R100 (R100) cells.

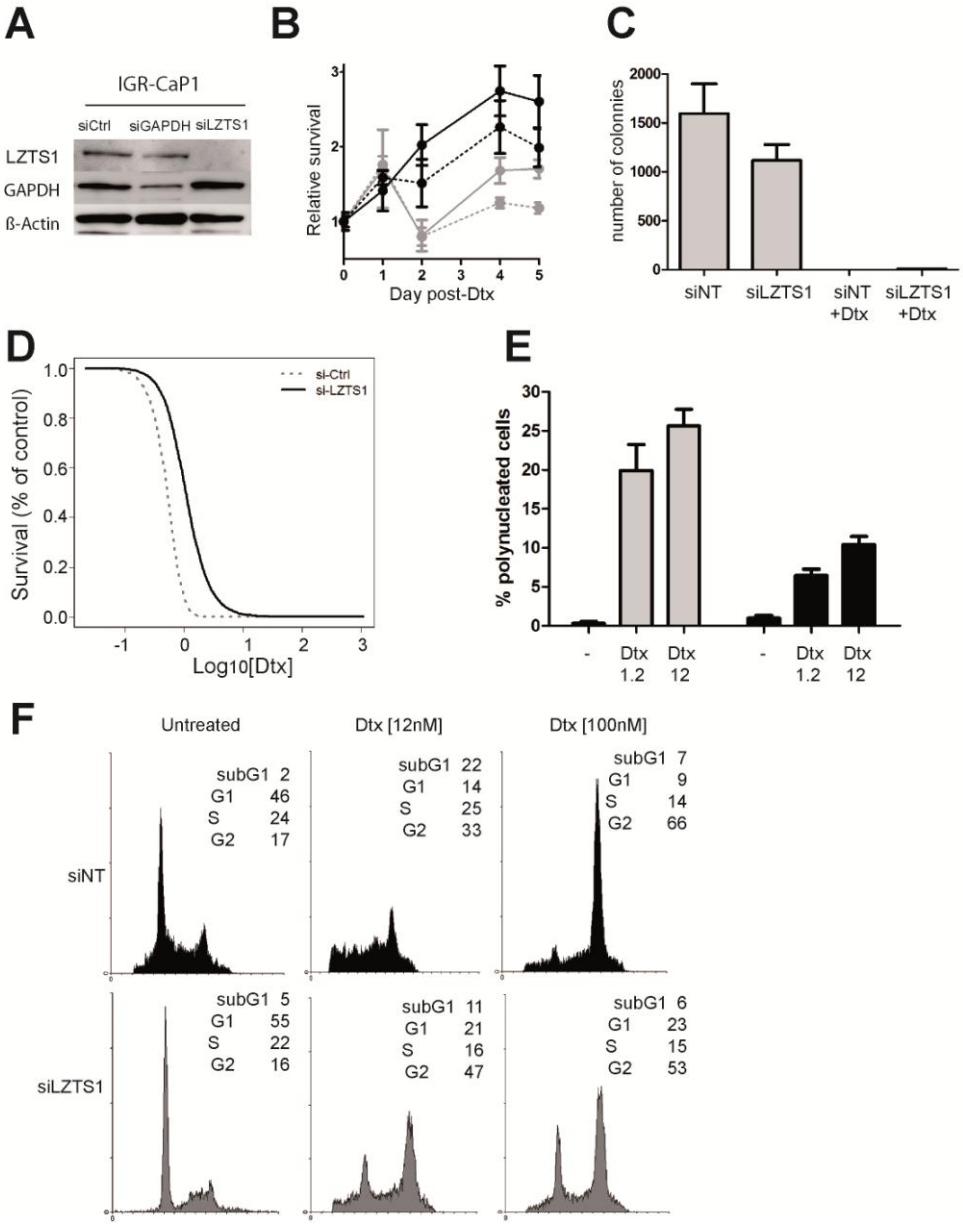


Figure 3: LZTS1 down-regulation enhances the drug resistance of IGR-CaP1 cells to docetaxel
A: Effective suppression of LZTS1 expression in parental IGR-CaP1 cells after transfection with small interfering RNA targeting LZTS1 (siLZTS1) for 48h. Cells transfected with either a non-targeted siRNA (siCtrl) or a siRNA targeting GAPDH (siGAPDH) were used as control. Western blot analysis with specific antibodies was performed to detect the protein levels of LZTS1, GAPDH or β-actin (monitored as a loading control). These data are representative of three separate experiments. **B:** Growth curves comparing the LZTS1-depleted cells (siLZTS1, black line) with the parental IGR-CaP1 cells (siNT, grey line). Docetaxel at 1.2nM was added 24h after siRNA transfection (hatched lines). **C:** Depletion of LZTS1 protein with siLZTS1 significantly reduced the number of IGR-CaP1 cell colonies. A few number of colonies survived after docetaxel treatment. **D:** The dose-response curves showed a significant difference in relative resistance to docetaxel in LZTS1-depleted IGR-CaP1 cells (siLZTS1, black line) (IC_{50}=1.1nM, range [0.78-1.5]) compared to parental IGR-CaP1 cells (siNT, grey line) (IC_{50}=0.53nM, range [0.45-0.61]). These data are representative of data obtained with different siLZTS1. **E:** Determination of the number of polynucleated cells in LZTS1-depleted IGR-CaP1 cells (siLZTS1, black color) or not (siNT, grey color), in absence (untreated) or in the presence of 1.2 and 12nM docetaxel. **F:** Representative cell cycle distributions of LZTS1-depleted IGR-CaP1 cells (siLZTS1, grey color) or not (siNT, black color), in absence (untreated) or in the presence of 12nM and 100nM of docetaxel. X-axis: propidium iodide nucleic acid stain (DNA content); Y-axis: cell number per channel (counts). The percentage of cells in the different stages of the cycle was indicated.

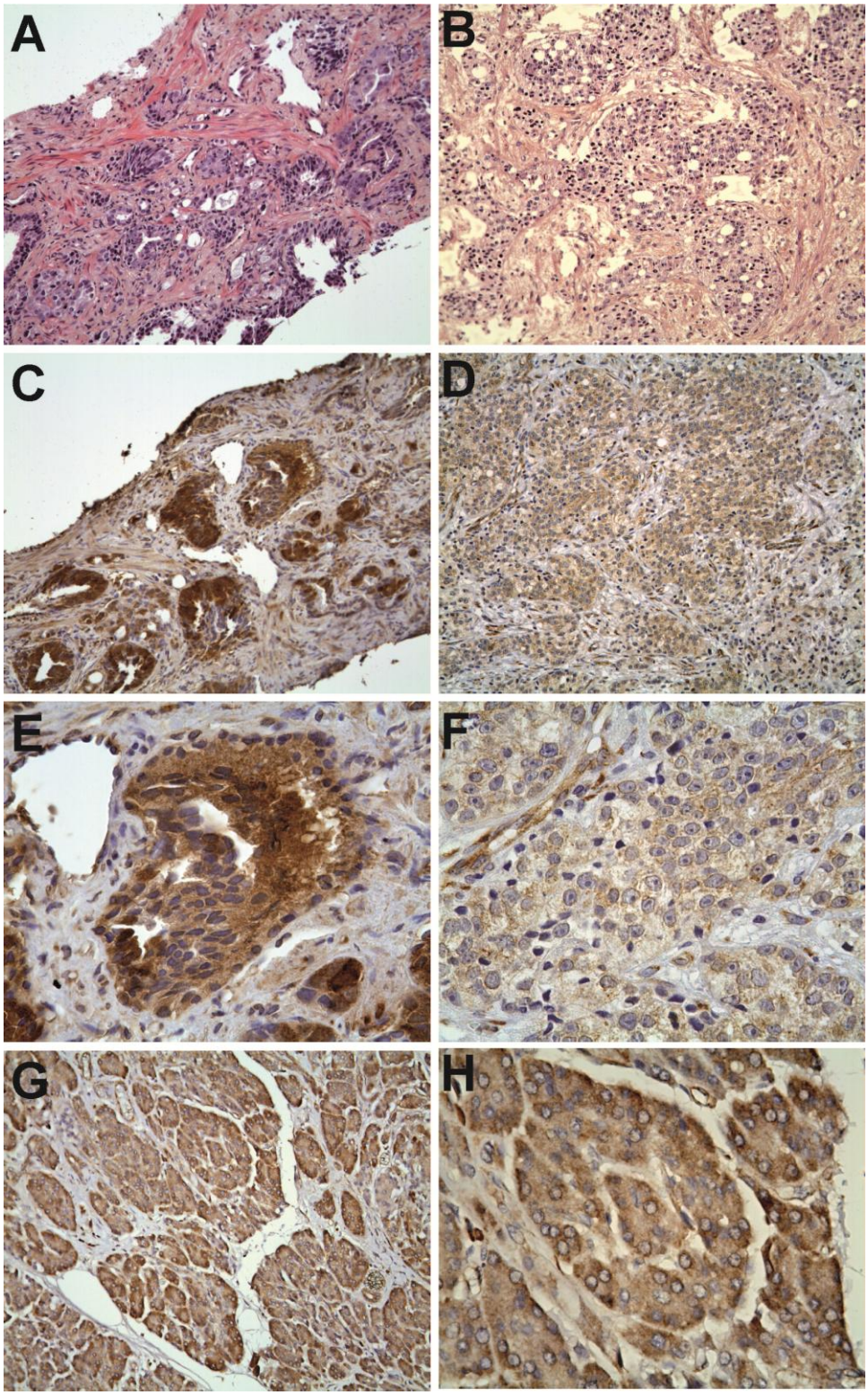


Figure 4: Heterogeneity in LZTS1 protein expression in human tumors from docetaxel-treated patients with metastatic prostate cancer

A and **B:** HES staining of biopsy sections confirmed the presence of prostate adenocarcinoma in diagnosis biopsies from patients bearing metastatic prostate cancer treated with docetaxel therapy. Immunohistochemical staining showed high expression (**C** and **E**) or absence of expression (**D** and **F**) of LZTS1. The staining of LZTS1 in normal exocrine pancreas showed a positive uniform intracellular staining and was used as positive control (**G-H**). **A-D, G**: Magnification 20x, **E-F**: 100x, **H**: x60.

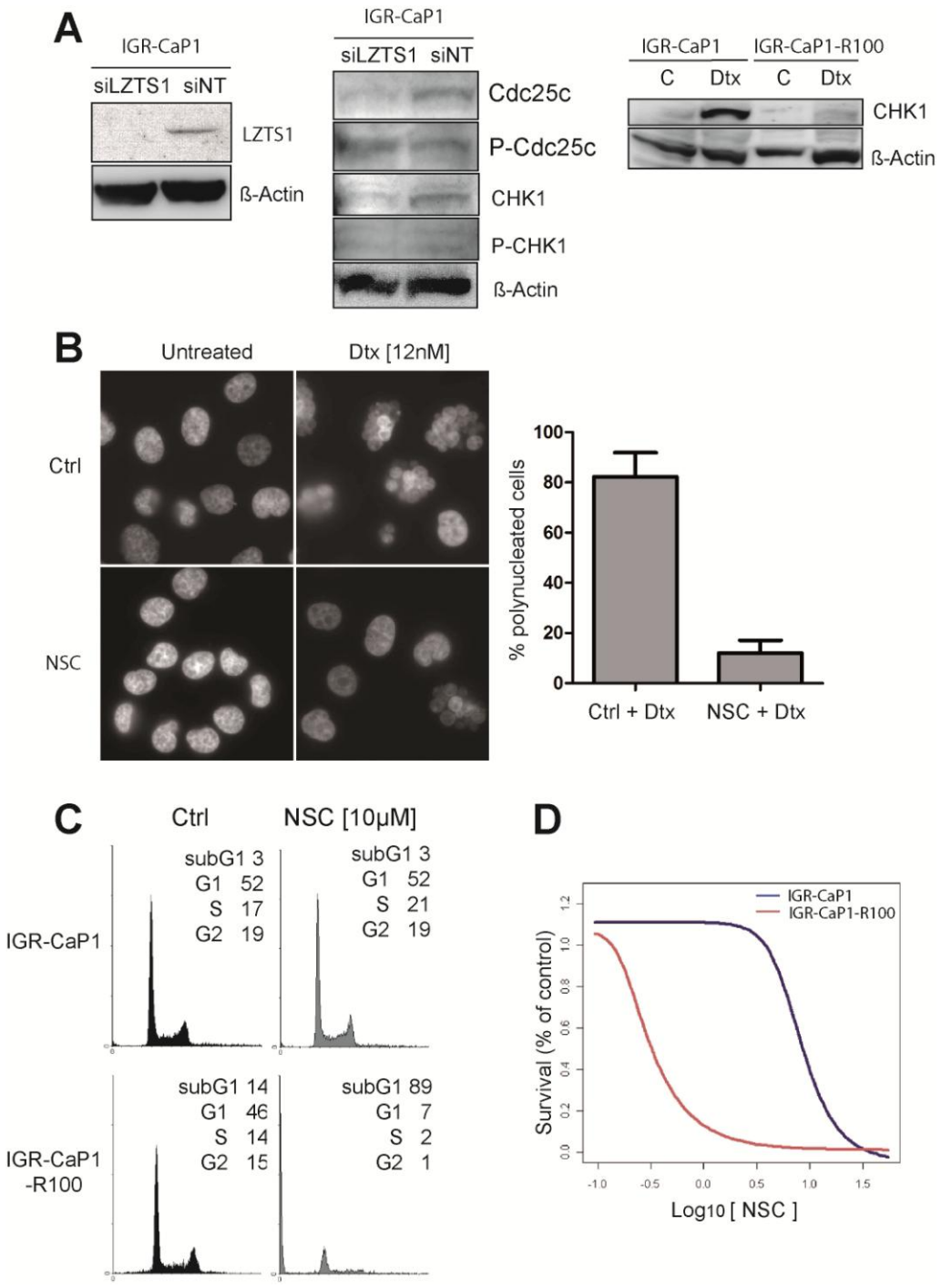
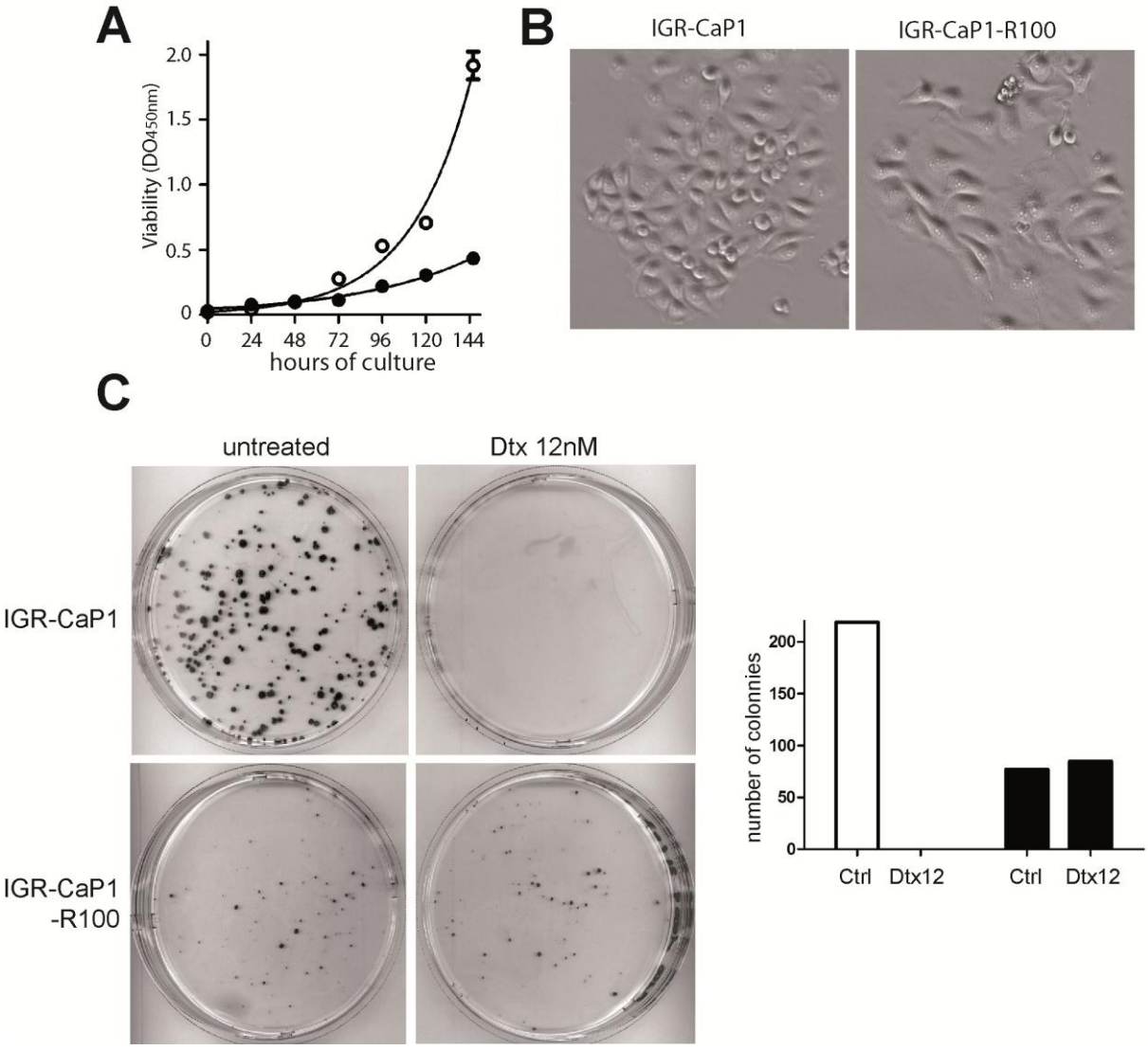


Figure 5: Implication of the cell cycle partners of LZTS1 in the docetaxel-resistance mechanism
A: Whole cell extracts of the LZTS1-depleted IGR-CaP1 cells (siLZTS1) or parental cells (siNT) and IGR-CaP1-R100 were subjected to immunoblotting with antibodies that specifically recognize cell cycle partners Cdc25c and CHK1 and their respective phosphorylated forms. Actin was monitored as a loading control. **B:** The immunofluorescence for nuclei (Dapi, blue) showed the polynucleation in the presence of 12nM Docetaxel, in IGR-CaP1 cells treated for 1 hour with 10µM Cdc25c inhibitor NSC 663284 or mock cells (Ctrl). The % of polynucleated cells was determined in three experiments (mean ± SD, n>150 cells). **C:** Representative cell cycle distributions of IGR-CaP1 and IGR-CaP1-R100 cells in absence (Ctrl, black) or in the presence of 10µM NSC inhibitor. X-axis DNA content; Y-axis: cell counts. **D:** The dose-response curves showed a very significant difference in relative resistance to NSC inhibitor in resistant IGR-CaP1-R100 cells (red line) (IC_{50}=1.39µM, range [0.45-4.3]) compared to parental IGR-CaP1 cells (blue line) (IC_{50}=10.84µM, range [9.6-12]).



