

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Rôle de TP53INP1 dans l'histoire naturelle du cancer prostatique

THESE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Le 8 Mars 2012

Par **Mme le Docteur Sophie GIUSIANO-COURCAMBECK**

Née le 16 Avril 1976 à Marseille

Pour obtenir le grade de DOCTEUR en SCIENCES de L'UNIVERSITE
d'AIX-MARSEILLE

Spécialité : Oncologie

Membres du Jury

Mr le Pr ROSSI

Mme le Pr RIOUX-LECLERCQ

Mr le Pr DE LA TAILLE

Mr le Pr MICHIELS

Mr le Dr BENAHMED

Mr le Pr GARCIA

Mme le Dr ROCCHI

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

Co-directrice de Thèse

INSERM U624 « Stress Cellulaire » - Aix-Marseille Université
Parc Scientifique et Technologique de Luminy - Case 915
13288 Marseille cedex 9 - France

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier chaleureusement les membres du Jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Merci au Pr Rossi d'avoir accepté la présidence de ce Jury. Je souhaite que notre collaboration dans le cadre de nos fonctions hospitalières puisse se poursuivre longtemps.

Merci au Pr Rioux-Leclercq et au Pr De la Taille d'avoir accepté la tâche de rapporteurs de ce travail.

Merci au Pr Michiels et au Dr Benahmed pour leur présence dans ce Jury.

Merci au Pr Garcia, mon directeur de Thèse, pour avoir été l'instigateur de ce projet d'étude et pour la confiance qu'il m'a accordée pour la réalisation de cette Thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Dr Palma Rocchi, ma co-directrice de Thèse, pour son encadrement et sa très grande disponibilité à mon égard tant au moment des expériences dans le laboratoire que dans la rédaction de ce manuscrit. Merci de m'avoir fait partager tes connaissances et tes compétences. J'ai apprécié tes conseils toujours précieux et avisés. Merci Palma.

Merci aux autres membres de l'Unité U624, en particulier son directeur Juan Iovanna pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci aux filles de l'équipe de Palma : Virginie, Claudia, Tracy, Yi, Julie... pour leur aide et leurs conseils.

Merci à Marie Noëlle Lavaut pour ses compétences techniques et sa disponibilité.

Merci à mes parents pour leur soutien.

Merci à mon mari pour son aide et surtout sa patience au quotidien.

Et enfin un énorme bisou à ma fille Léa que j'aime tant et qui me comble tous les jours de bonheur.

PUBLICATIONS

Publications servant de support à cette Thèse :

Giusiano S, Garcia S, Andrieu C, Dusetti NJ, Bastide C, Gleave M, Taranger-Charpin C, Iovanna JL, Rocchi P. TP53INP1 overexpression in prostate cancer correlates with poor prognostic factors and is predictive of biological cancer relapse. *Prostate* 2012;72(2):117-28.

Giusiano S, Baylot V, Fazli L, Gleave M, Iovanna JL, Taranger-Charpin C, Garcia S, Rocchi P. TP53INP1 as new therapeutic target in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 2011 Dec 27. doi:10.1002/pros.22477 (sous presse).

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
PUBLICATIONS	2
SOMMAIRE	3
I. Epidémiologie, diagnostic et pronostic du cancer de la prostate	5
1. Epidémiologie	5
a. L'âge	7
b. Les facteurs ethniques et géographiques	10
i) Au niveau international	10
ii) Au niveau européen.....	12
iii) En France	13
c. Les facteurs génétiques	14
i) Formes familiales et héréditaires associées à des mutations rares	15
ii) Formes sporadiques « multifactorielles» et polymorphismes génétiques	16
d. Les facteurs environnementaux.....	19
i) Régime riche en graisses	19
ii) Inflammation	19
2. Diagnostic	19
a. Clinico-biologique	19
b. Anatomopathologique.....	21
i) Rappel de l'histologie de la prostate normale	21
ii) Histopathologie	21
3. Facteurs Pronostiques	25
II. De la phase hormono-sensible à la phase de résistance à la castration	27
1. Initiation de la carcinogenèse prostatique	27
2. Hormono-sensibilité et traitements	28
a. Cancers cliniquement localisés	30
i) Cancer de la prostate localisé à faible risque (T1c, T2a et Gleason ≤ 6 et PSA ≤ 10 ng/ml)	30
ii) Cancer de la prostate localisé à risque intermédiaire (T = T2b ou Gleason = 7 ou PSA = 10-20ng/ml)..	33
.....	33
iii) Cancer de la prostate localisé à haut risque (T \geq T2c ou Gleason ≥ 8 ou PSA > 20 ng/ml).....	33
b. Cancers localement avancés ou métastatiques	34
i) Cancers localement avancés (T3/T4, N0-X, M0).....	34
ii) Cancers avec atteinte ganglionnaire pelvienne (tous T, cN1/pN1, M0).....	34
iii) Cancers métastatiques hormono-sensibles	35
3. Phase de résistance à la castration	36
a. Mécanismes.....	36
i) Hypersensibilité du RA	37
ii) Mutations du RA	37
iii) Activation du RA par les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase	37
iv) Mécanismes indépendants du RA	37
b. Prise en charge	38
i) Chimiothérapie.....	38
ii) Place des thérapies moléculaires ciblées	39
III. TP53INP1 : données fondamentales	44
1. Identification de TP53INP1	44

2. Structure de TP53INP1.....	44
3. Fonctions de TP53INP1	45
a. TP53INP1 dans le cycle cellulaire et l'apoptose.....	45
b. TP53INP1 et p53 : interaction.....	46
i) TP53INP1 est induit par p53.....	46
ii) TP53INP1 active p53 en retour.....	46
iii) Indépendance de p53.....	47
4. Expression de TP53INP1 dans les carcinomes	48
a. TP53INP1 et adénocarcinomes gastriques.....	48
b. TP53INP1 et adénocarcinomes coliques.....	49
c. TP53INP1 et adénocarcinomes pancréatiques.....	50
d. TP53INP1 et carcinomes médullaires de la thyroïde.....	51
NOS OBJECTIFS : étude de l'expression de TP53INP1 en pathologie prostatique.....	52
RESULTATS	54
I. Résultats 1 : prostate normale, inflammatoire et adénocarcinomes prostatiques hormono-sensibles	54
1. Sur lames conventionnelles.....	54
2. Sur TMA : TP53INP1 facteur de mauvais pronostic.....	54
3. Sur lignées cellulaires LNCaP.....	55
4. 1 ^{ère} publication.....	55
5. Valorisation et transfert de technologies.....	56
II. Résultats 2 : adénocarcinomes prostatiques résistants à la castration	57
1. Sur TMA : TP53INP1 lié à l'échappement hormonal.....	57
2. Sur lignées cellulaires C4-2.....	57
3. Sur modèles animaux (souris).....	57
4. 2 ^{ème} publication.....	58
5. Valorisation et transfert de technologies.....	59
CONCLUSION	60
TABLE DES MATIERES.....	62
REFERENCES	64

I. Epidémiologie, diagnostic et pronostic du cancer de la prostate

1. Epidémiologie

A l'heure actuelle en France, avec 71 500 nouveaux cas, le cancer de la prostate (CaP) est le cancer le plus fréquent (tous sexes confondus) se situant devant le cancer du sein (52 500 nouveaux cas), le cancer colo-rectal (40 000 nouveaux cas) et le cancer du poumon (37 000 nouveaux cas) (**Tableau 1**).

Il constitue par ailleurs, avec 8790 décès par an, la 3^{ème} cause de décès par cancer chez l'homme après le cancer du poumon (21 000 décès) et le cancer colo-rectal (9200 décès) (**Tableau 2**).

Localisations	Effectif(*)	Incidence			Mortalité		
		Part	Rang	Effectif	Part	Rang	
Prostate	71 500	20,0	1	8 790	6,0	4	
Sein	52 500	14,7	2	11 500	7,8	3	
Côlon-rectum	40 000	11,2	3	17 400	11,9	2	
Poumon	37 000	10,3	4	28 700	19,6	1	
Lèvre, cavité orale, pharynx	10 990	3,1	5	3 370	2,3	10	
Lymphome malin non hodgkinien	10 830	3,0	6	3 710	2,5	8	
Vessie	10 700	3,0	7	4 670	3,2	5	
Rein	10 510	2,9	8	3 790	2,6	7	
Pancréas	10 140	2,8	9		0,0		
Thyroïde	9 000	2,5	10	380	0,3	20	
Mélanome de la peau	8 250	2,3	11	1 570	1,1	16	
Foie	7 650	2,1	12		0,0		
Corps de l'utérus	6 560	1,8	13	1 900	1,3	15	
Estomac	6 460	1,8	14	4 420	3,0	6	
Myélome multiple et maladie immunoproliférative	5 450	1,5	15	3 000	2,0	13	
Système nerveux central	4 570	1,3	16	2 940	2,0	14	
Ovaire	4 530	1,3	17	3 130	2,1	12	
OEsophage	4 240	1,2	18	3 470	2,4	9	
Leucémie aiguë	3 430	1,0	19	3 140	2,1	11	
Leucémie lymphoïde chronique	3 270	0,9	20	1 060	0,7	17	
Larynx	3 210	0,9	21	1 030	0,7	18	
Col de l'utérus	2 820	0,8	22	940	0,6	19	
Testicule	2 220	0,6	23	87	0,1	22	
Maladie de Hodgkin	1 720	0,5	24	282	0,2	21	
Tous cancers	357 500	100,0		146 500	100,0		

(*) : Effectif total arrondi

Tableau 1 : Classement des cancers par incidence et décès, tous sexes confondus, en France, 2010 (InVs, Inserm, Francim, Hôpitaux de Lyon, INCa).

Localisations	Incidence			Mortalité		
	Effectif(*)	Part	Rang	Effectif	Part	Rang
Prostate	71 500	35,22	1	8790	10,40	3
Poumon	27 000	13,30	2	21 000	24,85	1
Côln-rectum	21 000	10,34	3	9 200	10,89	2
Vessie	8 900	4,38	4	3 510	4,15	4
Lèvre, cavité orale, pharynx	7 900	3,89	5	2 650	3,14	7
Rein	7 000	3,45	6	3 510	4,15	4
Lymphome malin non hodgkinien	5 900	2,91	7	2 010	2,38	8
Foie	5 900	2,91	8		0,00	
Pancréas	5 300	2,61	9		0,00	
Estomac	4 210	2,07	10	2 840	3,36	5
Mélanome de la peau	3 870	1,91	11	870	1,03	14
OEsophage	3 170	1,56	12	2 720	3,22	6
Myélome multiple et maladie immunoproliférative	2 950	1,45	13	1560	1,85	11
Larynx	2 710	1,33	14	890	1,05	13
Système nerveux central	2 550	1,26	15	1 670	1,98	10
Testicule	2 220	1,09	16	87	0,10	17
Thyroïde	2 180	1,07	17	150	0,18	16
Leucémie lymphoïde chronique	2 040	1,00	18	600	0,71	15
Leucémie aiguë	1 840	0,91	19	1 690	2,00	9
Maladie de Hodgkin	820	0,40	20	900	1,07	12
Tous cancers	203 000	100		84 500	100,00	

(*) : Effectif total arrondi

Tableau 2: Classement des cancers par incidence et décès en France chez l'homme, 2010 (InVs, Inserm, Francim, Hôpitaux de Lyon, INCa).

Les principaux facteurs de risque du CaP sont l'âge, l'origine ethnique et géographique, et les antécédents familiaux. D'autres facteurs notamment génétiques et environnementaux peuvent également jouer un rôle dans le développement de ce cancer.

a. L'âge

Le risque de développer un CaP augmente avec l'âge. En effet, l'estimation du nombre de nouveaux cas de CaPs selon l'âge indique une survenue tardive de ce cancer. L'incidence est très faible avant 50 ans, puis augmente progressivement avec l'âge. Ainsi, près de 69 % des CaPs surviennent après 65 ans (**Tableau 3**). L'âge moyen au diagnostic est d'environ 71 ans.

	[00 ; 14]	[15 ; 49]	[50 ; 64]	[65 ; 74]	[75 ; 84]	[85 ; ++]	Total
Incidence	3	386	21 612	26 611	18 399	4 566	71 577
Taux pour 100 000	0,05	2,70	362,61	1135,00	1140,63	880,51	
Mortalité	0	11	572	1 496	3 655	3 057	8 791
Taux pour 100 000	0	0,08	9,60	63,81	226,59	169,80	

Tableau 3 : Nombre de cas et de décès et taux pour 100 000 personnes-années par tranche d'âge du cancer de la prostate en 2010 (InVs, Inserm, Francim, Hôpitaux de Lyon, INCa).

Il existe par ailleurs une augmentation importante du risque d'avoir un cancer diagnostiqué au cours de sa vie chez les cohortes de naissances les plus jeunes. En effet, le risque pour un homme d'être atteint de ce cancer avant 75 ans augmente considérablement avec la cohorte de naissance. Chez les hommes nés en 1940, le risque atteint 18,6 % soit un risque environ 7 fois plus élevé que celui des hommes nés en 1910. On rappellera par ailleurs qu'il faut ajouter au nombre de cas cliniquement diagnostiqués, celui des cancers latents, microscopiques ou infra-cliniques, beaucoup plus fréquents, et pour lesquels on ne peut faire que des approximations à partir d'études autopsiques par tranches d'âge. Ainsi, environ 20% des autopsies réalisées chez les personnes de plus de 45 ans, de sexe masculin, retrouvent des lésions cancéreuses prostatiques (80% chez les hommes de plus de 80 ans).

Le risque de décès par CaP entre 0-74 ans est faible quelle que soit la cohorte de naissance. Ce risque diminue régulièrement des cohortes les plus anciennes aux plus récentes, passant de 1,4 % pour les hommes nés en 1910 à 0,8 % pour ceux nés en 1940, soit une diminution de presque 50 % entre ces deux cohortes. Plus de 3 décès sur 4 ont lieu après 75 ans (**Tableau 4**). Sur la période 2003-2007, l'âge médian au décès est de 80 ans.

Localisations	Effectif(*)	%	Âge en années													
			[00 ; 14]	%	[15 ; 49]	%	[50-64]	%	[65-74]	%	[75-84]	%	[85 ; ++]	%	[65 ; ++]	%
Prostate	8 790	6,0	0	0,0	11	0,1	572	6,5	1 496	17,0	3 655	41,6	3 057	34,8	8 208	93,4
Sein	11 500	7,8	0	0,0	1 075	9,3	3 038	26,4	2 081	18,1	2 777	24,1	2 318	20,2	7 176	62,4
Côlon-rectum	17 400	11,9	0	0,0	431	2,5	2 828	16,3	3 346	19,2	6 025	34,6	4764	27,4	14 135	81,2
Poumon	28 700	19,6	0	0,0	1 525	5,3	10 407	36,3	7 231	25,2	7 125	24,8	2582	9,0	16 938	59,0
Lèvre, cavité orale, pharynx	3 370	2,3	0	0,0	288	8,5	1 554	46,1	689	20,4	577	17,1	259	7,7	1525	45,3
Lymphome malin non hodgkinien	3 710	2,5	5	0,1	151	4,1	569	15,3	746	20,1	1 339	36,1	894	24,1	2979	80,3
Vessie	4 670	3,2	0	0,0	19	0,4	112	2,4	147	3,1	390	8,4	489	10,5	1 026	22,0
Rein	3 790	2,6	6	0,2	141	3,7	762	20,1	827	21,8	1 270	33,5	782	20,6	2 879	76,0
Thyroïde	380	0,3	0	0,0	14	3,7	64	16,8	72	18,9	132	34,7	98	25,8	302	79,5
Mélanome de la peau	1 570	1,1	0	0,0	218	13,9	389	24,8	302	19,2	395	25,2	262	16,7	959	61,1
Corps de l'utérus	1 900	1,3	0	0,0	25	1,3	336	17,7	431	22,7	647	34,1	461	24,3	959	50,5
Estomac	4 420	3,0	0	0,0	235	5,3	861	19,5	887	20,1	1 421	32,1	1012	22,9	3 320	75,1
Myélome multiple et maladie immunoproliférative	3 000	2,0	0	0,0	39	1,3	393	13,1	633	21,1	1170	39,0	771	17,4	2 574	85,8
Système nerveux central	2 940	2,0	92	3,1	427	14,5	939	31,9	670	22,8	595	20,2	217	7,4	1 482	50,4
Ovaire	3 130	2,1	0	0,0	143	4,6	698	22,3	688	22,0	975	31,2	629	20,1	2 292	73,2
OEsophage	3 470	2,4	0	0,0	129	3,7	1 227	35,4	831	23,9	892	25,7	389	11,2	2 112	60,9
Leucémie aiguë	3 140	2,1	52	1,7	270	8,6	474	15,1	631	20,1	1 084	34,5	630	20,1	2 345	74,7
Leucémie lymphoïde chronique	1 060	0,7	0	0,0	6	0,6	90	8,5	178	16,8	413	39,0	379	35,8	970	91,5
Larynx	1 030	0,7	0	0,0	54	5,2	423	41,1	236	22,9	226	21,9	88	8,5	550	53,4
Col de l'utérus	940	0,6	0	0,0	224	23,8	293	31,2	109	11,6	151	16,1	164	17,4	424	45,1
Testicule	87	0,1	0	0,0	46	52,9	16	18,4	8	9,2	10	11,5	7	8,0	25	28,7
Maladie de Hodgkin	282	0,2	0	0,0	72	25,5	59	20,9	46	16,3	71	25,2	38	13,5	155	55,0
Tous cancers	146 500	100,0	202	0,1	7 119	4,9	34 827	23,8	31 122	21,2	44 478	30,4	29 067	19,8	104 667	71,4

(*) : Effectif total arrondi

Tableau 4 : Décès estimés et part dans la mortalité des cancers par localisation et par tranches d'âge, tous sexes confondus en France en 2010 (InVs, Inserm, Francim, Hôpitaux de Lyon, INCa).

b. Les facteurs ethniques et géographiques

Les données issues des différents registres disponibles (**Globocan, Observatoire européen du cancer...**) montrent qu'il existe une variation des taux de prévalence et d'incidence du CaP selon les pays et l'origine ethnique.

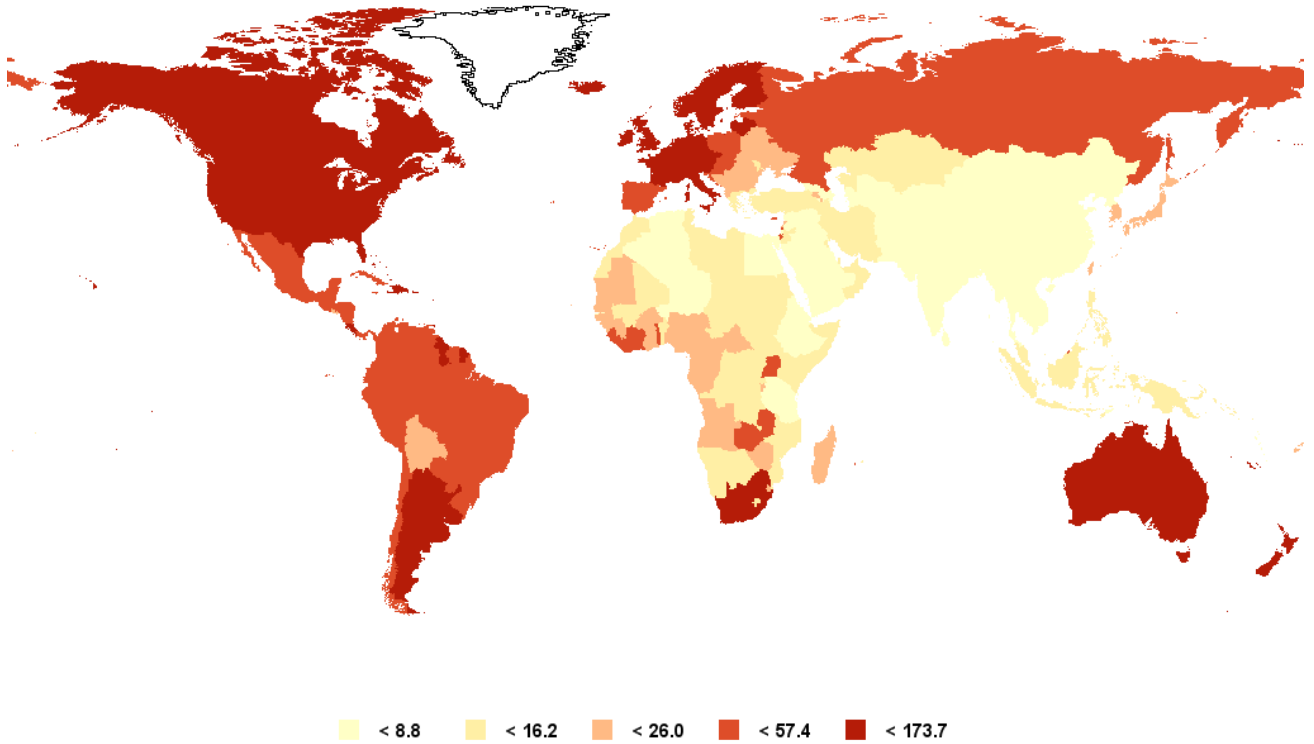
i) Au niveau international

Dans le monde, le CaP est au second rang des cancers chez l'homme avec 903 000 nouveaux cas en 2008 [1] (source: statistiques **Globocan, 2008, <http://www-dep.iarc.fr>**). Près de $\frac{3}{4}$ des cas enregistrés le sont dans les pays développés (644 000 cas). Les taux d'incidence varient jusqu'à un facteur X 25 entre certains pays de par le monde. Les taux d'incidence les plus élevés sont retrouvés sur le continent Australien (> 100 pour 100 000), en Europe du Nord et de l'Ouest et en Amérique du Nord (**Figures 1 et 2**). Les taux d'incidence les plus faibles sont retrouvés en Asie Centrale et en Asie du Sud (4,1 pour 100 000).

Aux Etats-Unis en 2008, selon l'American Cancer Society, environ 25% des cancers diagnostiqués chez les hommes étaient des CaPs. De plus, il existe un plus fort taux d'incidence (+30%) chez les Afro-Américains (137/100 000) par rapport aux Américains caucasiens (101/100 000). On notera aussi une augmentation de la fréquence des CaPs chez les hommes asiatiques ayant immigré aux Etats-Unis et une augmentation de l'incidence au Japon probablement en relation avec une progression vers un mode de vie occidental, laissant supposer le rôle d'un facteur environnemental [2]. Avec 258 000 décès en 2008, le CaP est la 6^{ème} cause de décès par cancer chez les hommes dans le monde. Aux Etats-Unis, c'est la 2^{ème} cause de décès par cancer chez les hommes avec 28 660 décès en 2008, derrière le cancer du poumon avec 90 810 décès [3].

Les écarts entre les pays en terme de mortalité sont moins importants (facteur X 10 maximum) comparés aux variations des taux d'incidence (**Figure 2**). Les taux de mortalité sont en général plus élevés dans les populations noires, intermédiaires chez les caucasiens et faibles dans les populations asiatiques.

Estimated age-standardised incidence rate per 100,000
Prostate, all ages



GLOBOCAN 2008 (IARC) - 28.11.2011

Figure 1 : Incidence du cancer de la prostate dans le monde, Globocan, 2008 (IARC).

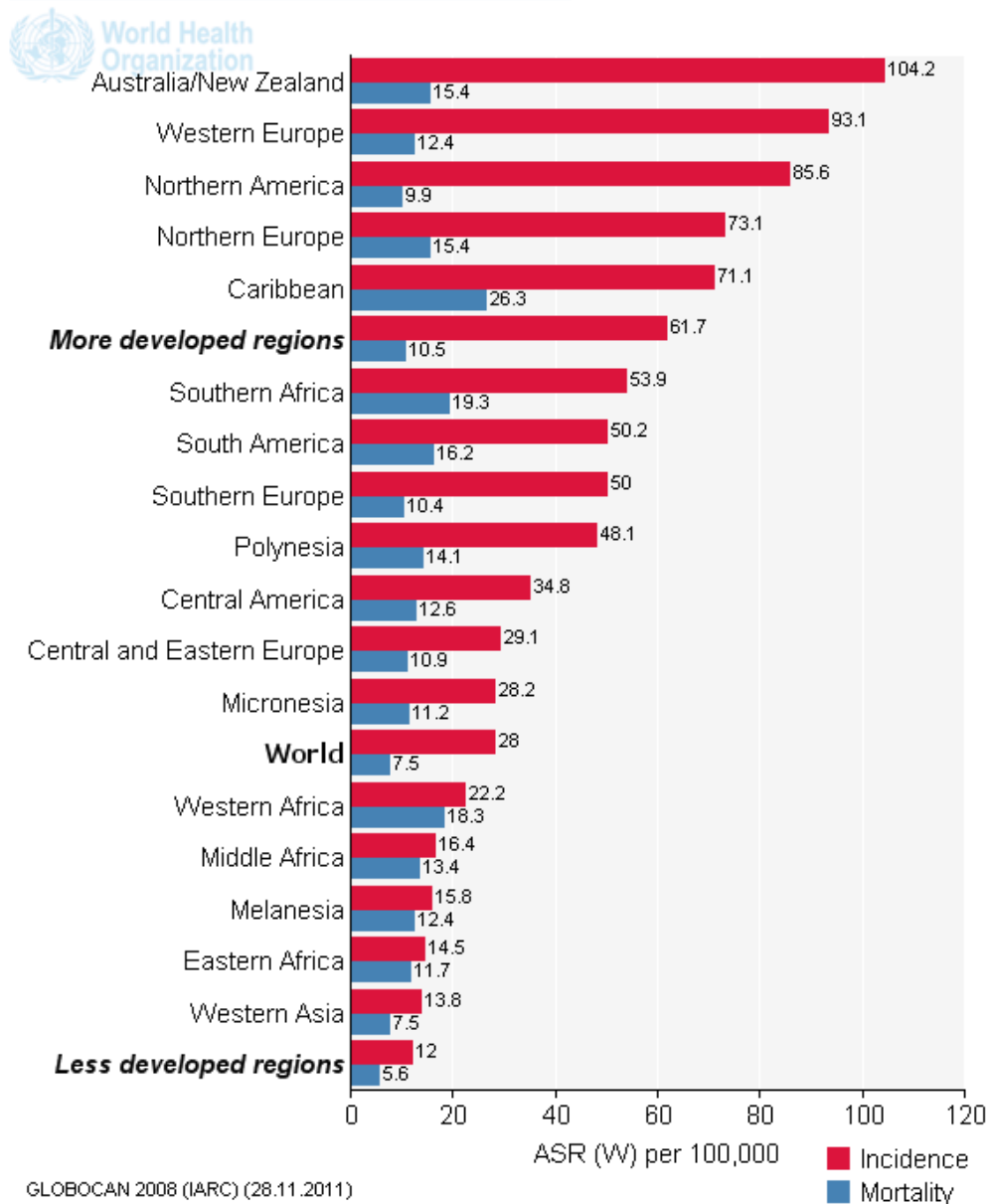


Figure 2 : Incidence et mortalité du cancer de la prostate, Globocan, 2008 (IARC).

ii) Au niveau européen

Dans l’Union européenne (EU 27), 338 600 nouveaux cas de CaPs ont été enregistrés en 2008 (soit près de 25 % des cancers chez l’homme ou 13,8 % de l’ensemble des cancers, tous sexes confondus) avec une mortalité de 71 291 décès (soit 10 % de la mortalité masculine par cancer ou 6 % de l’ensemble des mortalités par cancer).

D'une façon générale, les pays situés dans le Nord de l'Europe (Irlande, France, Norvège, Suède, Islande, Finlande) ont une incidence plus élevée (>100/100 000) que ceux situés au Sud ou à l'Est comme la Grèce ou la Bulgarie (taux < 25/100 000).

iii) En France

La France se situe parmi les pays de l'Union européenne à fort taux d'incidence (taux standardisé monde supérieur à 100 pour 100 000 hommes) de CaP. En effet, le taux d'incidence standardisée à la population mondiale en France en 2008 est de 118,3 pour 100 000 hommes (estimé à 125,7/100 000 en 2011), nettement supérieur à celui de l'Union européenne (72,4), des États-Unis (83,8) et du Canada (101,1). En revanche, peu de variations sont observées entre les pays concernant la mortalité par CaP (**Figure 3**).

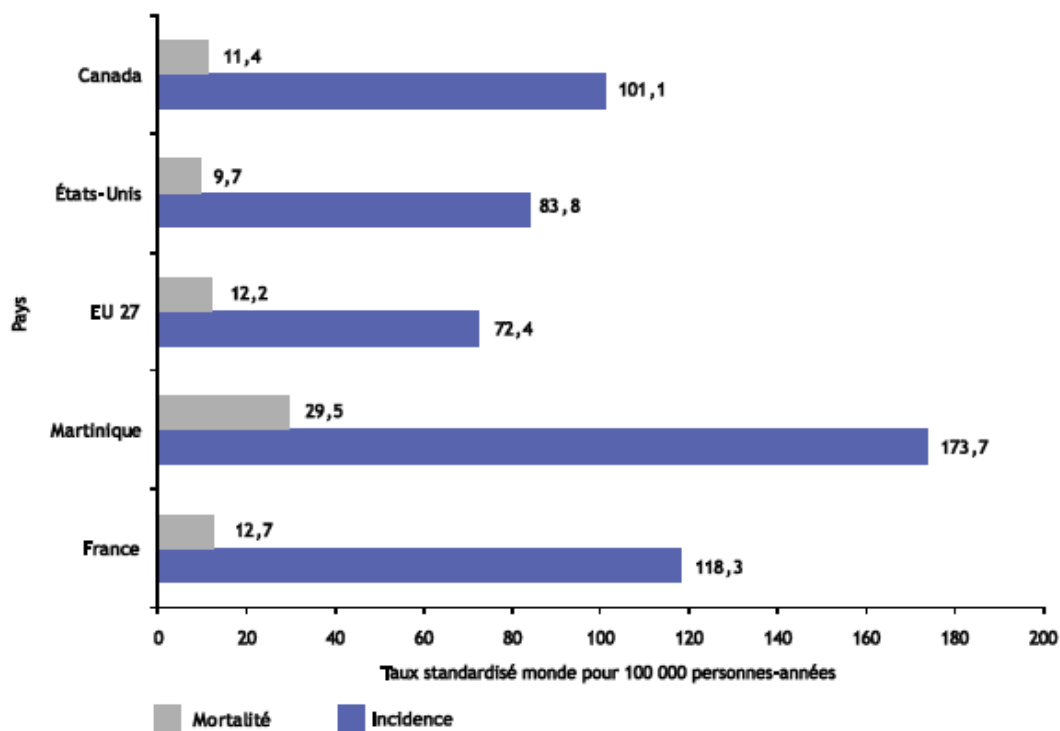


Figure 3 : Taux d'incidence et de mortalité (standardisés monde) du cancer de la prostate en France et à l'échelle internationale en 2008 (taux pour 100 000 personnes), Globocan, 2008 (IARC).

