

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/110759 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/050153

(22) Date de dépôt international :
22 janvier 2015 (22.01.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
14 50588 23 janvier 2014 (23.01.2014) FR

(71) Déposants : **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS** - [FR/—]; 3, rue Michel Ange, Paris, 75016 (FR). **UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1** [FR/FR]; 5 Bld Henri IV CS 19044, F-34967 Montpellier Cx 2 (FR). **CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE** [FR/FR]; 2 rue de Viguerie, F-31059 Toulouse Cedex 9 (FR).

(72) Inventeurs : **GARCIA, Marcel**; 79bis Rue de l'Occitanie, F-34730 Prades Le Lez (FR). **VAILLANT, Ophélie**; 24 Avenue Monteroni d'Arbia B33 Res.Palazzo Dei Fiori, F-34920 Le Crès (FR). **REBILLARD, Xavier**; 56 Allée des Fées, F-34980 Saint Gely Du Fesc (FR). **MAZEROLLES, Catherine**; 55 Avenue du Lauragais, F-31400 Toulouse (FR). **GARY-BOBO, Magali**; 14 Rue Romani, F-34170 Castelnaud-Le-Lez (FR). **MORERE, Alain**; 32 Rue de la Traversière, F-34980 Saint Gely Du Fesc (FR).

(74) Mandataire : **CABINET PLASSERAUD**; 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : NOVEL METHOD FOR SCREENING FOR PROSTATE CANCER

(54) Titre : NOUVELLE MÉTHODE DE DÉPISTAGE DU CANCER DE LA PROSTATE

(57) Abstract : The invention relates to a method for the *in vitro* diagnosis of prostate cancer in a patient, characterised in that it comprises a step of measuring the expression level of the gene of the cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-M6PR) in a sample of prostate tissue of the patient, the determination of overexpression of said CI-M6PR gene indicating the presence of prostate cancer in said patient.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* d'un cancer prostatique chez un sujet caractérisée en ce qu'elle comprend une étape de mesure du niveau d'expression du gène du récepteur mannose 6-phosphate cation indépendant (RM6P-CI) dans un échantillon de tissu prostatique dudit sujet, la détermination d'une surexpression dudit gène du RM6P-CI étant indicative de la présence d'un cancer prostatique chez ledit sujet.



WO 2015/110759 A1

Nouvelle méthode de dépistage du cancer de la prostate

La présente invention a pour objet une nouvelle méthode de diagnostic ou de dépistage du cancer de la prostate.

5 Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent en France et représente la quatrième cause de mortalité dans la population. Dans les faits, le dépistage individuel par dosage du taux d'antigène prostatique spécifique (« PSA » : « Prostate Specific Antigen ») s'est largement répandu et 70% des hommes de plus de 50 ans réalisent au moins un dosage de PSA sur une période de 3 ans (chiffres 2012
10 provenant de la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés). Soixante-dix mille nouveaux cas de cancer de la prostate sont diagnostiqués chaque année en France.

Cependant deux grandes études randomisées, l'une américaine (« PLCO3 » : « Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial), l'autre européenne
15 (« ERSPC », « European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer ») ont apporté des résultats contradictoires quant à l'utilité et le bénéfice du dépistage par dosage de PSA^{1, 2, 3}. Le rapport d'orientation sur le cancer de la prostate publié en février 2012 par la Haute Autorité de Santé, et une publication dans le Bulletin du Cancer² mettent en évidence le caractère imparfait du dosage de PSA, du toucher
20 rectal et « l'absence à ce jour de marqueur et d'examen de dépistage ou de diagnostic permettant d'identifier précocement les formes de cancer de la prostate ». Ils soulignent également « l'importance de la recherche sur des tests de dépistage performants et des marqueurs permettant de distinguer les formes agressives des formes indolentes ».

25 Une lésion cancéreuse prostatique se traduit histologiquement par la perte de cellules basales. Actuellement, des anticorps dirigés contre des marqueurs de cellules basales (p63, CK 903, CK 5/6) sont utilisés en clinique afin de réaliser le diagnostic. Cependant leur spécificité et leur sensibilité restent limitées, et des lésions de type non cancéreux (adénoses, hyperplasie adénomateuse atypique, atrophie ou
30 hyperplasie post atrophique) peuvent présenter une discontinuité des cellules basales, ce qui rend l'interprétation difficile^{5,6}.

A titre d'exemples de marqueurs de cellules cancéreuses prostatiques autres que le PSA envisagés à ce jour pour le diagnostic, on pourra citer AMACR[®], GSTP1

méthylé[®] et TMPRSS2-ETS[®]. L'AMACR[®] (P504S) est le nom commercial d'un anticorps spécifique de la protéine tissulaire « α -méthylacyl CoA Racemase » qui est hyper-exprimée dans les cancers de la prostate⁷. Cet anticorps a ainsi été développé afin d'analyser le profil d'expression dans les biopsies prostatiques.

5 Cependant lesdits marqueurs (AMACR[®], GSTP1 méthylé[®], TMPRSS2-ETS[®]) présentent des limites car ils sont également surexprimés dans les hyperplasies prostatiques bénignes⁸. D'autre part, certains cancers de la prostate ne sont pas diagnostiqués par ces marqueurs. Ainsi, aucun consensus n'a été trouvé à ce jour pour leur utilisation clinique.