Supplementary Figure 1: Cell-growth characteristics of docetaxel-resistant cells
A: The growth rate of IGR-CaP1 (○) and of docetaxel-resistant IGR-CaP1-R100 cells (●) was determined as described in Materials and Methods. The doubling-time was determined as 23h for the parental IGR-CaP1 cells and 45h for the resistant IGR-CaP1-R100 cells **B:** Photomicrograph showing morphologic comparison between IGR-CaP1 and IGR-CaP1-R100 cells. Magnification 100x. **C:** The cell survival assay was performed after 2 weeks of culture in presence or in absence of 12nM of Docetaxel. The number of colonies was determined.

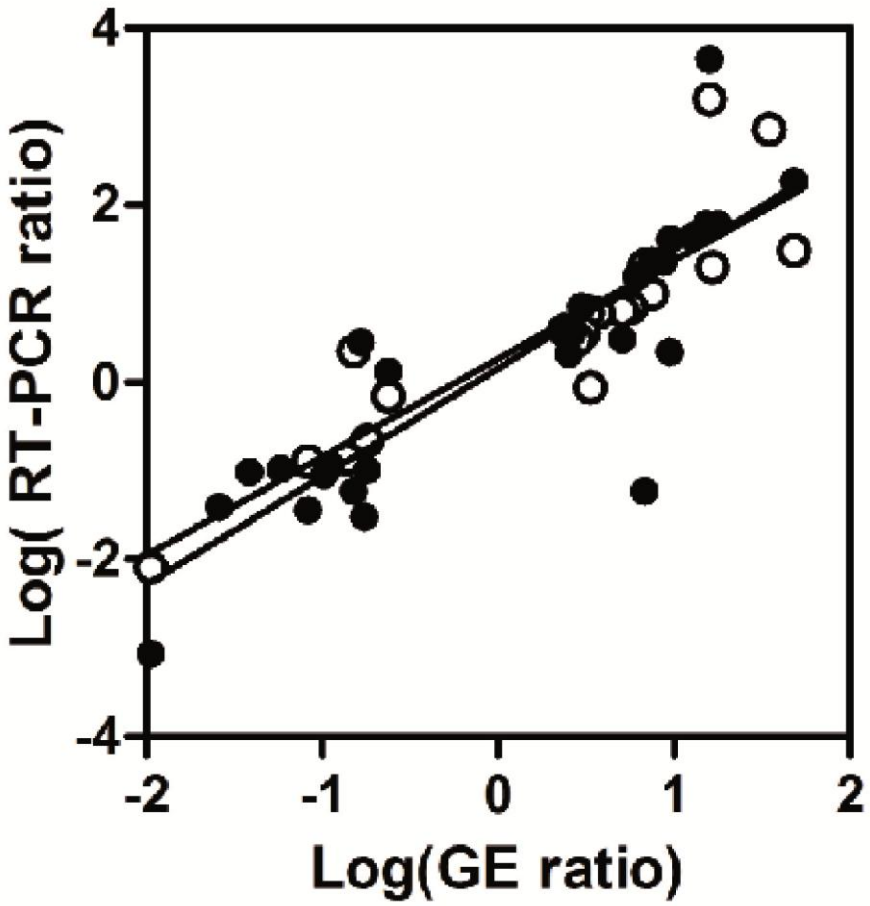
Seq ID	Name	Sequence Description	Accession #	FC Mean
1232941	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	NM_006528	48,2
1205171	RUNDC3B	RUN domain containing 3B	NM_138290;NM_001134405;NM_001134406	34,7
1202663	FAM110C	ens|Protein FAM110C ENST00000327669]	-	19,4
1210304	PURG	purine-rich element binding protein G	NM_013357	17,8
1196776	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	NM_001165;NM_182962	16,6
1209185	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B	NM_000927	15,8
1207904	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	NM_002089	15,2
1229388	TNF	tumor necrosis factor	NM_000594	12,6
1220649	MCTP1	multiple C2 domains, transmembrane 1	NM_024717;NM_001002796	10,8
1219086	C2orf55	chromosome 2 open reading frame 55	NM_207362	10,3
1233751	CDH16	cadherin 16, KSP-cadherin	NM_004062	10,2
1217707	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	NM_006187	9,5
1207907	FAM111A	family with sequence similarity 111	NM_022074;NM_001142520;NM_001142519;NM_001142521	9,4
1209710	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1	NM_001353;NM_001354;NM_205845	8,7
1205224	GNG11	guanine nucleotide binding protein, gamma 11	NM_004126	8,7
1198215	GAS1	growth arrest-specific 1	NM_002048	8,7
1225148	UBXN10	UBX domain protein 10	NM_152376	8,6
1229184	ITGB8	integrin, beta 8	NM_002214	8,3
1200118	A_24_P691826	Unknown	-	8,2
1219599	AHR	aryl hydrocarbon receptor	NM_001621	7,5
1220124	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	NM_001013398;NM_000598	7,4
1221692	AQP1	aquaporin 1	NM_198098	7,2
1215481	FHOD3	formin homology 2 domain containing 3	NM_025135	7,1
1229825	PLEKHH2	pleckstrin homology dom-containing family H m2	NM_172069	7,1
1205239	MID1	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	NM_033290;NM_000381;NM_001098624	7,0
1211518	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin t1 motif	NM_006988	6,9
1211111	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	NM_003012	6,8
1232721	KRT7	keratin 7	NM_005556	6,5
1206092	DUSP23	dual specificity phosphatase 23	NM_017823	6,5
1226162	IL15	interleukin 15	NM_172174;NM_000585	6,1
1209657	CACNG6	calcium channel, voltage-dep, gamma subunit 6	NM_145814;NM_145815;NM_031897	6,1
1196794	C9orf150	chromosome 9 open reading frame 150	NM_203403	6,1
1199725	VCX	variable charge, X-linked	NM_013452	6,0
1207370	C1orf88	chromosome 1 open reading frame 88	NM_181643	6,0
1216607	ADAM22	ADAM metallopeptidase domain 22	-	5,9
1219117	SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_003064	5,8
1230421	TMEFF1	tomoregulin-1	NM_003692	5,6
1199190	GPC3	glypican 3	NM_004484;NM_001164617;NM_001164618;NM_001164619	5,6
1224502	MANEAL	mannosidase, endo-alpha-like	NM_001031740;NM_001113482;NM_152496	5,6
1205177	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, m1	NM_007350	5,6
1199006	FBXL16	F-box and leucine-rich repeat protein 16	NM_153350	5,6
1203558	A_32_P77252	Unknown	-	5,5
1210822	RFTN1	raftlin, lipid raft linker 1	NM_015150	5,1
1199656	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	NM_000076;NM_001122630;NM_001122631	5,1
1232761	RHOU	ras homolog gene family, member U	NM_021205	5,0
1204622	VCAN	versican	NM_004385;NM_001164097;NM_001164098;NM_001126336	5,0

Supplementary Table I: Signature of 46 genes highly up-regulated in docetaxel-resistant cells
The list corresponds to the genes which gene expression was highly up-regulated in docetaxel-resistant cell lines (Fold-Change > 5, P-value < 10^{-10}).

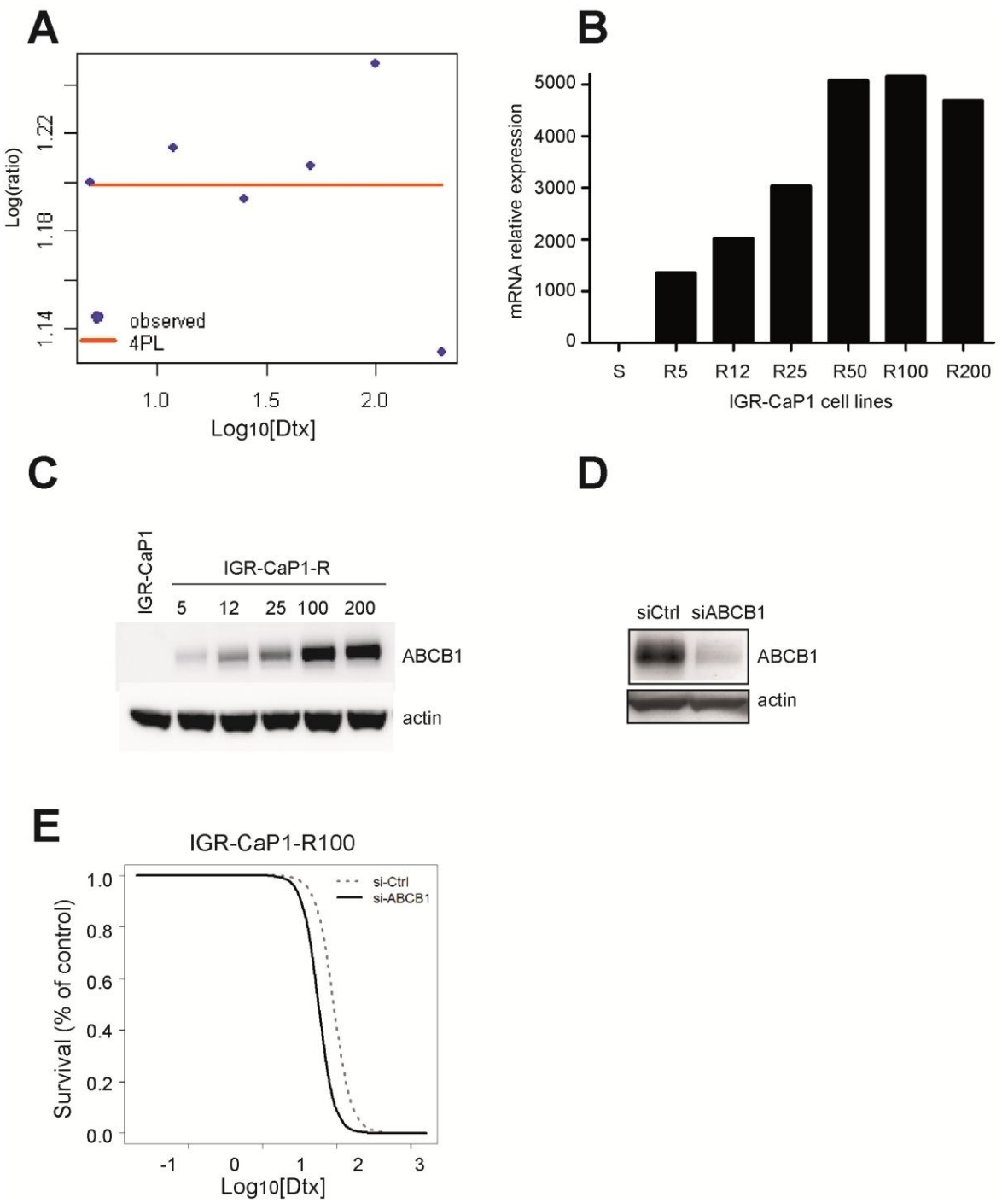
Seq ID	Name	Sequence Description	Accession #	FC Mean
1203986	C1QL1	complement component 1, q subcomponent-like 1	NM_006688	-5,1
1214006	AUTS2	autism susceptibility candidate 2	NM_015570;NM_001127231	-5,1
1223791	FAM179A	family with sequence similarity 179, member A	NM_199280	-5,2
1210684	DUSP13	dual specificity phosphatase 13	NM_001007271;NM_001007273;NM_001007272;NM_016364	-5,2
1209204	LNX1	ligand of numb-protein X 1	NM_032622;NM_001126328	-5,4
1223263	TTN	titin	NM_133378;NM_133437;NM_133432;NM_003319	-5,5
1235427	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	NM_001430	-5,5
1200929	C12orf59	chromosome 12 open reading frame 59	NM_153022	-5,6
1219276	FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1	NM_005130	-5,6
1207208	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	NM_144497;NM_005100	-5,6
1197977	CCDC141	gb|Homo sapiens cDNA FLJ39502 fis	-	-5,6
1226559	MOXD1	monooxygenase, DBH-like 1	NM_015529	-6,0
1214168	A_23_P72747	Unknown	-	-6,0
1232725	DHRS3	dehydrogenase/reductase member 3	NM_004753	-6,1
1198572	SUNC1	Sad1 and UNC84 domain containing 1	NM_001030019;NM_152782	-6,2
1214509	SLC3A1	solute carrier family 3, member 1	NM_000341	-6,2
1228836	SYTL3	synaptotagmin-like 3	NM_001009991	-6,2
1204228	LZTS1	leucine zipper, putative tumor suppressor 1	NM_021020	-6,4
1206922	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	NM_145791;NM_145764;NM_145792;NM_020300	-6,4
1208428	MSX2	msh homeobox 2	NM_002449	-6,4
1225255	LOC100293208	ref|PREDICTED: hypothetical protein	XM_002346086;XM_002342826;XM_002346985	-6,6
1205053	LIN7A	lin-7 homolog A	NM_004664	-6,6
1209275	LINGO2	leucine rich repeat and Ig domain containing 2	NM_152570	-6,6
1222753	MEIS2	Meis homeobox 2	NM_170677;NM_170674;NM_170675;NM_170676	-6,8
1226527	MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog	NM_005375;NM_001161656;NM_001161658;NM_001161660	-7,3
1234677	PNOC	prepronociceptin	NM_006228	-7,3
1212807	FZD8	frizzled homolog 8	NM_031866	-7,4
1195766	CPM	carboxypeptidase M	NM_001874;NM_198320;NM_001005502	-7,7
1223948	EBF3	early B-cell factor 3	NM_001005463	-7,8
1216372	PROS1	protein S	NM_000313	-7,8
1217390	SALL1	sal-like 1	NM_002968;NM_001127892	-8,1
1206175	PLAC8	placenta-specific 8	NM_016619;NM_001130716	-8,3
1223291	DCLK1	doublecortin-like kinase 1	NM_004734	-8,4
1234271	ZAR1	zygote arrest 1	NM_175619	-8,8
1220770	OLR1	oxidized low density lipoprotein	NM_002543	-9,2
1202453	GAL	galanin prepropeptide	NM_015973	-9,2
1206912	LHFP	lipoma HMGIC fusion partner	NM_005780	-10,7
1215728	A_32_P181131	Unknown -		-10,8
1220846	TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1	NM_014220	-11,2
1198048	GJC1	gap junction protein, gamma 1	NM_005497;NM_001080383	-11,4
1235542	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	NM_000346	-11,5
1225404	SLC12A3	solute carrier family 12, member 3	NM_000339;NM_001126107;NM_001126108	-11,6
1224501	AK3L1	adenylate kinase 3-like 1	NM_001005353;NM_203464;NM_013410	-11,8
1197643	SHISA9	shisa homolog 9 (Xenopus laevis)	NM_001145205	-13,2
1227142	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	NM_000610;NM_001001389;NM_001001390;NM_001001391	-13,4
1235563	THSD7A	thrombospondin, type I, domain containing 7A	NM_015204	-13,7
1219154	CGNL1	cingulin-like 1	NM_032866	-14,0
1200386	GALNT14	UDP-N-acetyl-alpha-D- GalNAc-T14	NM_024572	-14,7
1228142	SLC16A10	solute carrier family 16, member 10	NM_018593	-14,8
1211279	SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	NM_006714	-15,5
1220128	SLC10A4	solute carrier family 10, member 4	NM_152679	-17,1
1198712	SLC39A8	solute carrier family 39, member 8	NM_022154;NM_001135146;NM_001135148	-17,8
1218589	PLAT	plasminogen activator, tissue	NM_000930;NM_033011	-18,4
1208524	ENST00000440678	ens|Relaxin receptor 1	-	-18,7
1218470	SLC1A3	solute carrier family 1, member 3	NM_004172;NM_001166695	-20,2
1225909	SMAD9	ens|Mothers against decapentaplegic homolog 9	-	-21,6
1224378	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	NM_001008540;NM_003467	-26,6
1216450	PDE1A	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	NM_001003683	-26,6
1210346	KANK4	KN motif and ankyrin repeat domains 4	NM_181712	-26,8
1211735	PLCXD3	PI-PLC X domain-containing protein 3	NM_001005473	-27,6
1202341	LPAR3	lysophosphatidic acid receptor 3	NM_012152	-27,6
1215939	SLC16A12	solute carrier family 16, member 12	NM_213606	-27,6
1223600	TMEM47	transmembrane protein 47	NM_031442	-31,7
1199588	ITGA2	integrin, alpha 2	NM_002203	-39,9
1198058	FAM198B	family with sequence similarity 198, member B	NM_016613;NM_001031700;NM_001128424	-41,2
1198589	SHISA3	shisa homolog 3 (Xenopus laevis)	NM_001080505	-321,2

Supplementary Table II: Signature of 66 genes highly down-regulated in docetaxel-resistant cells

The list corresponds to the genes which gene expression was highly down-regulated in docetaxel-resistant cell lines (Fold-Change > 5, P-value < 10^{-10}).