Il existe par ailleurs une accentuation de l'écart entre les régions. Cinq régions sont particulièrement touchées par ce cancer avec une incidence supérieure de + 12 % par rapport à la moyenne nationale : la Bretagne (+ 24 %), le Nord-Pas-de-Calais, la Picardie (+ 16 %), le

Pays de la Loire (+ 14 %) et la Haute-Normandie (+ 13 %). Les incidences les plus faibles sont observées en Corse (- 29 % par rapport à la moyenne nationale), Provence-Alpes-Côte d'Azur (- 19 %), Midi-Pyrénées (- 14 %), Languedoc-Roussillon (- 10 %) et en Île-de-France (- 10 %). Il semble que l'utilisation du PSA ne se soit pas développée au même rythme dans toutes les régions.

On note par ailleurs une surmortalité dans le Nord et dans le Centre de la France. La Picardie enregistre le taux le plus élevé (16 décès pour 100 000 hommes), suivie par le Nord-Pas-de-Calais et le Centre (15,2), la Haute-Normandie (14,8), l'Auvergne (14,7) et la Bretagne (14,4). Les taux les plus faibles s'observent dans les régions du Sud avec un minimum en Corse (9,1 décès pour 100 000 hommes) et en Provence-Alpes-Côte d'Azur (10,8).

Hors métropole, on notera qu'en Guadeloupe et Martinique, le cancer de la prostate est la pathologie tumorale la plus fréquente et la 1^{ère} cause de mortalité par cancer. De plus, ces deux îles présentent une forte incidence de CaP, en liaison vraisemblable avec les origines africaines de la population [4].

Malgré « l'épidémie » de CaP observée en France depuis une vingtaine d'année, la mortalité par cancer de la prostate décroît en France depuis 1989, avec une baisse de 4,3 % par an depuis 2003. Il en est de même aux États-Unis où la mortalité décroît de 4,1 % depuis 1994. Ces diminutions sont probablement liées à l'usage intensifié de traitements curatifs associés à une hormonothérapie [5].

Au total, cette disparité géographique et ethnique dans l'incidence du CaP suggère le rôle très probablement combiné de facteurs génétiques et environnementaux pour expliquer ces variations.

c. Les facteurs génétiques

Le risque de développer un CaP agressif voire mortel est influencé par des facteurs génétiques qui, schématiquement, peuvent être classifiés en deux entités [6] :

- des formes familiales et héréditaires liées à des mutations rares
- et des formes sporadiques liées à une hérédité « multifactorielle » où sont impliqués les polymorphismes génétiques

i) Formes familiales et héréditaires associées à des mutations rares

Dès 1950, les travaux de Morganti et al [7] ont démontré l'existence d'une agrégation familiale possible pour le CaP. Plus récemment, des études cas-témoins et des analyses de ségrégations ont été menées pour essayer d'évaluer la part des facteurs génétiques et leur mode d'hérédité dans ces formes familiales [8, 9]. Les formes familiales de CaP (au moins 2 cas chez des apparentés de 1^{er} degré) sont retrouvées dans environ 20% des cas. Au sein de ces familles, une forme héréditaire est reconnue avec des critères plus stricts : 3 cas chez des apparentés de 1^{er} ou second degré, ou 2 cas diagnostiqués avant l'âge de 55 ans. Les formes héréditaires ne sont retrouvées que chez 5% des patients. La transmission héréditaire peut se faire sur un mode autosomique dominant mais aussi sur un mode lié au sexe (lié à l'X) (**Figure 4**).

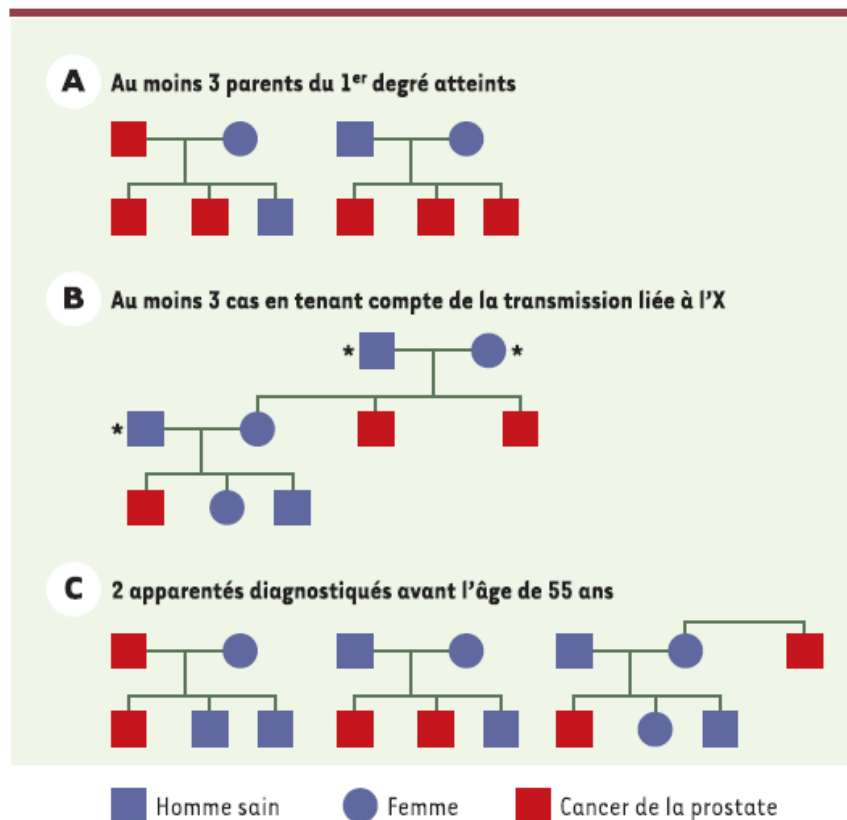


Figure 4 : Critères cliniques de reconnaissance des formes héréditaires de cancer de la prostate. *Pas d'antécédents de cancer de la prostate dans la génération (d'après Cussenot O et al. [6]).

Un gène de prédisposition au CaP appelé Hereditary Prostate Cancer 1 (HPC1) codant pour la RNase L, une endoribonucléase, a été identifié en 1996 par une équipe de Baltimore au niveau

de la région 1q24-25 du chromosome 1 [10]. En 1998, un locus de prédisposition, nommé PcaP (Predisposin for prostate cancer), a été identifié en 1q42.2-43 [11, 12]. Depuis, d'autres locus pour des gènes de prédispositions aux formes héréditaires ont été identifiés : HPCX (Xq27-28), HPC20 (20q13), HPC2 (17p11), PG1 (Prostate cancer susceptibility gene 1) (8p22-23). Certains autres locus, dans les régions chromosomiques 5q31-33, 7q32 et 19q12, seraient quant à eux associés à des formes particulièrement agressives de la maladie.

Des études épidémiologiques ont montré l'association possible d'autres cancers (sein, digestifs...) aux CaPs dans certaines familles, suggérant en cela l'existence de gènes de prédisposition communs [13]. Les gènes BRCA1 (17q21) et BRCA2 (13q12-13), qui prédisposent au cancer du sein héréditaire, ont également été évoqués pour le CaP. Des mutations germinales de BRCA2 sont retrouvés chez 2% des hommes atteints d'un CaP avant 55 ans [14, 15]. Cependant, la proportion de CaPs héréditaires en rapport avec une mutation des gènes BRCA reste peu fréquente, expliquant probablement leur absence de mise en évidence dans les analyses de liaison.

Ainsi, l'ensemble de ces données montre bien l'hétérogénéité génétique de la prédisposition au CaP dans sa forme héréditaire [16]: double mode de transmission (autosomique dominant et lié au sexe) et implication variable des gènes de prédisposition selon l'origine ethno-géographique des familles.

ii) Formes sporadiques « multifactorielles » et polymorphismes génétiques

Ces formes « multifactorielles » correspondent à la majorité des CaPs, où les facteurs génétiques dits à risque sont une combinaison défavorable issue du mélange du patrimoine génétique du père et de la mère. Cette combinaison de facteurs génétiques interfère avec des facteurs de l'environnement (pollution, alimentation, mode de vie, perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A...) qu'ils soient aggravants ou protecteurs. Certains facteurs endogènes et polymorphismes génétiques ont été associés à un risque individuel ou familial accru de CaP; ils pourraient expliquer les importantes variations d'incidence observées entre populations, ainsi que certaines agrégations familiales [6]. Ces polymorphismes impliquent essentiellement des gènes intervenant dans la régulation hormonale (stéroïdes) et le développement de la prostate mais aussi dans le métabolisme des carcinogènes. Ainsi, un polymorphisme spécifique du gène codant pour la 5 α -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) et est directement impliquée dans la croissance et la différenciation prostatique androgéno-dépendante (AD). Les métabolites de la DHT ont été observés à des taux plus élevés chez les sujets mélanodermes et caucasiens que chez les Asiatiques. Par ailleurs, un polymorphisme spécifique du gène du récepteur de la vitamine D (gène VDR localisé en 2q12), indépendant de l'origine ethnique, serait corrélé à un risque accru de développer un CaP. Ceci permettrait d'expliquer la relation inverse existant entre les variations géographiques d'exposition au soleil et le risque de CaP. De même, un polymorphisme du gène du récepteur des androgènes (localisé en Xq11-13) serait associé à un risque plus élevé de CaP et observé plus fréquemment chez les hommes de race noire que chez les Caucasiens ou les Asiatiques.

Le **tableau 5** résume les différents polymorphismes génétiques susceptibles d'être associés au CaP.

Gène (symbole)/locus	Polymorphisme(s) associé(s)
Récepteur des androgènes (AR)/Xq11-13	Répétition CAG (< 18-23 répétitions) Répétition GGC (< 16 répétitions)
5 α -réductase de type 2 (SRD5A2)/2p23	Répétition TA (18 répétitions) A49T V89L [effet protecteur du génotype Leu/Leu]
CYP3A4 (cytochrome P450)/7q22	CYP3A4-V
17 α -hydroxylase (CYP17)/10q24-25	CYP17-A2
3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (HSD3B2)/1p13	B2-C759G
3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (HSD3B1)/1p13	B1-N367T
Aromatase (CYP19)/15q21	STRP-intron 4 (allèle 171pb)
Récepteur α des oestrogènes (ESR1)/6q25.1	Répétition GGGA - intron 1 (allèle avec un nombre de répétition différent de 5) C10T (génotype C/C)
Catéchol-O-méthyltransférase (COMT)/22q11.21-q11.23	Génotype G/A
(CYP1A1)/15q22-24	Msp1 (génotype Val/Val) 3801T>C 2455A>G
(CYP1B1)/2p22-21	Leu432Val (génotype Val/Val)
(CYP2D6)/22q13	Allèle B low activity
(CYP2E1)/10q24.3-qter	Polymorphisme Dral (génotype DD)
Glutation-S-transférase M1 (GSTM1)/1p13	Génotype -/-
Glutation-S-transférase P1 (GSTP1)/11q13	Génotype null homozygote
Glutation-S-transférase M3 (GSTM3)/1p13.3	Génotype B/B
N-acétyl-transférase type 1 (NAT-1)/8p23	NAT1*10 higher activity
N-acétyl-transférase type 2 (NAT-2)/8p23	NAT2 slow acetylator
NADPH quinone oxydoréductase (NQO1)/16q22	Génotype null homozygote
Interleukine 8 (IL8)/4q12-13	IL8-251 [effet protecteur du génotype TT]
Interleukine 10 (IL10)/1q31-32	IL10-1082 (génotype AA)

<i>Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3)/7p13-12</i>	-202bp A/C - promoteur (allèle C) [augmente le risque de développer un cancer plus agressif]
<i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)/6p12</i>	VEGF-1154 [effet protecteur du génotype AA] - 460bp C/T - promoteur (génotype TT)
<i>Transforming growth factor-β1 (TGF-β1)/19q13.2</i>	L10P
Endostatine (COL18A1)/21q22.3	D104N
<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)/6p21.2</i>	20bp 3' C/T (allèle T)
<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B)/12p13.1-p12</i>	V109G (génotype VV)
<i>Vitamine D receptor (VDR)/12q12-14</i>	Fok1 (allèle f) Répétition polyA (> 18 répétitions) Polymorphisme TaqI (allèle T)
Ostéocalcine (BGLAP)/1q25-q31	Polymorphisme HindIII [effet protecteur du génotype CC]
Protéine P53 (TP53)/17p13.1	Effet protecteur du génotype Pro/Pro au codon 72
(NKX3.1)/8p21	C154T
<i>Endothelial cell specific form of NOS (ecNOS)/7q35-36</i>	Glu-Asp298 (génotype GG)
<i>Human oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1)/3p26</i>	Ser 326Cys 11657 A/G
<i>Kallikrein 10 (KLK10)/19q13</i>	Ala50Ser
<i>Human paraoxonase (PON1)/7q21.3</i>	I102V
<i>Leucine zipper, putative tumor suppressor 1 (LZTS1)/8p22</i>	WF101-010 (allèle A), WF101-012 (allèle C), WF101-031 (allèle C), WF101-014 (allèle G)
α-méthylacyl-CoA racémase (AMACR)/5p13	M9V, G1175D, S291L, K277E
<i>X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1)/19q13</i>	Arg399Gln (génotype Arg/Arg) [association avec un régime pauvre en anti-oxydants (vitamine E et lycopène)]
<i>Xeroderma pigmentosum group D (XPD)/19q13.32</i>	Asp312Asn (génotype Asn/Asn)
Glutathion peroxydase 1 (GPX1)/3p21	Répétition GCG (génotype 6/6)
<i>Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, , phenol-preferring, member 1 (SULT1A1)/16p12.1</i>	SULT1A1*1 high activity allele
E-cadhérine (CDH1)/16q22	-160pb C/A -promoteur (allèle A)
Superoxyde dismutase à manganèse (SOD2)/6q25.3	Ala16Val (génotype Ala/Ala)

Tableau 5 : Polymorphismes génétiques associés au cancer de la prostate (d'après Cussenot O et al. [6]).

d. Les facteurs environnementaux

i) Régime riche en graisses

Parmi les facteurs environnementaux, le rôle de facteurs alimentaires est évoqué. Un régime alimentaire contenant trop de matières grasses pourrait favoriser la survenue du CaP. Ceci expliquerait pourquoi la fréquence des CaPs est moins élevée dans les populations asiatiques que chez les asiatiques vivants aux Etats-Unis [17]. En effet, la principale différence alimentaire entre ces populations repose sur la consommation des matières grasses. Chez les asiatiques, l'apport calorique moyen apporté par les graisses est de 20% contre 40% chez les Nord-Américains [18]. Les graisses animales seraient les plus dangereuses [19]. A l'inverse, les aliments riches en anti-oxydants tels les caroténoïdes, les licopènes, le sélénium et la vitamine E seraient protecteurs.

ii) Inflammation

De nombreux auteurs affirment que l'inflammation chronique de la prostate (épisodes répétés de prostatite) serait un facteur clé dans l'initiation de la carcinogenèse prostatique. Une forme particulière d'inflammation appelée Atrophie Inflammatoire Proliférative (ou PIA pour Proliférative Inflammatory Atrophy) serait pour certains auteurs [20-23] la lésion qui précéderait les lésions de PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia). (voir paragraphe sur l'initiation de la carcinogenèse prostatique)

2. Diagnostic

a. Clinico-biologique

Le CaP est un cancer de bon pronostic qui évolue lentement. Brièvement, on distingue une période de latence infra-clinique, asymptomatique, dont on évalue très mal la durée et qui est variable selon les individus. A ce stade, le diagnostic de CaP sera posé au cours d'un dépistage systématique pouvant être proposé aux hommes de plus de 50 ans par le dosage sérique du PSA (Prostatic Specific Antigen). Son utilisation bien que controversée et non spécifique reste un outil utile au dépistage.

Puis survient une phase symptomatique avec à l'examen clinique un nodule perceptible au toucher rectal en rapport avec un cancer localisé dans la prostate (T2) ou pouvant se développer en envahissant l'espace extra-prostatique (T3). Des signes urinaires peuvent éventuellement être présents.

Vient ensuite le stade métastatique, avec métastases ganglionnaires et osseuses qui peut encore dans certains pays être le mode révélation de ce cancer.

Rappel de la classification TNM 2010 :

Tumeur primitive

- Tx : renseignements cliniques insuffisants pour classer la tumeur primitive
- T0 : pas de signe de tumeur primitive
- T1 : tumeur indétectable ni cliniquement, ni par imagerie

T1a : tumeur de découverte fortuite lors d'un examen histologique représentant moins de 5% du tissu réséqué

T1b : tumeur de découverte fortuite lors d'un examen histologique représentant plus de 5% du tissu réséqué

T1c : tumeur identifiée par biopsie à l'aiguille, par exemple dans le cas d'une élévation du PSA

- T2 : tumeur limité à la glande prostatique

T2a : tumeur envahissant la moitié ou moins d'un lobe

T2b : tumeur envahissant plus de la moitié d'un lobe mais pas les 2 lobes

T2c : tumeur envahissant les 2 lobes

- T3 : extension tumorale au-delà de la capsule prostatique

T3a : extension extra-capsulaire (uni-ou bilatérale) incluant l'envahissement microscopique du col vésical

T3b : tumeur envahissant la ou les vésicule(s) séminale(s)

- T4 : tumeur fixée ou envahissant des structures adjacentes autres que les vésicules séminales : sphincter externe, rectum, muscles élévateurs et/ou paroi pelvienne

Adénopathies régionales

- Nx : renseignements cliniques insuffisants pour classer l'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
- N0 : pas d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
- N1 : atteinte des ganglions lymphatiques régionaux

Métastases à distance

- M0 : pas de métastases à distance
- M1 : métastases à distance

M1a : adénopathie(s) non régionale(s)

M1b : os

M1c : autre(s) localisation(s)

b. Anatomopathologique

Dans tous les cas pour assurer un diagnostic de certitude, il faudra recourir à des PBP (Ponctions Biopsies Prostatiques) avec analyse anatomo-pathologique. Ces PBP sont faites par voie transrectale, écho-guidées et multiples (12 au minimum) afin d'augmenter l'échantillonnage tissulaire qui reste cependant minime et assez aléatoire.

i) Rappel de l'histologie de la prostate normale

La prostate est constituée de tissu épithélial glandulaire et de tissu conjonctif fibro-musculaire, dont l'aspect et les proportions relatives varient assez peu selon les 3 zones anatomiques de la prostate : zone périphérique (ZP), zone centrale (ZC) et zone de transition (ZT).

Le contingent épithélial est formé de glandes à contours festonnées et de canaux de plus gros calibre. Ces structures sont revêtues de 2 assises cellulaires : l'une luminale sécrétrice (interne), l'autre basale plus externe. Les cellules lumineales sécrétrices sont cylindro-cubiques, ont un cytoplasme clair ou un peu plus foncé (ZC) et un noyau basal non nucléolé. Ces cellules synthétisent et sécrètent l'antigène spécifique de prostate (PSA), l'acide citrique et la phosphatase acide. Les cellules basales sont plutôt cubiques ou aplaties, ont un haut rapport nucléo-cytoplasmique et un nucléole souvent visible. Par ailleurs ces cellules basales expriment la protéine p63. La perte d'expression de p63 signe une perte de l'assise basale. Cette disparition de l'assise basale est un critère majeur de malignité.

ii) Histopathologie

Les carcinomes prostatiques sont des adénocarcinomes acineux qui se développent à partir des cellules lumineales sécrétantes des glandes prostatiques. L'adénocarcinome prostatique peut prendre différentes formes, en fonction de son site d'origine dans la prostate et de sa différenciation histologique.

D'une façon générale, on oppose les cancers de la zone de transition (environ 20% des cancers) qui restent longtemps latents et les cancers de la zone périphérique (les plus fréquents environ 70 à 80 %), qui vont donner plus précocement un nodule perceptible au toucher rectal. Ces derniers prennent souvent naissance à partir de lésions pré-néoplasiques intracanalaires ou PIN pour Prostatic Intraepithelial Neoplasia.

1. PIN

La prévalence des lésions de PIN augmente avec l'âge, passant de 20% avant 50 ans à 50 à 80% après 80 ans. Ces lésions sont multifocales et prédominent dans la zone périphérique. On distingue les PIN de bas grade et les PIN de haut grade. C'est l'association maintenant reconnue des lésions de PIN de haut grade à l'adénocarcinome prostatique qui fait l'intérêt de leur reconnaissance.

Les lésions de PIN de haut grade, seules reconnues comme lésions précancéreuses (et non les PIN de bas grade) se caractérisent par la présence de glandes hyperbasophiles en regard des glandes voisines normales, mais l'architecture canalaire et acineuse reste conservée au sein d'un stroma fibro-musculaire se disposant régulièrement entre les glandes. A plus fort grossissement il existe une prolifération épithéliale luminale intra-canalaire. La stratification nucléaire est souvent marquée. La plupart des noyaux des cellules lumineuses ont une taille augmentée avec un nucléole souvent proéminent (comme dans les cellules cancéreuses) mais l'assise de cellules basales est **toujours** présente (même si parfois discontinue). Les techniques immunohistochimiques peuvent montrer une positivité souvent assez peu intense de la p504s au niveau des cellules lumineuses et toujours un marquage continu ou discontinu p63+ positif des cellules basales.

2. Adénocarcinomes

Brièvement, les adénocarcinomes (ADK) se développent donc à partir des cellules lumineuses prostatiques. La prolifération adénocarcinomateuse est composée de glandes de taille variée revêtues d'une seule assise de cellules au noyau fortement nucléolé. Il y a une disparition de l'assise basale, critère majeur de malignité. Les techniques immunohistochimiques montrent une positivité de la p504s au niveau des cellules lumineuses et une disparition de l'assise basale (p63 négatif).

- **Grade et score de Gleason**

Les ADK prostatiques forment un spectre de lésions, allant de carcinomes très bien différenciés où les glandes tumorales diffèrent peu des glandes normales à des carcinomes très peu

différenciés ne présentant ni la morphologie, ni les fonctions sécrétoires habituelles. Ces aspects peuvent se rencontrer au sein d'un même foyer tumoral ou sous forme de plusieurs foyers distincts. Le système de grading proposé par Gleason et actualisé en 2005 par la conférence de consensus de l'International Society of Urological Pathology (ISUP) [24] rend très bien compte du polymorphisme de ces cancers et permet de donner en termes chiffrés un score qui permet de préjuger de leur agressivité (**Figure 5 et Tableau 6**). Brièvement, les principales caractéristiques de cette classification sont :

- d'avoir défini 5 grades architecturaux allant du grade 1, le plus différencié, au grade 5, le moins différencié.
- de prendre en compte les 2 grades architecturaux les plus représentés pour définir le score de Gleason qui est obtenu par la somme du premier grade et du second grade sur pièce de prostatectomie. Si un 3^{ème} contingent est présent, il sera mentionné. Sur PBP, le score de Gleason est la somme du grade le plus représenté et du grade le plus agressif. Un cancer prostatique est jugé agressif lorsqu'il comporte une composante de grade 4 et un score supérieur à 6 [25].
- de ne pas tenir compte des aspects cytologiques de la tumeur.

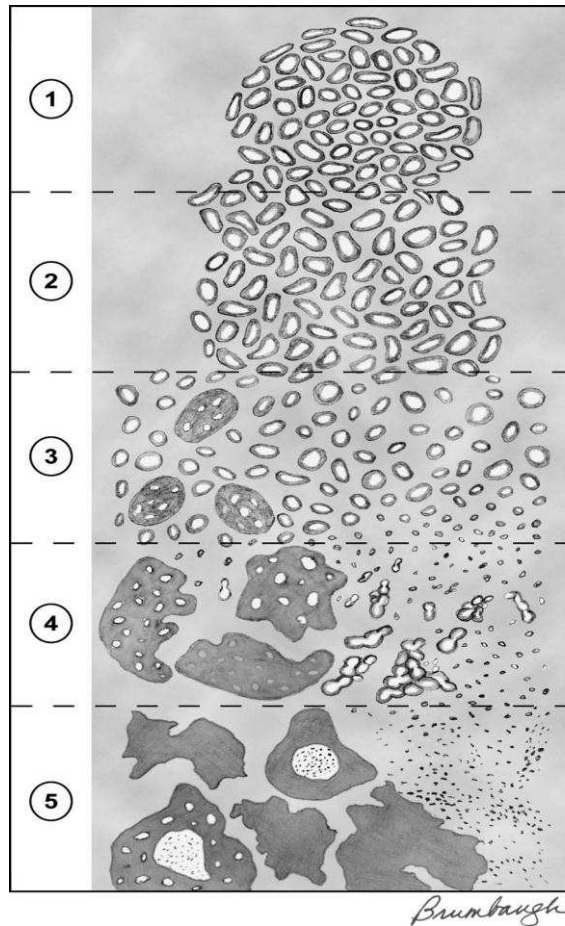


Figure 5 : Schéma pour établir le grade de Gleason (d'après l'ISUP [24]).

Grade de Gleason	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Architecture	Nodulaire	Perte de la régularité des limites périphériques	Infiltration +	Infiltration ++	Massifs ou infiltration ++
Glandes	Régulières rondes ou ovales, séparées	Idem grade 1, mais perte de l'uniformité Espaces interglandulaires augmentés	Irrégulières Arrondies ou étirées	Fusionnées +++ Massifs cribriformes Glandes aux contours mal définis, aux lumières mal formées	Absence de différenciation glandulaire Nappes, cordons, ou cellules isolées Massifs pleins ou centrés par nécrose
Taille des glandes	Normales	Normales	Irrégulières Plus petites que dans grade 1 ou 2	Irrégulières	Petites
Nucléole	Mal visible	Visible	> 1 μ	>1 μ basophile	>1 μ basophile
Cytoplasme	Abondant et clair	Abondant et clair	Variablement éosinophile	Basophile, réduit ou clair	Réduit
Stroma	Néant	Fin	Micronodules collagéniques	Variable	Variable

Tableau 6 : Récapitulatif des aspects histologiques des grades de Gleason.

- **Classification pTNM**

La classification pTNM est le versant anatomopathologique de la classification clinique TNM après analyse histopathologique. Les catégories pT, pN et pM correspondent aux catégories T, N et M. Cependant il n'existe pas de catégorie pT1 parce qu'il y a une quantité insuffisante de tissu prélevé pour déterminer l'extension tumorale maligne.

3. Facteurs Pronostiques

Les principaux facteurs pronostiques dans le CaP reposent sur des critères histo-clinico-biologiques.

La classification de D'Amico pré-opératoire [26] (**Tableau 7**) permet de classer le patient en 3 groupes de risque (faible, intermédiaire et élevé) en fonction du stade clinique TNM, du taux de PSA pré-opératoire et du score de Gleason retrouvé sur PBP. Cette classification permet d'orienter la prise en charge thérapeutique (voir chapitre traitement).

	Stade TNM	Score de Gleason	Taux de PSA (ng/ml)
Faible	≤ T2a (et)	≤ 6 (et)	≤ 10
Intermédiaire	T2b (ou)	7 (ou)	10 à 20
Elevé	≥ T2c (ou)	≥ 8 (ou)	> 20

Tableau 7 : Classification de D'Amico. Evaluation du risque de rechute biologique à 10 ans après traitement local.

D'un point de vue anatomopathologique, outre le score de Gleason, la longueur de la tumeur ainsi que le pourcentage de carottes biopsiques positives sont également des facteurs pronostiques importants à mentionner.

Après prostatectomie radicale, le stade pTNM définitif et le statut des marges d'exérèse chirurgicales sont également des facteurs pronostiques importants. Cependant, ces marqueurs ne permettent pas de mettre en place une thérapie ciblée au sens strict du terme comme cela est par exemple le cas dans le cancer du sein avec l'HER2 et l'Herceptine.

Il semble donc intéressant de pouvoir trouver d'autres marqueurs pronostiques capables de prédire l'évolution de la maladie et pouvant également servir de cible thérapeutique spécifique.

TP53INP1 (pour Tumor Protein 53-Induced Nuclear protein), a fait l'objet de plusieurs travaux fondamentaux dans le laboratoire. Il s'agit d'une protéine de réponse au stress surexprimée dans de nombreux états inflammatoires notamment dans des états de pancréatite. Par ailleurs, les données issues de ces travaux ont également démontré que TP53INP1, par son implication dans le cycle cellulaire et l'apoptose, interviendrait dans certains adénocarcinomes (gastriques, pancréatiques et coliques).

C'est la raison pour laquelle nous avons voulu savoir si TP53INP1 pouvait éventuellement être impliquée dans la carcinogenèse prostatique (notamment la carcinogenèse prostatique liée à l'inflammation) voire intervenir en tant que marqueur pronostique dans les ADK prostatiques.

II. De la phase hormono-sensible à la phase de résistance à la castration

1. Initiation de la carcinogenèse prostatique

Les mécanismes responsables de l'initiation de la carcinogenèse prostatiques ne sont pas encore totalement élucidés. Nous avons déjà évoqué plus haut la participation des gènes de susceptibilité. Un autre facteur, l'inflammation et notamment l'atrophie inflammatoire proliférative (PIA) semble également intervenir pour certains auteurs dans cette phase initiale de la maladie.

La PIA est définie par des lésions d'atrophie épithéliale glandulaire focale souvent associée à une inflammation chronique (population mononuclée) et souvent directement adjacente à des lésions de PIN, de cancers ou des deux [20, 23, 27, 28].

Au niveau de ces zones de PIA, l'épithélium glandulaire est morphologiquement atrophique mais moléculairement prolifératif. En effet, les cellules épithéliales glandulaires expriment des marqueurs de prolifération tels que le Ki67 [20]. Par ailleurs, ces zones de PIA sont le plus souvent situées au niveau de la zone périphérique de la prostate, zone où les cancers sont les plus fréquents [20, 27].

La fréquente association de la PIA avec l'inflammation chronique suggère que ces lésions de PIA résultent probablement d'une prolifération régénérative des cellules épithéliales prostatiques en réponse au stress oxydatif causé par l'inflammation (libération de substances oxydantes (radicaux libres) par les cellules inflammatoires) [20, 22]. Par ailleurs cette prolifération, associée à la présence de carcinogènes et de radicaux libres, favoriserait l'apparition de mutations. Ces altérations génétiques pourraient alors entraîner l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Cette atrophie inflammatoire proliférative serait donc la lésion qui précéderait les lésions de PIN (**Figure 6**).

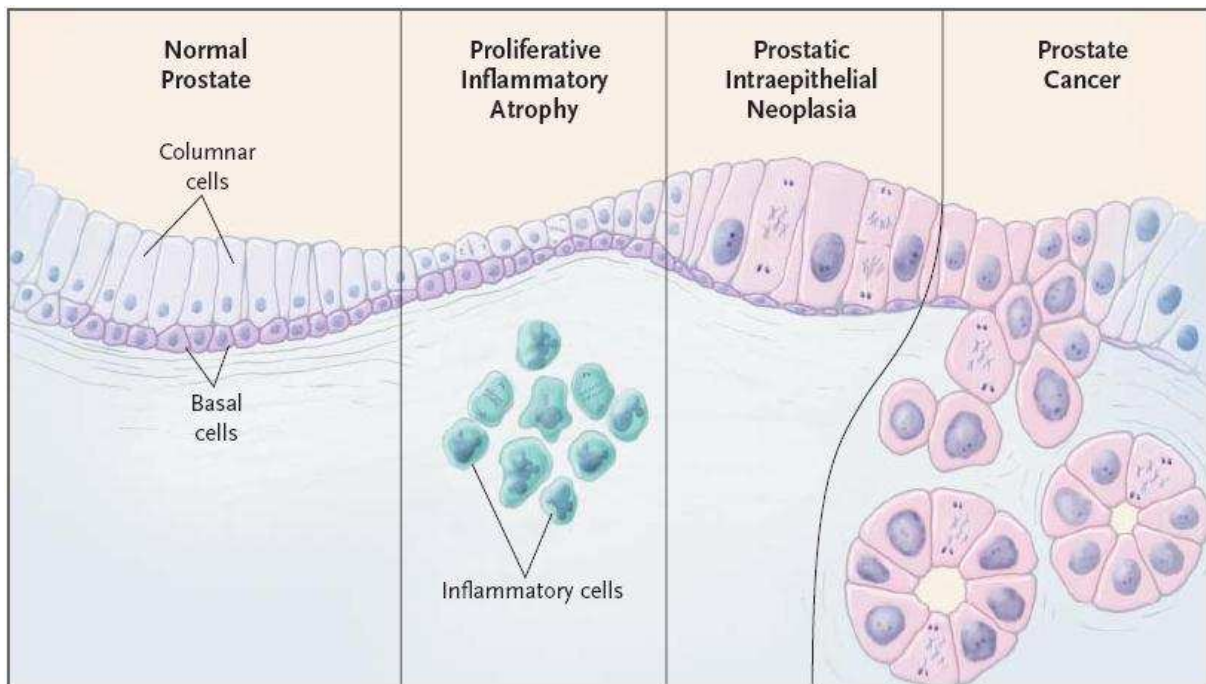


Figure 6 : L'atrophie inflammatoire proliférative comme précurseur des lésions dysplasiques (PIN) et du cancer de la prostate (CaP) (d'après Nelson WG et al. [22]).

2. Hormono-sensibilité et traitements

Nous avons vu que le CaP est un cancer de bon pronostic qui évolue lentement avec une période de latence infra-clinique dont on évalue très mal la durée et qui est variable selon les individus. Vient ensuite une phase symptomatique, avec un nodule perceptible au TR en rapport avec un cancer localisé dans la prostate (T2), ou pouvant se développer en envahissant l'espace extra-prostatique (T3, localement avancé). Durant cette phase symptomatique, le CaP reste dans un premier temps androgéno- (ou hormono-) sensible. La croissance et la prolifération des cellules tumorales se font grâce à l'action des androgènes circulants (testostérone transformée en DHT dans la cellule prostatique) qui agissent sur le récepteur aux androgènes (RA). **La figure 7** résume le mode d'action du RA. De ce fait, même lorsqu'il est diagnostiqué à un stade avancé (envahissement ganglionnaire ou à distance), une survie relativement prolongée peut être obtenue grâce à une privation androgénique (hormonothérapie).

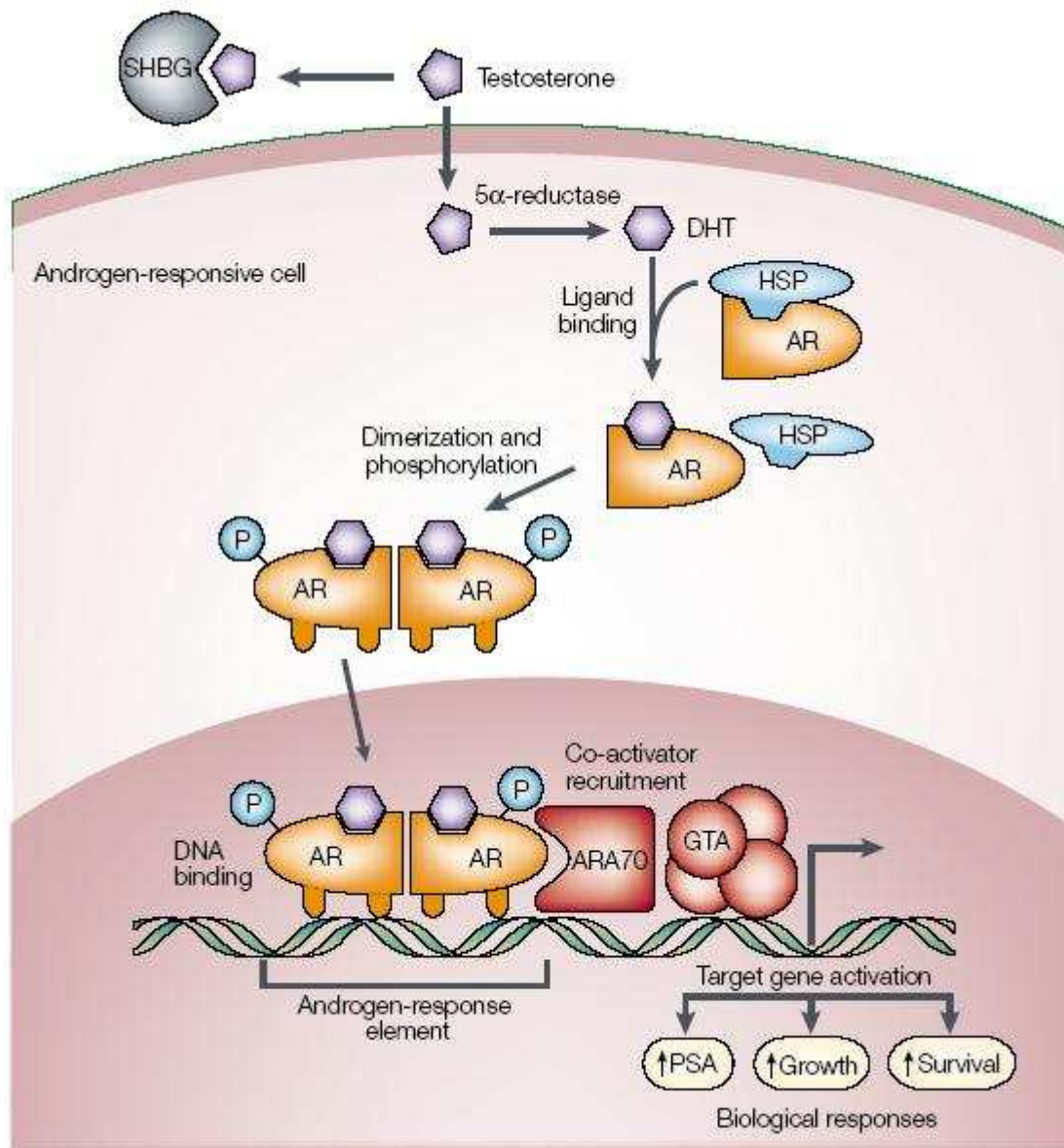


Figure 7 : Mode d'action génomique du RA. La testostérone (T) libre entre dans les cellules prostatiques où elle est convertie en DHT par l'enzyme 5 α -réductase. La liaison de la DHT au RA induit la dissociation des protéines chaperonnes (HSP 90 et 70), la phosphorylation du RA, son homodimérisation suivie de sa translocation nucléaire. Dans le noyau, le complexe DHT/RA se lie aux éléments de réponse aux androgènes (ARE) au niveau du promoteur de gènes cibles du RA. Des co-facteurs se lient également à ce complexe DHT/RA facilitant ou inhibant son interaction avec l'appareil de transcription. L'activation ou la répression de gènes cibles conduisent à des réponses biologiques comme la croissance, la survie et la production de PSA (d'après Feldman BJ et al. [29]).

Durant cette phase le CaP est donc accessible aux différentes thérapeutiques qui dépendent de son état d'avancement (chirurgie/radiothérapie/hormonothérapie), ce qui explique les bons taux de survie observés. En France, les hommes atteints de CaP sont identifiés comme ayant une bonne probabilité de guérir de leur cancer. Les taux de survies relatives à 1 et 5 ans sont de 94 et 80 %. L'âge des patients a un impact important sur la survie relative. Ainsi, la survie à 5 ans est plus élevée chez les 55- 65 (81 %) et les 65-74 (82 %) ans [âges moyens] comparé aux 75-85 (75 %) et 15-55 (70 %) ans [âges extrêmes] [30]. De plus, la survie relative à 5 ans varie également avec le stade au moment du diagnostic. Selon les données américaines, les taux de survie à 5 ans pour les patients diagnostiqués en 1999-2005 sont de 100 % pour les cancers loco-régionaux contre 30,6 % pour les cancers métastatiques [31].

Dans l'« État des lieux sur la survie attendue des patients atteints de cancers en France » publié par l'INCa en 2010, ces taux de survie sont appliqués au nombre de nouveaux cas de CaPs diagnostiqués en France en 2005, afin d'estimer le nombre de patients pouvant guérir de leur cancer. Ainsi, parmi les 62 245 hommes atteints d'un CaP en 2005, au moins 34 259 seraient en vie 5 ans après le diagnostic avec une survie supérieure ou égal à 80 % et devraient ainsi guérir de leur cancer (INCa, 2010).

De façon assez schématique, plusieurs options thérapeutiques peuvent être proposées en fonction de l'état du cancer au diagnostic, de l'âge du patient, de son espérance de vie, des comorbidités associées et du choix du patient (INCa, HAS, 2008).

a. Cancers cliniquement localisés

Au sein des tumeurs localisées, trois sous-groupes ont été définis selon leurs caractéristiques cliniques, anatomopathologiques et biologiques. Ces groupes ont été déterminés selon le risque de rechute biologique 10 ans après un traitement local.

i) Cancer de la prostate localisé à faible risque (T1c, T2a et Gleason ≤ 6 et PSA ≤ 10 ng/ml)

Il existe plusieurs options thérapeutiques de référence pour ces patients : les options curatives immédiates (prostatectomie totale, radiothérapie externe et curiethérapie) et la prise en charge différée (surveillance active). Un patient présentant un CaP cliniquement localisé considéré à faible risque évolutif doit être informé de ces différentes possibilités de prise en charge et des bénéfices et risques (notamment troubles urinaires, sexuels, digestifs) associés à chacune.

1. Les options curatives immédiates

• La prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale (ablation de la totalité de la prostate et des vésicules séminales) est l'un des traitements de référence des tumeurs localisées de la prostate chez l'homme avec une espérance de vie estimée supérieure à 10 ans (qui tient compte de l'âge et des comorbidités individuelles). C'est le traitement qui assure le meilleur contrôle de la maladie. Cet acte chirurgical présente l'intérêt majeur d'obtenir de grandes chances de guérison dans le cas où le cancer est bien confiné à la glande prostatique.

Trois voies d'abord existent pour réaliser la prostatectomie totale : les voies ouvertes rétro-pubienne et périnéale et les voies laparoscopiques. Le curage ganglionnaire ilio-obturateur bilatéral est optionnel pour les cancers à faible risque évolutif. La préservation des bandelettes neuro-vasculaires, uni ou bilatérale, peut être envisagée. Elle est contre-indiquée en cas de risque d'extension extra-prostatique.

Le patient est informé de la possibilité d'un traitement complémentaire adjuvant (radiothérapie et/ou hormonothérapie) en fonction des résultats de l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire.

• La radiothérapie

Elle repose sur deux modalités :

- la radiothérapie externe conformationnelle avec ou sans modulation d'intensité limitée à la loge prostatique. La radiothérapie externe conformationnelle utilise des appareils « accélérateurs linéaires de particules » qui délivrent, par voie externe, une irradiation de haute énergie. Ce sont des rayons X particuliers pouvant atteindre un organe situé en profondeur tout en épargnant les tissus sains périphériques. La radiothérapie est, avec la chirurgie, un des traitements les plus fréquents de ces cancers et peut aussi entraîner une guérison à elle seule. Le niveau de dose minimale recommandé est de 74 Gy.

- la curiethérapie exclusive par implants permanents de grains d'Iode¹²⁵. La radiothérapie interstitielle ou curiethérapie s'est développée en France dans les années 30. Elle consiste à placer des sources radioactives au contact des tumeurs. Dans les années 80, de nouvelles techniques basées sur l'implantation permanente de grains radioactifs apparaissent aux Etats-Unis. Il s'agit d'implanter des petits tubes de titane renfermant la substance radioactive, le plus souvent de l'I¹²⁵, mais aussi dans certains cas du palladium¹⁰³. La curiethérapie exclusive par implants permanents de grains d'I¹²⁵ s'adresse uniquement aux cancers circonscrits à la prostate T1c-T2a (le caractère localisé étant vérifié par IRM endo-rectale), sans symptômes obstructifs

majeurs (score mictionnel et débimétrie satisfaisants) avec un volume prostatique <50cc et en l'absence d'antécédent de résection endo-urétrale. Elle semble générer moins de complications que la prostatectomie.

2. La surveillance active

Le principe de la « surveillance active » est de surveiller étroitement des cancers à faible risque d'évolution au cours de la vie du patient. Elle consiste à évaluer régulièrement l'évolution de la maladie afin de retarder au maximum le traitement, tout en restant dans la fenêtre de curabilité. Ses modalités imposent un dosage du PSA, TR et biopsies de façon régulière. La surveillance active est envisagée dans deux circonstances :

- **Découverte fortuite après résection trans-urétrale de la prostate :**

Stade T1a pour les patients avec une espérance de vie estimée supérieure à 10 ans (qui tient compte de l'âge et des comorbidités individuelles) : une réévaluation clinique (TR) est recommandée avec un dosage de PSA total annuel et biopsies de la prostate périphérique restante si nécessaire.

- **Tumeur révélée par une élévation isolée du PSA et en l'absence de toute symptomatologie clinique :**

- Espérance de vie estimée < à 10 ans (tenant compte de l'âge et des comorbidités individuelles) : une surveillance active peut être discutée pour les stades T1-T2 chez les patients asymptomatiques.

- Espérance de vie estimée > à 10 ans : la surveillance active peut être discutée pour les tumeurs localisées si 2 biopsies au plus sont positives et aucune ne comprend plus de 3 mm de cancer.

Les critères d'initiation d'un traitement curatif incluent tout événement indicatif d'une progression :

- Stade clinique > T2a

- Temps de doublement du PSA < 3 ans

- PSA supérieur à 10 ng/ml

- Plus de 2 biopsies positives

- Score de Gleason à 7 ou plus

- Longueur du tissu tumoral de plus de 3 mm sur une biopsie

3. Traitements alternatifs

D'autres traitements peuvent éventuellement être proposés en alternative notamment à la chirurgie comme l'Ablatherm (il s'agit d'ultrasons focalisés de haute intensité). Ces traitements peuvent être proposés aux patients présentant des comorbidités (obésité, facteurs de risque cardio-vasculaires, etc...). Il s'agit en général de patients plus âgés (>70 ans). La tumeur doit être localisée (\leq T2), en principe sur moins de 4 carottes biopsiques et avec un PSA<15.

ii) Cancer de la prostate localisé à risque intermédiaire (T = T2b ou Gleason = 7 ou PSA = 10-20ng/ml)

Les traitements de référence sont la prostatectomie radicale et la radiothérapie externe de conformation de la loge prostatique avec ou sans modulation d'intensité, mais avec escalade de doses.

Une hormonothérapie courte (6 mois) par analogue de la LHRH peut être associée à la radiothérapie externe lorsque la dose est limitée à 70 Gy.

En cas de prostatectomie radicale, le curage ganglionnaire est recommandé. Le patient est informé de la possibilité d'un traitement complémentaire adjuvant (radiothérapie et/ou hormonothérapie) en fonction des résultats de l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire.

iii) Cancer de la prostate localisé à haut risque (T \geq T2c ou Gleason \geq 8 ou PSA > 20 ng/ml)

L'association d'une hormonothérapie et d'une radiothérapie de conformation de la loge prostatique avec ou sans modulation d'intensité est le traitement de référence. L'irradiation des aires ganglionnaires est habituellement pratiquée. La durée recommandée de l'homonothérapie est de 3 ans. L'opportunité d'un curage ganglionnaire permettant d'apprécier le stade peut être discutée pour moduler le traitement.

Pour un groupe restreint de patients (hommes jeunes, signes fonctionnels urinaires, à faible risque d'extension métastatique), une prostatectomie totale étendue sans préservation des bandelettes érectiles est une option. Elle doit répondre à des critères de qualité stricts et être précédée d'un curage ganglionnaire. Il n'y a pas de bénéfice à effectuer un traitement hormonal avant une prostatectomie totale. Le patient est informé de la possibilité d'un traitement complémentaire adjuvant (radiothérapie et/ou hormonothérapie) en fonction des résultats de l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire.

b. Cancers localement avancés ou métastatiques

i) Cancers localement avancés (T3/T4, N0-X, M0)

Le traitement de référence des cancers localement avancés, T3/T4, N0-X, M0, consiste en une radiothérapie conformationnelle de la loge prostatique étendue aux aires ganglionnaires pelviennes avec ou sans modulation d'intensité avec une hormonothérapie d'une durée recommandée de 3 ans. La radiothérapie a pour but de diminuer le risque de progression locale et l'hormonothérapie de prévenir le risque de métastases à distance.

On notera que pour certains stades T3a sélectionnés (hommes jeunes, signes fonctionnels urinaires, à faible risque d'extension métastatique), une prostatectomie totale étendue sans préservation des bandelettes érectiles est une option. Elle doit répondre à des critères de qualité stricts et être précédée d'un curage ganglionnaire. Le patient est informé de la possibilité d'un traitement complémentaire adjuvant (radiothérapie et/ou hormonothérapie) en fonction des résultats de l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire.

ii) Cancers avec atteinte ganglionnaire pelvienne (tous T, cN1/pN1, M0)

L'hormonothérapie précoce de longue durée est le traitement de référence. Le but du traitement hormonal est de s'opposer à l'action des androgènes qui stimulent la prostate. L'hormono-sensibilité des cellules cancéreuses est un facteur pronostique majeur, car si elle est excellente, le patient pourra avoir un traitement hormonal efficace de longue durée (parfois plusieurs années), ce qui ne sera pas le cas si un échappement au traitement apparaît précocement. La castration chimique par analogue de la LHRH est couramment utilisée en 1^{ère} ligne d'hormonothérapie. L'exposition prolongée aux agonistes de la LHRH diminue le niveau d'expression du récepteur à la LHRH, diminuant de ce fait la sécrétion de LH et la production de testostérone. Cette castration par analogue de la LHRH sera précédée dans les premiers jours du traitement par une augmentation de la testostérone circulante, qualifiée de « Flare up », car l'agoniste de la LHRH provoquera une stimulation de l'hypophyse et ainsi une hypersécrétion de LH puis de testostérone. Afin d'éviter cet effet, un anti-androgène est couramment administré quinze jours avant le début du traitement pour bloquer l'hypersécrétion transitoire de testostérone. Les antagonistes de la LHRH, tel le Degarelix, inhibent directement le récepteur de la LHRH entraînant une suppression soutenue et plus rapide de la testostérone sans

pic préalable. Quant à l'association d'un anti-androgène à la castration chimique, elle repose sur la nécessité de bloquer tous les androgènes circulants dans le sang (notamment les androgènes d'origine surrénalienne).

Une radiothérapie externe de la loge prostatique étendue aux ganglions pelviens peut être indiquée en cas d'envahissement ganglionnaire limité, associé à un taux de PSA et un score de Gleason faible. Son indication sera d'autant plus justifiée que le risque d'évolution métastatique apparaît faible. La prostatectomie totale peut se discuter si l'envahissement ganglionnaire est inférieur ou égal à 2 ganglions et microscopique.

Le principe de l'abstention-surveillance est de différer le traitement hormonal jusqu'à l'apparition de symptômes urinaires et osseux ou d'une élévation rapide du PSA total. Elle est possible avec un traitement hormonal (voire une association hormono-radiothérapie) différé pour un patient asymptomatique dont l'espérance de vie (qui tient compte de l'âge et des comorbidités individuelles) est estimée inférieure à dix ans.

iii) Cancers métastatiques hormono-sensibles

Lorsque le cancer est métastatique mais encore hormono-sensible, on institue une hormonothérapie qui ne peut être que palliative. Elle est instaurée de façon précoce. Il s'agit en général d'un traitement par un analogue de la LHRH combiné à un anti-androgène le premier mois suivi d'une monothérapie par analogue de la LHRH ou castration chirurgicale.

Des protocoles associant hormono-chimiothérapie sont en cours d'évaluation.

Le traitement hormonal est efficace pendant un certain temps mais cependant, après un degré variable, on observe une reprise de la croissance tumorale sur un mode hormono-résistant (résistant à la castration) qui signe un virage dans la maladie : on parle d'« échappement hormonal ». Les cellules tumorales continuent à croître malgré la privation androgénique qui avait été instaurée. Plusieurs mécanismes sont impliqués (voir chapitre sur l'hormono-résistance).

3. Phase de résistance à la castration

a. Mécanismes

Après la phase hormono-sensible survient une phase hormono-résistante (encore appelée phase de résistance à la castration) qui signe un virage dans la maladie. C'est déjà souvent le stade de dissémination métastatique à distance de la maladie. Le patient ne répond plus à l'hormonothérapie qui avait été instaurée : on dit qu'il existe un « échappement hormonal ». Cet échappement hormonal est donc défini comme la progression de la maladie disséminée malgré la privation androgénique qui avait été instaurée.

La physiopathologie de cet échappement hormonal n'est pas encore totalement élucidée mais les mécanismes peuvent être schématiquement regroupés en 5 catégories illustrées sur la Figure 8.

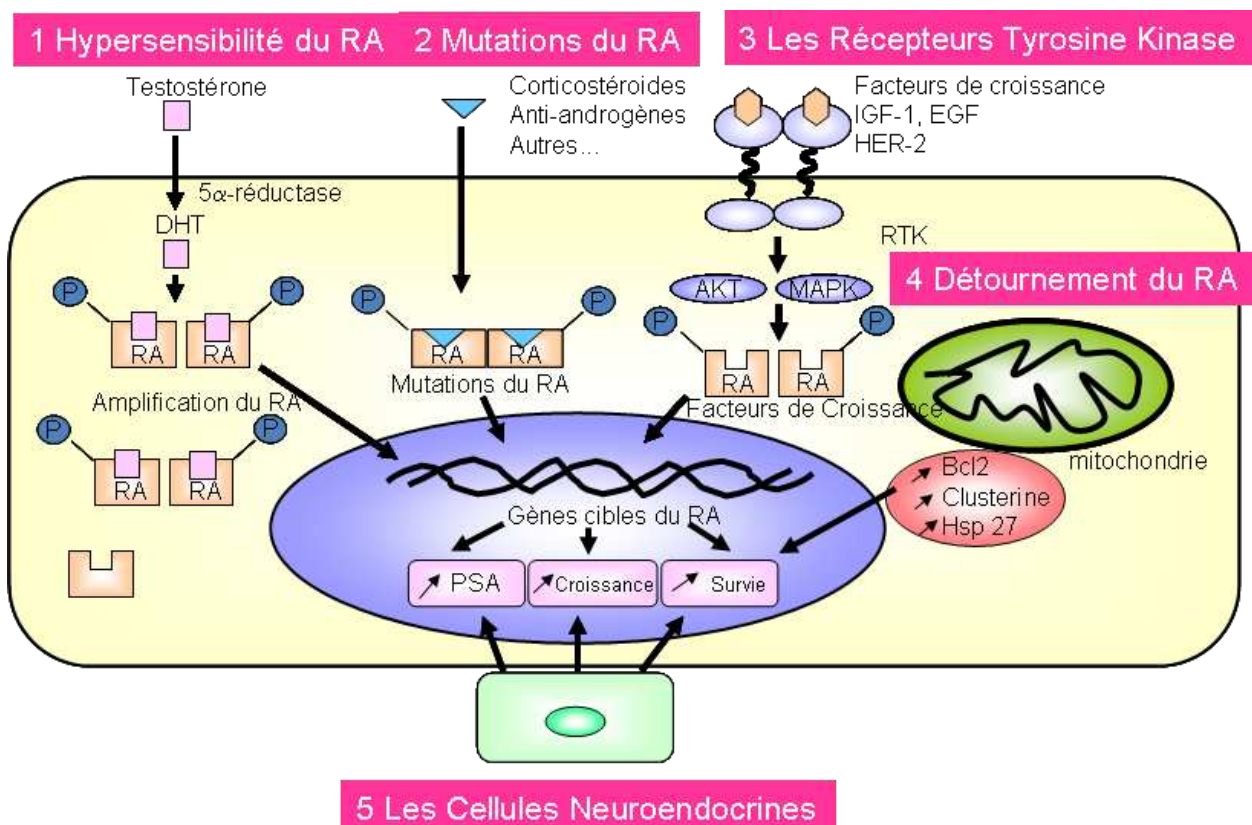


Figure 8 : Résumé des mécanismes de résistance à l'ablation androgénique des cancers prostatiques (d'après Feldman BJ et al. [29]).

i) Hypersensibilité du RA

L'augmentation de la sensibilité du RA résulte d'une surexpression (amplification) du RA, d'une stabilité accrue du RA et d'une localisation nucléaire améliorée dans les cellules tumorales. La stéroïdogénèse intratumorale contribue à la synthèse de testostérone et de dihydrotestostérone (DHT) contribuant donc à la persistance d'androgènes résiduels malgré la castration. L'amplification augmente l'expression du RA qui est, dès lors, plus sensible aux faibles concentrations d'androgènes résiduels.

ii) Mutations du RA

Des mutations « gain de fonction » du RA permettent l'activation du RA en présence de faibles concentrations en androgènes ou par d'autres stéroïdes, comme les corticostéroïdes surrénaliens ou les oestrogènes, ou encore même par des antagonistes du RA (anti-androgènes). Ces mutations diminuent donc la spécificité du RA qui peut donc être activé par d'autres ligands que les androgènes ou encore par les anti-androgènes. Cela constitue un mécanisme par lequel les cellules cancéreuses prostatiques continuent de croître dans un environnement dépourvu d'androgènes.

iii) Activation du RA par les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase

L'activation directe du RA en l'absence de ligand (androgènes) peut se faire suite à l'activation de différentes voies de signalisation dont celle des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (facteur de croissance comme l'IGF-1, l'EGF mais aussi HER-2). Cela résulte notamment en la phosphorylation du RA (par les voies MAP Kinases et AKT) conduisant alors à l'augmentation de son activité transcriptionnelle, de sa translocation nucléaire ou de sa stabilité.

iv) Mécanismes indépendants du RA

1. Cellules neuro-endocrines

Dans la prostate, il existe des cellules neuro-endocrines disséminées en petit nombre parmi les cellules luminales sécrétoires exocrines et les cellules basales. Ces cellules neuro-endocrines ont été décrites comme capables de sécréter des neuropeptides comme la bombésine et

l'adrénomédulline, permettant la croissance et la survie des cellules tumorales prostatiques en l'absence d'androgènes.

2. Détournement du RA par les facteurs anti-apoptotiques

D'autres voies de signalisation peuvent fonctionner indépendamment du RA. Les agents anti-androgéniques, qui empêchent l'activation du RA, inhibent la prolifération cellulaire et provoquent l'entrée en apoptose des cellules tumorales hormono-sensibles. Cependant, même en dépit d'un taux de réponse élevé, la rémission n'est que temporaire car certaines cellules tumorales survivantes sont capables de détourner la voie du RA et de manifester une croissance androgéno-indépendante. Il se produit une pression de sélection qui induit une voie alternative de survie.

L'hormono-résistance est aussi associée à une surexpression adaptative de facteurs anti-apoptotiques dont le rôle est de bloquer la mort cellulaire engendrée par l'hormonothérapie. Certains de ces facteurs (Bcl-2, clusterine, Hsp27) font l'objet d'études approfondies afin de voir s'ils pourraient servir de cibles thérapeutiques afin de restaurer la sensibilité des cellules de CaPs à la thérapie [32, 33].

Là encore il nous paraissait intéressant de voir si TP53INP1 de par son rôle dans l'apoptose pouvait être impliquée au cours de l'échappement hormonal.

b. Prise en charge

i) Chimiothérapie

La phase hormono-résistante, nous l'avons vu, signe un virage dans la maladie. C'est déjà souvent le stade de dissémination métastatique à distance de la maladie. Le patient, en échappement hormonal, ne répond plus à l'hormonothérapie qui avait été instaurée. La chimiothérapie reste assez peu efficace et la survie moyenne des patients reste de l'ordre de 14 à 18 mois [34-36]. Peu d'outils thérapeutiques sont disponibles et l'on comprend tout le challenge de pouvoir trouver de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettraient de restaurer la sensibilité des CaPs à l'hormono- et la chimio-thérapie.

Les formes hormono-résistantes peuvent relever d'une manipulation hormonale (modification du traitement hormonal par ajout ou changement de l'anti-androgène) si le patient est relativement peu symptomatique ou d'un traitement par chimiothérapie lors de l'apparition de douleurs osseuses notamment ou d'altération de l'état général, ou en cas de critères de

progression rapide. La chimiothérapie a pour but de diminuer la croissance tumorale et peut diminuer les douleurs liées au cancer (dans ce cas, une radiothérapie palliative à faible dose peut également être associée afin de diminuer la douleur). Elle consiste à administrer des agents chimiques toxiques combinés à un stéroïde afin d'éliminer les cellules cancéreuses.

Actuellement, le docétaxel (Taxotère) en association à la prednisone est homologué dans le traitement du CaP métastatique hormono-résistant (résistant à la castration). Malheureusement, même si la chimiothérapie a démontré son impact sur la survie, l'efficacité reste encore relativement faible. Des traitements de seconde ligne comme la chimiothérapie par cabazitaxel pour les patients ayant progressé sous docétaxel ont récemment donné de bons résultats en termes de survie globale (essai de phase III TROPIC) [37]. De nombreux essais cliniques sont par ailleurs en cours afin d'améliorer la prise en charge du CaP hormono-résistant (voir paragraphe sur les thérapies ciblées).

Les bisphosphonates administrés par voie intraveineuse (acide zolédronique) font partie des protocoles de prévention des complications osseuses (fractures pathologiques, compression médullaire, irradiation ou chirurgie osseuse, hypercalcémie induite par des tumeurs) des stades avancés avec métastases osseuses.

L'abstention-surveillance est possible pour un patient asymptomatique dont l'espérance de vie (qui tient compte de l'âge et des comorbidités individuelles) est estimée inférieure à 10 ans. Un traitement hormonal différé est entrepris en cas de progression clinique ou biologique importante.

ii) Place des thérapies moléculaires ciblées

En dépit d'avancées significatives dans la compréhension des mécanismes biologiques du CaP et de son évolution métastatique, la prise en charge de cette maladie, en particulier en phase de résistance à la castration, demeure un challenge clinique. En effet, même si aujourd'hui les patients avec un CaP résistant à la castration vivent plus longtemps et avec une meilleure qualité de vie, la plupart voire tous mourront de leur maladie. De nouveaux traitements sont donc nécessaires. De nombreux agents thérapeutiques potentiels ont fait ou font l'objet d'essais cliniques afin d'améliorer la prise en charge du CaP résistant à la castration [38-42]

1. *Les petites molécules « small molecules »*

Les nouvelles thérapeutiques les plus avancées dans leur développement concernent l'inhibition de la voie du RA (abiratérone [43], MDV3100 [44-46]), qui demeure capitale même en phase de résistance à la castration.