Supplementary Figure 2: Validation of microarray data by real-time RT-QPCR
A group of 35 genes found in the docetaxel-resistance signature of 116 genes have been studied by quantitative RT-PCR. Result comparison between microarray and RT-PCR data by a spearman test showed a very good correlation in the same samples used for microarray and RT-PCR (training set ○) (rho=0.938) and in a set of independent samples (validation set ●) (rho=0.889).



Supplementary Figure 3: Implication of ABCB1 expression in docetaxel-resistant IGR-CaP1-R cells

A: Determination of ABCB1/Mdr1 gene expression in the microarray analysis. **B:** Real-time quantitative RT-PCR confirmed microarray data and showed a high increase of ABCB1 gene expression in the resistant cell lines. **C:** Whole cells extract of parental and of the drug-resistant IGR-CaP1-R cells were subjected to immunoblotting with antibodies that specifically recognize ABCB1 or actin (monitored as a loading control). **D:** Effective suppression of ABCB1 expression in resistant IGR-CaP1-R100 cells after transfection with siABCB1 for 72h. Cells transfected with a non-targeted siRNA (siNT) was used as control. Western blot analysis with specific antibodies was performed to detect the protein levels of ABCB1. These data are representative of three separate experiments. **E:** The dose-response curves showed the relative resistance to docetaxel in ABCB1-depleted IGR-CaP1-R100 cells (siABCB1, black line) (IC_{50}=54nM, range [47-62]) compared to IGR-CaP1-R100 cells (siCtrl, grey line) (IC_{50}=79nM, range [55-100]).

Region	Position	% Methylation	
		Parental IGR-CaP1 cells	IGR-CaP1-R100 cells
Region 1	115	26	90
	127	20	74
	132	8	54
	138	11	66
	147	2	29
	284	24	60
	1121	0	24
	1136	0	69
	1142	0	49
	1167	3	78
	1249	0	50
	1259	0	80
	1262	0	90
	1296	3	60
	1311	13	75
	1316	5	68
	1363	12	58
	1367	25	90
	1397	1	45
	1440	5	60
Region 2	49150	100	100
	49159	100	100
	49219	97	99
	49254	100	100
	49289	100	100
	49296	100	100
	49338	100	100
	49346	100	99
	49386	94	100
	49409	96	98
	49426	100	100
	49444	97	100
	49472	99	100
	49479	93	100
	49493	100	100
	49523	99	99
	49531	97	98
	49534	100	100
	49567	99	100
	49573	100	99
	49603	100	100
	49640	100	100
	49665	100	100
	49678	50	67
	49716	93	90
	49768	100	100
	49775	94	94
	49802	94	96
	49899	100	100
	49902	100	100

Supplementary Table III: Methylation profile in LZTS1 gene in docetaxel-resistant cells
The positions of the methylated cytosine nucleotides on the LZTS1 gene sequence are indicated. Twenty methylated CpG were found in the region 1 and 32 methylated CpG were found in region 2. The % of methylation has been estimated for each site.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Implication de LZTS1 dans la régulation de CHK1 :

La diminution de l'expression de CHK1 n'affecte pas l'expression de LZTS1 (Figure 24A). En effet, on observe qu'en absence de LZTS1 (siLZTS1), l'expression de CHK1 est équivalente à celle obtenue avec le siNT. De plus, l'extinction des deux protéines ensembles augmente la résistance de la lignée IGR-CaP1 comme on peut le voir au niveau des profils d'IC50. La figure 24B illustre très clairement que la perte simultanée de LZTS1 et CHK1 décale la courbe dose-réponse de façon importante vers la droite, et rend donc la lignée plus résistante à la drogue.

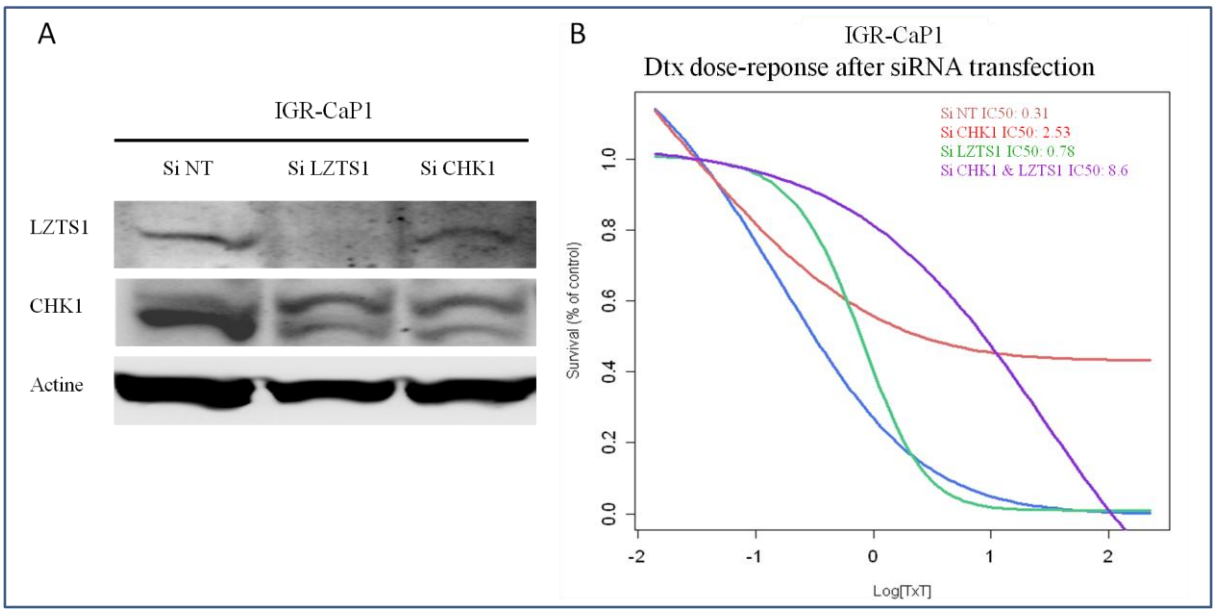


Figure 23 : Implication de CHK1 dans le mécanisme de résistance au Dtx
A- Expression de CHK1 dans les cellules dépletées de LZTS1 ; B- courbes de réponse au Dtx après extinction simultanée de LZTS1 et CHK1.

Validation sur des biopsies humaines :

Du fait des résultats publiés cette année dans le cancer de la prostate sur la β3-tubuline, nous avons choisi de tester en immunohistochimie l'expression de la β3-tubuline, en plus de celle de LZTS1, comme des biomarqueurs potentiels pour prédire la réponse au docetaxel.

Nous avons trouvé dans notre série de biopsies prostatiques que 9/27 (33,3%) sont négatives pour LZTS1, 14/27 (51,8%) sur expriment la β3-tubuline. L'interprétation est cependant difficile pour

certaines biopsies compte tenu de la faible quantité de matériel tumoral. Un test de corrélation a été effectué pour chacun de ces marqueurs afin d'évaluer leur potentiel prédictif sur la réponse au docetaxel (Tableau 12).

Aucun de ces biomarqueurs ne permet de discriminer de manière significative les patients sensibles des patients résistants. Nos résultats ne confirment donc pas les données récentes sur l'implication de la β3-tubuline. D'autre part, les résultats que nous avons obtenus sur LZTS1 ne nous permettent pas de corréler la sous-expression de LZTS1 avec le phénotype résistant. Mais ces résultats préliminaires doivent être interprétés avec prudence compte tenu du petit échantillon de patients étudié.

TUBULINE	Sensible (16)	Résistant (11)
+	62,5% (10)	36,4% (4)
-	37,5% (6)	63,3% (7)
		P=0,25

LZTS1	Sensible (16)	Résistant (11)
+	62,5% (10)	72,7% (8)
-	37,5% (6)	27,3% (3)
		P=0,69

Tableau 12 : Test de corrélation entre les différents biomarqueurs et la réponse au docetaxel.

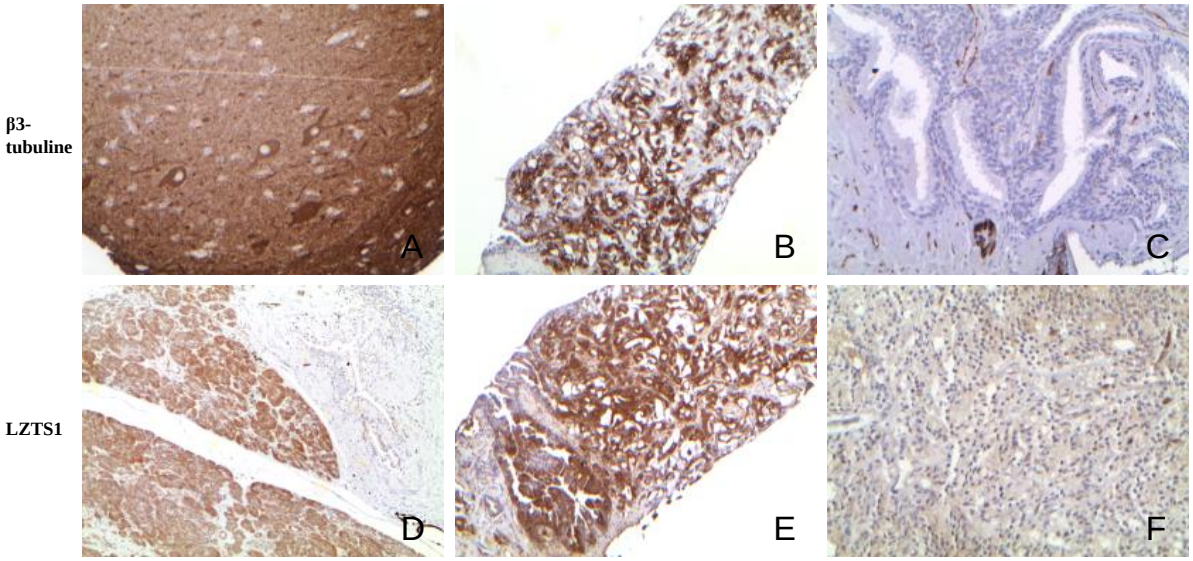


Figure 24 : Immunomarquage des deux biomarqueurs potentiels LZTS1 et β3-tubuline dans les tumeurs de prostate

L'expression cytoplasmique de β3-tubuline dans le tissu cérébral normal est utilisée comme contrôle positif (A). Adénocarcinome prostatique exprimant fortement la β3-tubuline (B) et négatif pour la β3-tubuline (C). Le marquage cytoplasmique de LZTS1 au niveau du pancréas exocrine normal est utilisé comme contrôle positif (D). Cancer de la prostate exprimant fortement LZTS1 (E) et négatif (F)

Nous avons également recherché l'impact pronostique de ces marqueurs en analyse univariée. La sous-expression de LZTS1 ou la surexpression de β3-tubuline ne sont pas associées de manière significative à une moins bonne survie globale. La survie à 5 ans, selon l'expression de LZTS1, n'est pas modifiée, elle est de 25,4 mois pour les négatifs contre 25,8 mois pour les positifs.

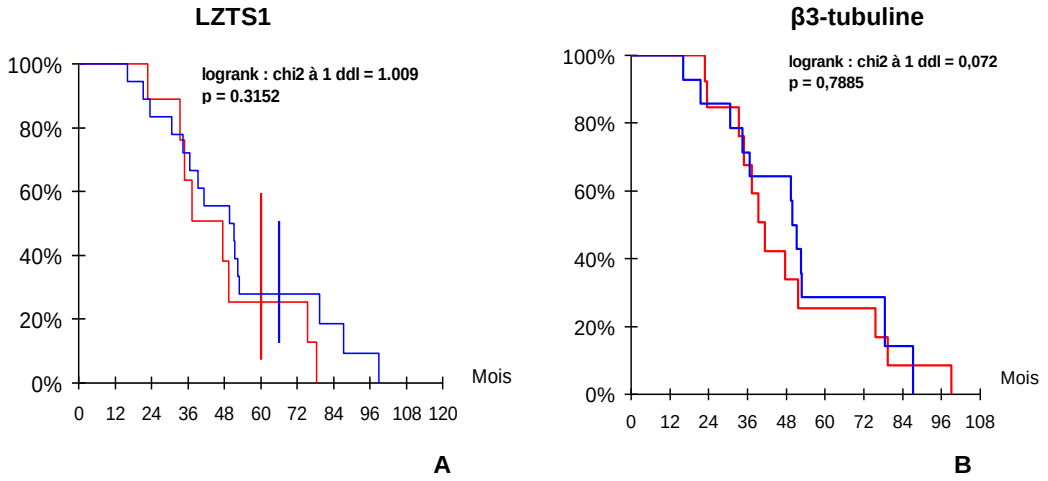


Figure 25 : Courbes de survie globale en fonction de l'expression de LZTS1 ou β3-tubuline
LZTS1 (A), β3-tubuline (B). Les courbes rouges représentent les biopsies négatives et les courbes bleues les biopsies positives

DISCUSSION

La connaissance des mécanismes de résistance aux cytotoxiques est indispensable pour améliorer la prise en charge des patients et développer des outils prédictifs permettant de sélectionner les patients répondeurs et orienter les patients non-répondeurs vers une autre thérapie plus efficace. Dans le cas du cancer de la prostate, il n'existe actuellement aucun biomarqueur prédictif de la réponse au docetaxel. Dans la dernière partie de ce travail de la thèse, nous avons mis au point à partir de la lignée IGR-CaP1 une série de clones résistants au docetaxel. Ces clones constituent un outil unique puisque nous avons obtenu une résistance dose dépendante avec des clones résistants jusqu'à la dose de 1µM de docetaxel. Rappelons que les lignées résistantes décrites dans la littérature survivent seulement à une dose de 10nM de docetaxel. Nous avons également identifié par microarray, à partir des clones IGR-CaP1 résistants, une liste de gènes impliqués dans la résistance au docetaxel que nous avons validées par RT-PCR. Récemment, l'analyse génomique globale par microarray des clones LNCaP et PC3 résistants au docetaxel (0.5, 2.5, 5 et 12nM) nous a permis d'identifier deux autres signatures d'expression génique. En combinant les résultats obtenus dans les trois lignées, nous identifions une signature de 57 gènes. Cette signature n'a été obtenue que récemment et son analyse est en cours.

Parmi les gènes retrouvés dans la signature portant sur la lignée IGR-CaP1 résistante, nous nous sommes focalisés sur LZTS1. Nos données obtenues *in vitro* suggèrent que LZTS1 pourrait jouer un rôle important dans la résistance au docetaxel dans le cancer de la prostate.

Les cellules IGR-CaP1 et R100 possèdent une morphologie semblable, avec des noyaux ronds et homogènes. Cependant, suite à un traitement par docetaxel, et contrairement aux cellules R100, les cellules IGR-CaP1 deviennent polynuclées avant de mourir. En effet, l'apparition des noyaux anormaux correspond à un effet de la drogue et le reflet d'une entrée en catastrophe mitotique et d'un blocage en pro-métaphase secondaire au traitement. La catastrophe mitotique est une mort cellulaire en réponse à une mitose aberrante avec ségrégation chromosomique aberrante. C'est donc une stratégie d'élimination des mitoses anormales. Le check-point G2/M est une étape cruciale du cycle cellulaire pouvant diriger la cellule vers la catastrophe mitotique. La surexpression de Cdk1 pourrait aboutir à ce type de mort cellulaire. La perte des voies d'inhibition comme ATM, ATR, CHK1 peut également être incriminée dans ce mécanisme. Dans ce travail, nous avons montré que la sous-expression de LZTS1 dans les cellules sensibles diminue la polynucléation induite par le docetaxel par rapport aux cellules qui expriment LZTS1. Ceci suggère que LZTS1 est l'une des altérations moléculaires qui empêche les cellules résistantes d'entrer en catastrophe mitotique après traitement par docetaxel.

Nous montrons également, en calculant les IC50 ainsi que par des tests de clonogénicité, que l'extinction de LZTS1 confère aux cellules IGR-CaP1 la capacité de résister au docetaxel. En revanche, nous avons observé que l'expression ectopique de LZTS1 n'est pas suffisante pour restaurer une sensibilité des cellules IGR-CaP1-R100 (résultats non présentés). Ces données suggèrent que le phénomène de résistance est un mécanisme complexe et implique probablement l'altération d'autres voies de signalisation.