L'abiratérone est un inhibiteur du cytochrome CYP17A1 impliqué dans la synthèse des androgènes. Il a montré son efficacité dans le CaP résistant à la castration dans une étude de phase I (diminution du PSA sérique > 50% chez 57 % des patients) [43] et plusieurs études de phase II ont confirmé son activité antitumorale chez les patients résistants à la castration avant ou après docétaxel. Une étude de phase III vient de récemment confirmer l'efficacité de l'abiratérone associé à la prednisone chez les patients avec un CaP métastatique résistant à la castration ayant progressé sous docétaxel (étude COU-AA-301) [47].

Le MDV3100 est un inhibiteur non stéroïdien des androgènes caractérisé par une forte affinité pour le RA et permettant l'inhibition des voies de transduction du signal. Une étude de phase I/II a confirmé l'activité antitumorale du MDV3100 chez les patients avec un CaP hormono-résistant à la fois avant et après chimiothérapie [46, 48] et un récent essai de phase III (étude AFFIRM) a montré un gain de survie de 4,8 mois chez les patients pré-traités par chimiothérapie. Un essai de phase III (étude PREVAIL) chez les patients métastatiques hormono-résistants naïfs de chimiothérapie est actuellement en cours.

Les petites molécules inhibitrices de Hsp90 (protéine chaperonne impliquée dans la stabilisation du RA) semblent également prometteuses [49, 50].

Les dérégulations de la voie de transduction PI3K/AKT/mTOR sont actuellement de plus en plus explorées dans le CaP et l'interaction entre la voie du RA et la voie PI3K/AKT a récemment été bien analysée [51]. Le ciblage de ces protéines par des combinaisons d'inhibiteurs (AKT, m-Tor, etc...) est aussi en cours d'évaluation.

D'autres petites molécules (comme par exemple les inhibiteurs de stat-3) sont en phase de développement pour inhiber certaines protéines associées à l'inflammation [52].

2. Immunothérapie, anticorps bloquants et vaccination

La voie de l'angiogenèse a également été étudiée dans le CaP métastatique hormono-résistant. Des anticorps monoclonaux comme le bevacizumab (anti-VEGF) ou des inhibiteurs oraux de tyrosine kinase comme l'imatinib (anti-PDGFR), le sunitinib ou le sorafenib (anti- VEGFR et anti -PDGFR) ont fait l'objet de plusieurs études de phase II et III [53, 54] qui n'ont pas montré de bénéfice en terme de survie dans le CaP résistant à la castration.

Des anticorps dirigés contre les récepteurs aux facteurs de croissance ont également été testés. L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) semblait être une cible thérapeutique potentielle mais malheureusement les inhibiteurs de l'EGF-R comme le gefitinib n'ont pas montré de résultats dans une étude de phase II [55]. Des anticorps monoclonaux ou des petites molécules ciblant l'Insulin-like Growth Factor -1 Receptor (IGF-1R) sont en cours de développement.

Le dasatinib quant à lui, un puissant inhibiteur de la famille des Src kinases, inhibant également c-kit et PDGFR, est actuellement en cours d'évaluation dans une étude de phase III en association avec le docétaxel dans les cancers métastatiques résistant à la castration.

Le lénalidomide est une molécule ayant une double action anti-angiogénique et immunomodulatrice [56] dont les premiers résultats en phase I semblaient prometteurs mais l'essai de phase III comparant le docétaxel seul à l'association docétaxel-lénalidomide qui était en cours s'est prématurément terminé en raison de l'absence de résultats significatifs.

Les thérapies visant à agir sur le processus de développement des métastases osseuses sont également importantes. Récemment, le denosumab, un anticorps monoclonal dirigé contre RANK-Ligand (Receptor Activator of Nuclear factor kappaB) a montré son efficacité à retarder et réduire le risque d'événements osseux par rapport à l'acide zolédronique dans les cancers hormono-résistants avec métastases osseuses [57].

Une autre approche consiste à utiliser des cellules dendritiques pour déclencher une réponse immunitaire spécifique dirigée contre les antigènes tumoraux. Un vaccin autologue à base de cellules dendritiques (sipuleucel-T, Provenge ®) a montré une augmentation de la survie médiane de 4,1 mois (essai de phase III IMPACT [58]) chez les patients atteints d'un CaP métastatique hormono-résistant peu ou pas symptomatiques. Ce vaccin a été homologué en 2010 aux Etats-Unis. D'autres stratégies de vaccination ou de modulation de l'immunité (anticorps anti-CTLA4 notamment [59]) sont en cours d'évaluation.

3. Les oligonucléotides antisens (ASO)

Une autre approche est celle des oligonucléotides antisens. Lorsque la structure « cristalline, conformationnelle » de la protéine cible sur laquelle on veut agir n'est pas bien connue, il semble plus pertinent d'utiliser des oligonucléotides antisens ou (ASO) qui vont directement se fixer sur l'ARNm de façon spécifique et entraîner une inhibition de la synthèse de la protéine cible.

Deux ASO, l'OGX-011 et l'OGX-427, respectivement dirigés contre les protéines chaperonnes anti-apoptotiques clusterine et Hsp27 semblent particulièrement prometteurs dans le CaP résistant à la castration.

L'OGX-011 (Custirsen) a montré son efficacité en termes de survie globale dans un essai clinique de phase II [32] comparant chez des patients hormono-résistant naïfs de chimiothérapie le docétaxel + prednisone au docétaxel + prednisone en association avec l'OGX-011. Un essai clinique de phase III est en cours comparant, chez les patients porteurs d'un CaP métastatique hormono-résistant, une 1ère ligne de chimiothérapie standard par docétaxel + prednisone au docétaxel + prednisone en association avec l'OGX-011. Des associations OGX-011 + MDV3100 dans les CaPs hormono-résistants sont également à l'essai [60].

L'OGX-427 en phase I [33] a montré une diminution des cellules tumorales circulantes et une réduction des taux de PSA. Il fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase II associé à la prednisone chez les patients avec un cancer résistant à la castration n'ayant pas eu de chimiothérapie.

Là encore, dans l'optique de trouver de nouveaux agents thérapeutiques dans le CaP résistant à la castration, il nous semblait intéressant de voir si TP53INP1 pouvait éventuellement constituer une cible thérapeutique potentielle.

Au total, on pourrait donc modéliser la progression du cancer de la prostate par un schéma très général tenant essentiellement compte des altérations génétiques observées aux différents stades de la carcinogenèse prostatique (**Figure 9**).

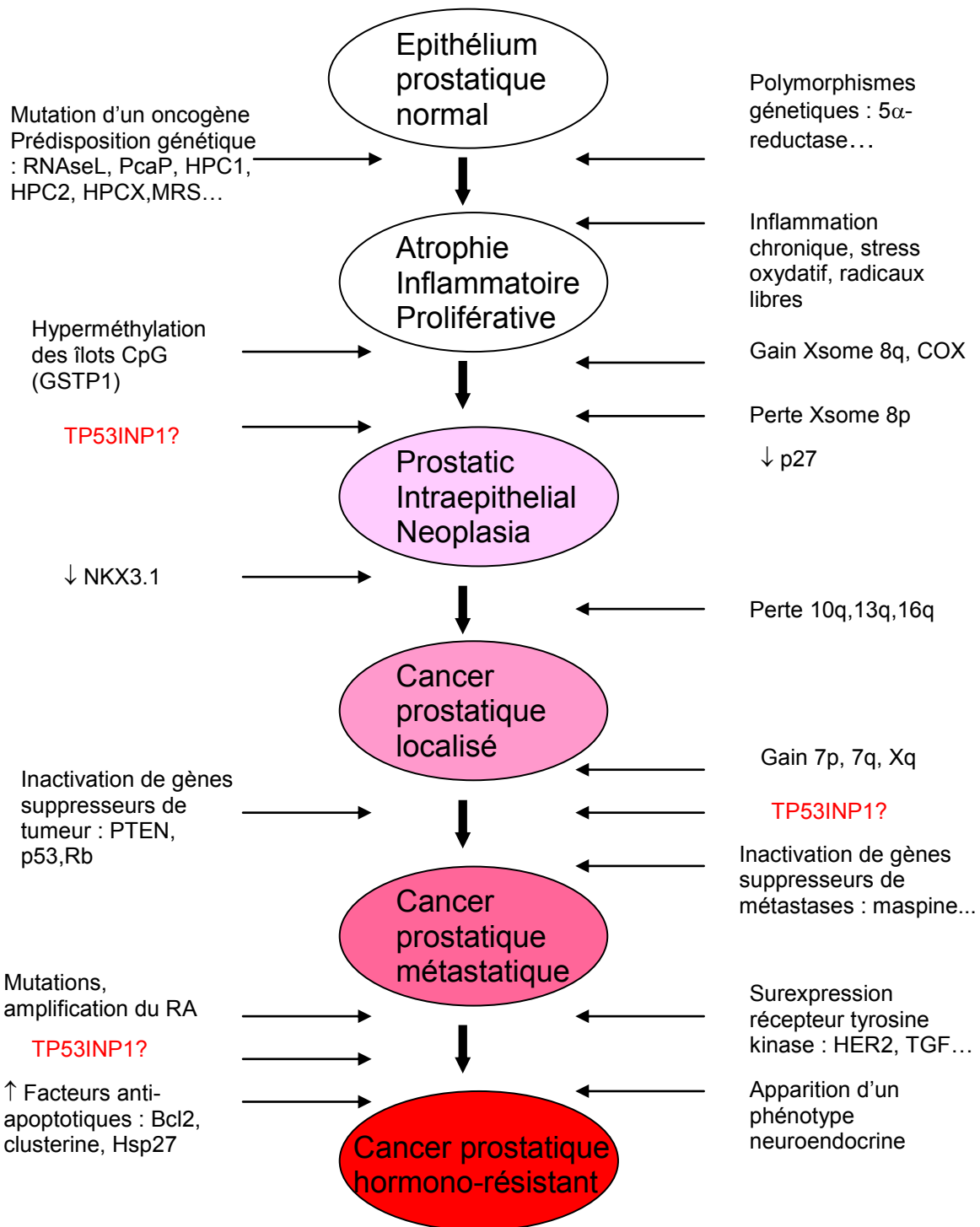


Figure 9 : Modélisation de la progression du cancer de la prostate en fonction des altérations génétiques observées aux différents stades (d'après Nelson WG et al. [22]).

III. TP53INP1 : données fondamentales

1. Identification de TP53INP1

L'unité U624 de l'INSERM (Marseille Luminy) s'intéresse au stress cellulaire, à la recherche de nouveaux acteurs et à la caractérisation de leurs fonctions notamment dans la genèse et la progression tumorale. Le modèle d'étude de cette unité est celui de pancréatite aiguë (PA) qui constitue un stress cellulaire majeur.

Trois modèles expérimentaux distincts ont permis la mise en évidence des isoformes de la même protéine, appelée TEAP (Thymus Expressed Acidic Protein) par Carrier et al. [61], SIP (Stress Induced Protein) par Dusetti et al. [62] et p53DINP1 (p53-dependent Damage-Inducible Nuclear Protein 1) par Okamura et al. [63]. Afin d'harmoniser la nomenclature, la Human Genome Organisation a proposé de nommer cette protéine TP53INP1 pour Tumor Protein 53 Induced Nuclear Protein 1. Le gène codant cette protéine porte chez l'homme le nom TP53INP1 et chez la souris *Trp53inp1*.

2. Structure de *TP53INP1*

Le gène *Trp53inp1* murin comporte 5 exons s'étendant sur environ 20 kb, l'épissage alternatif de l'exon 4 produisant deux transcrits codant pour deux protéines, TP53INP1 α et TP53INP1 β de poids moléculaires respectifs 18 et 27 kDa (**Figure 10**). Les protéines TP53INP1 ne présentent pas de domaine connu, à l'exception d'un domaine PEST généralement associé aux protéines à demi-vie courte [64].

Chez l'homme, le gène TP53INP1 est porté par le chromosome 8 (8q22) [65]. Les isoformes humaines de TP53INP1 α et β présentent une très forte homologie avec les protéines murines, avec 89,0 % et 87,5% d'identité, respectivement.

Dans la suite du manuscrit, TP53INP1 et p53 seront indifféremment employés pour exprimer le gène ou la protéine qu'ils soient animaux ou humains.

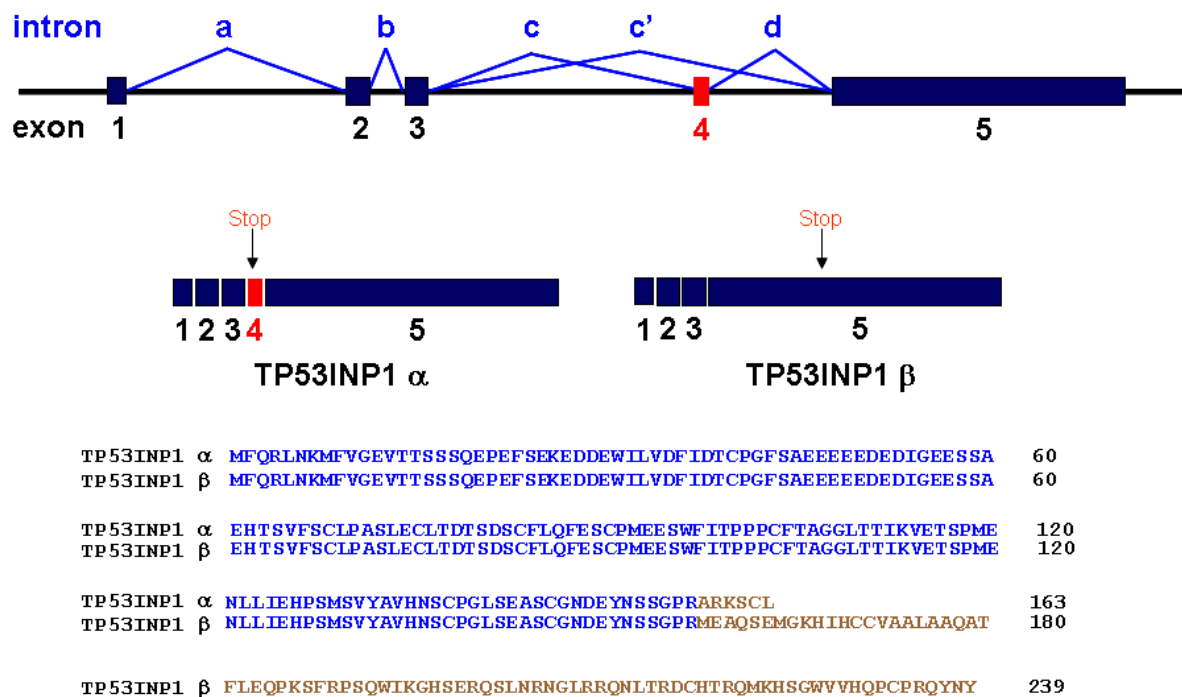


Figure 10 : Structure de TP53INP1. L'épissage alternatif du gène produit les deux isoformes protéiques TP53INP1 α et β . Alignement des séquences primaires des protéines TP53INP1 α et β montrant les parties communes (en bleu) ou variables (en brun) avec la numérotation correspondante des acides aminés (d'après Dusetti et al. [62]).

3. Fonctions de TP53INP1

a. TP53INP1 dans le cycle cellulaire et l'apoptose

Des travaux fondamentaux ont montré que les deux produits du gène TP53INP1 (TP53INP1 α et β) étaient des régulateurs de la croissance cellulaire et de l'apoptose. En effet, la surexpression *in vitro* de l'une ou l'autre des isoformes de TP53INP1 par transfection transitoire dans des cellules en culture induisait un arrêt de la prolifération et de la formation de colonies, ainsi qu'une apoptose [66].

Il semblait donc que TP53INP1 était impliqué à la fois dans le contrôle du cycle cellulaire et dans l'apoptose, les études ultérieures ont précisé le lien entre TP53INP1 et les membres de la famille p53.

b. TP53INP1 et p53 : interaction

La littérature concernant les régulateurs et interacteurs de p53, de même que ses gènes cibles, est très vaste. Elle met en évidence le rôle essentiel de ses activateurs et de ses cibles dans la fonction de suppression de tumeur.

i) TP53INP1 est induit par p53

Il a été montré dans le laboratoire que l'induction de TP53INP1 dans des cellules stressées par l'adriamycine ou l'eau oxygénée ne se produisait qu'en présence d'un gène TP53 fonctionnel. Ainsi, les lignées de cellules tumorales en culture dans lesquelles TP53 était muté et inactivé ne présentaient aucune induction de TP53INP1 ; le même résultat était obtenu dans des fibroblastes de souris déficientes pour p53. De plus, une séquence consensus de fixation de p53 a été identifiée dans le promoteur de TP53INP1 et des tests d'activité transcriptionnelle ont montré que cette séquence consensus était fonctionnelle [67]. Le gène TP53INP1 est donc bien une cible et un effecteur possible de p53.

ii) TP53INP1 active p53 en retour

Il existe également une boucle de rétroaction positive dans laquelle TP53INP1 participe à l'activation de p53. En effet, TP53INP1 α et TP53INP1 β augmentent fortement l'activité transcriptionnelle de p53. Dans des cellules humaines en culture, l'interaction de TP53INP1, p53 et des kinases PKC δ ou HIPK2 permet l'activation de p53 par phosphorylation de son résidu sérine Ser46 et la transcription de gènes cibles liés à l'arrêt du cycle cellulaire (p21, mdm2) et à l'apoptose (Pig3, Bax, p53AIP1) [63, 68, 69]. Il a été démontré que TP53INP1 α et TP53INP1 β ainsi que p53 et HIPK2 se localisent dans les mêmes structures sub-nucléaires appelés PML-NB (ProMyelocytic Leukemia-Nuclear Bodies). p53 est recrutée dans ces structures en réponse au stress, de même qu'un certain nombre de molécules qui régulent sa fonction.

TP53INP1 est donc également un régulateur de l'activité de p53.

Ces résultats fondamentaux permettent de proposer un modèle d'action pour TP53INP1 (**Figure 11**).

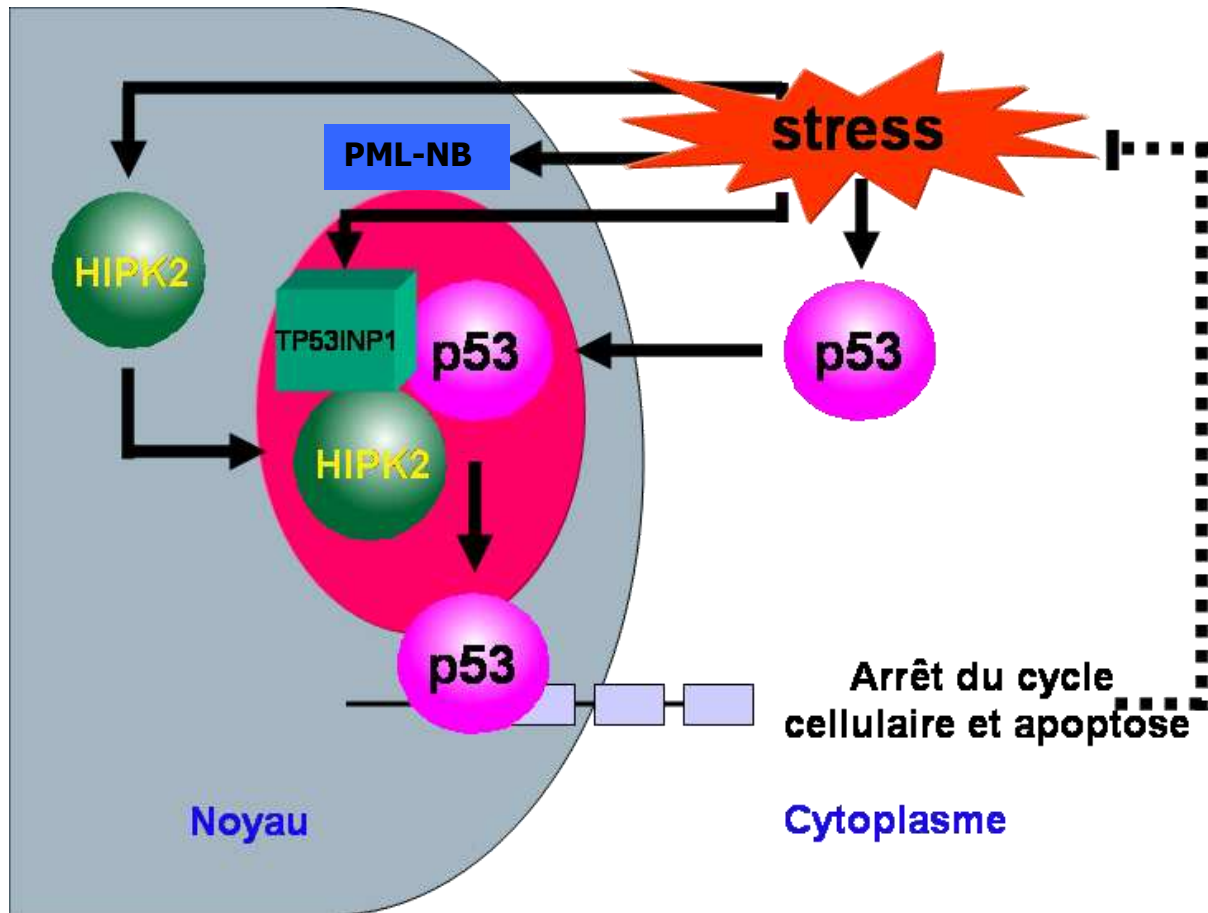


Figure 11 : Modèle d'action de TP53INP1. L'activation de p53 par un stress cellulaire induirait l'expression du gène TP53INP1. Les protéines TP53INP1 α et TP53INP1 β synthétisées se transloqueraient dans le noyau, à l'intérieur des PML-NB. Le recrutement de p53 dans les PML-NB conduirait à la formation d'un complexe multiprotéique comprenant au moins TP53INP1 α , TP53INP1 β , p53 et HIPK2. Ce complexe régulerait la fonction transcriptionnelle de p53 afin d'optimiser la réponse au stress. En particulier, p53 serait activée pour induire l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et pour faciliter l'apoptose.

iii) Indépendance de p53

La famille de p53 comprend également deux autres membres, p63 et p73. Ce dernier présente des similarités fonctionnelles avec p53 et sa surexpression dans des cellules peut induire l'expression de plusieurs gènes cibles de p53 pour commander un arrêt du cycle cellulaire et une entrée en apoptose [70]. Dans cette perspective, Tomasini et al., ont démontré que, en absence de p53, un stress par le cisplatine pouvait également entraîner une induction de

TP53INP1 par p73. La fixation de p73 sur le site consensus de fixation p53 dans le promoteur de TP53INP1 permet l'expression du gène, avec toutefois une efficacité réduite par rapport à l'induction par p53 dans des cellules sauvages. Des expériences de clonage de promoteurs suivies de co-transfections dans des cellules p53^{-/-} ont montré que les isoformes de TP53INP1 modifiaient l'activité transcriptionnelle de p73 sur les promoteurs de p21, MDM2 et Bax [71].

Par ailleurs, l'induction ectopique du facteur de transcription E2F1 dans des cellules en culture déficientes en p53 permet également l'induction de plusieurs cofacteurs pro-apoptotiques de p53 et notamment de TP53INP1 [72], confirmant ainsi la possibilité d'une induction p53-indépendante de TP53INP1.

Une interaction entre TP53INP1 et p63 n'a en revanche pas été démontrée pour l'instant.

4. Expression de TP53INP1 dans les carcinomes

Au sein de l'unité U624, plusieurs travaux ont été poursuivis dans le but de confirmer les premières données fondamentales sur TP53INP1. Il s'agit notamment d'études sur des modèles animaux et en pathologie digestive humaine.

a. TP53INP1 et adénocarcinomes gastriques

Une étude réalisée par Jiang PH et al. [73], portant sur 142 cas de cancers gastriques humains, compare l'expression de TP53INP1 et de p53 à l'index apoptotique, ainsi qu'aux principaux facteurs pronostiques clinico-biologiques.

Il a été démontré que la muqueuse gastrique normale exprime TP53INP1 dans 98% des cas. En revanche, cette expression est perdue dans 36% des adénocarcinomes étudiés. Cette perte de marquage est corrélée à la différenciation tumorale, les tumeurs peu différenciées n'exprimant TP53INP1 que dans 43,9% des cas contre 81,6% des adénocarcinomes bien différenciés.

De même, la perte de TP53INP1 est significativement associée à l'invasion en profondeur de la paroi gastrique, à la présence d'emboles lymphatiques, de métastases ganglionnaires ou hépatiques et à une diminution de la survie (facteur non indépendant en analyse multivariée).

L'index apoptotique (mesuré par TUNEL) est significativement plus élevé dans les lésions dans lesquelles l'expression de TP53INP1 est conservée.

L'immunodétection de p53 (47,9% des tumeurs malignes) est significativement corrélée à la perte de celle de TP53INP1.

En conclusion, cette étude confirme les données fondamentales qui lient TP53INP1 à p53 et à l'apoptose et la valeur pronostique potentielle de l'immunodétection de TP53INP1.

b. TP53INP1 et adénocarcinomes coliques

L'expression de TP53INP1 a été évaluée dans le laboratoire sur une série d'adénocarcinomes coliques.

La muqueuse colique normale exprime TP53INP1. Les variations de son expression dans les cancers coliques ont des points communs avec celles observées dans l'estomac.

En effet, la perte du marquage est corrélée à la différenciation tumorale, les tumeurs peu différenciées n'exprimant pas TP53INP1.

De même, la perte de TP53INP1 est significativement associée à l'invasion en profondeur de la paroi colique. Ainsi des altérations du marquage sont présentes dans certains adénomes en dysplasie sévère ou adénocarcinomes superficiels. Leur incidence augmente avec la progression tumorale et aucune des tumeurs pan-pariétales n'exprime TP53INP1.

Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus dans les cancers gastriques.

Par ailleurs, une lignée de souris déficientes pour TP53INP1 (TP53INP1^{-/-}) a été créée au sein de l'unité U624 [74]. Ces animaux ont été soumis à des agents de stress tels le Dextran Sulfate (DSS) capables d'induire une colite ainsi qu'à un agent carcinogène l'azoxyméthane (AOM) capable d'induire des tumeurs. Ce modèle reproduit la séquence Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI) – adénocarcinome colique chez l'homme.

Les souris TP53INP1^{-/-} développent des colites plus graves que les souris sauvages. De plus, ces mêmes souris développent plus de tumeurs sous l'action conjuguée du DSS et de l'AOM.

Les lésions de colites induites et de carcinogénèse associée sont donc aggravées en l'absence de TP53INP1.

Ce travail apporte donc des arguments supplémentaires quant à l'implication de TP53INP1 dans la carcinogénèse colique liée à l'inflammation.

c. TP53INP1 et adénocarcinomes pancréatiques

Une étude immunohistochimique rétrospective a été réalisée dans le laboratoire [75] à partir des prélèvements issus d'une série de 71 patients pour lesquels les facteurs histo-pronostiques étaient disponibles et parfois la survie.

Les diagnostics histologiques des lésions tumorales étaient les suivants : 3 TIPMP, 9 cystadénomes mucineux ou séreux, 43 adénocarcinomes canauxiers, 4 métastases ganglionnaires et 4 métastases pancréatiques. Parallèlement, le marquage a également été évalué pour le pancréas péri-tumoral, soit normal soit avec présence d'une pancréatite obstructive, ainsi que pour des échantillons de pancréas normaux (pancréatectomies pour cause non tumorale).

La quasi-totalité des tissus bénins testés exprime TP53INP1. La perte du marquage se manifeste dès le stade de dysplasie modérée (PanIN2) pour lequel la moitié des cas est négative. Tous les cas de PanIN3, 86% des ADK canauxiers et toutes les métastases testées présentent une perte d'expression de TP53INP1.

En conclusion, ces résultats montrent une perte précoce de l'expression de TP53INP1 dans l'épithélium canalaire pancréatique. Celle-ci se produit au stade de néoplasie intra-épithéliale (PanIN) et paraît contemporaine des mutations décrites pour p53 [76].

Par ailleurs, l'étude de l'impact de l'expression de TP53INP1 sur la croissance tumorale in vivo a fait appel à un modèle de xénogreffes dans des souris nude.

L'expression de TP53INP1 a été rendue inductible dans une lignée de cellules MiaPaCa-2 issues d'un adénocarcinome humain peu différencié. Plusieurs types d'implantations de tumeurs ont été réalisées : sous-cutanées, intra-péritonéales et intra-pancréatiques.

Dans tous les modèles, l'expression de TP53INP1 a abouti à un moindre développement tumoral (diminution du volume tumoral et de l'index d'extension tumorale).

A noter que l'immunodétection de la caspase-3 activée est plus élevée dans les cellules qui expriment TP53INP1, témoin d'une apoptose accrue.

En conclusion, ces résultats suggèrent très fortement que l'induction de TP53INP1 s'accompagne d'une inhibition de la croissance tumorale et ce en relation avec une augmentation de l'apoptose.

De plus, cette publication émet l'hypothèse selon laquelle l'inactivation de TP53INP1 dans les ADK pancréatiques serait due au mi-RNA 155 (miR-155). Les mi-RNA sont des micro-fragments d'ARN complémentaires d'ARN messagers dont ils empêchent la traduction. Le miR-155 est réputé oncogène ; il a été retrouvé à l'état fonctionnel dans les cellules cancéreuses canalaire pancréatiques.

d. TP53INP1 et carcinomes médullaires de la thyroïde

Nous avons réalisé une étude immunohistochimique portant sur 38 cas de carcinomes médullaires de la thyroïde qui a fait l'objet d'une publication originale [77]. En raison de la prise en charge spécifique des CMT familiaux, seuls des cas sporadiques ont été retenus.

Alors que les cellules C normales et les cas d'hyperplasie testés expriment TP53INP1, environ 40% des carcinomes médullaires sont négatifs. A l'inverse des autres organes précédemment étudiés, cette perte d'expression s'accompagne d'un meilleur profil évolutif : moindre invasion métastatique en nombre de malades et en pourcentage de ganglions atteints, absence de récurrence après chirurgie.

Un parallèle a été établi entre les données immunohistochimiques sur coupe en paraffine et des prélèvements cytologiques. L'immunodétection de TP53INP1 sur cytologie pré-opératoire pourrait donc constituer une aide à la décision thérapeutique quant à l'extension du geste chirurgical.

Cependant, pour l'instant, aucune explication de la perte d'expression de TP53INP1 dans ce type de cette pathologie ne peut être avancée. En effet, la carcinogenèse des CMT ne fait pas intervenir de phénomènes inflammatoires ou de stress oxydatif et ce sont des tumeurs pour lesquelles ni l'apoptose ni p53 ne participent au pronostic ou à l'agressivité.

En conclusion, la modulation de l'expression de TP53INP1 est associée à une variation du pronostic tumoral mais le rôle de cette protéine dans ces tumeurs reste à élucider.

NOS OBJECTIFS : étude de l'expression de TP53INP1 en pathologie prostatique

Des travaux préliminaires avaient donc montré le rôle de TP53INP1 dans les états inflammatoires de nombreux organes ainsi que son implication dans certains adénocarcinomes (estomac, pancréas, colon, thyroïde). L'expression de TP53INP1 n'ayant jamais été étudiée dans la prostate, le but de cette thèse était d'analyser l'expression de cette protéine de réponse au stress dans la prostate normale, dans la prostate inflammatoire et dans des ADK prostatiques à différents stades de leur évolution.

En ce qui concerne la prostate normale et les états prostatiques inflammatoires nous avons essentiellement travaillé sur lames histologiques conventionnelles avec techniques immunohistochimiques.

En ce qui concerne les ADK prostatiques, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la phase hormono-sensible (hormono-dépendante) de la maladie. Pour ce faire, nous avons travaillé sur lames conventionnelles mais surtout sur un TMA (Tissue Micro-Array), puce tissulaire constituée de 330 échantillons tumoraux provenant de 91 patients opérés d'un cancer de la prostate par prostatectomie radicale. L'analyse de l'expression de TP53INP1 s'est faite par analyse quantitative automatisée d'images microscopiques numérisées. Nous avons complété notre étude en utilisant *in vitro* des lignées cellulaires LNCaP issues de cancers prostatiques humains hormono-sensibles que nous avons traitées par un oligonucléotide antisens inhibiteur de TP53INP1 (ASO TP53INP1). L'ensemble de nos résultats a fait l'objet d'une 1^{ère} publication originale [78].

Nous nous sommes dans un deuxième temps intéressés à la phase hormono-résistante de la maladie. Pour ce faire nous avons travaillé sur un TMA composé d'échantillons tumoraux provenant de patients sous hormonothérapie ou au stade d'hormono-résistance. Nous avons également complété notre étude en utilisant *in vitro* des lignées cellulaires C4-2 issues de cancers prostatiques humains résistants à la castration que nous avons traitées par l'ASO TP53INP1. Enfin, nous avons utilisé un modèle *in vivo* de souris nude chez lesquelles nous avons implantées des tumeurs hormono-résistantes par l'injection de cellules C4-2, souris que

nous avons traitées avec l'ASO TP53INP1+/- docétaxel. Nos résultats ont fait l'objet d'une seconde publication originale [79] (sous presse).

RESULTATS

I. Résultats 1 : prostate normale, inflammatoire et adénocarcinomes prostatiques hormono-sensibles

1. Sur lames conventionnelles

TP53INP1, dans la prostate normale, n'est exprimée qu'au niveau des cellules basales prostatiques. Il existe une néo-expression de TP53INP1 dans les cellules épithéliales luminales prostatiques en cas de prostatite, dans les lésions de PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia) de haut grade et dans les ADK prostatiques.

2. Sur TMA : TP53INP1 facteur de mauvais pronostic

Sur TMA, nous avons pu corréler l'expression de TP53INP1 avec des paramètres clinico-pathologiques. La surexpression de TP53INP1 dans les ADK prostatiques est significativement corrélée, en analyse univariée, à des facteurs de mauvais pronostic (grade de Gleason ≥ 4 , score de Gleason ≥ 8 , score de D'Amico défavorable, métastases ganglionnaires, rechute biologique). En analyse multivariée, la surexpression de TP53INP1 est un facteur prédictif indépendant du risque de rechute biologique. Ces modulations d'expression de TP53INP1 étaient comparables à celles que nous avons observées dans les carcinomes de la thyroïde (expression de TP53INP1 corrélée à des facteurs de mauvais pronostic) et inverse à celles de la plupart des carcinomes développés à partir des autres organes (estomac, colon, pancréas, etc...)

où c'est la perte d'expression de TP53INP1 qui est corrélée à des facteurs de mauvais pronostic.

3. Sur lignées cellulaires LNCaP

Nous avons tout d'abord pu montrer, *in vitro*, que la stimulation de cellules LNCaP par des cytokines inflammatoires augmentait de façon statistiquement significative les taux d'ARNm de TP53INP1 confirmant le rôle de protéine de réponse au stress de TP53INP1 déjà démontré dans d'autres organes et laissant suggérer que TP53INP1 pourrait être impliqué dans la carcinogenèse prostatique liée à l'inflammation. De plus, dans le but d'étudier l'effet de l'inhibition de TP53INP1, nous avons développé un oligonucléotide antisens (ASO) capable d'inhiber l'expression de TP53INP1. L'inhibition de TP53INP1 par l'ASO induit une augmentation de l'apoptose et une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires hormono-sensibles LNCaP. Ces résultats semblent faire de TP53INP1 une possible cible thérapeutique dans le traitement du cancer de la prostate.

4.1^{ère} publication

Giusiano S, Garcia S, Andrieu C, Dusetti NJ, Bastide C, Gleave M, Taranger-Charpin C, Iovanna JL, Rocchi P. TP53INP1 overexpression in prostate cancer correlates with poor prognostic factors and is predictive of biological cancer relapse. *Prostate* 2012;72(2):117-28.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

This material is reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc.

Cet article est reproduit avec la permission de John Wiley & Sons, Inc.

TP53INP1 Overexpression in Prostate Cancer Correlates With Poor Prognostic Factors and Is Predictive of Biological Cancer Relapse

Sophie Giusiano,^{1,2,3*} Stéphane Garcia,^{1,2,3} Claudia Andrieu,^{2,3} Nelson Javier Dusetti,^{2,3} Cyrille Bastide,^{3,4} Martin Gleave,⁵ Colette Taranger-Charpin,^{1,2,3} Juan Lucio Iovanna,^{2,3} and Palma Rocchi^{2,3}

¹Department of Pathology, Hôpital Nord, Chemin des Bourrellys, Marseille, France

²INSERM, U624 « Stress cellulaire », Marseille, France

³Université de la Méditerranée, Marseille, France

⁴Department of Urology, Hôpital Nord, Bd P Dramard, Marseille, France

⁵The Prostate Center, Vancouver General Hospital, Vancouver, BC, Canada

BACKGROUND. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) is a proapoptotic protein involved in cell stress response. Whereas there is an overexpression of TP53INP1 in numerous tissues submitted to stress agents, TP53INP1 is down-expressed in stomach, pancreatic, and inflammation-mediated colic carcinomas. In medullary thyroid carcinomas, TP53INP1 overexpression correlates with poor prognosis. TP53INP1 expression has never been reported in Prostate Cancer (PC). Our aim was to investigate variations of TP53INP1 expression and their correlation to clinicopathological parameters in PC.

METHODS. Quantitative measurements of immunohistochemical expression of TP53INP1 using high-throughput densitometry, assessed on digitized microscopic tissue micro-array images, were correlated with clinicopathological parameters in 91 human PC. Treatment of LNCaP tumor cells in vitro with cytokines and with TP53INP1 antisense oligonucleotide (ASO) was also analyzed.

RESULTS. In normal prostate tissues, TP53INP1 is only expressed in prostate basal cells. There is a de novo TP53INP1 expression in prostate luminal cells in inflammatory prostate tissues, high grade PIN lesions and in PC. Stimulation of LNCaP cells with inflammatory cytokines enhances the level of TP53INP1 mRNA. In PC, TP53INP1 overexpression correlates with high Gleason grade, unfavorable D'Amico score and lymph node invasion, and is an independent factor of biological cancer relapse. Moreover, treatment of LNCaP cells with a TP53INP1 ASO down-regulates TP53INP1 protein level, inhibits proliferation, and induces apoptosis.

CONCLUSION. TP53INP1 overexpression in PC seems to be a worse prognostic factor, particularly predictive of biological cancer relapse. Results in vitro suggest that TP53INP1 could be considered as a relevant target for potential specific therapy. *Prostate* 72: 117–128, 2012.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: TP53INP1; prostate cancer; biological relapse; quantitative immunohistochemistry; tissue micro-arrays

INTRODUCTION

Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) is a p53-inducible cell stress response protein. Previous works showed that TP53INP1 expression is strongly induced in vivo in mice with acute pancreatitis [1], and in vitro in several cell lines submitted to various stress agents [2,3].

Conflict of Interest: None

*Correspondence to: Dr. Sophie Giusiano, Department of Pathology, Hôpital Nord, Pavillon Etoile, Chemin des Bourrellys, 13915 Marseille, France. E-mail: sophie.giusiano@ap-hm.fr

Received 1 February 2011; Accepted 5 April 2011

DOI 10.1002/pros.21412

Published online 2 May 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Overexpression of TP53INP1 induces cell cycle arrest in G1 phase and enhances the p53-mediated apoptosis [4]. Furthermore, TP53INP1 is a major mediator of p53 antioxidant function [5]. Jiang et al. [6] showed a down-expression of TP53INP1 in gastric adenocarcinomas and its association with a poor prognosis. Gironella et al. [7] also showed that TP53INP1 expression is decreased in pancreatic ductal adenocarcinomas. Gommeaux et al. [8] showed that down-expression of TP53INP1 in a mice model was involved in inflammation-mediated colic carcinogenesis. We recently showed that TP53INP1 overexpression in medullary thyroid carcinomas was correlated with poor prognostic factors (lymph node metastatic involvement, local recurrence) [9]. We found similar results in digestive endocrine tumors (unpublished data).

Prostate cancer (PC) is the most common malignancy in males and the second leading cause of cancer-related deaths in the United States and Europe [10]. It appears in three steps: (i) an initial prostate carcinogenesis step during which inflammatory phenomena seem involved, (ii) an androgen-dependent progression step during which PC is not very aggressive and responds to therapy, (iii) and a final androgen-independent step during which PC escapes to hormonal therapy (HNT) and leads very rapidly to death. The multi-step model of prostate carcinogenesis suggests an accumulation of genetic alterations, epigenetic changes, and post-translational modifications. Some authors focusing on the initial step claim that proliferative inflammatory atrophy is the pre-cancerous lesion leading to Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) lesions and then to invasive carcinoma [11–13]. In addition, TP53 mutations are observed in advanced PC [14].

The aim of the present paper was to analyze the expression patterns of TP53INP1 in a large series of human PC to (1) identify the possible variations of TP53INP1 expression; (2) investigate their correlation with clinicopathological parameters and evaluate their prognostic value; (3) assess the biological function of TP53INP1 down-regulation using a TP53INP1 Antisense Oligonucleotide (ASO).

MATERIALS AND METHODS

Patients and Specimens

PC samples for Tissue Micro-Array (TMA) were obtained from 91 patients who underwent Radical Prostatectomy (RP) in the Department of Urology of the Hôpital Nord of Marseille from January 2002 to December 2006. Fifty one patients had a favorable D'Amico score [15], 9 had an intermediate score and

31 had an unfavorable score. Gleason score varied from 6 to 9: 20 patients were at 6, 52 patients were at 7, 10 patients were at 8 and 9 patients were at 9. 48 patients were pT2 and 43 patients were pT3. Four patients had lymph node metastasis and 18 patients had a biological cancer relapse with a mean follow-up of 71 months (37–95 months). Clinicopathological data are summarized in Table I.

All RP were entirely included according to the Stanford technique [16]. All tumor samples were fixed in buffered formalin, paraffin-embedded at controlled temperature and stored at 18–22°C. All patients were informed at the time of surgery that tissues blocks stored in the laboratory archives might be used for delayed diagnostic and research purpose, to which they agreed.

TMA Construction

The TMA was constructed according to the following protocol. Briefly, for each Gleason grade, two cores were realized from the primary paraffin block (donor block). Tumors' areas were delimited by circling within tissue section (S. Giusiano, S. Garcia) appropriate areas with a permanent black pen on hematoxylin and eosin-stained (HES) paraffin sections in order to guide the technician's punches of cores from the primary paraffin block. Cores were sampled using a tissue-arreyer (Alphelys, Plaisir, France). Core cylinders of 0.6 mm diameter punched

TABLE I. Clinicopathological Parameters of the TMA's Patients

Clinicopathological parameters	Number of patients (N = 91)
D'Amico score	
Favorable	51
Intermediate	9
Unfavorable	31
Gleason score	
6	20
7	52
8	10
9	9
Tumor stage (pT)	
pT2	48
pT3	43
Lymph node invasion	
No	87
Yes	4
Biological relapse	
No	73
Yes	18

from the donor block were then deposited in the recipient paraffin block. Sixteen normal prostate tissues, six PIN lesions, and six negative controls (placenta) were introduced. We punched two cores per Gleason grade (i.e., 2, 4, or 6 cores per patient) with a total of 330 cores. TMA sections (4 μm thick) were cut 24 hr before immunohistochemical processing.

Immunohistochemistry (IHC)

A standard avidin-biotin-peroxydase complex method (ABC) was used for immunostaining. Deparaffined sections were treated by microwaving at a high power for 5 min twice in a 10 mmol/L citrate buffer to retrieve antigenicity. After washing with PBS, the sections were immersed in 3% hydrogen peroxide in methanol for 20 min to block any endogenous peroxidase activity. Then the ABC staining system kit (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) was used for the detection. Sections were incubated overnight at 4°C with 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of rat anti-human monoclonal antibody raised against TP53INP1 (clone E12 kindly provided by Dr A. Carrier in Reference 7). After washing with PBS, detection was done by successively incubating the sections with biotinylated goat anti-rat IgG for 30 min, and avidin-biotin-HRP for 30 min. After extensive washings with PBS, sections were stained with three,3-diaminobenzidine for 2–10 min. Then, sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted.

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH)

Paraffin blocks and HES slides from 20 radical prostatectomy specimens were obtained from Vancouver General Hospital. Paraffin blocks were chosen by observing the HES slides. Small TMA (60 cores-triplicates) were constructed from these blocks. In an RNase free environment, paraffin blocks were cut into 5-micron sections and stored in 4°C. The paraffin sections were dewaxed in two Caplan Jars of Xylene each for 10 min and re-hydrated using a graded set of ethanol solutions. After sections were treated with Proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 37°C for 30 min, they were acetylated by incubation in 0.1 M tri-ethanolamine pH 8.0 buffer containing 0.25% acetic anhydride for 10 min. Sections were incubated in pre-hybridization buffer containing 50% formamide for 10 min at 37°C. Riboprobes (sense and antisense) were obtained from Dr MJ. Pebusque. Sense and antisense probes were labeled using DIG- RNA Labeling Kit (Sp6/T3) from Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Sections were hybridized with probes (8.3 ng/100 μl in hybridization buffer) overnight at 42°C. The next

day sections were washed by 2X SSC, 1X SSC, and 0.1X SSC solutions consecutively for 2×15 min in each. The sections were incubated with NTE buffer containing RNase A for 30 min to remove unattached RNA. After wash in 0.1X SSC, sections were incubated in post-hybridization buffer containing 0.1% triton and 2% BSA for 30 min. Anti-Dig alkaline phosphatase-Fab fragment from Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) in dilution of 1/100 was applied on sections for 2 hr. After three washes in post-hybridization buffer 1 and incubation in post-hybridization buffer 2 for 10 min, sections were transferred to color solution of NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium salt plus 5-bromo-4-chloro indolyl phosphate) from Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and were incubated overnight in room temperature in dark. The next day sections were washed with post-hybridization buffer 3 for 5 min, rinsed in DW, and mounted cover glass with aqueous mounting media (Faramount, DakoCytomatio, Carpinteria, CA).

Image Analysis Procedure

Image analysis was used for quantification of immunohistochemistry. The TMA analysis with the SAMBA 2050 automated device (SAMBA Technologie/TRIBVN, Châtillon 92320, France) was performed as previously described [17–27].

First, an image of the entire slide was built up using a low-power magnification ($\times 2$, pixel dimension 3.7 μm). Second, the area of the slide containing the TMA cores was automatically delineated and scanned at higher magnification ($\times 10$, pixel dimension 7.4 μm). Third, a specially developed tool referred to as TMA cropTM then allowed superimposition of the TMA grid onto the reduced image and precise alignment of each node of the grid with the core location within the image. The final step was performed automatically using the core image contents to ensure pixel precision of the match. From the images acquired with $\times 10$ magnification, a new set of images was next computed, one for each core. After color analysis of the core images, the SAMBA “immuno” software was applied [17,25,26] in usual tissue sections. Several parameters per core were computed: The area of counterstaining, the ratio of the positive area versus counterstained areas, and a quick score QS (percentage of positive area \times mean optical density). Optical density (OD) was evaluated on a scale of grey levels (arbitrary units ranging from 0 (100% transmission, OD = 0) to 255 (1% transmission, OD = 2)). The computation of each parameter was obtained provided numerical values consisting of continuous variables for statistical tests.

Tumor Cell Lines

Human prostate cancer LNCaP cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were maintained in RPMI 1640 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) supplemented with 10% FBS.

Treatment of LNCaP Cells With Cytokines

Cells were plated at a density of 1 million per 78 cm² in 10 ml RPMI growth medium (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). After 24 hr the cells either remained untreated or were treated (stimulated) with either 40 ng/ml TNF α or either 10 ng/ml IL6. In each case (without treatment, TNF α and IL6), reaction was stopped and cells were frozen at -80°C at 6 hr and 8 hr for RNA extraction.

RNA Extraction

Total RNA was extracted directly from cells using TRIZOL reagent (Invitrogen).

Quantitative Real-Time PCR Analysis

The expression of the TP53INP1 mRNAs was analyzed by quantitative Real-Time PCR amplification analysis. Total RNAs were isolated using Trizol method (Invitrogen). Then 1 μ g RNAs were reverse-transcribed into cDNA by using ImProm-IITM Reverse Transcription system (Promega, Madison, WI) (0.5 μ g oligo dT primer, 1 μ L ImProm-IITM reverse transcriptase, 0.5 μ L of RNase inhibitor, 1 μ L of 10 mM dNTP mix, 4.8 μ L of 25 mM MgCl₂, 4 μ L of 5 \times RT buffer) in a final volume of 20 μ L. The thermal cycling protocol employed included two steps (step 1: 70°C for 5 min, and 4°C for 5 min; step 2: 25°C for 5 min, 42°C for 1 hr, 70°C for 15 min, and 4°C forever).

The quantitative Real-Time PCR was conducted using the LightCycler 2.0 instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France). Reaction mixtures contained total volume of 20 μ l consisting of: 5 μ l of each diluted cDNA (1:10), 10 μ L SYBR Premix Ex Taq (2 \times) (TaKaRa Bio. Inc, Japan), 0.4 μ L primers Forward and primers Reverse (10 μ M) of target gene TP53INP1 and internal control 18S, and 4.2 μ L H₂O. The sequences of primers were as following: TP53INP1 primer F: 5'-TTCCTCCAACCAAGAACCAGA-3' and primer R: 5'-AGTAGGTGACTCTTCACTGATGT-3'; 18S primer F: 5'-CTACCACATCCAAGGAAGGC-3', and primer R: 5'-TTTTTCGTCACCTCCCCG-3 (Eurogentec S. A., Seraing, Belgium). The PCR conditions were: An initial denaturation step at 95°C for 10 sec; then 45 cycles of 95°C for 5 sec, 57°C for 6 sec, and 72°C for 12 sec. A melting curve was carried out after

amplification programme by heating at temperatures from 65°C to 95°C in 1.5 min and a final cooling step at 40°C for 1 min was performed. Each sample was analyzed in triplicate in the PCR reaction to estimate the reproducibility of data. The data were acquired by using Roche Molecular Biochemicals light cycler software version 3.5 and statistical analysis was obtained by RealQuant (Roche).

TP53INP1 ASO

Phosphorothioate ASOs used in this study were purchased from Operon Biotechnologies (Cologne, Germany). The sequence of TP53INP1 ASO used corresponded to the human TP53INP1 translation initiation site (5'-CTGGAGAGGCGCTGGAACAT-3'). A scrambled antisense oligonucleotide ASO (5'-CG-TGTAGGTACGGCAGATC-3') was used as a control.

Treatment of LNCaP Cells With Increasing Concentrations of TP53INP1 ASO

LNCaP cells were plated at the density of 1 million cells per 78 cm² and treated 1 day later for 2 days with increasing concentrations of ASO in order to obtain the minimal efficient dose (MED). Oligofectamine, a cationic lipid (Invitrogen, Life Technologies) was used to increase the ASO uptake into the cells. LNCaP cells were treated with 10 nM, 30 nM, 50 nM, 70 nM, and 100 nM of ASO after a pre-incubation for 20 min with 3 mg/mL oligofectamine in serum free optiMEM. Four hours after the beginning of the incubation, the medium was replaced with standard culture medium described above.

Western Blot Analysis

Samples containing equal amounts of protein (40 μ g) from lysates of treated LNCaP cells underwent electrophoresis on a SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose filter. Filters were blocked in PBS containing 5% non fat milk powder at 4°C overnight and then incubated for 1 hr with a 1:200-diluted anti-human TP53INP1 rat monoclonal antibody (kindly provided by Dr A. Carrier in Reference 7) or 1:2000-diluted anti-human Vinculin mouse monoclonal antibody (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Filters were then incubated for 30 min with 1:1000-diluted horseradish peroxidase-conjugate anti-rat or 1:2500-diluted horseradish peroxidase-conjugate antimouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Specific proteins were detected using an enhanced chemiluminescence western blotting analysis system (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL).

Treatment of LNCaP Cells With 70 nM of ASO (MED)

LNCaP cells were plated at the density of 100,000 cells per 3.8 cm² and 1 million per 78.5 cm² and treated 1 day later for 2 days with ASO. Oligofectamine, a cationic lipid (Invitrogen, Life Technologies) was used to increase the ASO uptake into the cells. LNCaP cells were treated with 70 nM of ASO after a pre-incubation for 20 min with 3 mg/mL oligofectamine in serum free optiMEM. Four hours after the beginning of the incubation, the medium was replaced with standard culture medium described above.

In Vitro Mitogenic Assay

The in vitro growth-inhibitory effects of TP53INP1 ASO on LNCaP cells were assessed using an assay based on the uptake and elution of crystal violet dye by the cells (as previously described in Reference 28). One day after ASO treatment, cells were fixed in 1% glutaraldehyde (Sigma), stained with 0.5% crystal violet (Sigma), and eluted with 500 μ l of Sorensen's solution (9 mg of trisodium citrate in 305 ml of distilled H₂O, 195 ml of 0.1 N HCl, and 500 ml of 90% ethanol). Absorbance of each well was measured by a Titertek Multiskan TCC/340 (Flow Laboratories, McLean, VA) at 560 nm. Each assay was done in quadruplicate.

Flow Cytometric Analysis

Flow cytometric analysis of propidium iodide-stained nuclei was done as described previously in Reference 29. Briefly, one day after ASO treatment, cells were trypsinized and analyzed for relative DNA content on a dual laser flow cytometer (Beckman Coulter et Epics Elite, Beckman, Inc, Miami, FL). Each assay was done in triplicate.

Measurement of Caspase-3/7 Activity

One day after ASO treatment, a caspase-3/7 activity assay was used to measure the apoptotic effect of transfection. Caspase-3/7 activity was measured using the Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay Fluorometric Kit (Promega). Caspase-3 activity was measured by the cleavage of the fluorometric substrate Z-DEVD-R110 according to the instructions of the manufacturer (Promega). Next, Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Reagent (100 μ l) was added to each well of a black 96-well plate containing 100 μ L of blank, control or treated cells culture media. Each experiment was performed in triplicate. The plate was covered with a plate sealer, incubated at room temperature for 30 min before measuring the fluorescence of each well.

Statistical Analysis

Statistical analysis for TMA results was performed using NCSS and Statistica statistical softwares. The correlations between TP53INP1 expression (Quick score levels) and clinicopathological parameters (D'Amico score, Gleason grade, Gleason score, tumor stage, lymph node metastasis, and biological relapse) were evaluated on univariate analysis using Tukey-Kramer and/or Mann-Whitney U tests. A Cox multiple regression model was used for multivariate analysis. A value of $P \leq 0.05$ (*) was considered statistically significant.

For the in vitro experiments, results were expressed as the mean +/- SE. Statistical analysis was done with a one-way ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference test (StatView 512, Brain Power, Inc, Calabasas, CA). $P \leq 0.05$ was considered significant (*), $P \leq 0.01$ (**), and $P \leq 0.001$ (***) .

RESULTS

TP53INP1 expression is increased in inflammatory prostate tissues, in high grade PIN lesions and in PC. In normal prostate tissues, TP53INP1 was only expressed in the cytoplasm of prostate basal cells. Interestingly, there was a neo-expression of TP53INP1 in the cytoplasm of prostate luminal cells in inflammatory prostate tissues, in high grade PIN lesions, and in PC (Fig. 1). To assess the relationship between TP53INP1 expression and inflammatory observed in prostate cancer tissues, we looked by using cytokines described to be involved in PC (TNFalpha, IL6) if they could induce TP53INP1 expression in PC model LNCaP. Results presented in Figure 2 clearly demonstrate that stimulation of LNCaP cells in vitro with inflammatory cytokines (TNFalpha and IL6) significantly enhances TP53INP1 mRNA levels. The effect of TNFalpha or IL6 on TP53INP1 expression in LNCaP cells was determined in vitro using quantitative Real-Time PCR. TP53INP1 mRNA levels were normalized to 18S levels, and the fold change between treated and untreated cells was determined. Relative to untreated cells, treatment of LNCaP cells with 40 ng/ml TNFalpha or 10 ng/ml IL6 increased the TP53INP1 mRNA levels by 2.25- or 2.41- fold, respectively (** $P \leq 0.001$) after 6 hr and by 1.57- or 2.17- fold, respectively (** $P \leq 0.001$) after 8 hr (Fig. 2).

In human PC, TP53INP1 overexpression correlates with poor prognostic factors and is an independent predictive factor of biological cancer relapse. On TMA, about 18% of cores were not interpretable (stroma, non tumoral area, unsticked cores). By image analysis, Gleason grade 3 PC had a Quick Score

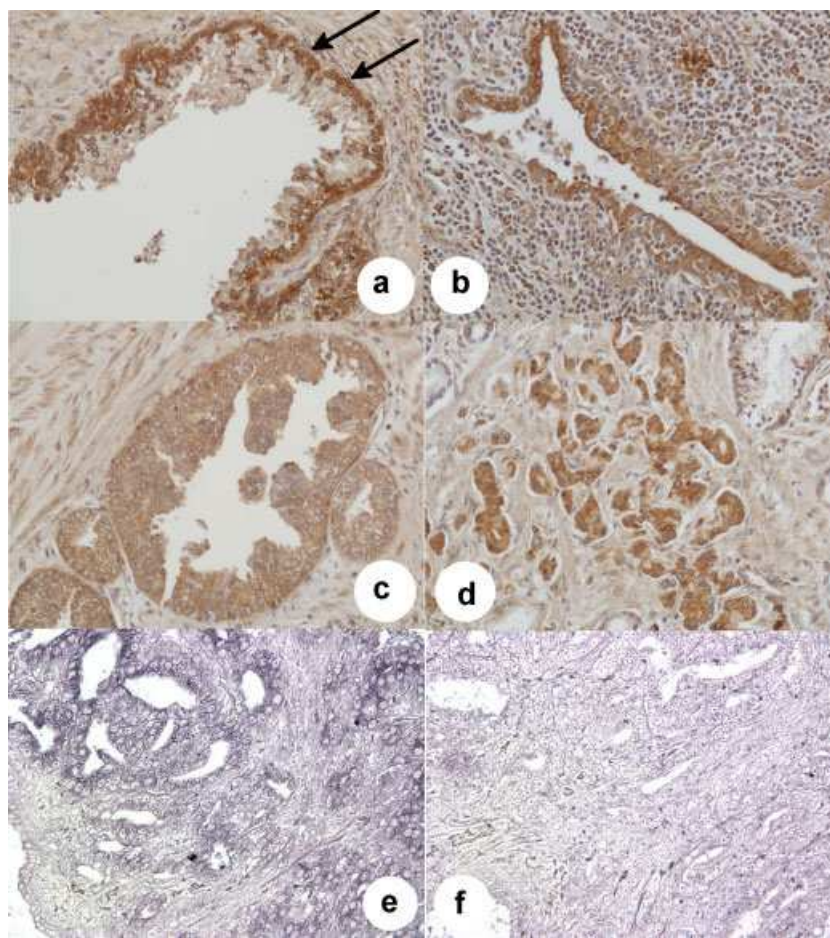


Fig. 1. TP53INP1 expression (IHC, magnification X 200). In normal prostate tissues, TP53INP1 was only expressed in the cytoplasm of prostate basal cells (black arrows) (a). There was a neo-expression of TP53INP1 in the cytoplasm of prostate luminal cells in inflammatory prostate tissues (b), in high grade PIN lesions (c) and in PC (d). CISH: Expression of TP53INP1 digoxigenin-labeled antisense. TP53INP1 was localized in cytoplasm and nucleoli of the prostate tumor cells (e). CISH: TP53INP1 sense probe (negative control) (f). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

(QS) = 7.76, grade 4 PC had a QS = 11.47, and grade 5 PC had a QS = 11.97. Gleason Score 6 PC had a QS = 7.39, score 7 PC had a QS = 8.78, score 8 PC had a QS = 10.2, and score 9 PC had a QS = 11.15. QS was 8.39 in favorable D'Amico score, 8.85 in intermediate score, and 9.42 in unfavorable score. QS was 8.72 in absence of lymph node invasion and 12.17 in case of lymph node invasion. QS was 8.14 in absence of biological relapse and 11.23 in case of biological relapse. QS was 8.85 in pT2 stage and 8.95 in pT3 stage. On univariate analysis, there was a statistically significant increase of TP53INP1 expression with Gleason grade. Indeed, TP53INP1 expression was significantly higher in Gleason grade 4 ($P = 0.000053$) and grade 5 ($P = 0.000021$) tumors compared with Gleason grade 3 tumors (Fig. 3a). A similar statistically significant correlation was obtained with Gleason score. Indeed, TP53INP1 expression was significantly higher in score 8 and score 9 tumors

compared with lower score tumors ($P < 0.05$) (not shown). Furthermore, increase of TP53INP1 expression was significantly associated with unfavorable D'Amico score ($P = 0.01$) and biological cancer relapse ($P = 0.000093$) (Fig. 3b, d). A similar correlation was observed with lymph node invasion ($P = 0.04$) (Fig. 3c). However, it should be noted that, due to the small cases, the "P" value ($P = 0.04$) was just below to the "cut-off" for statistical significance ($P < 0.05$). TP53INP1 expression was also higher in pT3 stage tumors compared with pT2 stage tumors but the difference was not significant ($P > 0.05$) (not shown). On multivariate analysis, TP53INP1 overexpression was an independent predictive factor of biological cancer relapse ($P = 0.001$) (Fig. 3d). The other independent factor was Gleason score ($P = 0.009$) (not shown).