Dans la lignée IGR-CaP1, le traitement par le docetaxel induit une augmentation de l'expression de Chk1, un des acteurs principaux de checkpoint mitotique. Cependant, dans la lignée résistante, on ne voit pas de modification de Chk1, ce qui nous laisse émettre deux hypothèses : Il est possible que la lignée R100 ait acquis des modifications moléculaires qui inhibent le checkpoint, ce qui permet aux cellules anormales et polynuclées induites par le docetaxel d'échapper à la mort cellulaire et de développer d'autres mécanismes supplémentaires permettant la résistance définitive. En effet, lors de l'établissement de la lignée résistante, nous avons constaté pendant les 4 premiers passages en présence de la drogue, que les cellules devenaient polynuclées suite au traitement et restent bloquées pendant longtemps. A partir de ces cellules polynuclées, nous avons vu apparaitre des cellules mononuclées résistantes. L'autre possibilité serait que dans la lignée IGR-CaP1-R100, la drogue n'induit plus d'anomalies susceptibles de déclencher le checkpoint.
La première hypothèse semble plus pertinente. En effet, comme nous l'avons vu dans les résultats complémentaires, l'inhibition de l'expression de LZTS1 par siARN dans la lignée IGR-CaP1, diminue l'expression de CHK1. Ces résultats suggèrent que la résistance aux taxanes pourrait être secondaire à un glissement mitotique suivie par un échappement au checkpoint G2/M.

LZTS1 semble être une protéine majeure dans le contrôle du cycle cellulaire et le checkpoint mitotique. Nous proposons donc le modèle suivant :
Pendant la prophase, en absence de LZTS1, la protéine Cdc25C est dégradée par le protéasome, ce qui réduit l'activité du complexe (Cyclin B1/Cdk1), qui induit une transition métaphase/anaphase prématurée, probablement un échapement au SAC et un glissement mitotique. L'absence de LZTS1 semble également induire la diminution de l'expression de Chk1, et par la suite, une inhibition du checkpoint G2/M permettant aux cellules ayant acquis des anomalies de continuer à proliférer (Figure 26).

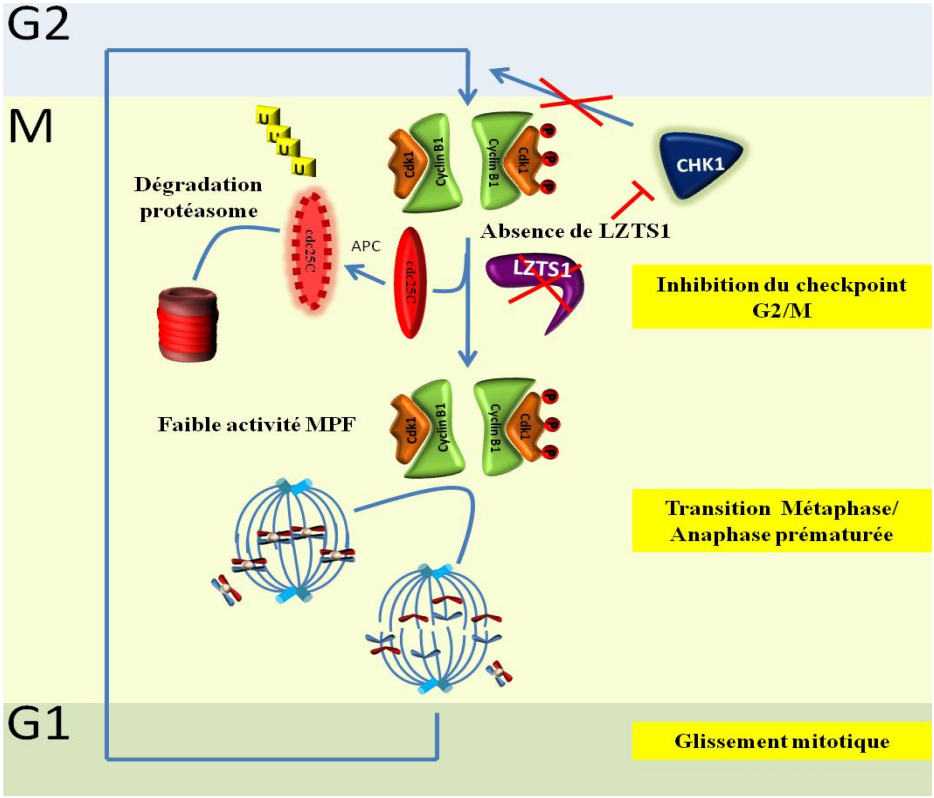


Figure 26: Modèle du rôle de LZTS1 dans la résistance au Docetaxel.

LZTS1 et CHK1 ont tous les deux comme cible la cycline Cdc25C. Dans ce travail, nous montrons également que l'inhibition des cyclines Cdc25C par l'inhibiteur NSC « quinolinedione Cdc25 phosphatase inhibitor » induit une mortalité massive dans la lignée résistante alors qu'elle n'induit pas cette mortalité dans la lignée sensible. Cependant, des expériences d'extinction d'expression par siRNA sont nécessaires pour confirmer ces résultats. La Cdc25C pourrait être une cible thérapeutique dans les cancers résistants aux taxanes.

Actuellement, l'étude fonctionnelle se poursuit autour de LZTS1 dans le laboratoire afin de mieux comprendre les interactions de ce gène suppresseur de tumeur avec les protéines du cycle cellulaire, notamment CHK1 et Cdc25C. La connaissance des altérations de la voie devrait permettre de mieux comprendre le rôle de LZTS1 dans la résistance au docetaxel et dans le checkpoint mitotique mais aussi de trouver d'autres cibles thérapeutiques pour contourner la résistance. Ces résultats obtenus dans la lignée IGR-CaP1 sont également à confirmer sur les autres lignées de cancer de la prostate. Même si les résultats obtenus *in vitro* sont encourageants, l'étude immuno-histochimique sur des tumeurs de patients n'a pas permis de valider LZTS1 comme un nouveau biomarqueur prédictif ou pronostique. Il faut cependant analyser ces données avec précaution compte-tenu du faible nombre de

patients inclus dans cette étude préliminaire. Il est nécessaire d'évaluer l'expression de LZTS1 sur une série de patients plus importante. D'autre part, dans la population globale des patients selectionnés pour cette éude préliminaire, les deux sous-populations de patients ne sont pas comparables. En effet, les patients résistants constituent un sous-groupe de mauvais pronostic au diagnostic avec un score de Gleason élevé et une maladie d'emblée métastatique. Il est important de noter que l'expression de LZTS1 dans les tumeurs peut être très différente entre les patients. LZTS1 est retrouvé fortement sous-exprimé dans 33,3% des biopsies analysées. La forte expression de LZTS1 chez plus de 60% des patients dans notre étude est contradictoire avec les données de la littérature qui montrent une sous expression dans environ 70% des tumeurs quel que soit le type histologique (406). Encore une fois, notre série de patients est trop petite et on trouve peu de données sont disponibles dans la littérature sur le CaP pour pouvoir conclure d'une façon définitive.

Par contre, même si cette étude est une analyse préliminaire, elle nous permet de conclure quant à la faisabilité de l'étude immuno-histologique. Les biopsies des patients inclus dans l'essai de phase III GETUG12 sont en cours de collecte au laboratoire. 207 patients ont été inclus dans le bras docetaxel et l'analyse de ce matériel biologique devrait permettre d'avancer dans la validation d'une stratégie de prise en charge adaptée à chaque patient et au profil moléculaire de chaque tumeur. Même si les résultats cliniques de l'essai GETUG12 présentés à l'ASCO en 2011 ne montrent pas de gain en termes de survie sans progression à 4 ans dans le bras docetaxel (http://abstract.asco.org/AbstView_102_77102.html), il semble que certains patients bénéficient de l'adjonction de la chimiothérapie. Afin de tenir compte de la complexité des mécanismes de résistance, il est probable qu'un seul biomarqueur ne permette pas de sélectionner les patients mais qu'une combinaison de biomarqueurs serait plus performante. L'un des facteurs limitant reste la taille des échantillons et la faible quantité de matériel tumoral sur certaines biopsies. Néanmoins, nous poursuivrons nos efforts pour identifier une combinaison de marqueurs qui nous permette de sélectionner les patients pouvant bénéficier d'un traitement par chimiothérapie.

CONCLUSION GENERALE

Mon travail de doctorat est articulée autour de deux axes principaux. La mise au point de nouveaux modèles précliniques de CaP et l'identification d'un biomarqueur de résistance au docetaxel dans le CaP.

Ce travail de thèse mené au sein de l'équipe du Dr. Anne Chauchereau a permit d'établir et de caractériser :

- Un nouveau modèle cellulaire issu d'un CaP localisé qui présente des marqueurs de cellules souches cancéreuses.
- Un modèle animal sous-cutané et orthotopique capable d'induire des métastases viscérales spontanées.
- Un modèle animal de métastases osseuses de CaP, quasiment unique dans sa capacité à reproduire des lésions évolutives ostéocondensantes. Contrairement aux autres modèles, celui-ci est plus « physiologique », il est obtenu via la circulation générale sans induction de lésion du périoste. Il permet d'étudier quasiment toutes les étapes du processus métastatique osseux : le chimiotactisme, l'adhésion à l'endothélium médullaire, l'extravasation, la prolifération tumorale intraosseuse et les lésions de nature mixte.

Ces modèles peuvent être d'une grande utilité pour mieux comprendre la pathogénèse du CaP et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ils permettent d'évaluer les nouvelles molécules aussi bien *in vitro* au niveau cellulaire, que chez l'animal au niveau de la tumeur et des métastases.

Notre modèle de métastases osseuses, constitue un outil précieux et pertinent pour évaluer les nouvelles molécules anti-métastatiques comme par exemple le cabozantinib, actuellement évalué en essaie clinique de phase II dans le cancer de la prostate métastatique.

La deuxième partie de mon travail a permit de mettre au point trois modèles cellulaires résistants au docetaxel qui sont d'un grand apport pour mieux comprendre la chimiorésitance dans le CaP et qui seront de bons outils pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces modèles résistants nous ont permis d'identifier et de valider plusieurs signatures de gènes impliquées dans la résistance au docetaxel. L'analyse de la signature commune à ces trois lignées (IGR-CaP1-R, LNCaP-R et PC3-R) est actuellement en cours d'étude. En collaboration avec la plate-forme Biophenics de l'Institut Curie, nous effectuerons par stratégie siARN, une validation fonctionnelle de haut débit pour choisir un groupe de marqueurs potentiels de résistance.

Enfin, nous avons montré *in vitro* que la protéine LZTS1 est un acteur principal de la résistance au docetaxel et pourrait être un biomarqueur potentiel de résistance au docetaxel. Suite à l'étude immuno-histochimique préliminaire de LZTS1 sur des biopsies de patients atteints de CaP, il est maintenant nécessaire de valider LZTS1 sur les biopsies des patients inclus dans l'essai de phase III GETUG12.
Il est également pertinent de comprendre le mécanisme de résistance impliquant la protéine LZTS1. Nous prévoyons des études supplémentaires sur l'interaction de LZTS1 avec ses deux partenaires CHK1 et Cdc25C qui semblent également être impliqués dans la résistance au docetaxel. Ce travail ouvre également des perspectives sur la définition de nouvelles cibles therapeutiques dans le traitement du CaP résistant au docetaxel.

RÉFERENCES

1. Adams J. Clinical Lecture ON THE DISEASES OF THE PROSTATE GLAND. The Lancet. 1855;65(1658):573-574.
2. Guérin S, Hill C. [Cancer epidemiology in France in 2010, comparison with the USA]. Bull Cancer. 2010 janv;97(1):47-54.
3. Cussenot O. [The Campaign Program for Prostate Integrated Research]. Bull Cancer. 2010 déc;97(12):1497-1498.
4. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. Urology. 2003 déc 22;62(6 Suppl 1):3-12.
5. Pienta KJ, Goodson JA, Esper PS. Epidemiology of prostate cancer: molecular and environmental clues. Urology. 1996 nov;48(5):676-683.
6. Pettaway CA, Troncoso P, Ramirez EI, Johnston DA, Steelhammer L, Babaian RJ. Prostate specific antigen and pathological features of prostate cancer in black and white patients: a comparative study based on radical prostatectomy specimens. J. Urol. 1998 août;160(2):437-442.
7. Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, et al. Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. Am. J. Epidemiol. 1995 avr 15;141(8):732-740.
8. Ravery V, Javerliat I, Toublanc M, Boccon-Gibod L, Delmas V, Boccon-Gibod L. [Features of prostatic cancer in French individuals of African-Caribbean origin]. Prog. Urol. 2000 avr;10(2):231-236.
9. Cussenot O, Valeri A, Meria P, Berthon P, Fournier G, Teillac P, et al. [Genetic aspects in cancers of the prostate]. Pathol. Biol. 1996 oct;44(8):737-743.
10. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. J. Urol. 1993 sept;150(3):797-802.
11. Valeri A, Drelon E, Azzouzi R, Delannoy A, Teillac P, Fournier G, et al. [Epidemiology of familial prostatic cancer: 4-year assessment of French studies]. Prog. Urol. 1999 sept;9(4):672-679.
12. Cussenot O, Cancel-Tassin G. [Genetic susceptibility to prostate cancer]. Med Sci (Paris). 2004 mai;20(5):562-568.
13. Ostrander EA, Markianos K, Stanford JL. Finding prostate cancer susceptibility genes. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2004;5:151-175.
14. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. Br. J. Cancer. 1991 juin;63(6):963-966.
15. Stellman SD, Wang QS. Cancer mortality in Chinese immigrants to New York City. Comparison with Chinese in Tianjin and with United States-born whites. Cancer. 1994 févr 15;73(4):1270-1275.
16. Wynder EL, Fujita Y, Harris RE, Hirayama T, Hiyama T. Comparative epidemiology of cancer between the United States and Japan. A second look. Cancer. 1991 févr 1;67(3):746-763.
17. Glade MJ. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Nutrition. 1999 juin;15(6):523-526.
18. Rose DP, Boyar AP, Wynder EL. International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption.

Cancer. 1986 déc 1;58(11):2363-2371.
19. Sinha R, Park Y, Graubard BI, Leitzmann MF, Hollenbeck A, Schatzkin A, et al. Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States. Am. J. Epidemiol. 2009 nov 1;170(9):1165-1177.
20. Kawaii S, Lansky EP. Differentiation-promoting activity of pomegranate (Punica granatum) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. J Med Food. 2004;7(1):13-18.
21. Potter SR, Horniger W, Tinzl M, Bartsch G, Partin AW. Age, prostate-specific antigen, and digital rectal examination as determinants of the probability of having prostate cancer. Urology. 2001 juin;57(6):1100-1104.
22. Bok RA, Small EJ. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. Nat Rev Cancer. 2002 déc;2(12):918-926.
23. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. Am. J. Surg. Pathol. 1988 déc;12(12):897-906.
24. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. J. Urol. 1974 janv;111(1):58-64.
25. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. JAMA. 1998 sept 16;280(11):969-974.
26. English HF, Santen RJ, Isaacs JT. Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. Prostate. 1987;11(3):229-242.
27. McNeal JE, Haillot O, Yemoto C. Cell proliferation in dysplasia of the prostate: analysis by PCNA immunostaining. Prostate. 1995 nov;27(5):258-268.
28. Prins GS, Birch L, Greene GL. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. Endocrinology. 1991 déc;129(6):3187-3199.
29. Wang Y, Wang K, Jette DC, Wishart DS. Production of an anti-prostate-specific antigen single-chain antibody fragment from Pichia pastoris. Protein Expr. Purif. 2001 déc;23(3):419-425.
30. Buttyan, Shabsigh, Perlman, Colombel. Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids. Trends Endocrinol. Metab. 1999 mars;10(2):47-54.
31. Evans GS, Chandler JA. Cell proliferation studies in the rat prostate: II. The effects of castration and androgen-induced regeneration upon basal and secretory cell proliferation. Prostate. 1987;11(4):339-351.
32. Vashchenko N, Abrahamsson P-A. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. Eur. Urol. 2005 févr;47(2):147-155.
33. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. Urol. Oncol. 2007 oct;25(5):398-400.
34. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. Am. J. Pathol. 2003 sept;163(3):923-933.
35. Schulz WA, Hatina J. Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. J. Cell. Mol. Med. 2006 mars;10(1):100-125.