TP53INP1 is dose-dependently downregulated by antisense oligonucleotide (ASO) in vitro. In order

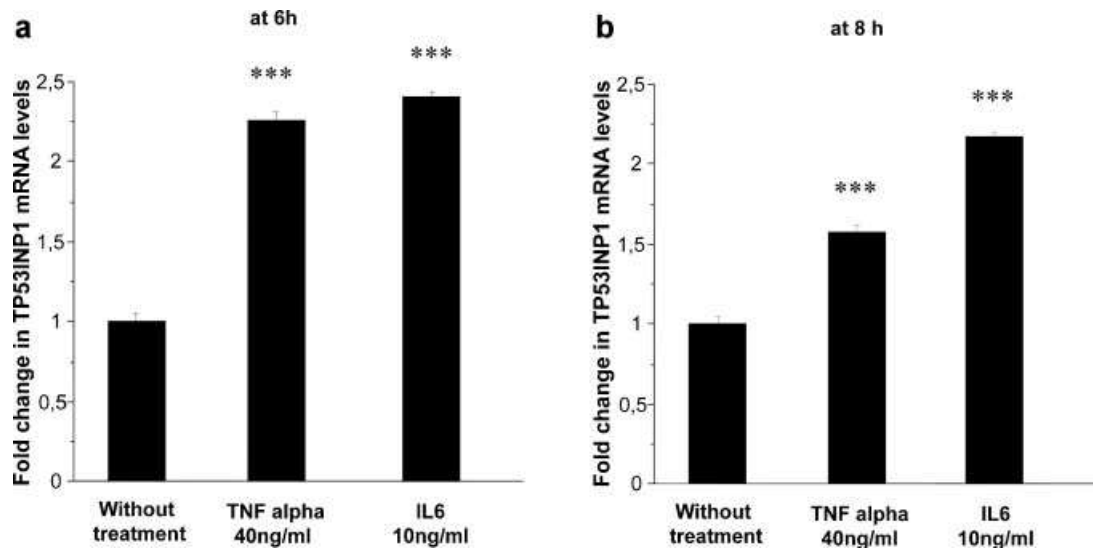


Fig. 2. Treatment of LNCaP cells in vitro with TNFalpha or IL6 increased TP53INP1 mRNA levels. LNCaP cells were treated with 40 ng/ml TNFalpha or 10 ng/ml IL6. In each case (without treatment, TNFalpha and IL6), cells were harvested for quantitative Real-Time PCR (6 hr and 8 hr). TP53INP1 mRNA levels were normalized to 18S levels, and the fold change between treated and untreated cells are shown. Relative to untreated cells, treatment of LNCaP cells with 40 ng/ml TNFalpha or 10 ng/ml IL6 increased the TP53INP1 mRNA levels by 2.25- or 2.41- fold, respectively ($***P \leq 0.001$) after 6 hr and by 1.57- or 2.17- fold, respectively ($***P \leq 0.001$) after 8 hr.

to assess the role of TP53INP1 in PC, we down-regulated TP53INP1 expression using antisense (ASO) in LNCaP PC model. LNCaP cells were treated with increasing concentrations of ASO in order to obtain the MED. Protein was extracted from transfected cells and TP53INP1 protein levels were analyzed by Western blotting using 40 μ g of protein. TP53INP1 ASO treatment significantly reduced TP53INP1 protein expression up to 70% in a dose-dependent manner, whereas TP53INP1 protein expression was not significantly suppressed by scrambled ASO control (Fig. 4).

TP53INP1 ASO inhibits proliferation and induces apoptosis of LNCaP cells in vitro. To further study the effect of TP53INP1 down-regulation in PC, inhibition of TP53INP1 using TP53INP1 ASO was employed with the appropriate scrambled controls. TP53INP1 ASO treatment significantly reduced LNCaP cell growth by 33.3% ($***P \leq 0.001$) at a concentration of 70 nM, 1 day post-treatment compared with scrambled ASO controls (Fig. 5a). Similar results were found on another prostate cancer cell line C4-2 that expresses TP53INP1 (data not shown). The induction of apoptosis by TP53INP1 ASO was clearly shown using flow cytometry. After the same treatment schedule described above, the fraction of cells undergoing apoptosis (sub G0-G1 fraction) was significantly higher after treatment with TP53INP1 ASO at a concentration of 70 nM compared with scrambled ASO controls (39% versus 5.77%) ($**P \leq 0.01$) (Fig. 5b). Similar results were also found on C4-2 cells

(data not shown). The induction of apoptosis by TP53INP1 was also shown using the measurement of the caspase-3/7 activity. The caspase-3/7 activity was significantly higher after treatment with TP53INP1 ASO at a concentration of 70 nM compared with scrambled ASO controls (ratio = 2.94) ($**P \leq 0.01$) (Fig. 5c).

DISCUSSION

This study is the first to investigate the expression of TP53INP1 in prostate tissues. We showed that TP53INP1 in normal prostate tissues was only expressed in prostate basal cells. It has already been established that TP53INP1 is able to interact with p53 modulating p53 transcriptional activity in pancreatic tissues [3]. In turn, p53 is able to activate TP53INP1 transcription. In the absence of p53, Tomasini et al. [30] showed that TP53INP1 is functionally associated with p73 and allows regulation of cell cycle progression and apoptosis independently from p53. Now, p63, another protein of the same family, is known to be only expressed in prostate basal cells in normal prostate tissue. At this day, no study has established a relation between these two proteins. Interestingly, we showed there was a neo-expression of TP53INP1 in prostate luminal cells in inflammatory tissues, in high grade PIN lesions, and in PC. There is emerging evidence in the literature that prostatic inflammation may contribute to prostate cancer development [31]. Some authors focusing on the

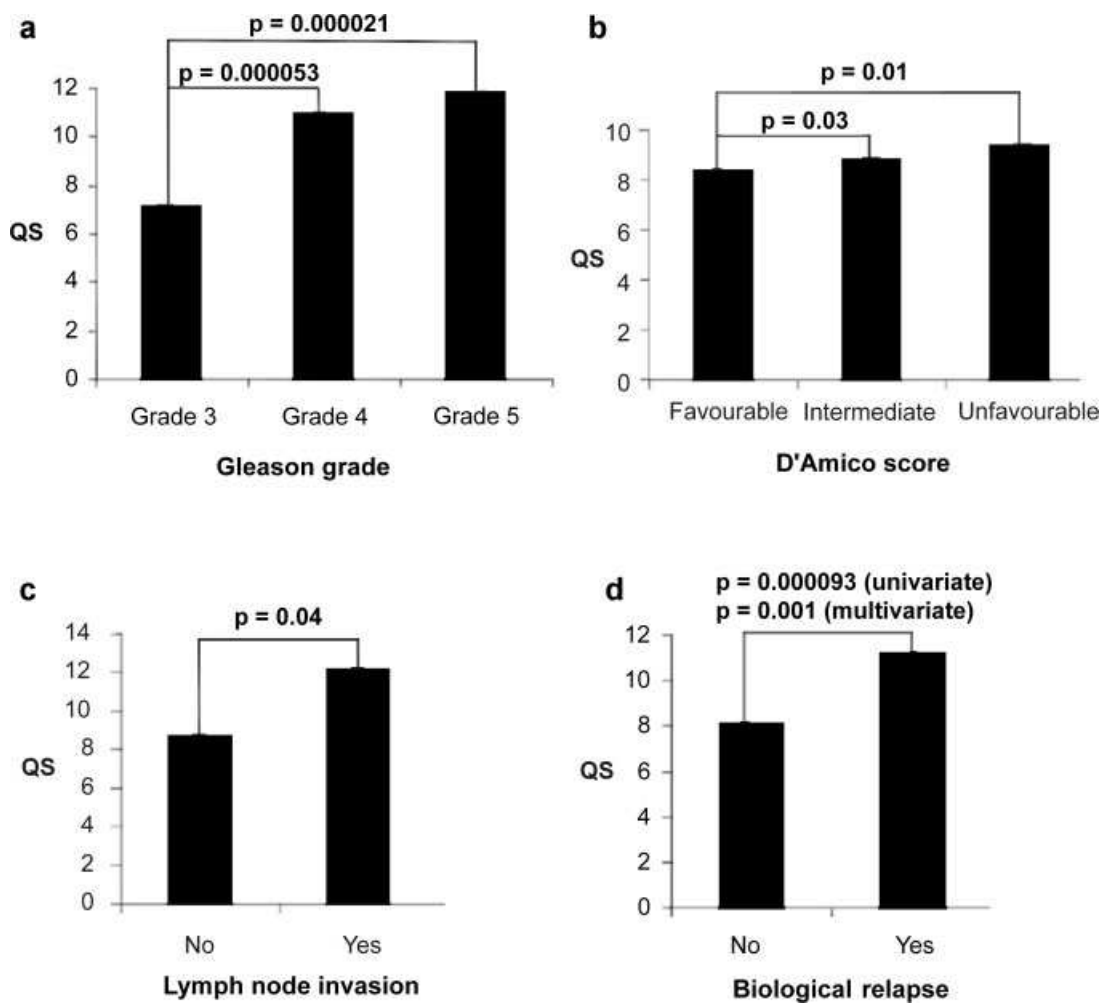


Fig. 3. In human PC, TP53INP1 overexpression correlates with poor prognostic factors and is an independent predictive factor of biological cancer relapse. TP53INP1 expression was significantly higher in Gleason grade 4 ($P = 0.000053$) and Gleason grade 5 ($P = 0.000021$) tumors compared with Gleason grade 3 tumors (a). On univariate analysis, increase of TP53INP1 expression was significantly associated with unfavourable D'Amico score ($P = 0.01$) (b), lymph node invasion ($P = 0.04$) (c) and biological cancer relapse ($P = 0.000093$) (d). On multivariate analysis, TP53INP1 overexpression was an independent predictive factor of biological cancer relapse ($P = 0.001$) (d).

initial step of prostatic carcinogenesis claim that proliferative inflammatory atrophy (PIA) is the pre-cancerous lesion leading to PIN and then to invasive carcinoma [11–13]. Several studies have shown a correlation between inflammatory cytokines and an increased risk for developing prostate cancer. IL6, an important proinflammatory cytokine, seems to be involved during carcinogenesis in the cross-talk between inflammatory cells and prostate tumor cells. IL6 can influence malignant processes [32]. IL6 enhances proliferation and acts as a survival signal for many malignant cell types including prostate tumor cell lines [11,33]. Moreover, elevated serum levels of both TNF-alpha and IL6 are associated with poor prognosis in patients with various cancers, including prostate cancer [34].

In this context, we found interesting to look if inflammatory cytokines could induce stress-induced protein TP53INP1 on PC LNCaP cells in vitro. Our results showed that stimulation of LNCaP cells with inflammatory cytokines (TNFalpha and IL6) enhances the expression of TP53INP1 mRNA. These results suggest that increase of TP53INP1 expression could be involved in the inflammation-mediated prostatic carcinogenesis. This is in line with previous studies showing that TP53INP1 expression increases in response to inflammatory stress or other stress agents such as ultra-violet, mutagenic stress, ethanol, heat shock, and oxidative stress [1–3]. Moreover, in a mice model TP53INP1 is correlated to inflammation-mediated colic carcinogenesis [8].

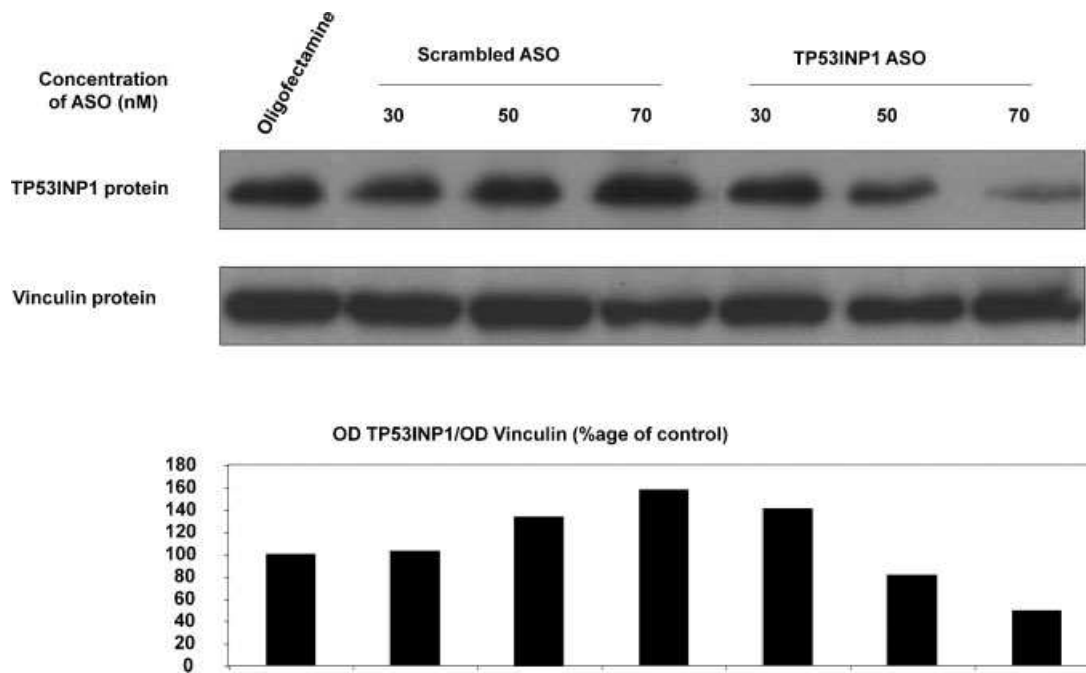


Fig. 4. TP53INP1 is dose-dependently downregulated by oligonucleotide antisense (ASO) in vitro. LNCaP cells were treated with 10 nM, 30 nM, 50 nM, 70 nM, and 100 nM of ASO in order to obtain the minimal efficient dose (MED). Protein was extracted from transfected cells and TP53INP1 protein levels were analyzed by western blotting using 40 μ g of protein. TP53INP1 ASO significantly reduced TP53INP1 protein expression up to 70% in a dose-dependent manner whereas TP53INP1 protein expression was not significantly suppressed by scrambled ASO control.

Furthermore, in PC we showed that TP53INP1 overexpression correlated with poor prognostic factors such as high Gleason grade and score, unfavorable D'Amico score, lymph node invasion, and biological cancer relapse. Our findings in human PC contrast with the pattern usually observed in others neoplasms where TP53INP1 expression inversely correlates with tumor aggressiveness. Indeed, Jiang et al. [6] showed a down-expression of TP53INP1 in gastric adenocarcinomas and its association with a poor prognosis. Gommeaux et al. [8] showed that down-expression of TP53INP1 in a mice model was involved in inflammation-mediated colic carcinogenesis. Gironella et al. [7] also showed that TP53INP1 expression is decreased in pancreatic ductal adenocarcinomas.

It is now difficult to explain how the overexpression of TP53INP1 in PC is correlated with poor prognosis whereas in colon, stomach and pancreas it is the down-expression of this protein that is correlated with poor prognosis. However, this is the first time that TP53INP1 has been specifically evaluated in PC but we have found similar results in digestive endocrine tumors (unpublished data). Moreover, we recently showed that TP53INP1 overexpression in medullary thyroid carcinomas was also correlated with poor prognostic factors (lymph node metastatic

involvement, local recurrence) [9]. We assume that the variability in tissues expression of key molecular partners of TP53INP1 could modify its actions. Indeed, TP53INP1 is a tumor suppressor gene, located on the chromosome band 8q22 [35]. Its expression depends on the activation of wild-type p53 [4]. In pancreas it has been shown that a micro-RNA (mi-RNA155) [7] could repress the expression of TP53INP1. Nevertheless, in PC, no such study has been made and preliminary results have shown that partners of TP53INP1 are not probably the same that in others organs (not shown). At present, our group is working to delineate the interactome network of TP53INP1 in different cancers.

Moreover, we demonstrated that TP53INP1 overexpression was an independent predictive factor of biological cancer relapse on multivariate analysis. That is very interesting for early detection of patients with a poor outcome in order to treat them more intensively.

TP53INP1 ASO treatment inhibits proliferation and induces apoptosis of LNCaP tumor cells in vitro. We found similar results on another prostate cancer cell line C4-2 that expresses TP53INP1.

In other tissues such as colon and pancreas, TP53INP1 is a tumor suppressor gene, and therefore most cell lines coming from these tumors do not

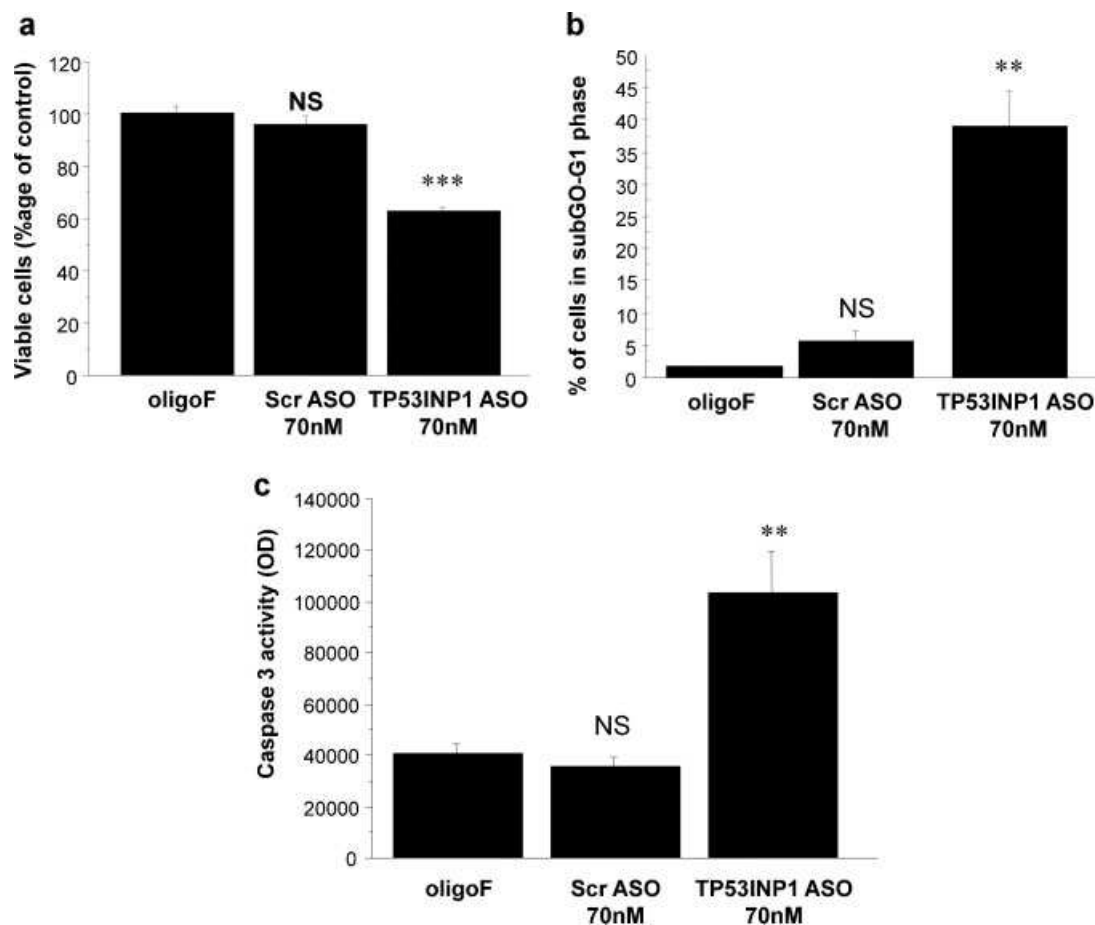


Fig. 5. TP53INP1 ASO inhibits proliferation of LNCaP cells and induces apoptosis in vitro. LNCaP cells were treated daily with 70 nM of TP53INP1 ASO or scrambled ASO control for 2 days. Cell viability was determined using the crystal violet assay. TP53INP1 ASO treatment significantly reduced LNCaP cell growth by 33.3% ($***P \leq 0.001$), 1 day post-treatment compared with scrambled ASO control (a). The induction of apoptosis by TP53INP1 ASO was clearly shown using flow cytometry. After the same treatment schedule described above, the fraction of cells undergoing apoptosis (sub-G0-G1 fraction) was significantly higher after treatment with TP53INP1 ASO compared with scrambled ASO control (39% versus 5.77%) ($**P \leq 0.01$) (b). The induction of apoptosis by TP53INP1 was also shown using the measurement of the caspase-3/7 activity. The caspase-3/7 activity was significantly higher after treatment with TP53INP1 ASO at a concentration of 70 nM compared with scrambled ASO control (ratio = 2.94) ($**P \leq 0.01$) (c).

express TP53INP1. Our team previously published that forced overexpression of TP53INP1 in colon (SW480) [30] and pancreas (MiaPaCa-2, Panc-1) [7] induces cell cycle arrest and apoptosis.

This seems to confirm the hypothesis that it is an increase of TP53INP1 expression that is implicated in PC and we are now working to see if TP53INP1 can be a target for specific therapy of PC.

CONCLUSIONS

TP53INP1 overexpression in PC seems to be a worse prognostic factor, particularly predictive of biological cancer relapse. Furthermore, our results in vitro suggest that TP53INP1 could be considered as a relevant target for potential specific therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr A Carrier for rat anti-human monoclonal antibody anti-TP53INP1, Dr L Fazli for CISH, Dr MJ Pébusque for sense and antisense riboprobe (CISH), and MN Lavaut for TMA building.

REFERENCES

1. Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem* 2001;276:44185–44192.
2. Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng CC, Taya Y, Monden M, Nakamura Y. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell* 2001;8:85–94.

3. Tomasini R, Samir AA, Pebusque MJ, Calvo EL, Totaro S, Dagorn JC, Dusetti NJ, Iovanna JL. P53-dependent expression of the stress-induced protein (SIP) Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *Eur J Cell Biol* 2002;81:294–301.
4. Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, Malissen B, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem* 2003;278:37722–37729.
5. Cano CE, Gommeaux J, Pietri S, Culcasi M, Garcia S, Seux M, Barelrier S, Vasseur S, Spoto RP, Pebusque MJ, Dusetti NJ, Iovanna JL, Carrier A. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Canc Res* 2009;69:219–226.
6. Jiang PH, Motoo Y, Garcia S, Iovanna JL, Pebusque MJ, Sawabu N. Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:691–696.
7. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pebusque MJ, Dusetti NJ. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16170–16175.
8. Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pebusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, Carrier A. Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol* 2007;27:2215–2228.
9. Taieb D, Giusiano S, Sebag F, Marcy M, de Micco C, Palazzo FF, Dusetti NJ, Iovanna JL, Henry JF, Garcia S, Taranger-Charpin C. Tumor protein p53-induced nuclear protein (TP53INP1) expression in medullary thyroid carcinoma: A molecular guide to the optimal extent of surgery? *World J Surg* 34:830–835.
10. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361:859–864.
11. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: Implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999;155:1985–1992.
12. Putzi MJ, De Marzo AM. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 2000;56:828–832.
13. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349:366–381.
14. Stapleton AM, Timme TL, Gousse AE, Li QF, Tobon AA, Kattan MW, Slawin KM, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC. Primary human prostate cancer cells harboring p53 mutations are clonally expanded in metastases. *Clin Canc Res* 1997;3:1389–1397.
15. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Weinstein M, Tomaszewski JE, Schultz D, Rhude M, Rocha S, Wein A, Richie JP. Predicting prostate specific antigen outcome preoperatively in the prostate specific antigen era. *J Urol* 2001;166:2185–2188.
16. Stamey TA, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Morphometric and clinical studies on 68 consecutive radical prostatectomies. *J Urol* 1988;139:1235–1241.
17. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:829–835.
18. Charpin C, Vielh P, Duffaud F, Devictor B, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Horschowski N, Piana L. Quantitative immunocytochemical assays of P-glycoprotein in breast carcinomas: Correlation to messenger RNA expression and to immunohistochemical prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1539–1545.
19. Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Devictor B, Andrac L, Choux R, Lavaut MN, Allasia C. Automated and quantitative immunocytochemical assays of CD44v6 in breast carcinomas. *Hum Pathol* 1997;28:289–296.
20. Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Martini F, Andrac L, Bonnier P, Lavaut MN, Allasia C. CD31/PECAM automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas: Correlation with patient follow-up. *Am J Clin Pathol* 1997;107:534–541.
21. Charpin C, Garcia S, Bonnier P, Martini F, Andrac L, Horschowski N, Lavaut MN, Allasia C. Prognostic significance of Nm23/NDPK expression in breast carcinoma, assessed on 10-year follow-up by automated and quantitative immunocytochemical assays. *J Pathol* 1998;184:401–407.
22. Charpin C, Garcia S, Bonnier P, Martini F, Andrac L, Horschowski N, Lavaut MN, Allasia C. bcl-2 automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas: Correlation with 10-year follow-up. *J Clin Oncol* 1998;16:2025–2031.
23. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: Comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression. *Hum Pathol* 2004;35:176–183.
24. Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse in breast cancer: Retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Canc* 2005;116:734–739.
25. Garcia S, Dales JP, Charafe-Jauffret E, Carpentier-Meunier S, Andrac-Meyer L, Jacquemier J, Andonian C, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype. *Hum Pathol* 2007;38:830–841.
26. Charpin C, Giusiano S, Secq V, Carpentier S, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Garcia S. Quantitative immunocytochemical profile to predict early outcome of disease in triple-negative breast carcinomas. *Int J Oncol* 2009;34:983–993.
27. Charpin C, Secq V, Giusiano S, Carpentier S, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Garcia S. A signature predictive of disease outcome in breast carcinomas, identified by quantitative immunocytochemical assays. *Int J Canc* 2009;124:2124–2134.
28. Gleave M, Tolcher A, Miyake H, Nelson C, Brown B, Beraldi E, Goldie J. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model. *Clin Canc Res* 1999;5:2891–2898.
29. Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L, Hurtado-Coll A, Yamanaka K, Gleave M. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Canc Res* 2004;64:6595–6602.
30. Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn JC, Pebusque MJ, Iovanna JL, Dusetti NJ. TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene* 2005;24:8093–8104.

31. Haverkamp J, Charbonneau B, Ratliff TL. Prostate inflammation and its potential impact on prostate cancer: A current review. *J Cell Biochem* 2008;103:1344–1353.
32. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem* 2005;95:497–505.
33. Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol* 2004;172:S6–S11; discussion S11-12.
34. Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Canc* 2004;90:2312–2316.
35. Nowak J, Tomasini R, Mattei MG, Azizi Samir LA, Dagorn JC, Dusetti N, Iovanna JL, Pebusque MJ. Assignment of tumor protein p53 induced nuclear protein 1 (TP53INP1) gene to human chromosome band 8q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res* 2002;97:140E.

5. Valorisation et transfert de technologies

La molécule inhibitrice ASO TP53INP1 a fait l'objet d'un dépôt de brevet européen : **Patent EP10187564.9** (2010) "Compounds inhibiting TP53INP1 activity for the treatment of prostate cancer, and its use in screening and diagnostic methods."

II. Résultats 2 : adénocarcinomes prostatiques résistants à la castration

1. Sur TMA : TP53INP1 lié à l'échappement hormonal

Nous avons pu montrer sur TMA constitué d'échantillons tumoraux de patients traités à différents stades d'hormonothérapie ou au stade d'hormono-résistance, que l'expression de TP53INP1 diminue dans les ADK prostatiques sous hormonothérapie et que TP53INP1 devient uniformément fortement surexprimé lors de l'échappement hormonal.

2. Sur lignées cellulaires C4-2

De façon comparable aux lignées hormono-sensibles, l'inhibition de TP53INP1 par l'ASO TP53INP1 induit une augmentation de l'apoptose et une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires hormono-résistantes C4-2.

3. Sur modèles animaux (souris)

Nous avons dans un premier temps confirmé les données obtenues par TMA sur un modèle animal (souris nude) chez lesquelles nous avons implantés des tumeurs (xénogreffes) par injections de cellules tumorales LNCaP. L'expression de TP53INP1 dans les tumeurs a été évaluée après castration. L'expression de TP53INP1 diminue légèrement une semaine après castration puis TP53INP1 devient significativement surexprimé 35 jours après la castration (phase hormono-résistante). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus sur TMA.

Dans un second temps, nous avons voulu tester in vivo sur des souris nude, l'efficacité de l'ASO TP53INP1 dans la phase hormono-résistante du cancer. Nous avons donc injecté par

voie sous-cutanée des cellules tumorales hormono-résistantes C4-2 (10 millions de cellules /100µl) dans des souris nude. Lorsque les tumeurs ont acquis un volume suffisant, nous avons séparés les souris en 4 groupes. Deux groupes ont été traités par injection quasi-journalière (5 jours sur 7) intra-péritonéale d'ASO TP53INP1 à la dose de 10mg/kg/jour pendant 7 semaines +/- chimiothérapie par docétaxel. Les deux autres groupes servaient de contrôles : scrambled ASO +/- chimiothérapie par docétaxel.

Le traitement par ASOTP53INP1 diminue de façon statistiquement significative la croissance des tumeurs hormono-résistantes par rapport aux souris contrôles et augmente la cytotoxicité du docétaxel.

4.2^{ème} publication

Giusiano S, Baylot V, Fazli L, Gleave M, Garcia S, Taranger-Charpin C, Iovanna J, Rocchi P. TP53INP1 as new therapeutic target in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 2011 Dec 27. doi: 10.1002/pros.22477.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

This material is reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc.

Cet article est reproduit avec la permission de John Wiley & Sons, Inc.

TP53INP1 As New Therapeutic Target in Castration-Resistant Prostate Cancer

Sophie Giusiano,^{1,2,3*} Virginie Baylot,^{2,3} Claudia Andrieu,^{2,3} Ladan Fazli,⁴ Martin Gleave,⁴
 Juan Lucio Iovanna,^{2,3} Colette Taranger-Charpin,^{1,2,3} Stéphane Garcia,^{1,2,3}
 and Palma Rocchi^{2,3}

¹Department of Pathology, Hôpital Nord, Chemin des Bourrellys, Marseille, France

²Aix-Marseille Univ, Marseille, France

³INSERM U624 «Stress Cellulaire», Marseille, France

⁴The Vancouver Prostate Centre, Vancouver, BC, Canada

BACKGROUND. Prostate cancer (PC) is one of the most common malignancies in industrialized countries, and the second leading cause of cancer-related death in the United States. We recently showed that over-expression of tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1), a cell stress response protein, is a worse prognostic factor in PC, particularly predictive of biological cancer relapse. Moreover, treatment of castration-sensitive (CS) LNCaP tumor cells with a TP53INP1 antisense oligonucleotide (TP53INP1 ASO) inhibits proliferation and induces apoptosis. The aim of this study was to investigate variations of TP53INP1 expression in PC during androgen withdrawal therapy and in castration-resistant prostate cancer (CRPC).

METHODS. Quantitative measurements of immunohistochemical expression of TP53INP1 using high-throughput densitometry, assessed on digitized microscopic tissue micro-array images were correlated with hormone therapy (HT) status in human PC. Northern blot analysis of TP53INP1 after castration was performed in LNCaP xenograft. Treatment of CR C4-2 tumor cells in vitro with TP53INP1 ASO was analyzed. We also analyzed the effect of TP53INP1 ASO treatment in vivo on tumor xenograft growth.

RESULTS. TP53INP1 protein expression decreases during HT and increases after HT in human CRPC. TP53INP1 mRNA increases significantly in CR tumors of LNCaP xenograft. Moreover, treatment of CR C4-2 cells with TP53INP1 ASO downregulates TP53INP1 protein level, inhibits proliferation, and induces apoptosis. Finally, in vivo, TP53INP1 ASO treatment significantly inhibits the tumoral progression of CR C4-2 xenograft and enhances docetaxel cytotoxicity.

CONCLUSIONS. These results suggest that TP53INP1 could be considered as a relevant-specific target for molecular therapy of CRPC. *Prostate*

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: TP53INP1; castration-resistant prostate cancer; antisense oligonucleotide; tissue micro-array; hormone therapy

INTRODUCTION

Remarkably, in the more than a 100 years that have passed, prostate cancer (PC) has become a major health problem of the 21st century. PC is one of the most common malignancies in industrialized countries, and the second leading cause of cancer-related death in the United States with about 30,000 deaths reported annually [1]. Even with aggressive screening, approximately one-third of patients believed to

All authors of the paper certify that there is no potential conflicts of interest related to financial situations or others consideration of any kind.

*Correspondence to: Dr. Sophie Giusiano, Department of Pathology, Hôpital Nord, Pavillon Etoile, Chemin des Bourrellys, 13915 Marseille, France. E-mail: sophie.giusiano@ap-hm.fr

Received 5 November 2011; Accepted 1 December 2011

DOI 10.1002/pros.22477

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

have localized PC will already have micro-metastatic disease at the time of definitive local therapy [2]. These patients will eventually progress to clinically detectable metastatic disease and will require systemic therapy. Typically, these patients initially respond to androgen ablative therapy, but with time, their tumors ultimately become unresponsive and recur within 2 years as castration-resistant prostate cancer (CRPC) [3]. At this point patients have a median survival of around 12–15 months [2]. Androgen ablation does not induce the apoptotic death of CR cells even though the cells retain “the machinery to undergo this programmed form of death” [4–6]. Significant progress is still needed in the development of non-androgen ablative approaches for treating CRPC. A remarkable fact about metastatic PC is that its lethality is not attributable to a high rate of malignant proliferation but enhanced resistance to apoptosis [7,8]. Recently, docetaxel-based regimens have shown improved survival in men with CRPC in phase III studies [9,10]. However, the median overall survival was prolonged for only 2–3 months, and thus development of new therapeutic approaches are essential, including antisense oligonucleotides (ASO) and drug therapies that target relevant signaling pathways [11].

We recently showed, using tissue micro-array (TMA) analysis, that over-expression of tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1), a cell stress response protein, is a worse prognostic factor in PC, particularly predictive of biological cancer relapse [12]. Moreover, treatment of castration-sensitive (CS) LNCaP tumor cells with a TP53INP1 ASO inhibits proliferation and induces apoptosis. The aim of the present study was to investigate variations of TP53INP1 expression in PC during androgen withdrawal therapy and in CRPC.

MATERIALS AND METHODS

Prostate Tissue Specimens for Hormone-Treated (HT) Arrays

Prostate tissues ($n = 232$) were obtained from the tissue bank in the Department of Pathology and Prostate Research Laboratory in the Jack Bell Research Centre at the Vancouver General Hospital. Specimens were chosen to represent various treatment duration of androgen withdrawal therapy prior to radical prostatectomy ranging from no treatment ($n = 35$), 1–3 months ($n = 58$), 3–6 months ($n = 52$), and 6 months ($n = 57$). CR tumors were also identified ($n = 30$). Most tissues were from radical prostatectomy specimens, whereas CR tissues were obtained from transurethral resections or metastatic lesions from men with CR disease. Metastatic lesions were obtained from warm autopsy specimens of 13 men who

succumbed to PC (courtesy of Dr. Bob Vessella, Washington University, Seattle). All radical prostatectomy specimens in the array were Gleason grade ≤ 4 and clinical stage T1 or T2. One metastatic prostate lesion was obtained per patient from 7 bone lesions, 3 lymph node lesions, 2 liver lesions, and 1 adrenal lesion.

Tissue Micro-Array

A TMA was constructed using a Beecher microarrayer from the above paraffin-embedded specimens with matching hematoxylin–eosin slides used to identify the tumor and accurately obtain the core sample. Each case is represented with three cores in the TMA.

Immunohistochemistry

Sections were deparaffinized and rehydrated through xylene and ethanol then transferred to the 0.02% Triton for permeabilization. Slides in citrate buffer (pH = 6) were heated in the steamer for 30 min. After cooling for 30 min and washing thrice for 5 min in PBS, the slides were incubated in 3% BSA for further 30 min. The slides were successively transferred to 3% H₂O₂ for 10 min and then were incubated overnight with anti-TP53INP1 (clone E12 kindly provided by Dr. A. Carrier, Inserm U624, Marseilles, France) at the concentration of 1:200 in 1% BSA. The next day, the primary antibody was washed extensively with PBS and the LSAB+ kit (Dako, Carpinteria, CA) was used as detection system. Chromogen Nova-red (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was applied for 2 min and counterstaining was performed with hematoxylin–eosin (Vector Laboratories). After ethanol rehydrating, the slides were covered with a cover glass with Cytoseal, a xylene-based mounting media (Stephen Scientific, Riverdale, NJ). Negative control slides were processed in an identical fashion to that above, with the substitution of 1% BSA for the primary antiserum. Photomicrographs were taken through a Leica DMLS microscope coupled to a digital camera (Photometrics CoolSNAP, Roper Scientific, Inc., Glenwood, IL).

Scoring of TP53INP1 Staining and Image Analysis

The staining intensity of malignant tissue was evaluated and scored by one pathologist and automated quantitative image analysis was done with pro-plus image software (MediaCybernetics, San Diego, CA). Specimens were graded from 0 to +3 intensity representing the range from no staining to heavy staining. The overall percentage of cancer cells showing

staining was also indicated. All comparisons of staining intensities and percentages were made at 200× magnification.

Tumor Cell Lines

The human CS PC cell line LNCaP was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and the human CR prostatic cancer cell line C4-2 was made by Dr. Martin Gleave (The Prostate Centre, Vancouver, Canada). Cells were maintained in RPMI 1640 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) supplemented with 10% FBS.

LNCaP Tumor Xenograft

For in vivo study, 10^6 CS LNCaP cells were inoculated s.c. with 0.1 ml of Matrigel (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) in the flank region of 5-week-old male athymic nude mice (Harlan Sprague Dawley, Inc. Indianapolis, IN) via 27-gauge needle. All animal procedures were performed according to local guidelines on animal care and with appropriate institutional certification. Tumors were measured twice weekly and their volumes were calculated by the formula length × width × depth × 0.5236. Mice bearing tumors between 200 and 300 mm³ in volume were castrated via scrotal approach and sacrificed at 0, 3–7, 28, and 35 days after.

PSA Index Determination

PSA determination was performed weekly for the two constant periods in all mice. Blood samples were obtained (100 μl) by tail bleeding, serum were recovered and stored at –20°. Serum PSA concentration was measured using the automated IMX immunoassay system (Abbott, France). The PSA index was defined as the PSA secretion in serum per unit of tumoral volume (ng/ml/mm³) as previously described by Rocchi et al. [13].

Northern Blot Analysis

Total RNA was isolated from LNCaP xenografts using Trizol method (Invitrogen, Life Technologies, Inc., Burlington, Ontario, Canada). The quality and quantity of RNA was assessed with an Agilent 2100 bioanalyzer (Caliper Technologies Corp., Mountain View, CA). Electrophoresis, hybridization, and washing conditions were carried out as previously reported [14]. TP53INP1 cDNA probes were obtained from M.J. Pébusque (Inserm U624, Marseilles). The density of bands for TP53INP1 were normalized with 28S rRNA by densitometric analysis (Quantity One, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Each assay was done in triplicate.

TP53INP1 ASO

Phosphorothioate ASOs used in this study were purchased from Operon Biotechnologies (Cologne, Germany). The sequence of TP53INP1 ASO used corresponded to the human TP53INP1 translation initiation site (5'-CTGGAGAGGCCGCTGGAACAT-3'). A scrambled ASO (5'-CGTGTAGGTACGGCAGATC-3') was used as a control.

Treatment of CRC4-2 Cells With Increasing Concentrations of TP53INP1 ASO

C4-2 cells were plated at the density of 1.5 million cells/78 cm² and treated 1 day later for 2 days with increasing concentrations of ASO in order to obtain the minimal efficient dose (MED). Oligofectamine, a cationic lipid (Invitrogen, Life Technologies) was used to increase the ASO uptake into the cells. C4-2 cells were treated with 10, 30, 50, 70, and 100 nM of ASO after a pre-incubation for 20 min with 3 mg/ml oligofectamine in serum-free optiMEM. Four hours after the beginning of the incubation, the medium was replaced with standard culture medium described above.

Western Blot Analysis

Samples containing equal amounts of protein (40 μg) from lysates of treated C4-2 cells underwent electrophoresis on a SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter. Filters were blocked in PBS containing 5% non-fat milk powder at 4°C overnight and then incubated for 1 hr with a 1:200 diluted antihuman TP53INP1 rat monoclonal antibody (kindly provided by Dr. A. Carrier, Inserm U624) or 1:2,000 diluted antihuman Vinculin mouse monoclonal antibody (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Filters were then incubated for 30 min with 1:1,000 diluted horseradish peroxidase-conjugate antirat or 1:2,500 diluted HRP-conjugate antimouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Specific proteins were detected using an enhanced chemiluminescence Western blotting analysis system (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL).

Treatment of CRC4-2 Cells With 70 nM of ASO (MED)

C4-2 cells were plated at the density of 150,000 cells/3.8 cm² and 1.5 million/78.5 cm² and treated 1 day later for 2 days with ASO. Oligofectamine, a cationic lipid (Invitrogen, Life Technologies) was used to increase the ASO uptake into the cells. C4-2 cells were treated with 70 nM of ASO after a pre-incubation for 20 min with 3 mg/ml oligofectamine in serum-free optiMEM. Four hours after the beginning of the incubation, the medium was replaced with standard culture medium described above.

In Vitro Mitogenic assay

The in vitro growth-inhibitory effects of TP53INP1 ASO on C4-2 cells were assessed using an assay based on the uptake and elution of crystal violet dye by the cells as previously described [15]. One day after ASO treatment, cells were fixed in 1% glutaraldehyde (Sigma), stained with 0.5% crystal violet (Sigma), and eluted with 500 μ l of Sorensen's solution (9 mg of trisodium citrate in 305 ml of distilled H₂O, 195 ml of 0.1 N HCl, and 500 ml of 90% ethanol). Absorbance of each well was measured by a Titertek Multiskan TCC/340 (Flow Laboratories, McLean, VA) at 560 nm. Each assay was done in quadruplicate.

Flow Cytometric Analysis

Flow cytometric analysis of propidium iodide-stained nuclei was done as described previously [16]. Briefly, 1 day after ASO treatment, cells were trypsinized and analyzed for relative DNA content on a dual laser flow cytometer (Beckman Coulter et Epics Elite, Beckman, Inc, Miami, FL). Each assay was done in triplicate.

C4-2 Tumor Xenograft

For in vivo study, 10⁶ CR C4-2 cells were inoculated s.c. with 0.1 ml of Matrigel (Becton Dickinson Labware) in the flank region of 5-week-old male athymic nude mice (Harlan Sprague Dawley, Inc.) via 27-gauge needle. All animal procedures were performed according to local guidelines on animal care and with appropriate institutional certification. When mice bearing tumors were 100 mm³ in volume, we made four groups. Two groups received scrambled control \pm docetaxel whereas the two groups received TP53INP1 ASO treatment (10 mg/kg/day) \pm docetaxel during 6 weeks. Tumors were measured twice weekly and their volumes were calculated by the formula length \times width \times depth \times 0.5236.

Statistical Analysis

All the results were expressed as the mean \pm SE. Statistical analysis was done with a one-way ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference test (StatView, Brain Power, Inc., Calabasas, CA). * $P \leq 0.05$ was considered significant; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

RESULTS

TP53INP1 Immunostaining Decreases During HT and Increases After HT in Human CRPC

To investigate variations of TP53INP1 levels during androgen ablation or during CR progression in

the human disease, 232 PC specimens spotted on a TMA were stained for TP53INP1 by immunohistochemistry (Fig. 1A,B). TP53INP1 protein was present in the cytoplasm of the cancer cells (Fig. 1A). TP53INP1 significantly decreases during hormone therapy (HT) to become uniformly highly expressed in 45% of CR samples compared to all time points 1–3 (increase of 71%), 3–6 (increase of 97%), and 6 (increase of 108%) months after HT (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; Fig. 1B). The mean intensity of positive cells in the untreated, 1–3, 3–6, >6 months, and CR were 1.55, 1.07, 0.93, 0.88, and 1.83, respectively, when scored as described in Materials and Methods Section. CR tumor tissue from prostate and metastatic sites exhibited uniform and highly positive TP53INP1 staining (Fig. 1C,D).

TP53INP1 mRNA Levels Increase in LNCaP Nude Xenograft After Castration

To investigate variations of TP53INP1 levels after castration in PC xenograft, 10⁶ CS LNCaP cells were inoculated s.c. with 0.1 ml of Matrigel (Becton Dickinson Labware) in the flank region of 5-week-old male athymic nude mice (Harlan Sprague Dawley, Inc.) via 27-gauge needle. All animal procedures were performed according to local guidelines on animal care and with appropriate institutional certification. Tumors were measured twice weekly and their volumes were calculated by the formula length \times width \times depth \times 0.5236. Mice bearing tumors between 200 and 300 mm³ in volume were castrated via scrotal approach and tumors were harvested 0, 3–7, 28, and 35 days after castration. TP53INP1 mRNA levels were measured by Northern blot analysis as described in Materials and Methods Section. TP53INP1 mRNA levels slightly decrease during the first week after castration to significantly increase 35 days after castration in CR tumors (Fig. 2A,B) that overexpress PSA (Fig. 2C).

TP53INP1 Is Dose-Dependently Downregulated by Antisense Oligonucleotide (ASO) In Vitro

In order to assess the role of TP53INP1 in CRPC, we downregulated TP53INP1 expression using ASO in C4-2 model. CR C4-2 cells were treated with increasing concentrations of ASO in order to obtain the MED. Protein was extracted from transfected cells and TP53INP1 protein levels were analyzed by Western blotting using 40 μ g of protein. TP53INP1 ASO treatment significantly reduced TP53INP1 protein expression up to 70% in a dose-dependent manner, whereas TP53INP1 protein expression was not significantly suppressed by scrambled ASO control (Fig. 3A,B).

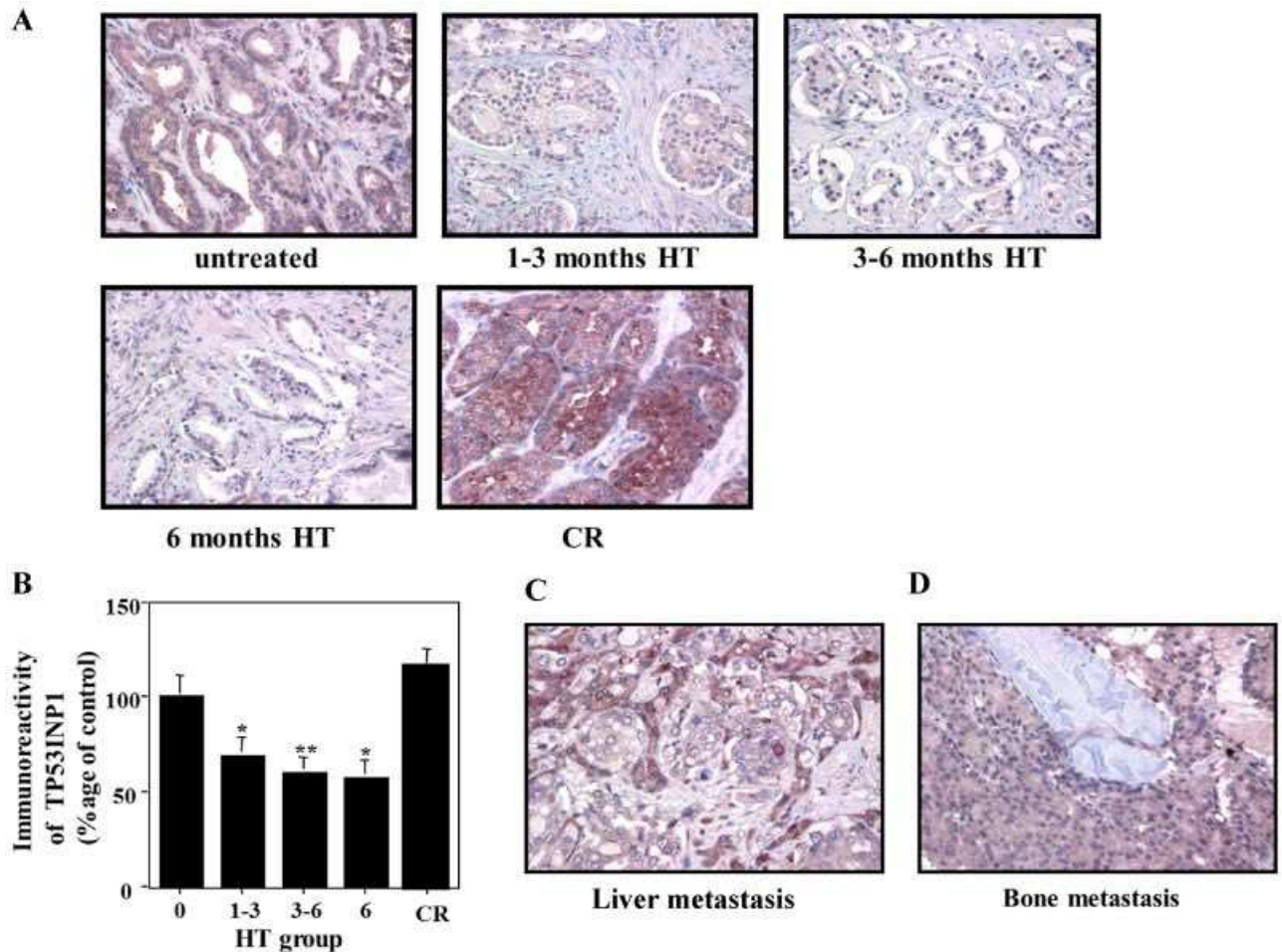


Fig. 1. TP53INPI immunostaining decreases during HT and increases after HT in human CRPC. To investigate variations of TP53INPI levels during androgen-ablation or during CR progression in the human disease, 232 PC specimens spotted on a tissue micro-array were stained for TP53INPI by immunohistochemistry (**A,B**). TP53INPI protein was present in the cytoplasm of the cancer cells (**A**). TP53INPI significantly decreases during HT to become uniformly highly expressed in 45% of CR samples compared to all time points 1–3 (increase of 71%), 3–6 (increase of 97%), and 6 (increase of 108%) months after HT (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; **B**). The mean intensity of positive cells in the untreated, 1–3, 3–6, >6 months, and CR were 1.55, 1.07, 0.93, 0.88, and 1.83, respectively, when scored as described in Materials and Methods Section. CR tumor tissue from prostate and metastatic sites exhibited uniform and highly positive TP53INPI staining (**C,D**).

TP53INPI ASO Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of CR C4-2 Cells In Vitro

To further study the effect of TP53INPI downregulation in CRPC, inhibition of TP53INPI using TP53INPI ASO was employed with the appropriate scrambled controls. TP53INPI ASO treatment significantly reduced C4-2 cell growth by 27% (** $P \leq 0.001$) at a concentration of 70 nM, 1 day post-treatment compared with scrambled ASO control (Fig. 4A). The induction of apoptosis by TP53INPI ASO was clearly shown using flow cytometry. After the same treatment schedule described above, the fraction of cells undergoing apoptosis (sub-G0–G1 fraction) was significantly higher after treatment with TP53INPI ASO at a concentration of 70 nM compared

with scrambled ASO control (15.3% vs. 1.5%, *** $P \leq 0.001$; Fig. 4B).

TP53INPI ASO Reduces the Tumor Growth in Mice (C4-2 Xenografts)

To determine the effect of TP53INPI ASO in vivo, 10^6 CR C4-2 cells were inoculated s.c. with 0.1 ml of Matrigel (Becton Dickinson Labware) in the flank region of 5-week-old male athymic nude mice (Harlan Sprague Dawley, Inc.) via 27-gauge needle. All animal procedures were performed according to local guidelines on animal care and with appropriate institutional certification. When mice bearing tumors were 100 mm³ in volume, we made four groups. Two groups received scrambled control \pm docetaxel

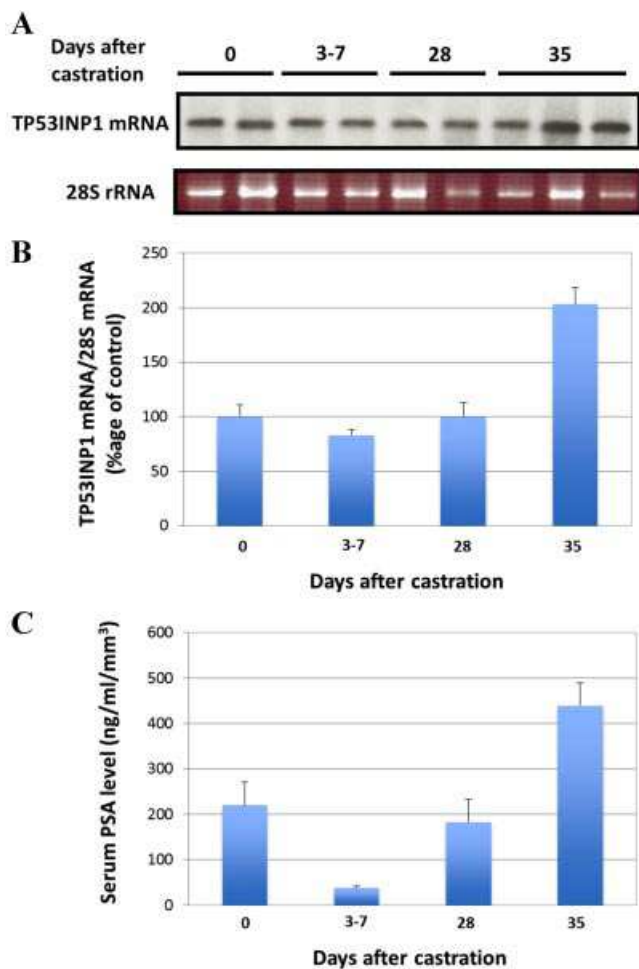


Fig. 2. Expression profile of TP53INP1 in LNCaP nude xenograft after castration. To investigate variations of TP53INP1 levels after castration in PC xenograft, 10^6 CS LNCaP cells were inoculated s.c. with 0.1 ml of Matrigel (Becton Dickinson Labware) in the flank region of 5-week-old male athymic nude mice (Harlan Sprague Dawley, Inc.) via 27-gauge needle. All animal procedures were performed according to local guidelines on animal care and with appropriate institutional certification. Tumors were measured twice weekly and their volumes were calculated by the formula length \times width \times depth \times 0.5236. Mice bearing tumors between 200 and 300 mm³ in volume were castrated via scrotal approach and tumors were harvested 0, 3–7, 28, and 35 days after castration. TP53INP1 mRNA levels were measured by Northern blot analysis. The density of bands for TP53INP1 were normalized with 28S rRNA. TP53INP1 mRNA levels decrease during the first week after castration to significantly increase 35 days after castration in CR tumors (A,B) that overexpress PSA (C).

whereas the other two groups received TP53INP1 ASO treatment (10 mg/kg/day) \pm docetaxel during 6 weeks. Tumors were measured twice weekly and their volumes were calculated by the formula length \times width \times depth \times 0.5236. TP53INP1 downregulation using TP53INP1 ASO treatment significantly

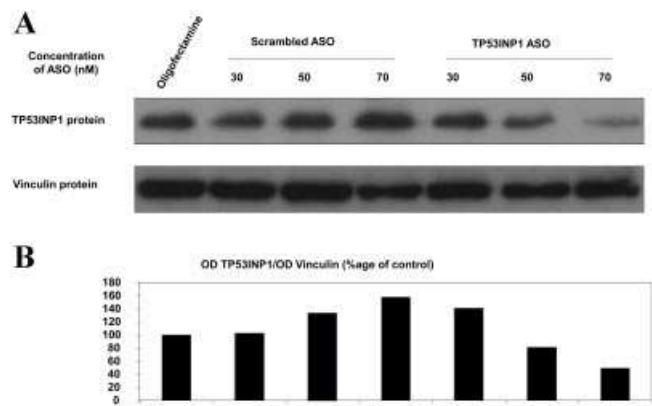


Fig. 3. TP53INP1 is dose-dependently downregulated by anti-sense oligonucleotide (ASO) in vitro. CR C4-2 cells were treated with 10, 30, 50, 70, and 100 nM of ASO in order to obtain the minimal efficient dose (MED). Protein was extracted from transfected cells and TP53INP1 protein levels were analyzed by Western blotting using 40 μ g of protein. TP53INP1 ASO significantly reduced TP53INP1 protein expression up to 70% in a dose-dependent manner, whereas TP53INP1 protein expression was not significantly suppressed by scrambled ASO control (A,B).

inhibits CR tumor progression compared with scrambled ASO control group. Indeed, at the end of the experiment, tumor volume was 1093.14 mm³ in mice treated with TP53INP1 ASO versus 2729.26 mm³ in mice treated with scrambled ASO control ($*P < 0.05$; Fig. 5A). Moreover, TP53INP1 ASO treatment enhances docetaxel cytotoxicity. Indeed, at the end of the experiment, tumor volume was 709.94 mm³ in mice treated with TP53INP1 ASO + docetaxel versus 2212.02 mm³ in mice treated with scrambled ASO control + docetaxel ($*P < 0.05$; Fig. 5B).

DISCUSSION

This study is the first to investigate TP53INP1 variations expression in CRPC. Androgen ablation induces apoptotic PC cell death in 70–80% of men with advanced PC. However, although most patients initially respond well to androgen ablation, remissions are temporary and after 2 years of androgen blockade, most patients progress to CRPC [17]. Recently, docetaxel-based chemotherapy has prolonged the median overall survival by 2–3 months [11]. Cellular and molecular events that mediate CRPC progression are complex and multifactorial [13].

TP53INP1 is a p53-inducible cell stress response protein known to be increased in response to inflammatory stress or other stress agents, such as ultraviolet, mutagenic stress, ethanol, heat shock, and oxidative stress [18–20]. Over-expression of TP53INP1 induces cell cycle arrest in G1 phase and enhances the p-53-mediated apoptosis [21]. Furthermore TP53INP1

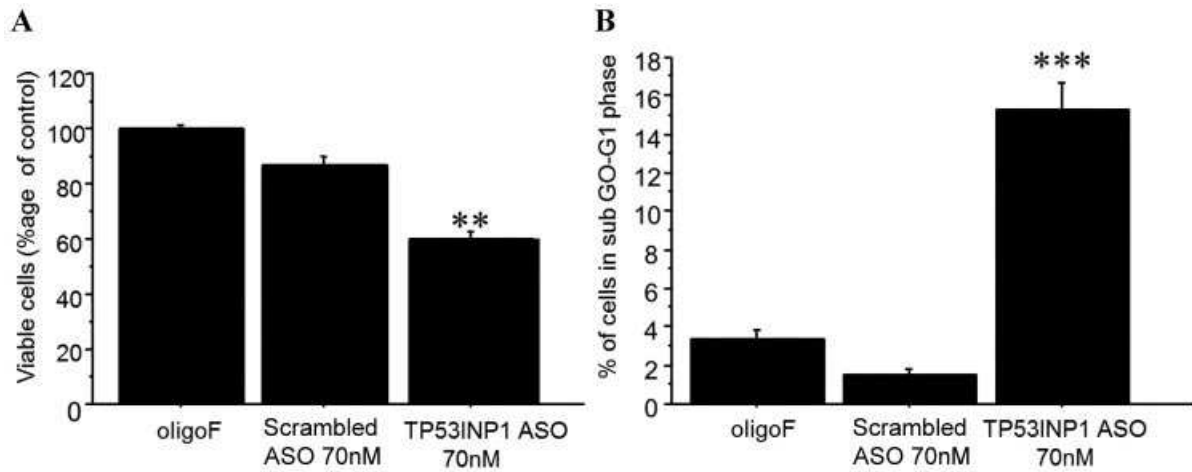


Fig. 4. TP53INP1 ASO inhibits proliferation and induces apoptosis of CR C4-2 cells in vitro. C4-2 cells were treated daily with 70 nM of TP53INP1 ASO or scrambled ASO control for 2 days. Cell viability was determined using the crystal violet assay. TP53INP1 ASO treatment significantly reduced CR C4-2 cell growth by 27% (** $P < 0.001$), 1 day post-treatment compared with scrambled ASO control (**A**). The induction of apoptosis by TP53INP1 ASO was clearly shown using flow cytometry. After the same treatment schedule described above, the fraction of cells undergoing apoptosis (sub-G0–G1 fraction) was significantly higher after treatment with TP53INP1 ASO compared with scrambled ASO control (15.3% vs. 1.5%, *** $P < 0.001$; **B**).

is a major mediator of p53 antioxidant function [22]. Jiang et al. [23] showed a downexpression of TP53INP1 in gastric adenocarcinomas and its association with a poor prognosis. Gironella et al. [24] also showed that TP53INP1 expression is decreased in pancreatic ductal adenocarcinomas. Gommeaux et al. [25] showed that downexpression of TP53INP1 in a

mice model was involved in inflammation-mediated colic carcinogenesis.

Our recent findings in medullary thyroid carcinomas and in PC contrast with the pattern usually observed in others neoplasms where TP53INP1 expression inversely correlates with tumor aggressiveness. Indeed, we recently showed that TP53INP1

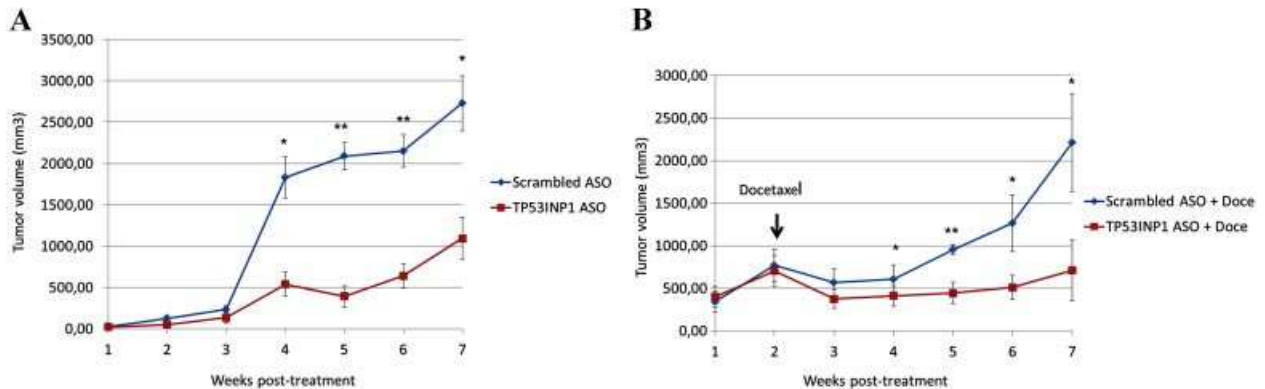


Fig. 5. TP53INP1 ASO reduces the tumor growth in mice (C4-2 xenografts). To determine the effect of TP53INP1 ASO in vivo, 10^6 CR C4-2 cells were inoculated s.c. with 0.1 ml of Matrigel (Becton Dickinson Labware) in the flank region of 5-week-old male athymic nude mice (Harlan Sprague Dawley, Inc.) via 27-gauge needle. All animal procedures were performed according to local guidelines on animal care and with appropriate institutional certification. When mice bearing tumors were 100 mm^3 in volume, we made four groups. Two groups received scrambled control \pm docetaxel whereas the other two groups received TP53INP1 ASO treatment (10 mg/kg/day) \pm docetaxel during 6 weeks. Tumors were measured twice weekly and their volumes were calculated by the formula length \times width \times depth \times 0.5236. TP53INP1 downregulation using TP53INP1 ASO treatment significantly inhibits CR tumor progression compared with scrambled ASO control group. Indeed, at the end of the experiment, tumor volume was 1093.14 mm^3 in mice treated with TP53INP1 ASO versus 2729.26 mm^3 in mice treated with scrambled ASO control (* $P < 0.05$, **A**). Moreover, TP53INP1 ASO treatment enhances docetaxel cytotoxicity. Indeed, at the end of the experiment, tumor volume was 709.94 mm^3 in mice treated with TP53INP1 ASO + docetaxel versus 2212.02 mm^3 in mice treated with scrambled ASO control + docetaxel (* $P < 0.05$, **B**).

over-expression in medullary thyroid carcinomas was correlated with poor prognostic factors (lymph node metastatic involvement, local recurrence) [26]. We also showed that over-expression of TP53INP1 is correlated with poor prognostic factors in PC, particularly predictive of biological cancer relapse; and that a TP53INP1 ASO inhibits proliferation and induces apoptosis in CS tumor cells in vitro [12].