36. Bastian PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS, Rogers CG, Lin X, De Marzo AM, et al. Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. Eur. Urol. 2004 déc;46(6):698-708.
37. Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. Carcinogenesis. 2005 juill;26(7):1170-1181.
38. De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JI, et al. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. J. Cell. Biochem. 2004 févr 15;91(3):459-477.
39. Bethel CR, Faith D, Li X, Guan B, Hicks JL, Lan F, et al. Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. Cancer Res. 2006 nov 15;66(22):10683-10690.
40. He WW, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, et al. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. Genomics. 1997 juill 1;43(1):69-77.
41. Kim MJ, Cardiff RD, Desai N, Banach-Petrosky WA, Parsons R, Shen MM, et al. Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002 mars 5;99(5):2884-2889.
42. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science. 2005 oct 28;310(5748):644-648.
43. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furusato B, Furasato B, Sun C, et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. Oncogene. 2005 mai 26;24(23):3847-3852.
44. Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, True LD, et al. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. Cancer Res. 1999 sept 1;59(17):4180-4184.
45. Vaarala MH, Porvari K, Kyllönen A, Lukkarinen O, Vihko P. The TMPRSS2 gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cancer patients: detection of mutated TMPRSS2 form in a case of aggressive disease. Int. J. Cancer. 2001 déc 1;94(5):705-710.
46. Attard G, Clark J, Ambroisine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. Oncogene. 2008 janv 10;27(3):253-263.
47. Iljin K, Wolf M, Edgren H, Gupta S, Kilpinen S, Skotheim RI, et al. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. Cancer Res. 2006 nov 1;66(21):10242-10246.
48. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. Cell. 2009 sept 4;138(5):822-829.
49. Wang X, Kruithof-de Julio M, Economides KD, Walker D, Yu H, Halili MV, et al. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. Nature. 2009 sept 24;461(7263):495-500.
50. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc

onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1982 déc;79(24):7824-7827.
51. Andreoiu M, Cheng L. Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. Hum. Pathol. 2010 juin;41(6):781-793.
52. Hsing AW, Chu LW, Stanczyk FZ. Androgen and prostate cancer: is the hypothesis dead? Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2008 oct;17(10):2525-2530.
53. Ribeiro FR, Henrique R, Martins AT, Jerónimo C, Teixeira MR. Relative copy number gain of MYC in diagnostic needle biopsies is an independent prognostic factor for prostate cancer patients. Eur. Urol. 2007 juill;52(1):116-125.
54. Ribeiro FR, Jerónimo C, Henrique R, Fonseca D, Oliveira J, Lothe RA, et al. 8q gain is an independent predictor of poor survival in diagnostic needle biopsies from prostate cancer suspects. Clin. Cancer Res. 2006 juill 1;12(13):3961-3970.
55. Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. J. Biol. Chem. 2002 août 9;277(32):28706-28713.
56. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. Cancer Res. 1999 sept 1;59(17):4291-4296.
57. Goberdhan DCI, Wilson C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. Hum. Mol. Genet. 2003 oct 15;12 Spec No 2:R239-248.
58. Gray IC, Phillips SM, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J, Spurr NK. Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. Cancer Res. 1995 nov 1;55(21):4800-4803.
59. Dong JT, Li CL, Sipe TW, Frierson HF Jr. Mutations of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancers from Chinese patients. Clin. Cancer Res. 2001 févr;7(2):304-308.
60. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998 avr 28;95(9):5246-5250.
61. Dong JT, Sipe TW, Hyytinen ER, Li CL, Heise C, McClintock DE, et al. PTEN/MMAC1 is infrequently mutated in pT2 and pT3 carcinomas of the prostate. Oncogene. 1998 oct 15;17(15):1979-1982.
62. Mimeault M, Batra SK. Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. Carcinogenesis. 2006 janv;27(1):1-22.
63. Abate-Shen C, Banach-Petrosky WA, Sun X, Economides KD, Desai N, Gregg JP, et al. Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. Cancer Res. 2003 juill 15;63(14):3886-3890.
64. Polakis P. Wnt signaling and cancer. Genes Dev. 2000 août 1;14(15):1837-1851.
65. Verras M, Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. Cancer Lett. 2006 juin 8;237(1):22-32.
66. Chesire DR, Ewing CM, Sauvageot J, Bova GS, Isaacs WB. Detection and analysis of beta-catenin mutations in prostate cancer. Prostate. 2000 déc 1;45(4):323-334.
67. Chesire DR, Ewing CM, Gage WR, Isaacs WB. In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. Oncogene. 2002 avr 18;21(17):2679-2694.
68. Schweizer L, Rizzo CA, Spires TE, Platero JS, Wu Q, Lin T-A, et al. The androgen receptor can signal through Wnt/beta-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation

mechanism to castration levels of androgens. BMC Cell Biol. 2008;9:4.
69. Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, et al. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. Cancer. 2004 sept 15;101(6):1345-1356.
70. Camparo P, Vieillefond A. [Molecular aspects of prostate cancer: recent data from the literature]. Bull Cancer. 2007 juill;94(7 Suppl):F77-88.
71. Sanchez P, Hernández AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, et al. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004 août 24;101(34):12561-12566.
72. Datta S, Datta MW. Sonic Hedgehog signaling in advanced prostate cancer. Cell. Mol. Life Sci. 2006 févr;63(4):435-448.
73. Schulze C. Sertoli cells and Leydig cells in man. Adv Anat Embryol Cell Biol. 1984;88:1-104.
74. Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2004 nov;92(4):221-236.
75. Prins GS. Molecular biology of the androgen receptor. Mayo Clin. Proc. 2000 janv;75 Suppl:S32-35.
76. Vander Griend DJ, D'Antonio J, Gurel B, Antony L, Demarzo AM, Isaacs JT. Cell-autonomous intracellular androgen receptor signaling drives the growth of human prostate cancer initiating cells. Prostate. 2010 janv 1;70(1):90-99.
77. Litvinov IV, De Marzo AM, Isaacs JT. Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003 juill;88(7):2972-2982.
78. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. Endocr. Rev. 2004 avr;25(2):276-308.
79. Pollard M, Luckert PH, Sporn MB. Prevention of primary prostate cancer in Lobund-Wistar rats by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. Cancer Res. 1991 juill 1;51(13):3610-3611.
80. Mononen N, Schleutker J. Polymorphisms in genes involved in androgen pathways as risk factors for prostate cancer. J. Urol. 2009 avr;181(4):1541-1549.
81. Imperato-McGinley J, Zhu Y-S. Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency. Mol. Cell. Endocrinol. 2002 déc 30;198(1-2):51-59.
82. Hsing AW. Hormones and Prostate Cancer: What's Next? Epidemiologic Reviews. 2001 janv 1;23(1):42 -58.
83. Ford OH, Gregory CW, Kim D, Smitherman AB, Mohler JL. Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. J. Urol. 2003 nov;170(5):1817-1821.
84. Koivisto P. Aneuploidy and rapid cell proliferation in recurrent prostate cancers with androgen receptor gene amplification. Prostate Cancer Prostatic Dis. 1997 sept;1(1):21-25.
85. Linja MJ, Savinainen KJ, Saramäki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res. 2001 mai 1;61(9):3550-3555.
86. Kokontis JM, Hsu S, Chuu C-pin, Dang M, Fukuchi J, Hiipakka RA, et al. Role of androgen receptor in the progression of human prostate tumor cells to androgen

independence and insensitivity. Prostate. 2005 déc 1;65(4):287-298.
87. Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. Cancer Res. 2006 mars 1;66(5):2815-2825.
88. Hara T, Miyazaki J-ichi, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, et al. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. Cancer Res. 2003 janv 1;63(1):149-153.
89. Steketee K, Timmerman L, Ziel-van der Made ACJ, Doesburg P, Brinkmann AO, Trapman J. Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. Int. J. Cancer. 2002 juill 20;100(3):309-317.
90. Gaddipati JP, McLeod DG, Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Finger MJ, Moul JW, et al. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. Cancer Res. 1994 juin 1;54(11):2861-2864.
91. Culig Z, Bartsch G. Androgen axis in prostate cancer. J. Cell. Biochem. 2006 oct 1;99(2):373-381.
92. Masiello D, Chen S-Y, Xu Y, Verhoeven MC, Choi E, Hollenberg AN, et al. Recruitment of beta-catenin by wild-type or mutant androgen receptors correlates with ligand-stimulated growth of prostate cancer cells. Mol. Endocrinol. 2004 oct;18(10):2388-2401.
93. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. Nat. Rev. Cancer. 2001 oct;1(1):34-45.
94. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Nature. 1991 juin 6;351(6326):453-456.
95. Dong J-T. Prevalent mutations in prostate cancer. J. Cell. Biochem. 2006 févr 15;97(3):433-447.
96. Smith DM, Gao G, Zhang X, Wang G, Dou QP. Regulation of tumor cell apoptotic sensitivity during the cell cycle (Review). Int. J. Mol. Med. 2000 nov;6(5):503-507.
97. McDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Conti C, von Eschenbach AC, et al. Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. J. Urol. 1997 févr;157(2):569-574.
98. Richmond PJ, Karayiannakis AJ, Nagafuchi A, Kaisary AV, Pignatelli M. Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. Cancer Res. 1997 août 1;57(15):3189-3193.
99. De Marzo AM, Knudsen B, Chan-Tack K, Epstein JI. E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. Urology. 1999 avr;53(4):707-713.
100. Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Wheelock MJ, Johnson KR, Hemstreet GP, et al. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. Cancer Res. 2005 janv 15;65(2):483-492.
101. Peifer M. Beta-catenin as oncogene: the smoking gun. Science. 1997 mars 21;275(5307):1752-1753.
102. Lebret T, Méjean A. [Rare locations of metastases from prostate cancer]. Prog. Urol. 2008 nov;18 Suppl 7:S357-364.
103. Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. Clin. Cancer Res. 2006 oct 15;12(20 Pt 2):6243s-6249s.

104. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. Am. J. Pathol. 1998 sept;153(3):865-873.
105. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the « seed and soil » theory of metastatic dissemination. Clin. Exp. Med. 2006 déc;6(4):145-149.
106. Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. J. Natl. Cancer Inst. 1974 févr;52(2):413-427.
107. Day ML, Zhao X, Vallorosi CJ, Putzi M, Powell CT, Lin C, et al. E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. J. Biol. Chem. 1999 avr 2;274(14):9656-9664.
108. Dai Y, Bae K, Siemann DW. Impact of Hypoxia on the Metastatic Potential of Human Prostate Cancer Cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys [Internet]. 2011 juin 1 [cité 2011 juill 16];Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21640519
109. Arya M, Bott SR, Shergill IS, Ahmed HU, Williamson M, Patel HR. The metastatic cascade in prostate cancer. Surg Oncol. 2006 nov;15(3):117-128.
110. Biggerstaff JP, Seth N, Amirkhosravi A, Amaya M, Fogarty S, Meyer TV, et al. Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence in vitro and in vivo, and enhances experimental metastasis. Clin. Exp. Metastasis. 1999;17(8):723-730.
111. Tsingotjidou AS, Zotalis G, Jackson KR, Sawyers C, Puzas JE, Hicks DG, et al. Development of an animal model for prostate cancer cell metastasis to adult human bone. Anticancer Res. 2001 avr;21(2A):971-978.
112. Cooper CR, Pienta KJ. Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2000 juill;3(1):6-12.
113. Keller ET, Zhang J, Cooper CR, Smith PC, McCauley LK, Pienta KJ, et al. Prostate carcinoma skeletal metastases: cross-talk between tumor and bone. Cancer Metastasis Rev. 2001;20(3-4):333-349.
114. Liao J, Schneider A, Datta NS, McCauley LK. Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. Cancer Res. 2006 sept 15;66(18):9065-9073.
115. Scott LJ, Clarke NW, George NJ, Shanks JH, Testa NG, Lang SH. Interactions of human prostatic epithelial cells with bone marrow endothelium: binding and invasion. Br. J. Cancer. 2001 mai 18;84(10):1417-1423.
116. Cooper CR, McLean L, Walsh M, Taylor J, Hayasaka S, Bhatia J, et al. Preferential adhesion of prostate cancer cells to bone is mediated by binding to bone marrow endothelial cells as compared to extracellular matrix components in vitro. Clin. Cancer Res. 2000 déc;6(12):4839-4847.
117. Chappard D, Legrand E, Massin P, Basle MF, Audran M. [Pathophysiology of bone metastases]. Prog. Urol. 2003 avr;13(2 Suppl 1):9-17.
118. Edlund M, Sung S-Y, Chung LWK. Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments. J. Cell. Biochem. 2004 mars 1;91(4):686-705.
119. Cher ML. Mechanisms governing bone metastasis in prostate cancer. Curr Opin Urol. 2001 sept;11(5):483-488.
120. Guise TA, Yin JJ, Mohammad KS. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. Cancer. 2003 févr 1;97(3 Suppl):779-784.

121. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. Nat. Rev. Cancer. 2002 août;2(8):584-593.
122. Mohammad KS, Guise TA. Mechanisms of osteoblastic metastases: role of endothelin-1. Clin. Orthop. Relat. Res. 2003 oct;(415 Suppl):S67-74.
123. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. N. Engl. J. Med. 2004 avr 15;350(16):1655-1664.
124. Lee Y, Schwarz E, Davies M, Jo M, Gates J, Wu J, et al. Differences in the cytokine profiles associated with prostate cancer cell induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. J. Orthop. Res. 2003 janv;21(1):62-72.
125. Eaton CL, Coleman RE. Pathophysiology of bone metastases from prostate cancer and the role of bisphosphonates in treatment. Cancer Treat. Rev. 2003 juin;29(3):189-198.
126. Yin JJ, Pollock CB, Kelly K. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. Cell Res. 2005 janv;15(1):57-62.
127. Hall CL, Kang S, MacDougald OA, Keller ET. Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. J. Cell. Biochem. 2006 mars 1;97(4):661-672.
128. Cramer SD, Chen Z, Peehl DM. Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. J. Urol. 1996 août;156(2 Pt 1):526-531.
129. Nadiminty N, Lou W, Lee SO, Mehraein-Ghomi F, Kirk JS, Conroy JM, et al. Prostate-specific antigen modulates genes involved in bone remodeling and induces osteoblast differentiation of human osteosarcoma cell line SaOS-2. Clin. Cancer Res. 2006 mars 1;12(5):1420-1430.
130. Hoosein NM, Boyd DD, Hollas WJ, Mazar A, Henkin J, Chung LW. Involvement of urokinase and its receptor in the invasiveness of human prostatic carcinoma cell lines. Cancer Commun. 1991 août;3(8):255-264.
131. Xing RH, Rabbani SA. Regulation of urokinase production by androgens in human prostate cancer cells: effect on tumor growth and metastases in vivo. Endocrinology. 1999 sept;140(9):4056-4064.
132. Rabbani SA, Desjardins J, Bell AW, Banville D, Mazar A, Henkin J, et al. An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990 déc 31;173(3):1058-1064.
133. Achbarou A, Kaiser S, Tremblay G, Ste-Marie LG, Brodt P, Goltzman D, et al. Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo. Cancer Res. 1994 mai 1;54(9):2372-2377.
134. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003 mai 15;423(6937):337-342.
135. Baron R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. médecine/sciences. 2001;17(12):10.
136. Quinn JMW, Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005 mars 18;328(3):739-745.
137. Brown JM, Corey E, Lee ZD, True LD, Yun TJ, Tondravi M, et al. Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer. Urology. 2001 avr;57(4):611-616.
138. Dougherty KM, Blomme EA, Koh AJ, Henderson JE, Pienta KJ, Rosol TJ, et al. Parathyroid hormone-related protein as a growth regulator of prostate carcinoma. Cancer Res. 1999 déc 1;59(23):6015-6022.
139. Deftos LJ, Barken I, Burton DW, Hoffman RM, Geller J. Direct evidence that PTHrP

expression promotes prostate cancer progression in bone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005 févr 11;327(2):468-472.
140. Siegall CB, Schwab G, Nordan RP, FitzGerald DJ, Pastan I. Expression of the interleukin 6 receptor and interleukin 6 in prostate carcinoma cells. Cancer Res. 1990 déc 15;50(24):7786-7788.
141. Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H, et al. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. Clin. Cancer Res. 2000 juill;6(7):2702-2706.
142. Kanoh Y, Akahoshi T, Ohara T, Ohtani N, Mashiko T, Ohtani S, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and prostate-specific antigen in localized and metastatic prostate cancer. Anticancer Res. 2002 juin;22(3):1813-1817.
143. Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, et al. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. Mol. Cell. Biol. 2005 oct;25(19):8581-8591.
144. Wang Q, Diao X, Sun J, Chen Z. Regulation of VEGF, MMP-9, and metastasis by CXCR4 in a prostate cancer cell line. Cell Biol Int [Internet]. 2011 févr 10 [cité 2011 juin 29];Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21306303
145. Shih S-C, Robinson GS, Perruzzi CA, Calvo A, Desai K, Green JE, et al. Molecular profiling of angiogenesis markers. Am. J. Pathol. 2002 juill;161(1):35-41.
146. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. Am. J. Pathol. 1993 août;143(2):401-409.
147. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, et al. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. Urology. 1998 janv;51(1):161-167.
148. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. Nature. 1993 avr 29;362(6423):841-844.
149. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. Cancer Res. 1997 mars 1;57(5):963-969.
150. Strohmeyer D, Rössing C, Bauerfeind A, Kaufmann O, Schlechte H, Bartsch G, et al. Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. Prostate. 2000 nov 1;45(3):216-224.
151. Borre M, Nerstrøm B, Overgaard J. Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. Clin. Cancer Res. 2000 mai;6(5):1882-1890.
152. Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D, Freeman MR. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. Urology. 1999 sept;54(3):523-527.
153. Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C, et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. Cancer Res. 2002 févr 1;62(3):854-859.
154. Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, Kowalczyk P, Laudone VP, Albertsen PC, et al.

Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. Urology. 1999 sept;54(3):567-572.
155. Navone NM, Olive M, Ozen M, Davis R, Troncoso P, Tu SM, et al. Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis. Clin. Cancer Res. 1997 déc;3(12 Pt 1):2493-2500.
156. Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, et al. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. Prog. Clin. Biol. Res. 1980;37:115-132.
157. Attard G, Rizzo S, Ledaki I, Clark J, Reid AHM, Thompson A, et al. A novel, spontaneously immortalized, human prostate cancer cell line, Bob, offers a unique model for pre-clinical prostate cancer studies. Prostate. 2009 oct 1;69(14):1507-1520.
158. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Invest Urol. 1979 juill;17(1):16-23.
159. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). Int. J. Cancer. 1978 mars 15;21(3):274-281.
160. Iizumi T, Yazaki T, Kanoh S, Kondo I, Koiso K. Establishment of a new prostatic carcinoma cell line (TSU-Pr1). J. Urol. 1987 juin;137(6):1304-1306.
161. Mertz KD, Setlur SR, Dhanasekaran SM, Demichelis F, Perner S, Tomlins S, et al. Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: a new perspective for an old model. Neoplasia. 2007 mars;9(3):200-206.
162. Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, et al. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990 déc 14;173(2):534-540.
163. Kokontis J, Ito K, Hiipakka RA, Liao S. Expression and function of normal and LNCaP androgen receptors in androgen-insensitive human prostatic cancer cells. Altered hormone and antihormone specificity in gene transactivation. Receptor. 1991;1(4):271-279.
164. Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. J. Urol. 2005 févr;173(2):342-359.
165. Lee YG, Korenchuk S, Lehr J, Whitney S, Vessela R, Pienta KJ. Establishment and characterization of a new human prostatic cancer cell line: DuCaP. In Vivo. 2001 avr;15(2):157-162.
166. Korenchuk S, Lehr JE, MClean L, Lee YG, Whitney S, Vessella R, et al. VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. In Vivo. 2001 avr;15(2):163-168.
167. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. Neoplasia. 2008 févr;10(2):177-188.
168. Chung LW, Zhau HE, Wu TT. Development of human prostate cancer models for chemoprevention and experimental therapeutics studies. J. Cell. Biochem. Suppl. 1997;28-29:174-181.
169. Sramkoski RM, Pretlow TG 2nd, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, et al. A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 1999 août;35(7):403-409.
170. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate. 2003

nov 1;57(3):205-225.
171. Hartley-Asp B, Billström A, Kruse E. Identification by C-banding of two human prostate tumour cell lines, 1013L and DU 145. Int. J. Cancer. 1989 juill 15;44(1):161-164.
172. Marques RB, Erkens-Schulze S, de Ridder CM, Hermans KG, Waltering K, Visakorpi T, et al. Androgen receptor modifications in prostate cancer cells upon long-termandrogen ablation and antiandrogen treatment. Int. J. Cancer. 2005 nov 1;117(2):221-229.
173. Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. Cancer Res. 2004 mars 15;64(6):2270-2305.
174. Cussenot O, Berthon P, Berger R, Mowszowicz I, Faille A, Hojman F, et al. Immortalization of human adult normal prostatic epithelial cells by liposomes containing large T-SV40 gene. J. Urol. 1991 sept;146(3):881-886.
175. Berthon P, Cussenot O, Hopwood L, Leduc A, Maitland N. Functional expression of sv40 in normal human prostatic epithelial and fibroblastic cells - differentiation pattern of nontumorigenic cell-lines. Int. J. Oncol. 1995 févr;6(2):333-343.
176. Hayward SW, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, Narayan P. Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 1995 janv;31(1):14-24.
177. Wang Y, Sudilovsky D, Zhang B, Haughney PC, Rosen MA, Wu DS, et al. A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. Cancer Res. 2001 août 15;61(16):6064-6072.
178. Webber MM, Bello D, Kleinman HK, Wartinger DD, Williams DE, Rhim JS. Prostate specific antigen and androgen receptor induction and characterization of an immortalized adult human prostatic epithelial cell line. Carcinogenesis. 1996 août;17(8):1641-1646.
179. Ko D, Gu Y, Yasunaga Y, Nakamura K, Srivastava S, Moul JW, et al. A novel neoplastic primary tumor-derived human prostate epithelial cell line. Int. J. Oncol. 2003 juin;22(6):1311-1317.
180. Yasunaga Y, Nakamura K, Ewing CM, Isaacs WB, Hukku B, Rhim JS. A novel human cell culture model for the study of familial prostate cancer. Cancer Res. 2001 août 15;61(16):5969-5973.
181. Yasunaga Y, Nakamura K, Ko D, Srivastava S, Moul JW, Sesterhenn IA, et al. A novel human cancer culture model for the study of prostate cancer. Oncogene. 2001 nov 29;20(55):8036-8041.
182. Gu Y, Li H, Miki J, Kim K-H, Furusato B, Sesterhenn IA, et al. Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines. Experimental Cell Research. 2006 avr 1;312(6):831-843.
183. Novel human prostate cell lines derived from the transition and peripheral zones of the prostate for carcinogenesis studies [Internet]. [cité 2011 juin 30];Available from: http://www.spandidos-publications.com.gate2.inist.fr/or/25/1/121
184. Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordóñez NG, Killion JJ, Fidler IJ. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. J. Natl.

Cancer Inst. 1992 juin 17;84(12):951-957.
185. Pettaway CA, Pathak S, Greene G, Ramirez E, Wilson MR, Killion JJ, et al. Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. Clin. Cancer Res. 1996 sept;2(9):1627-1636.
186. Sato N, Gleave ME, Bruchovsky N, Rennie PS, Beraldi E, Sullivan LD. A metastatic and androgen-sensitive human prostate cancer model using intraprostatic inoculation of LNCaP cells in SCID mice. Cancer Res. 1997 avr 15;57(8):1584-1589.
187. van Weerden WM, Bangma C, de Wit R. Human xenograft models as useful tools to assess the potential of novel therapeutics in prostate cancer. Br. J. Cancer. 2009 janv 13;100(1):13-18.
188. Hoehn W, Schroeder FH, Reimann JF, Joebsis AC, Hermanek P. Human prostatic adenocarcinoma: some characteristics of a serially transplantable line in nude mice (PC 82). Prostate. 1980;1(1):95-104.
189. Ito YZ, Nakazato Y. A new serially transplantable human prostatic cancer (HONDA) in nude mice. J. Urol. 1984 août;132(2):384-387.
190. Ito YZ, Mashimo S, Nakazato Y, Takikawa H. Hormone dependency of a serially transplantable human prostatic cancer (HONDA) in nude mice. Cancer Res. 1985 oct;45(10):5058-5063.
191. Nagabhushan M, Miller CM, Pretlow TP, Giaconia JM, Edgehouse NL, Schwartz S, et al. CWR22: the first human prostate cancer xenograft with strongly androgen-dependent and relapsed strains both in vivo and in soft agar. Cancer Res. 1996 juill 1;56(13):3042-3046.
192. Pretlow TG, Wolman SR, Micale MA, Pelley RJ, Kursh ED, Resnick MI, et al. Xenografts of primary human prostatic carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 1993 mars 3;85(5):394-398.
193. Ellis WJ, Vessella RL, Buhler KR, Bladou F, True LD, Bigler SA, et al. Characterization of a novel androgen-sensitive, prostate-specific antigen-producing prostatic carcinoma xenograft: LuCaP 23. Clin. Cancer Res. 1996 juin;2(6):1039-1048.
194. van Weerden WM, de Ridder CM, Verdaasdonk CL, Romijn JC, van der Kwast TH, Schröder FH, et al. Development of seven new human prostate tumor xenograft models and their histopathological characterization. Am. J. Pathol. 1996 sept;149(3):1055-1062.
195. Klein KA, Reiter RE, Redula J, Moradi H, Zhu XL, Brothman AR, et al. Progression of metastatic human prostate cancer to androgen independence in immunodeficient SCID mice. Nat. Med. 1997 avr;3(4):402-408.
196. Li ZG, Mathew P, Yang J, Starbuck MW, Zurita AJ, Liu J, et al. Androgen receptor–negative human prostate cancer cells induce osteogenesis in mice through FGF9-mediated mechanisms. J Clin Invest. 2008 août 1;118(8):2697-2710.
197. de Pinieux G, Legrier ME, Poirson-Bichat F, Courty Y, Bras-Gonçalves R, Dutrillaux AM, et al. Clinical and experimental progression of a new model of human prostate cancer and therapeutic approach. Am. J. Pathol. 2001 août;159(2):753-764.
198. Legrier ME, de Pinieux G, Poirson-Bichat F, Apiou F, Dutrillaux AM, Boye K, et al. [A new model of human prostate cancer, the PAC120 xenograft]. Pathol. Biol. 2003 févr;51(1):1-4.
199. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho S-mei, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. Cancer. 2004 nov 15;101(10 Suppl):2371-2490.
200. DUNNING WF. PROSTATE CANCER IN THE RAT. Natl Cancer Inst Monogr. 1963 oct;12:351-369.

201. Isaacs JT, Isaacs WB, Feitz WF, Scheres J. Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers. Prostate. 1986;9(3):261-281.
202. Pollard M. Lobund-Wistar rat model of prostate cancer in man. Prostate. 1998 sept 15;37(1):1-4.
203. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH. Animal models of bone metastasis. Cancer. 2003 févr 1;97(3 Suppl):748-757.
204. Noble RL. The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration. Cancer Res. 1977 juin;37(6):1929-1933.
205. Varma VA, Austin GE. Morphologic characterization of early prostatic carcinomas in the ACI rat: a light and electron microscopic study. Exp. Mol. Pathol. 1990 avr;52(2):202-211.
206. Bostwick DG, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. Mod. Pathol. 2004 mars;17(3):360-379.
207. Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. Cancer Research. 2004 mars 15;64(6):2270 -2305.
208. Schneider A, Kalikin LM, Mattos AC, Keller ET, Allen MJ, Pienta KJ, et al. Bone turnover mediates preferential localization of prostate cancer in the skeleton. Endocrinology. 2005 avr;146(4):1727-1736.
209. Wu TT, Sikes RA, Cui Q, Thalmann GN, Kao C, Murphy CF, et al. Establishing human prostate cancer cell xenografts in bone: induction of osteoblastic reaction by prostate-specific antigen-producing tumors in athymic and SCID/bg mice using LNCaP and lineage-derived metastatic sublines. Int. J. Cancer. 1998 sept 11;77(6):887-894.
210. Haq M, Goltzman D, Tremblay G, Brodt P. Rat prostate adenocarcinoma cells disseminate to bone and adhere preferentially to bone marrow-derived endothelial cells. Cancer Res. 1992 sept 1;52(17):4613-4619.
211. Liepe K, Geidel H, Haase M, Hakenberg OW, Runge R, Kotzerke J. New model for the induction of osteoblastic bone metastases in rat. Anticancer Res. 2005 avr;25(2A):1067-1073.
212. Nemeth JA, Harb JF, Barroso U Jr, He Z, Grignon DJ, Cher ML. Severe combined immunodeficient-hu model of human prostate cancer metastasis to human bone. Cancer Res. 1999 avr 15;59(8):1987-1993.
213. LeRoy BE, Bahnson RR, Rosol TJ. Canine prostate induces new bone formation in mouse calvaria: A model of osteoinduction by prostate tissue. Prostate. 2002 févr 1;50(2):104-111.
214. Holleran JL, Miller CJ, Edgehouse NL, Pretlow TP, Culp LA. Differential experimental micrometastasis to lung, liver, and bone with lacZ-tagged CWR22R prostate carcinoma cells. Clin. Exp. Metastasis. 2002;19(1):17-24.
215. Drake JM, Danke JR, Henry MD. Bone-specific growth inhibition of prostate cancer metastasis by atrasentan. Cancer Biol. Ther. 2010 avr;9(8):607-614.
216. Zhau HY, Chang SM, Chen BQ, Wang Y, Zhang H, Kao C, et al. Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996 déc 24;93(26):15152-15157.
217. Xu J, Wang R, Xie ZH, Odero-Marah V, Pathak S, Multani A, et al. Prostate cancer

metastasis: role of the host microenvironment in promoting epithelial to mesenchymal transition and increased bone and adrenal gland metastasis. Prostate. 2006 nov 1;66(15):1664-1673.
218. Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM, Zhau HE, Kim EE, Hopwood VL, et al. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. Cancer Res. 1994 mai 15;54(10):2577-2581.
219. Chauchereau A, Al Nakouzi N, Gaudin C, Le Moulec S, Compagno D, Auger N, et al. Stemness markers characterize IGR-CaP1, a new cell line derived from primary epithelial prostate cancer. Exp. Cell Res. 2011 févr 1;317(3):262-275.
220. Craft N, Chhor C, Tran C, Belldegrun A, DeKernion J, Witte ON, et al. Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process. Cancer Res. 1999 oct 1;59(19):5030-5036.
221. Fizazi K, Sikes CR, Kim J, Yang J, Martinez LA, Olive MC, et al. High efficacy of docetaxel with and without androgen deprivation and estramustine in preclinical models of advanced prostate cancer. Anticancer Res. 2004 oct;24(5A):2897-2903.
222. Yang J, Fizazi K, Peleg S, Sikes CR, Raymond AK, Jamal N, et al. Prostate cancer cells induce osteoblast differentiation through a Cbfa1-dependent pathway. Cancer Res. 2001 juill 15;61(14):5652-5659.
223. Russell MR, Liu Q, Fatatis A. Targeting the {alpha} receptor for platelet-derived growth factor as a primary or combination therapy in a preclinical model of prostate cancer skeletal metastasis. Clin. Cancer Res. 2010 oct 15;16(20):5002-5010.
224. Casciari JJ, Sotirchos SV, Sutherland RM. Glucose diffusivity in multicellular tumor spheroids. Cancer Res. 1988 juill 15;48(14):3905-3909.
225. Takagi A, Watanabe M, Ishii Y, Morita J, Hirokawa Y, Matsuzaki T, et al. Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features. Anticancer Res. 2007 févr;27(1A):45-53.
226. Watanabe M, Takagi A. [Biological behavior of prostate cancer cells in 3D culture systems]. Yakugaku Zasshi. 2008 janv;128(1):37-44.
227. Song H, Jain SK, Enmon RM, O'Connor KC. Restructuring dynamics of DU 145 and LNCaP prostate cancer spheroids. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 2004 oct;40(8-9):262-267.
228. Hsiao AY, Torisawa Y-suke, Tung Y-C, Sud S, Taichman RS, Pienta KJ, et al. Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. Biomaterials. 2009;30(16):3020-3027.
229. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. Semin. Cancer Biol. 2005 oct;15(5):365-377.
230. Sowery RD, Hadaschik BA, So AI, Zoubeidi A, Fazli L, Hurtado-Coll A, et al. Clusterin knockdown using the antisense oligonucleotide OGX-011 re-sensitizes docetaxel-refractory prostate cancer PC-3 cells to chemotherapy. BJU Int. 2008 août;102(3):389-397.
231. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. Annals of Oncology. 2009 janv 1;20(1):84 -90.
232. Wong YC, Wang YZ. Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. Int. Rev. Cytol. 2000;199:65-116.
233. Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Gaddipati JP, Weghorst CM, Buzard GS, Moul JW, et

al. Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer. J. Urol. 1995 août;154(2 Pt 1):414-421.
234. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annu. Rev. Biochem. 2001;70:369-413.
235. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. J. Biol. Chem. 1985 nov 25;260(27):14873-14878.
236. Ulukan H, Swaan PW. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential. Drugs. 2002;62(14):2039-2057.
237. Smith IE. Mitoxantrone (novantrone): a review of experimental and early clinical studies. Cancer Treat. Rev. 1983 juin;10(2):103-115.
238. Duthie SJ, Grant MH. The role of reductive and oxidative metabolism in the toxicity of mitoxantrone, adriamycin and menadione in human liver derived Hep G2 hepatoma cells. Br. J. Cancer. 1989 oct;60(4):566-571.
239. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. Oncogene. 2003 oct 20;22(47):7280-7295.
240. Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2002 janv;2(1):1-17.
241. Gelmon K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. Lancet. 1994 nov 5;344(8932):1267-1272.
242. Guéritte F. General and recent aspects of the chemistry and structure-activity relationships of taxoids. Curr. Pharm. Des. 2001 sept;7(13):1229-1249.
243. Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. J. Clin. Oncol. 2006 nov 1;24(31):4991-4997.
244. Bernard-Marty C, Cardoso F, Piccart MJ. Use and abuse of taxanes in the management of metastatic breast cancer. Eur. J. Cancer. 2003 sept;39(14):1978-1989.
245. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, Moiseyenko V, Ayoub J-P, Cervantes G, et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. J. Clin. Oncol. 2002 juin 15;20(12):2812-2823.
246. Fossella FV, Rigas J. The use of docetaxel (Taxotere) in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. Semin. Oncol. 1999 juin;26(3 Suppl 11):9-12.
247. Belani CP. Docetaxel (Taxotere) in combination with platinum-based regimens in non-small cell lung cancer: results and future developments. Semin. Oncol. 1999 juin;26(3 Suppl 10):15-18.
248. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N. Engl. J. Med. 2004 oct 7;351(15):1502-1512.
249. Joly F, Tannock IF. Chemotherapy for patients with hormone-refractory prostate cancer. Ann. Oncol. 2004 nov;15(11):1582-1584.
250. Kingston DGI. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. J. Nat. Prod. 2009 mars 27;72(3):507-515.
251. Michielsen DPJ, Braeckman JG, Denis L. Cabazitaxel for the treatment of prostate cancer. Expert Opin Pharmacother. 2011 avr;12(6):977-982.