However, the role of TP53INP1 in PC progression has not yet been well-defined and to our knowledge no previous study has reported its association with CR disease. In this study, we showed, using microarray, that TP53INP1 levels decreased during HT and increased significantly after HT in human CRPC. The highly uniform expression of TP53INP1 in metastatic CR lesions obtained from rapid autopsy specimen suggests the association of TP53INP1 with the lethal component of this disease. These findings suggest that it might have a link between TP53INP1 and the androgen receptor (AR) pathway. This link could be direct via the androgen response element (ARE) in the promoter of TP53INP1 or indirect via oxidative stress. Indeed, the AR seems to be able to induce nitric oxide via the induction of nitric oxide synthases [27].

We also demonstrated using Northern blot analysis that TP53INP1 mRNA levels slightly decrease during the first week after castration in LNCaP nude xenograft to significantly increase 35 days after castration (CR phase) compared to non-castrated animal.

Furthermore, we extend these observations into functional data by showing that TP53INP1 downregulation using ASO inhibits proliferation and induces apoptosis of CR C4-2 cells in vitro. Moreover studies in vivo on mice confirmed that TP53INP1 downregulation using ASO significantly inhibits the tumoral progression of CR C4-2 xenograft and enhances docetaxel cytotoxicity.

Moreover, these findings link increased TP53INP1 levels with the CR phenotype and indicate that TP53INP1 could serve as relevant novel-specific therapeutic target to inhibit CR progression.

Our team is targeting cell survival and antiapoptotic genes upregulated after androgen withdrawal to delay tumor progression [28]. Previous clinical trials with second generation ASO targeting genes like clusterin [29] or Hsp27 [30] showed promising results [31,32]. Phosphorothioate ASOs are chemically modified stretches of ssDNA complementary to mRNA regions of a target gene, thereby inhibiting gene expression and providing a useful tool for in vitro and in vivo functional genomics, and can also serve as pre-clinical proof-of-principle to support the clinical development of a drug candidate [28,33]. In this study, suppression of TP53INP1 using ASO inhibits proliferation and induces apoptosis of CR C4-2

tumors cells in vitro and inhibits CR tumoral progression in vivo.

CONCLUSIONS

In summary, the results of this study support the hypothesis that increased TP53INP1 expression in CRPC after HT could be an adaptative response induced by castration to enhance cell survival and therefore promote CR tumor growth. TP53INP1 downregulation using ASO technology inhibits proliferation, enhances apoptosis, and then offers a treatment strategy to delay progression of PC after androgen withdrawal.

REFERENCES

1. Crawford ED. Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology* 2009;73:54–510.
2. Dowling AJ, Tannock IF. Systemic treatment for prostate cancer. *Can Treat Rev* 1998;24:283–301.
3. Fusi A, Procopio G, Della Torre S, Ricotta R, Bianchini G, Salvioni R, Ferrari L, Martinetti A, Savelli G, Villa S, Bajetta E. Treatment options in hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *Tumori* 2004;90:535–546.
4. Denmeade SR, Isaacs JT. Programmed cell death (apoptosis) and cancer chemotherapy. *Cancer Control* 1996;3:303–309.
5. Denmeade SR, Isaacs JT. Activation of programmed (apoptotic) cell death for the treatment of prostate cancer. *Adv Pharmacol* 1996;35:281–306.
6. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 1996;28:251–265.
7. Berges RR, Vukanovic J, Epstein JI, CarMichel M, Cisek L, Johnson DE, Veltri RW, Walsh PC, Isaacs JT. Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:473–480.
8. Pinski J, Parikh A, Bova GS, Isaacs JT. Therapeutic implications of enhanced G(0)/G(1) checkpoint control induced by coculture of prostate cancer cells with osteoblasts. *Cancer Res* 2001; 61:6372–6376.
9. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351: 1513–1520.
10. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1502–1512.
11. Gallagher E, Gapstur R. Hormone-refractory prostate cancer: A shifting paradigm in treatment. *Clin J Oncol Nurs* 2006;10:233–240.
12. Giusiano S, Garcia S, Andrieu C, Dusetti NJ, Bastide C, Gleave M, Taranger-Charpin C, Iovanna JL, Rocchi P. TP53INP1 overexpression in prostate cancer correlates with poor prognostic factors and is predictive of biological cancer relapse. *The Prostate* 2011; DOI: 10.1002/pros.21412.

13. Rocchi P, Muracciole X, Fina F, Mulholland DJ, Karsenty G, Palmari J, Ouafik L, Bladou F, Martin PM. Molecular analysis integrating different pathways associated with androgen-independent progression in LuCaP 23.1 xenograft. *Oncogene* 2004;23:9111–9119.
14. Rocchi P, Boudouresque F, Zamora AJ, Muracciole X, Lechevallier E, Martin PM, Ouafik L. Expression of adrenomedullin and peptide amidation activity in human prostate cancer and in human prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 2001;61:1196–1206.
15. Gleave M, Tolcher A, Miyake H, Nelson C, Brown B, Beraldi E, Goldie J. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model. *Clin Cancer Res* 1999;5:2891–2898.
16. Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L, Hurtado-Coll A, Yamanaka K, Gleave M. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:6595–6602.
17. Lucas A, Petrylak DP. The case for early chemotherapy for the treatment of metastatic disease. *J Urol* 2006;176:S72–S75.
18. Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng CC, Taya Y, Monden M, Nakamura Y. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell* 2001;8:85–94.
19. Tomasini R, Samir AA, Pebusque MJ, Calvo EL, Totaro S, Dagorn JC, Dusetti NJ, Iovanna JL, Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. P53-dependent expression of the stress-induced protein (SIP) molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *Eur J Cell Biol* 2002;81:294–301.
20. Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem* 2001;276:44185–44192.
21. Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, Malissen B, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem* 2003;278:37722–37729.
22. Cano CE, Gommeaux J, Pietri S, Culcasi M, Garcia S, Seux M, Barelier S, Vasseur S, Spoto RP, Pebusque MJ, Dusetti NJ, Iovanna JL, Carrier A. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Res* 2009;69:219–226.
23. Jiang PH, Motoo Y, Garcia S, Iovanna JL, Pebusque MJ, Sawabu N. Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:691–696.
24. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pebusque MJ, Dusetti NJ. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16170–16175.
25. Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pebusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, Carrier A. Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol* 2007;27:2215–2228.
26. Taieb D, Giusiano S, Sebag F, Marcy M, de Micco C, Palazzo FF, Dusetti NJ, Iovanna JL, Henry JF, Garcia S, Taranger-Charpin C. Tumor protein p53-induced nuclear protein (TP53INP1) expression in medullary thyroid carcinoma: A molecular guide to the optimal extent of surgery? *World J Surg* 2010;34:830–835.
27. Neugarten J, Ding Q, Friedman A, Lei J, Silbiger S. Sex hormones and renal nitric oxide synthases. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1240–1246.
28. Gleave ME, Zellweger T, Chi K, Miyake H, Kiyama S, July L, Leung S. Targeting anti-apoptotic genes upregulated by androgen withdrawal using antisense oligonucleotides to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer. *Invest New Drugs* 2002;20:145–158.
29. Chi KN, Eisenhauer E, Fazli L, Jones EC, Goldenberg SL, Powers J, Tu D, Gleave ME. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1287–1296.
30. Rocchi P, Beraldi E, Ettinger S, Fazli L, Vessella RL, Nelson C, Gleave M. Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Res* 2005;65:11083–11093.
31. Hirte HW, Higano CS, Gleave M, Chi KN. Phase I trial OGX-427, a 2' methoxyethyl antisense oligonucleotide (ASO), against Hsp27: Final results. *J Clin Oncol* 2010;28: Abstract 3077.
32. Hotte SJ, Yu EY, Hirte HW, Higano CS, Gleave M, Chi KN. OGX-427, a 2' methoxyethyl antisense oligonucleotide (ASO), against Hsp27: Results of a first-in-human trial. *J Clin Oncol* 2009;27: Abstract 3506.
33. Monia BP, Sasmor H, Johnston JF, Freier SM, Lesnik EA, Muller M, Geiger T, Altmann KH, Moser H, Fabbro D. Sequence-specific antitumor activity of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide targeted to human C-raf kinase supports an antisense mechanism of action in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15481–15484.

5. Valorisation et transfert de technologies

Extension du brevet sur l'ASO TP53INP1 au niveau international: **Patent PCT/IB2011/054555** (2011) "Compounds inhibiting TP53INP1 activity for the treatment of prostate cancer, and its use in screening and diagnostic methods."

CONCLUSION

Plusieurs études antérieures ont montré que TP53INP1, protéine de réponse au stress, était surexprimée dans de nombreux tissus soumis à un stress cellulaire et que sa perte d'expression était corrélée à un certain nombre de cancers (estomac, pancréas, colon notamment). Cependant, à notre connaissance aucune donnée n'était disponible dans la littérature sur le comportement de cette protéine dans le cancer le plus fréquent en France : le cancer de la prostate. L'objectif de cette thèse était donc de s'intéresser au rôle de TP53INP1 dans l'histoire naturelle du cancer prostatique.

Nous avons, pour ce faire, analysé l'expression de TP53INP1 dans de nombreux échantillons tumoraux humains sur puce tissulaire (TMA : Tissue Micro-Array) et nous avons complété nos données par des travaux fondamentaux *in vitro* sur lignées cellulaires et *in vivo* sur des souris nude.

Nos résultats soulignent que TP53INP1 intervient dans toutes les étapes de la carcinogénèse prostatique. En effet, alors que TP53INP1 est uniquement exprimée par les cellules basales dans des échantillons de prostate normale, on met en évidence une néo-expression de TP53INP1 dans les cellules luminales prostatiques au cours des états inflammatoires (prostatite), dans les lésions de PIN de haut grade et dans les ADK.

Nos résultats sur TMA montrent que la surexpression de TP53INP1 dans les ADK prostatiques est corrélée à des facteurs de mauvais pronostic et constitue un facteur prédictif indépendant du risque de rechute biologique. Il existe par ailleurs une diminution de l'expression de TP53INP1 après mise sous hormonothérapie suivie d'une reprise de l'expression intense et uniforme de TP53INP1 au cours de l'échappement hormonal (phase de résistance à la castration), résultats confirmés *in vivo* sur un modèle animal (xénogreffes de cellules tumorales LNCaP sur souris nude) après castration. Afin de voir l'effet de l'inhibition de TP53INP1, nous avons développé un oligonucléotide antisens (ASO TP53INP1), capable d'inhiber l'expression de TP53INP1.

Nos résultats *in vitro* sur lignées cellulaires hormono-sensibles (LNCaP) mais aussi hormono-résistantes (C4-2) montrent que l'inhibition de TP53INP1 par l'ASO TP53INP1 inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose.

Ces résultats ont été complétés par des travaux plus récents *in vivo* sur souris des nude chez lesquelles ont été implantées des cellules tumorales hormono-résistantes (C4-2). Le traitement

de ces souris par l'ASO TP53INP1 diminue la croissance des tumeurs hormono-résistantes et augmente la cytotoxicité de la chimiothérapie (docétaxel).

L'ensemble de ces résultats a conduit à un dépôt de brevet européen pour la molécule inhibitrice ASO TP53INP1, brevet récemment étendu au niveau international au vu des résultats des derniers travaux in vivo.

Au total, la surexpression de TP53INP1 semble donc intervenir tout au long de l'histoire naturelle du cancer prostatique : i) depuis l'initiation de la carcinogenèse prostatique (probablement liée à l'inflammation), ii) en tant que facteur pronostique et marqueur prédictif du risque de rechute biologique durant la phase hormono-sensible iii) mais aussi dans les mécanismes d'échappement hormonal qui interviennent plus tardivement. Bien que son mode d'action précis dans la prostate ne soit pas encore totalement élucidé, TP53INP1 semble être une cible très intéressante dans le développement de nouvelles thérapies ciblées particulièrement utiles dans le cancer de la prostate résistant à la castration.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
PUBLICATIONS	2
SOMMAIRE	3
I. Epidémiologie, diagnostic et pronostic du cancer de la prostate	5
1. Epidémiologie	5
a. L'âge	7
b. Les facteurs ethniques et géographiques	10
i) Au niveau international	10
ii) Au niveau européen	12
iii) En France	13
c. Les facteurs génétiques	14
i) Formes familiales et héréditaires associées à des mutations rares	15
ii) Formes sporadiques « multifactorielles » et polymorphismes génétiques	16
d. Les facteurs environnementaux	19
i) Régime riche en graisses	19
ii) Inflammation	19
2. Diagnostic	19
a. Clinico-biologique	19
b. Anatomopathologique	21
i) Rappel de l'histologie de la prostate normale	21
ii) Histopathologie	21
3. Facteurs Pronostiques	25
II. De la phase hormono-sensible à la phase de résistance à la castration	27
1. Initiation de la carcinogenèse prostatique	27
2. Hormono-sensibilité et traitements	28
a. Cancers cliniquement localisés	30
i) Cancer de la prostate localisé à faible risque (T1c, T2a et Gleason ≤ 6 et PSA ≤ 10 ng/ml)	30
ii) Cancer de la prostate localisé à risque intermédiaire (T = T2b ou Gleason = 7 ou PSA = 10-20ng/ml)	33
iii) Cancer de la prostate localisé à haut risque (T \geq T2c ou Gleason ≥ 8 ou PSA > 20 ng/ml)	33
b. Cancers localement avancés ou métastatiques	34
i) Cancers localement avancés (T3/T4, N0-X, M0)	34
ii) Cancers avec atteinte ganglionnaire pelvienne (tous T, cN1/pN1, M0)	34
iii) Cancers métastatiques hormono-sensibles	35
3. Phase de résistance à la castration	36
a. Mécanismes	36
i) Hypersensibilité du RA	37
ii) Mutations du RA	37
iii) Activation du RA par les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase	37
iv) Mécanismes indépendants du RA	37
b. Prise en charge	38
i) Chimiothérapie	38
ii) Place des thérapies moléculaires ciblées	39
III. TP53INP1 : données fondamentales	44
1. Identification de TP53INP1	44
2. Structure de TP53INP1	44

3. Fonctions de TP53INP1.....	45
a. TP53INP1 dans le cycle cellulaire et l'apoptose.....	45
b. TP53INP1 et p53 : interaction	46
i) TP53INP1 est induit par p53.....	46
ii) TP53INP1 active p53 en retour.....	46
iii) Indépendance de p53.....	47
4. Expression de TP53INP1 dans les carcinomes.....	48
a. TP53INP1 et adénocarcinomes gastriques.....	48
b. TP53INP1 et adénocarcinomes coliques.....	49
c. TP53INP1 et adénocarcinomes pancréatiques	50
d. TP53INP1 et carcinomes médullaires de la thyroïde.....	51
NOS OBJECTIFS : étude de l'expression de TP53INP1 en pathologie prostatique	52
RESULTATS.....	54
I. Résultats 1 : prostate normale, inflammatoire et adénocarcinomes prostatiques hormono-sensibles.....	54
1. Sur lames conventionnelles	54
2. Sur TMA : TP53INP1 facteur de mauvais pronostic	54
3. Sur lignées cellulaires LNCaP	55
4. 1 ^{ère} publication	55
5. Valorisation et transfert de technologies	56
II. Résultats 2 : adénocarcinomes prostatiques résistants à la castration.....	57
1. Sur TMA : TP53INP1 lié à l'échappement hormonal.....	57
2. Sur lignées cellulaires C4-2.....	57
3. Sur modèles animaux (souris).....	57
4. 2 ^{ème} publication.....	58
5. Valorisation et transfert de technologies	59
CONCLUSION	60
TABLE DES MATIERES	62
REFERENCES.....	64

REFERENCES

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, and Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA: Cancer J Clin* **61**, 69-90.
- [2] Muir CS, Nectoux J, and Staszewski J (1991). The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol* **30**, 133-140.
- [3] Crawford ED (2009). Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology* **73**, S4-10.
- [4] Fournier G, Valeri A, Mangin P, and Cussenot O (2004). [Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology]. *Ann Urol* **38**, 187-206.
- [5] Guerin S, and Hill C (2010). [Cancer epidemiology in France in 2010, comparison with the USA]. *Bullancer* **97**, 47-54.
- [6] Cussenot O, and Cancel-Tassin G (2004). [Genetic susceptibility to prostate cancer]. *Med Sci* **20**, 562-568.
- [7] Morganti G, Gianferrari L, Cresseri A, Arrigoni G, and Lovati G (1956). [Clinico-statistical and genetic research on neoplasms of the prostate]. *Acta Genet Stat Med* **6**, 304-305.
- [8] Gronberg H, Damber L, and Damber JE (1994). Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol* **152**, 1484-1487.
- [9] Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, and Thibodeau SN (1998). Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* **62**, 1425-1438.
- [10] Xu J (2000). Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. *Am J Hum Genet* **66**, 945-957.
- [11] Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wöhr G, Latil A, Millasseau P, Mellah I, Cohen N, et al. (1998). Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet* **62**, 1416-1424.
- [12] Cancel-Tassin G, Latil A, Valeri A, Mangin P, Fournier G, Berthon P, and Cussenot O (2001). PCAP is the major known prostate cancer predisposing locus in families from south and west Europe. *Eur J Hum Genet* **9**, 135-142.
- [13] Valeri A, Fournier G, Morin V, Morin JF, Drelon E, Mangin P, Teillac P, Berthon P, and Cussenot O (2000). Early onset and familial predisposition to prostate cancer significantly enhance the probability for breast cancer in first degree relatives. *Int J Cancer* **86**, 883-887.
- [14] Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, Hamoudi R, Hope Q, Osin P, Jackson R, Southgate C, Singh R, Falconer A, et al. (2003). Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *Am J Hum Genet* **72**, 1-12.
- [15] Gayther SA, de Foy KA, Harrington P, Pharoah P, Dunsmuir WD, Edwards SM, Gillett C, Ardern-Jones A, Dearnaley DP, Easton DF, et al. (2000). The frequency of germ-line mutations in the breast cancer predisposition genes BRCA1 and BRCA2 in familial prostate cancer. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group United Kingdom Familial Prostate Cancer Study Collaborators. *Cancer Res* **60**, 4513-4518.
- [16] Karayi MK, Neal DE, and Markham AF (2000). Current status of linkage studies in hereditary prostate cancer. *BJU Int* **86**, 659-669.

- [17] Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, and Mack TM (1991). Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* **63**, 963-966.
- [18] Chan JM, Gann PH, and Giovannucci EL (2005). Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol* **23**, 8152-8160.
- [19] Pienta KJ, and Esper PS (1993). Is dietary fat a risk factor for prostate cancer? *J Natl Cancer Inst* **85**, 1538-1540.
- [20] De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, and Nelson WG (1999). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* **155**, 1985-1992.
- [21] Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, and Isaacs WB (2004). The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol* **172**, S6-11.
- [22] Nelson WG, De Marzo AM, and Isaacs WB (2003). Prostate cancer. *N Engl J Med* **349**, 366-381.
- [23] Putzi MJ, and De Marzo AM (2000). Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* **56**, 828-832.
- [24] Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, and Egevad LL (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* **29**, 1228-1242.
- [25] Rasiah KK, Stricker PD, Haynes AM, Delprado W, Turner JJ, Golovsky D, Brenner PC, Kooner R, O'Neill GF, Grygiel JJ, et al. (2003). Prognostic significance of Gleason pattern in patients with Gleason score 7 prostate carcinoma. *Cancer* **98**, 2560-2565.
- [26] D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Weinstein M, Tomaszewski JE, Schultz D, Rhude M, Rocha S, Wein A, and Richie JP (2001). Predicting prostate specific antigen outcome preoperatively in the prostate specific antigen era. *J Urol* **166**, 2185-2188.
- [27] Ruska KM, Sauvageot J, and Epstein JI (1998). Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am J Surg Pathol* **22**, 1073-1077.
- [28] Shah R, Mucci NR, Amin A, Macoska JA, and Rubin MA (2001). Postatrophic hyperplasia of the prostate gland: neoplastic precursor or innocent bystander? *Am J Pathol* **158**, 1767-1773.
- [29] Feldman BJ, and Feldman D (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 34-45.
- [30] Grosclaude P, Bossard N, Remontet L, Belot A, Arveux P, Bouvier A, et al. (2007). *Survie des patients atteints de cancer en France : étude des registres du réseau Francim*. Paris Springer-Verlag, 406p.
- [31] Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, et al. (2009). *SEER Cancer Statistics Review (1975-2006)*. National Cancer Institute, Bethesda.
- [32] Chi KN, Hotte SJ, Yu EY, Tu D, Eigl BJ, Tannock I, Saad F, North S, Powers J, Gleave ME, et al. (2010). Randomized phase II study of docetaxel and prednisone with or without OGX-011 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* **28**, 4247-4254.
- [33] Hotte SJ, Yu EY, Hirte HW, Higano CS, Gleave M, and Chi KN (2010). Phase I trial OGX-427, a 2' methoxyethyl antisense oligonucleotide (ASO), against Hsp27: Final results. *J Clin Oncol* **28**, Abstract 3077.
- [34] Dowling AJ, and Tannock IF (1998). Systemic treatment for prostate cancer. *Cancer Treat Rev* **24**, 283-301.
- [35] Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, et al. (2004). Docetaxel and estramustine compared

- with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* **351**, 1513-1520.
- [36] Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, et al. (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* **351**, 1502-1512.
- [37] de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, et al. (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* **376**, 1147-1154.
- [38] Albiges L, Loriot Y, Gross-Goupil M, de La Motte Rouge T, Blesius A, Escudier B, Massard C, and Fizazi K (2010). [New drugs in metastatic castration-resistant prostate cancer]. *Bull Cancer* **97**, 149-159.
- [39] Beltran H, Beer TM, Carducci MA, de Bono J, Gleave M, Hussain M, Kelly WK, Saad F, Sternberg C, Tagawa ST, et al. (2011). New therapies for castration-resistant prostate cancer: efficacy and safety. *Eur Urol* **60**, 279-290.
- [40] Lassi K, and Dawson NA (2010). Update on castrate-resistant prostate cancer: 2010. *Curr Opin Oncol* **22**, 263-267.
- [41] Wu Y, Rosenberg JE, and Taplin ME (2011). Novel agents and new therapeutics in castration-resistant prostate cancer. *Curr Opin Oncol* **23**, 290-296.
- [42] Yap TA, Zivi A, Omlin A, and de Bono JS (2011). The changing therapeutic landscape of castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **8**, 597-610.
- [43] Attard G, Reid AH, Yap TA, Raynaud F, Dowsett M, Settatee S, Barrett M, Parker C, Martins V, Folklerd E, et al. (2008). Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven. *J Clin Oncol* **26**, 4563-4571.
- [44] Chen Y, Clegg NJ, and Scher HI (2009). Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *Lancet Oncol* **10**, 981-991.
- [45] Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, Wongvipat J, Smith-Jones PM, Yoo D, Kwon A, et al. (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* **324**, 787-790.
- [46] Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin ME, Efstathiou E, Rathkopf D, Shelkey J, Yu EY, Alumkal J, et al. (2010). Antitumor activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet* **375**, 1437-1446.
- [47] Scher HI, Logothetis C, Molina A, Goodman OB, Sternberg CN, Chi KN, Kheoh TS, Hagg CM, Fizaz K, and De Bono JS (2011). Improved survival outcomes in clinically relevant patient subgroups from COU-AA-301, a phase III study of abiraterone acetate (AA) plus prednisone (P) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) progressing after docetaxel-based chemotherapy *J Clin Oncol* **29**, abstract n° 4.
- [48] Higano CS, Beer TM, Taplin ME, Efstathiou E, Anand A, Hirmand M, Fleisher M, and Scher HI (2011). Antitumor activity of MDV3100 in pre-and post-docetaxel advanced prostate cancer: long-term follow-up of a phase I/II study. *J Clin Oncol* **29**, Abstract n° 134.
- [49] Lamoureux F, Thomas C, Yin MJ, Kuruma H, Fazli L, Gleave ME, and Zoubeidi A (2011). A novel HSP90 inhibitor delays castrate-resistant prostate cancer without altering serum PSA levels and inhibits osteoclastogenesis. *Clin Cancer Res* **17**, 2301-2313.
- [50] Saporita AJ, Ai J, and Wang Z (2007). The Hsp90 inhibitor, 17-AAG, prevents the ligand-independent nuclear localization of androgen receptor in refractory prostate cancer cells. *Prostate* **67**, 509-520.

- [51] Sarker D, Reid AH, Yap TA, and de Bono JS (2009). Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 4799-4805.
- [52] Bhasin D, Cisek K, Pandharkar T, Regan N, Li C, Pandit B, Lin J, and Li PK (2008). Design, synthesis, and studies of small molecule STAT3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 391-395.
- [53] Chi KN, Ellard SL, Hotte SJ, Czaykowski P, Moore M, Ruether JD, Schell AJ, Taylor S, Hansen C, Gauthier I, et al. (2008). A phase II study of sorafenib in patients with chemo-naive castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* **19**, 746-751.
- [54] Steinbild S, Mross K, Frost A, Morant R, Gillessen S, Dittrich C, Strumberg D, Hochhaus A, Hanauske AR, Edler L, et al. (2007). A clinical phase II study with sorafenib in patients with progressive hormone-refractory prostate cancer: a study of the CESAR Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIV. *Br J Cancer* **97**, 1480-1485.
- [55] Canil CM, Moore MJ, Winkquist E, Baetz T, Pollak M, Chi KN, Berry S, Ernst DS, Douglas L, Brundage M, et al. (2005). Randomized phase II study of two doses of gefitinib in hormone-refractory prostate cancer: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* **23**, 455-460.
- [56] Petrylak DP (2009). A phase I open-label study using lenalomide and docetaxel in castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* **27**, Abstract n° 5156.
- [57] Fizazi K, Carducci MA, Smith M, et al. (2010). Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* **28**, abstract LBA4507.
- [58] Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, et al. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* **363**, 411-422.
- [59] Small EJ, Tchekmedyan NS, Rini BI, Fong L, Lowy I, and Allison JP (2007). A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti-CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 1810-1815.
- [60] Matsumoto H, and Kuruma A (2011). An evaluation of clusterin antisense inhibitor OGX-011 in combination with the second-generation antiandrogen MDV3100 in a castrate-resistant prostate cancer model. *J Clin Oncol* **29**, Abstract n°4502.
- [61] Carrier A, Nguyen C, Victorero G, Granjeaud S, Rocha D, Bernard K, Miazek A, Ferrier P, Malissen M, Naquet P, et al. (1999). Differential gene expression in CD3epsilon- and RAG1-deficient thymuses: definition of a set of genes potentially involved in thymocyte maturation. *Immunogenetics* **50**, 255-270.
- [62] Dusetti NJ, Tomasini R, Azizi A, Barthet M, Vaccaro MI, Fiedler F, Dagorn JC, and Iovanna JL (2000). Expression profiling in pancreas during the acute phase of pancreatitis using cDNA microarrays. *Biochem Biophys Res Commun* **277**, 660-667.
- [63] Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng CC, Taya Y, Monden M, and Nakamura Y (2001). p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell*. **8**, 85-94.
- [64] Rogers S, Wells R, and Rechsteiner M (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- [65] Nowak J, Tomasini R, Mattei MG, Azizi Samir LA, Dagorn JC, Dusetti N, Iovanna JL, and Pebusque MJ (2002). Assignment of tumor protein p53 induced nuclear protein 1 (TP53INP1) gene to human chromosome band 8q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res* **97**, 140E.
- [66] Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, and Dusetti NJ (2001). Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem*. **276**, 44185-44192.

- [67] Tomasini R, Samir AA, Pebusque MJ, Calvo EL, Totaro S, Dagorn JC, Dusetti NJ, Iovanna JL, Tomasini R, Samir AA, et al. (2002). P53-dependent expression of the stress-induced protein (SIP) Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *Eur J Cell Biol* **81**, 294-301.
- [68] Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, Malissen B, Dagorn JC, Iovanna JL, and Dusetti NJ (2003). TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem*. **278**, 37722-37729.
- [69] Yoshida K, Liu H, and Miki Y (2006). Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem* **281**, 5734-5740.
- [70] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, et al. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809-819.
- [71] Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn JC, Pebusque MJ, Iovanna JL, and Dusetti NJ (2005). TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene* **24**, 8093-8104.
- [72] Hershko T, Chaussepied M, Oren M, and Ginsberg D (2005). Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* **12**, 377-383.
- [73] Jiang PH, Motoo Y, Garcia S, Iovanna JL, Pebusque MJ, and Sawabu N (2006). Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*. **12**, 691-696.
- [74] Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pebusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, et al. (2007). Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol*. **27**, 2215-2228. Epub 2007 Jan 2222.
- [75] Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, et al. (2007). Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16170-16175.
- [76] Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, and Hruban RH (2000). Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* **60**, 2002-2006.
- [77] Taieb D, Giusiano S, Sebag F, Marcy M, de Micco C, Palazzo FF, Dusetti NJ, Iovanna JL, Henry JF, Garcia S, et al. (2010) Tumor protein p53-induced nuclear protein (TP53INP1) expression in medullary thyroid carcinoma: a molecular guide to the optimal extent of surgery? *World J Surg* **34**, 830-835.
- [78] Giusiano S, Garcia S, Andrieu C, Dusetti NJ, Bastide C, Gleave M, Taranger-Charpin C, Iovanna JL, and Rocchi P (2012). TP53INP1 overexpression in prostate cancer correlates with poor prognostic factors and is predictive of biological cancer relapse. *Prostate* **72**, 117-28.
- [79] Giusiano S, Baylot V, Fazli L, Gleave M, Iovanna JL, Taranger-Charpin C, Garcia S, and Rocchi P (2012). TP53INP1 as new therapeutic target in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* doi: 10.1002/pros.22477 (**sous presse**).