252. Madan RA, Pal SK, Sartor O, Dahut WL. Overcoming chemotherapy resistance in prostate cancer. Clin. Cancer Res. 2011 juin 15;17(12):3892-3902.
253. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. J. Natl. Cancer Inst. 1990 août 1;82(15):1247-1259.
254. Dutcher SK. The tubulin fraternity: alpha to eta. Curr. Opin. Cell Biol. 2001 févr;13(1):49-54.
255. Miyamoto DT, Perlman ZE, Mitchison TJ, Shirasu-Hiza M. Dynamics of the mitotic spindle--potential therapeutic targets. Prog Cell Cycle Res. 2003;5:349-360.
256. Mandelkow EM, Lange G, Jagla A, Spann U, Mandelkow E. Dynamics of the microtubule oscillator: role of nucleotides and tubulin-MAP interactions. EMBO J. 1988 févr;7(2):357-365.
257. Löwe J, Li H, Downing KH, Nogales E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 A resolution. J. Mol. Biol. 2001 nov 9;313(5):1045-1057.
258. Ravelli RBG, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. Nature. 2004 mars 11;428(6979):198-202.
259. Tilney LG, Bryan J, Bush DJ, Fujiwara K, Mooseker MS, Murphy DB, et al. Microtubules: evidence for 13 protofilaments. J. Cell Biol. 1973 nov;59(2 Pt 1):267-275.
260. Downing KH, Nogales E. Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. Cell Struct. Funct. 1999 oct;24(5):269-275.
261. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat. Rev. Cancer. 2004 avr;4(4):253-265.
262. Heald R, Nogales E. Microtubule dynamics. J. Cell. Sci. 2002 janv 1;115(Pt 1):3-4.
263. Hyman AA, Karsenti E. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. Cell. 1996 févr 9;84(3):401-410.
264. Honore S, Pasquier E, Braguer D. Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. Cell. Mol. Life Sci. 2005 déc;62(24):3039-3056.
265. Fan J, Griffiths AD, Lockhart A, Cross RA, Amos LA. Microtubule minus ends can be labelled with a phage display antibody specific to alpha-tubulin. J. Mol. Biol. 1996 juin 14;259(3):325-330.
266. Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, et al. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. J. Cell Biol. 1988 oct;107(4):1437-1448.
267. Jánosi IM, Chrétien D, Flyvbjerg H. Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state. Biophys. J. 2002 sept;83(3):1317-1330.
268. Kim H, Binder LI, Rosenbaum JL. The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. J. Cell Biol. 1979 févr;80(2):266-276.
269. Verde F, Dogterom M, Stelzer E, Karsenti E, Leibler S. Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in Xenopus egg extracts. J. Cell Biol. 1992 sept;118(5):1097-1108.
270. Yoshida H, Hastie CJ, McLauchlan H, Cohen P, Goedert M. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). J. Neurochem. 2004 juill;90(2):352-358.
271. Cohen PT. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. Trends Biochem. Sci. 1997 juill;22(7):245-251.
272. Maney T, Wagenbach M, Wordeman L. Molecular dissection of the microtubule

depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. J. Biol. Chem. 2001 sept 14;276(37):34753-34758.
273. Manna T, Thrower D, Miller HP, Curmi P, Wilson L. Stathmin strongly increases the minus end catastrophe frequency and induces rapid treadmilling of bovine brain microtubules at steady state in vitro. J. Biol. Chem. 2006 janv 27;281(4):2071-2078.
274. Lüders J, Stearns T. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007 févr;8(2):161-167.
275. Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. Cell. 1986 mai 9;45(3):329-342.
276. Rusan NM, Fagerstrom CJ, Yvon AM, Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. Mol. Biol. Cell. 2001 avr;12(4):971-980.
277. Mitchison TJ, Salmon ED. Mitosis: a history of division. Nat. Cell Biol. 2001 janv;3(1):E17-21.
278. Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2005 janv;5(1):65-71.
279. Rao S, Orr GA, Chaudhary AG, Kingston DG, Horwitz SB. Characterization of the taxol binding site on the microtubule. 2-(m-Azidobenzoyl)taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of beta-tubulin. J. Biol. Chem. 1995 sept 1;270(35):20235-20238.
280. Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, Nogales E. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001 avr 24;98(9):5312-5316.
281. Díaz JF, Valpuesta JM, Chacón P, Diakun G, Andreu JM. Changes in microtubule protofilament number induced by Taxol binding to an easily accessible site. Internal microtubule dynamics. J. Biol. Chem. 1998 déc 11;273(50):33803-33810.
282. Braakhuis BJ, Hill BT, Dietel M, Kelland LR, Aapro MS, Zoli W, et al. In vitro antiproliferative activity of docetaxel (Taxotere), paclitaxel (Taxol) and cisplatin against human tumour and normal bone marrow cells. Anticancer Res. 1994 févr;14(1A):205-208.
283. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. Br. J. Cancer. 1993 déc;68(6):1104-1109.
284. Kolfschoten GM, Hulscher TM, Duyndam MCA, Pinedo HM, Boven E. Variation in the kinetics of caspase-3 activation, Bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. Biochem. Pharmacol. 2002 févr 15;63(4):733-743.
285. Haldar S, Basu A, Croce CM. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. Cancer Res. 1997 janv 15;57(2):229-233.
286. Rieder CL, Maiato H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. Dev. Cell. 2004 nov;7(5):637-651.
287. Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. Mol. Cancer Ther. 2005 oct;4(10):1495-1504.
288. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene. 0000;23(16):2825-2837.
289. Hernández-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G. Telling cells how to die: docetaxel therapy in cancer cell lines. Cell Cycle. 2007 avr 1;6(7):780-783.

290. Kops GJPL, Weaver BAA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. Nat. Rev. Cancer. 2005 oct;5(10):773-785.
291. Wonsey DR, Follettie MT. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. Cancer Res. 2005 juin 15;65(12):5181-5189.
292. Ho C-Y, Wong C-H, Li H-Y. Perturbation of the chromosomal binding of RCC1, Mad2 and survivin causes spindle assembly defects and mitotic catastrophe. J. Cell. Biochem. 2008 oct 15;105(3):835-846.
293. Kline-Smith SL, Walczak CE. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. Mol. Cell. 2004 août 13;15(3):317-327.
294. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell Death Differ. 2008 avr 11;15(7):1153-1162.
295. Cogswell JP, Brown CE, Bisi JE, Neill SD. Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. Cell Growth Differ. 2000 déc;11(12):615-623.
296. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. Nature. 1996 juin 20;381(6584):713-716.
297. POMERAT CM, KENT SP, LOGIE LC. Irradiation of cells in tissue culture. I. Giant cell induction in strain cultures versus elements from primary explants. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1957;47(2):158-174.
298. Mansilla S, Priebe W, Portugal J. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. Cell Cycle. 2006 janv;5(1):53-60.
299. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. J. Natl. Cancer Inst. 2007 oct 3;99(19):1441-1454.
300. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. Nat. Rev. Cancer. 2010 janv;10(1):9-22.
301. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. Nat. Rev. Cancer. 2004 juin;4(6):437-447.
302. Primeau AJ, Rendon A, Hedley D, Lilge L, Tannock IF. The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. Clin. Cancer Res. 2005 déc 15;11(24 Pt 1):8782-8788.
303. Heldin C-H, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. Nat. Rev. Cancer. 2004 oct;4(10):806-813.
304. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene. 2010 févr 4;29(5):625-634.
305. Maitland NJ, Collins AT. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. J. Clin. Oncol. 2008 juin 10;26(17):2862-2870.
306. Komiya A, Suzuki H, Imamoto T, Kamiya N, Nihei N, Naya Y, et al. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. Int. J. Urol. 2009 janv;16(1):37-44.
307. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. Nat. Rev. Cancer. 2009 sept;9(9):665-674.
308. Kobayashi H, Man S, Graham CH, Kapitain SJ, Teicher BA, Kerbel RS. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993 avr 15;90(8):3294-3298.
309. Qian DZ, Rademacher BLS, Pittsenbarger J, Huang C-Y, Myrthue A, Higano CS, et al. CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-

induced cytotoxicity. Prostate. 2010 mars 1;70(4):433-442.
310. Rosanò L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Lucidi A, et al. Acquisition of Chemoresistance and EMT Phenotype Is Linked with Activation of the Endothelin A Receptor Pathway in Ovarian Carcinoma Cells. Clinical Cancer Research. 2011 avr 15;17(8):2350 -2360.
311. Gonzalez-Garay ML, Chang L, Blade K, Menick DR, Cabral F. A beta-tubulin leucine cluster involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance. J. Biol. Chem. 1999 août 20;274(34):23875-23882.
312. Berrieman HK, Lind MJ, Cawkwell L. Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? Lancet Oncol. 2004 mars;5(3):158-164.
313. Hari M, Loganzo F, Annable T, Tan X, Musto S, Morilla DB, et al. Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules. Mol. Cancer Ther. 2006 févr;5(2):270-278.
314. Martello LA, Verdier-Pinard P, Shen H-J, He L, Torres K, Orr GA, et al. Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation. Cancer Res. 2003 mars 15;63(6):1207-1213.
315. Monzó M, Rosell R, Sánchez JJ, Lee JS, O'Brate A, González-Larriba JL, et al. Paclitaxel Resistance in Non–Small-Cell Lung Cancer Associated With Beta-Tubulin Gene Mutations. Journal of Clinical Oncology. 1999 juin 1;17(6):1786.
316. Wang Y, O'Brate A, Zhou W, Giannakakou P. Resistance to microtubule-stabilizing drugs involves two events: beta-tubulin mutation in one allele followed by loss of the second allele. Cell Cycle. 2005 déc;4(12):1847-1853.
317. Cabral F, Wible L, Brenner S, Brinkley BR. Taxol-requiring mutant of Chinese hamster ovary cells with impaired mitotic spindle assembly. J. Cell Biol. 1983 juill;97(1):30-39.
318. Wang Y, Yin S, Blade K, Cooper G, Menick DR, Cabral F. Mutations at leucine 215 of beta-tubulin affect paclitaxel sensitivity by two distinct mechanisms. Biochemistry. 2006 janv 10;45(1):185-194.
319. Sale S, Sung R, Shen P, Yu K, Wang Y, Duran GE, et al. Conservation of the class I beta-tubulin gene in human populations and lack of mutations in lung cancers and paclitaxel-resistant ovarian cancers. Mol. Cancer Ther. 2002 janv;1(3):215-225.
320. Warnick CT, Dabbas B, Ford CD, Strait KA. Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. J. Biol. Chem. 2001 juill 20;276(29):27363-27370.
321. Hara T, Ushio K, Nishiwaki M, Kouno J, Araki H, Hikichi Y, et al. A mutation in beta-tubulin and a sustained dependence on androgen receptor signalling in a newly established docetaxel-resistant prostate cancer cell line. Cell Biol. Int. 2010 févr;34(2):177-184.
322. Burkhart CA, Kavallaris M, Band Horwitz S. The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimitotic drugs. Biochim. Biophys. Acta. 2001;1471(2):O1-9.
323. Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics. Cell. Mol. Life Sci. 2001 déc;58(14):2069-2084.
324. Panda D, Miller HP, Banerjee A, Ludueña RF, Wilson L. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994 nov 22;91(24):11358-11362.
325. Derry WB, Wilson L, Khan IA, Luduena RF, Jordan MA. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. Biochemistry. 1997 mars 25;36(12):3554-3562.

326. Hasegawa S, Miyoshi Y, Egawa C, Ishitobi M, Tamaki Y, Monden M, et al. Mutational analysis of the class I beta-tubulin gene in human breast cancer. Int. J. Cancer. 2002 sept 1;101(1):46-51.
327. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. J. Clin. Invest. 1997 sept 1;100(5):1282-1293.
328. Nicoletti MI, Valoti G, Giannakakou P, Zhan Z, Kim JH, Lucchini V, et al. Expression of beta-tubulin isotypes in human ovarian carcinoma xenografts and in a sub-panel of human cancer cell lines from the NCI-Anticancer Drug Screen: correlation with sensitivity to microtubule active agents. Clin. Cancer Res. 2001 sept;7(9):2912-2922.
329. Sève P, Dumontet C. β-tubuline de classe III et cancer du poumon non à petites cellules. Revue des Maladies Respiratoires. 2010;27(4):383-386.
330. Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, Lord RVN, Bepler G, Novello S, et al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. Oncogene. 2003 juin 5;22(23):3548-3553.
331. Sève P, Isaac S, Trédan O, Souquet P-J, Pachéco Y, Pérol M, et al. Expression of class III {beta}-tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy. Clin. Cancer Res. 2005 août 1;11(15):5481-5486.
332. Liu B, Staren E, Iwamura T, Appert H, Howard J. Taxotere resistance in SUIT Taxotere resistance in pancreatic carcinoma cell line SUIT 2 and its sublines. World J. Gastroenterol. 2001 déc;7(6):855-859.
333. Laing N, Dahllöf B, Hartley-Asp B, Ranganathan S, Tew KD. Interaction of estramustine with tubulin isotypes. Biochemistry. 1997 janv 28;36(4):871-878.
334. Magi-Galluzzi C, Zhou M, Reuther AM, Dreicer R, Klein EA. Neoadjuvant docetaxel treatment for locally advanced prostate cancer: a clinicopathologic study. Cancer. 2007 sept 15;110(6):1248-1254.
335. Egevad L, Valdman A, Wiklund NP, Sève P, Dumontet C. Beta-tubulin III expression in prostate cancer. Scand. J. Urol. Nephrol. 2010 déc;44(6):371-377.
336. Ranganathan S, McCauley RA, Dexter DW, Hudes GR. Modulation of endogenous beta-tubulin isotype expression as a result of human beta(III)cDNA transfection into prostate carcinoma cells. Br. J. Cancer. 2001 sept 1;85(5):735-740.
337. Ferrandina G, Zannoni GF, Martinelli E, Paglia A, Gallotta V, Mozzetti S, et al. Class III beta-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. Clin. Cancer Res. 2006 mai 1;12(9):2774-2779.
338. Gan PP, Pasquier E, Kavallaris M. Class III beta-tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer. Cancer Res. 2007 oct 1;67(19):9356-9363.
339. Pryer NK, Walker RA, Skeen VP, Bourns BD, Soboeiro MF, Salmon ED. Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy. J. Cell. Sci. 1992 déc;103 (Pt 4):965-976.
340. Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. J. Cell Biol. 2002 juin 24;157(7):1187-1196.
341. Mimori K, Sadanaga N, Yoshikawa Y, Ishikawa K, Hashimoto M, Tanaka F, et al. Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful

Paclitaxel treatment. Br. J. Cancer. 2006 juin 19;94(12):1894-1897.
342. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005 juin 7;102(23):8315-8320.
343. Andre F, Hatzis C, Anderson K, Sotiriou C, Mazouni C, Mejia J, et al. Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. Clin. Cancer Res. 2007 avr 1;13(7):2061-2067.
344. Poruchynsky MS, Giannakakou P, Ward Y, Bulinski JC, Telford WG, Robey RW, et al. Accompanying protein alterations in malignant cells with a microtubule-polymerizing drug-resistance phenotype and a primary resistance mechanism. Biochem. Pharmacol. 2001 déc 1;62(11):1469-1480.
345. Zhang CC, Yang JM, White E, Murphy M, Levine A, Hait WN. The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells. Oncogene. 1998 mars 26;16(12):1617-1624.
346. Murphy M, Hinman A, Levine AJ. Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein. Genes Dev. 1996 déc 1;10(23):2971-2980.
347. Mistry SJ, Bank A, Atweh GF. Targeting stathmin in prostate cancer. Mol. Cancer Ther. 2005 déc;4(12):1821-1829.
348. Alli E, Bash-Babula J, Yang J-M, Hait WN. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer. Cancer Res. 2002 déc 1;62(23):6864-6869.
349. Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, Wallenstein S, Atweh GF. Effects of stathmin inhibition on the mitotic spindle. J. Cell. Sci. 2001 mars;114(Pt 5):909-916.
350. Friedrich B, Grönberg H, Landström M, Gullberg M, Bergh A. Differentiation-stage specific expression of oncoprotein 18 in human and rat prostatic adenocarcinoma. Prostate. 1995 août;27(2):102-109.
351. Mistry SJ, Atweh GF. Therapeutic interactions between stathmin inhibition and chemotherapeutic agents in prostate cancer. Mol. Cancer Ther. 2006 déc;5(12):3248-3257.
352. Zhou S-F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. Xenobiotica. 2008 juill;38(7-8):802-832.
353. Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. J. Natl. Cancer Inst. 1997 juill 2;89(13):917-931.
354. Bhangal, Halford, Wang, Roylance, Shah, Waxman. Expression of the multidrug resistance gene in human prostate cancer. Urol. Oncol. 2000 avr 1;5(3):118-121.
355. Makarovskiy AN, Siryaporn E, Hixson DC, Akerley W. Survival of docetaxel-resistant prostate cancer cells in vitro depends on phenotype alterations and continuity of drug exposure. Cell. Mol. Life Sci. 2002 juill;59(7):1198-1211.
356. Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation. Curr Opin Oncol. 2000 sept;12(5):450-458.
357. Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. Nat. Med. 1997 nov;3(11):1228-1232.
358. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. J. Pathol. 2005 janv;205(2):275-292.

359. Bhalla KN. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. Oncogene. 2003 déc 8;22(56):9075-9086.
360. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ. 2003 janv;10(1):26-35.
361. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu. Rev. Biochem. 2000;69:217-245.
362. Longley DB, Wilson TR, McEwan M, Allen WL, McDermott U, Galligan L, et al. c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death. Oncogene. 2006 févr 9;25(6):838-848.
363. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. Cell. 2000 juill 7;102(1):1-4.
364. Ségal-Bendirdjian E, Dudognon C, Mathieu J, Hillion J, Besançon F. [Cell death signalling: recent advances and therapeutic application]. Bull Cancer. 2005 janv;92(1):23-35.
365. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev. 2001 nov 15;15(22):2922-2933.
366. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. Genes Dev. 1999 déc 15;13(24):3179-3184.
367. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. Cancer Res. 2004 oct 15;64(20):7183-7190.
368. Kaufmann SH, Karp JE, Svingen PA, Krajewski S, Burke PJ, Gore SD, et al. Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. Blood. 1998 févr 1;91(3):991-1000.
369. Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. Cancer Res. 1996 mars 15;56(6):1253-1255.
370. Yoshino T, Shiina H, Urakami S, Kikuno N, Yoneda T, Shigeno K, et al. Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy. Clin. Cancer Res. 2006 oct 15;12(20 Pt 1):6116-6124.
371. Meijerink JP, Mensink EJ, Wang K, Sedlak TW, Slöetjes AW, de Witte T, et al. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. Blood. 1998 avr 15;91(8):2991-2997.
372. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002 juin;3(6):401-410.
373. Xia F, Altieri DC. Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53. Cancer Res. 2006 avr 1;66(7):3392-3395.
374. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. J. Biol. Chem. 2004 août 13;279(33):34087-34090.
375. Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 2003 juin 20;278(25):23130-23140.
376. Romagnoli M, Séveno C, Bataille R, Barillé-Nion S. [Survivin in cancerology : molecular aspects and therapeutic applications]. Med Sci (Paris). 2008 oct;24(10):821-827.
377. Zhang M, Mukherjee N, Bermudez RS, Latham DE, Delaney MA, Zietman AL, et al. Adenovirus-mediated inhibition of survivin expression sensitizes human prostate cancer cells to paclitaxel in vitro and in vivo. Prostate. 2005 août 1;64(3):293-302.
378. Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, et al. Expression of the

anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. Cell. Mol. Life Sci. 2002 août;59(8):1406-1412.
379. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N. Engl. J. Med. 2004 déc 30;351(27):2817-2826.
380. Zhang M, Latham DE, Delaney MA, Chakravarti A. Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. Oncogene. 2005 avr 7;24(15):2474-2482.
381. Fujie Y, Yamamoto H, Ngan CY, Takagi A, Hayashi T, Suzuki R, et al. Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. Jpn. J. Clin. Oncol. 2005 août;35(8):453-463.
382. Carrasco RA, Stamm NB, Marcusson E, Sandusky G, Iversen P, Patel BKR. Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic. Mol. Cancer Ther. 2011 févr;10(2):221-232.
383. Wang TH, Popp DM, Wang HS, Saitoh M, Mural JG, Henley DC, et al. Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent pathways in ovarian cancer cells. J. Biol. Chem. 1999 mars 19;274(12):8208-8216.
384. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. Mol. Cell. Biol. 1999 déc;19(12):8469-8478.
385. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Biochim. Biophys. Acta. 2007 août;1773(8):1263-1284.
386. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat. Rev. Cancer. 2002 juill;2(7):489-501.
387. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. Leukemia. 2003 mars;17(3):590-603.
388. Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M, et al. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. Anticancer Res. 2000 févr;20(1A):407-416.
389. Hu L, Hofmann J, Lu Y, Mills GB, Jaffe RB. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. Cancer Res. 2002 févr 15;62(4):1087-1092.
390. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer Treat. Rev. 2004 avr;30(2):193-204.
391. Lu Y, Lin YZ, LaPushin R, Cuevas B, Fang X, Yu SX, et al. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. Oncogene. 1999 nov 25;18(50):7034-7045.
392. Wu Z, McRoberts KS, Theodorescu D. The role of PTEN in prostate cancer cell tropism to the bone micro-environment. Carcinogenesis. 2007 juill;28(7):1393-1400.
393. Lin A, Karin M. NF-kappaB in cancer: a marked target. Semin. Cancer Biol. 2003 avr;13(2):107-114.
394. Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, Lai GM, Liao CM, Gao M, et al. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. Biochem. Pharmacol. 2002 mai 1;63(9):1709-1716.

395. Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T, et al. Inhibition of inhibitor of nuclear factor-kappaB phosphorylation increases the efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. Clin. Cancer Res. 2004 nov 15;10(22):7645-7654.
396. Dong QG, Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, Peng B, Wu T, et al. The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. Oncogene. 2002 sept 19;21(42):6510-6519.
397. Labbé JC, Capony JP, Caput D, Cavadore JC, Derancourt J, Kaghad M, et al. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. EMBO J. 1989 oct;8(10):3053-3058.
398. Fesquet D, Labbé JC, Derancourt J, Capony JP, Galas S, Girard F, et al. The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. EMBO J. 1993 août;12(8):3111-3121.
399. Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. Cell. 1994 août 26;78(4):713-724.
400. Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG. Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. Mol. Biol. Cell. 1995 janv;6(1):119-134.
401. Bulavin DV, Demidenko ZN, Phillips C, Moody SA, Fornace AJ Jr. Phosphorylation of Xenopus Cdc25C at Ser285 interferes with ability to activate a DNA damage replication checkpoint in pre-midblastula embryos. Cell Cycle. 2003 juin;2(3):263-266.
402. Bulavin DV, Higashimoto Y, Demidenko ZN, Meek S, Graves P, Phillips C, et al. Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. Nat. Cell Biol. 2003 juin;5(6):545-551.
403. Peter M, Nakagawa J, Dorée M, Labbé JC, Nigg EA. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. Cell. 1990 mai 18;61(4):591-602.
404. Zachariae W, Nasmyth K. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. Genes Dev. 1999 août 15;13(16):2039-2058.
405. Baldassarre G, Croce CM, Vecchione A. Take your « M » time. Cell Cycle. 2007 sept 1;6(17):2087-2090.
406. Vecchione A, Baldassarre G, Ishii H, Nicoloso MS, Belletti B, Petrocca F, et al. Fez1/Lzts1 absence impairs Cdk1/Cdc25C interaction during mitosis and predisposes mice to cancer development. Cancer Cell. 2007 mars;11(3):275-289.
407. Tsichlis PN, Hatziapostolou M, Hinds PW. Timing is everything: regulation of Cdk1 and aneuploidy. Dev. Cell. 2007 avr;12(4):477-479.
408. Zachariae W, Shevchenko A, Andrews PD, Ciosk R, Galova M, Stark MJ, et al. Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. Science. 1998 févr 20;279(5354):1216-1219.
409. Lorca T, Castro A, Martinez AM, Vigneron S, Morin N, Sigrist S, et al. Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in Xenopus egg extracts. EMBO J. 1998 juill 1;17(13):3565-3575.
410. Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbé J-C, Lorca T. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. Oncogene. 2005 janv 13;24(3):314-325.
411. Hagting A, Den Elzen N, Vodermaier HC, Waizenegger IC, Peters J-M, Pines J. Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C

switches from activation by Cdc20 to Cdh1. J. Cell Biol. 2002 juin 24;157(7):1125-1137.
412. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. Science. 1994 déc 16;266(5192):1821-1828.
413. Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. Curr. Opin. Cell Biol. 2006 avr;18(2):185-191.
414. Hermeking H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. Semin. Cancer Biol. 2006 juin;16(3):183-192.
415. Smits VA, Klompmaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg EA, Medema RH. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. Nat. Cell Biol. 2000 sept;2(9):672-676.
416. van Vugt MA, Smits VA, Klompmaker R, Medema RH. Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. J. Biol. Chem. 2001 nov 9;276(45):41656-41660.
417. Fletcher L, Cheng Y, Muschel RJ. Abolishment of the Tyr-15 inhibitory phosphorylation site on cdc2 reduces the radiation-induced G(2) delay, revealing a potential checkpoint in early mitosis. Cancer Res. 2002 janv 1;62(1):241-250.
418. Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C, Ducommun B. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. Cell Cycle. 2005 sept;4(9):1233-1238.
419. Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, Froment C, Trabut V, Dozier C, et al. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. J. Cell. Sci. 2004 mai 15;117(Pt 12):2523-2531.
420. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. Oncogene. 2001 avr 5;20(15):1803-1815.
421. Smits VA, Klompmaker R, Vallenius T, Rijksen G, Mäkela TP, Medema RH. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. J. Biol. Chem. 2000 sept 29;275(39):30638-30643.
422. Fang G, Yu H, Kirschner MW. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. Genes Dev. 1998 juin 15;12(12):1871-1883.
423. Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. J. Cell Biol. 2001 sept 3;154(5):925-936.
424. Dai W, Wang Q, Liu T, Swamy M, Fang Y, Xie S, et al. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. Cancer Res. 2004 janv 15;64(2):440-445.
425. Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, et al. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. Nature. 2001 janv 18;409(6818):355-359.
426. Kienitz A, Vogel C, Morales I, Müller R, Bastians H. Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. Oncogene. 2005 juin 16;24(26):4301-4310.
427. Sudo T, Nitta M, Saya H, Ueno NT. Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. Cancer Res. 2004 avr 1;64(7):2502-2508.
428. Xu K, Wang X, Xue W, Wang X, Hou S. [Expressions of MAD2 and p55CDC in prostate cancer and their correlations with the prostate cancer grading]. Beijing Da Xue

Xue Bao. 2003 déc 18;35(6):586-590.
429. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, et al. Analysis of human transcriptomes. Nat. Genet. 1999 déc;23(4):387-388.
430. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. J. Cell. Sci. 2002 févr 1;115(Pt 3):575-585.
431. Lens SMA, Wolthuis RMF, Klompmaker R, Kauw J, Agami R, Brummelkamp T, et al. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. EMBO J. 2003 juin 16;22(12):2934-2947.
432. Lens SMA, Medema RH. The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. Cell Cycle. 2003 déc;2(6):507-510.
433. Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan Z-M, Bondaruk J, Suzuki F, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. Nat. Genet. 2004 janv;36(1):55-62.
434. Noguchi S. Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. Cancer Sci. 2006 sept;97(9):813-820.
435. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 1997 févr 7;88(3):323-331.
436. Navone NM, Labate ME, Troncoso P, Pisters LL, Conti CJ, von Eschenbach AC, et al. p53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. J. Urol. 1999 janv;161(1):304-308.
437. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, et al. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 1993 oct 20;85(20):1657-1669.
438. Woods CM, Zhu J, McQueney PA, Bollag D, Lazarides E. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. Mol. Med. 1995 juill;1(5):506-526.
439. Debernardis D, Siré EG, De Feudis P, Vikhanskaya F, Valenti M, Russo P, et al. p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. Cancer Res. 1997 mars 1;57(5):870-874.
440. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. Cancer Res. 1996 févr 15;56(4):892-898.
441. Vikhanskaya F, Vignati S, Beccaglia P, Ottoboni C, Russo P, D'Incalci M, et al. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. Exp. Cell Res. 1998 mai 25;241(1):96-101.
442. Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. Cancer. 2000 juin 1;88(11):2619-2628.
443. Strobel T, Kraeft SK, Chen LB, Cannistra SA. BAX expression is associated with enhanced intracellular accumulation of paclitaxel: a novel role for BAX during chemotherapy-induced cell death. Cancer Res. 1998 nov 1;58(21):4776-4781.
444. Gualberto A, Aldape K, Kozakiewicz K, Tlsty TD. An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998 avr 28;95(9):5166-5171.
445. Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M, Gatti L, Perego P, Bresciani G, et al. p53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. J. Clin. Oncol. 2000 déc 1;18(23):3936-3945.

446. Schmidt M, Bachhuber A, Victor A, Steiner E, Mahlke M, Lehr HA, et al. p53 expression and resistance against paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2003 mai;129(5):295-302.
447. Cabeza-Arvelaiz Y, Sepulveda JL, Lebovitz RM, Thompson TC, Chinault AC. Functional identification of LZTS1 as a candidate prostate tumor suppressor gene on human chromosome 8p22. Oncogene. 2001 juill 12;20(31):4169-4179.
448. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell. 2010 juill 13;18(1):11-22.
449. Han S, Park K, Shin E, Kim H-J, Kim JY, Kim JY, et al. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. Oncol. Rep. 2010 juill;24(1):121-128.
450. Vecchione A, Croce CM, Baldassarre G. Fez1/Lzts1 a new mitotic regulator implicated in cancer development. Cell Div. 2007;2:24.
451. Vecchione A, Ishii H, Shiao YH, Trapasso F, Rugge M, Tamburrino JF, et al. Fez1/lzts1 alterations in gastric carcinoma. Clin. Cancer Res. 2001 juin;7(6):1546-1552.
452. Onken MD, Worley LA, Harbour JW. A metastasis modifier locus on human chromosome 8p in uveal melanoma identified by integrative genomic analysis. Clin. Cancer Res. 2008 juin 15;14(12):3737-3745.
453. Chen L, Zhu Z, Sun X, Dong X-Y, Wei J, Gu F, et al. Down-regulation of tumor suppressor gene FEZ1/LZTS1 in breast carcinoma involves promoter methylation and associates with metastasis. Breast Cancer Res. Treat. 2009 août;116(3):471-478.
454. Nonaka D, Fabbri A, Roz L, Mariani L, Vecchione A, Moore GW, et al. Reduced FEZ1/LZTS1 expression and outcome prediction in lung cancer. Cancer Res. 2005 févr 15;65(4):1207-1212.
455. Hawkins GA, Mychaleckyj JC, Zheng SL, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, et al. Germline sequence variants of the LZTS1 gene are associated with prostate cancer risk. Cancer Genet. Cytogenet. 2002 août;137(1):1-7.

European patent deposition EP 08 305 634.1

Europäisches Patentamt | European Patent Office | Office européen des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000038465	
Application number	EP08305634.1	
File No. to be used for priority declarations	EP08305634	
Date of receipt	02 October 2008	
Your reference	B767EP	
Applicant	INSTITUT GUSTAVE ROUSSY	
Country	FR	
Title	METHODS FOR PREDICTING OR MONITORING WHETHER A PATIENT AFFECTED BY A CANCER IS RESPONSIVE TO A TREATMENT WITH A MOLECULE OF THE TAXOID FAMILY	
Documents submitted	package-data.xml	ep-request.pdf (6 p.)
	ep-request.xml	application-body.xml
	SPECEPO.pdf\B767EP description.pdf (54 p.)	DRAW.pdf\B767EP figure.pdf (5 p.)
	F1002-1.pdf (1 p.)	F1002-2.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=V. Gallois 7632,O=Cabinet Becker & Associés,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	02 October 2008, 15:44:15 (CEST)	
Official Digest of Submission	7B:C3:60:BD:4B:1F:54:C5:A1:2D:2A:A2:F6:58:87:11:80:60:D6:9A	

/INPI, section dépôt/

European patent deposition EP 09 305 315.5

Europäisches Patentamt | European Patent Office | Office européen des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000051184	
Application number	EP09305315.5	
File No. to be used for priority declarations	EP09305315	
Date of receipt	14 April 2009	
Your reference	B864EP00	
Applicant	INSTITUT GUSTAVE ROUSSY	
Country	FR	
Title	PROSTATE CANCER CELL LINES AND THEIR USE IN SCREENING METHOD	
Documents submitted	package-data.xml	ep-request.xml
	application-body.xml	ep-request.pdf (5 p.)
	SPECEPO.pdf\B864EP Demande.pdf (29 p.)	DRAW.pdf\B864EP Figures.pdf (8 p.)
	BIOM-RECEIPT-1.pdf\B864EP00 Récépissé CNCM.pdf (1 p.)	
Submitted by	CN=V. Gallois 7632,O=Cabinet Becker & Associés,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	14 April 2009, 13:29:23 (CEST)	
Official Digest of Submission	F7:B9:B4:F8:AE:E7:A1:DA:12:8F:26:CA:E0:7C:DA:DF:B5:21:F8:FD	

/INPI, section dépôt/

European patent EP 10305361.7

Europäisches Patentamt | European Patent Office | Office européen des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000076339	
Application number	EP10305361.7	
File No. to be used for priority declarations	EP10305361	
Date of receipt	08 April 2010	
Your reference	B1017EP00	
Applicant	INSTITUT GUSTAVE ROUSSY	
Country	FR	
Title	METHODS FOR PREDICTING OR MONITORING WHETHER A PATIENT AFFECTED BY A CANCER IS RESPONSIVE TO A TREATMENT WITH A MOLECULE OF THE TAXOID FAMILY	
Documents submitted	package-data.xml	ep-request.xml
	application-body.xml	ep-request.pdf (5 p.)
	SPECEPO-1.pdf\B1017EP.pdf (63 p.)	f1002-1.pdf (1 p.)
	f1002-2.pdf (1 p.)	f1002-3.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=V. Gallois 7632,O=Cabinet Becker & Associés,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	08 April 2010, 16:29:54 (CEST)	
Official Digest of Submission	20:5A:BD:88:3B:97:BE:C1:C2:69:97:26:36:6C:87:A6:14:06:2E:22	

/INPI, section dépôt/