10 Le diagnostic du cancer de la prostate est réalisé actuellement par l'examen anatomopathologique d'une série de biopsies de la prostate (10 à 12 carottes de 17 mm de long obtenues par une aiguille de 18 gauge). Les prélèvements sont répartis régulièrement sous contrôle échographique sur le volume prostatique pour réaliser une cartographie. Le cancer de la prostate est hétérogène et des foyers cancéreux
15 peuvent émerger dans l'un ou l'autre lobe prostatique ou les deux. Le diagnostic de cancer de la prostate est dépendant de la qualité du prélèvement et des modalités de sa réalisation. De plus, malgré l'observation histologique et l'analyse des marqueurs de cellules basales, certaines lésions tissulaires non cancéreuses peuvent mimer un
20 diagnostic de cancer ou à l'inverse, une lésion cancéreuse peut échapper au diagnostic, ce qui nécessite l'addition de marqueurs tissulaires spécifiques des cellules cancéreuses prostatiques.

25 Il est donc d'un grand intérêt de pouvoir disposer de nouveaux outils spécifiques pour faciliter le diagnostic, l'estimation de l'agressivité tumorale et des risques individuels de progression pour orienter le choix de prise en charge du patient et éviter de laisser évoluer des lésions cancéreuses.

L'un des buts de la présente invention est donc de proposer une méthode de diagnostic du cancer de la prostate ne présentant pas les inconvénients de celles proposées à ce jour.

30 Un autre but de l'invention est de proposer une méthode de diagnostic spécifique du cancer de la prostate.

Un autre but de la présente invention est de diagnostiquer un cancer de la prostate lorsque ce dernier se trouve à un stade précoce.

Un autre but de l'invention est de diagnostiquer un cancer de la prostate de petite taille.

La présente invention résulte de la découverte surprenante et inattendue de la surexpression au niveau tissulaire du récepteur mannose 6-phosphate cation-indépendant (dénommé ci-après RM6P-CI) dans les cellules épithéliales cancéreuses de la prostate par rapport aux cellules prostatiques saines.

En effet, contre toute attente, les Inventeurs ont démontré que le RM6P-CI est surexprimé dans une large majorité des tissus prostatiques cancéreux mais qu'il ne l'est pas dans les tissus prostatiques sains.

Cette découverte inattendue permet d'envisager l'intérêt du RM6P-CI en tant que marqueur spécifique en vue d'une utilisation diagnostique.

Le RM6P-CI est un récepteur ubiquitaire de 300 kDa présent à la surface des cellules. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques et principalement dans l'adressage des enzymes vers le lysosome⁹. Ces enzymes lysosomales disposent de résidus mannose 6-phosphate (M6P) leur permettant d'être reconnues puis internalisées par le RM6P-CI.

Le RM6P-CI est aussi appelé récepteur à l'Insuline Growth Factor 2 (IGF2) puisqu'il dispose d'un site de liaison à l'IGF2 et est impliqué dans la dégradation de ce mitogène⁴. Ainsi, le RM6P-CI ou l'IGF2R, encore appelés ci-après « gène du RM6P-CI », « récepteur RM6P-CI », ou « gène de l'IGF2R » ou « récepteur IGF2R », présentent la même séquence nucléotidique et sont en réalité le même gène (gène identifié par le numéro « 3482 » au 15 Janvier 2015). La séquence génomique du RM6P-CI (ou IGF2R) est située sur le chromosome 6 et est décrite sous le numéro d'accès NCBI, NG_011785.1. La séquence ARNm correspondante est décrite sous le numéro d'accès NCBI, NM_000876.2 et la séquence protéique sous le numéro d'accès NP_000867.2.

Lors de la carcinogenèse, le profil d'expression de nombreux gènes et protéines se trouve modifié. Dans de précédentes études réalisées sur de multiples cancers, le RM6P-CI a été caractérisé comme un gène suppresseur de tumeur.

Dans les cancers du foie, du sein, du poumon, des ovaires ou encore les tumeurs adéno-corticales, le récepteur RM6P-CI présente une perte d'hétérozygotie et de nombreuses mutations somatiques^{10,11,12}. Les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles entraînent une diminution de l'expression du récepteur

RM6P-CI dans ces cancers, excepté pour le cancer du sein où sa concentration est inchangée entre tissus sains et cancéreux¹³. Dans certaines cellules cancéreuses, le rôle de suppresseur de tumeur pour le gène RM6P-CI a été proposé grâce à des expériences d'induction de surexpression¹⁴ ou à l'inverse d'inhibition de l'expression du RM6P-CI¹⁵. Dans le premier cas, la surexpression du RM6P-CI diminue la capacité des cellules à induire des tumeurs et diminue le taux de croissance tumorale. A l'inverse, l'inhibition du RM6P-CI augmente la croissance cellulaire et diminue l'index apoptotique.

Il a été montré par Huang et al.¹⁶ la présence d'auto-anticorps anti-RM6P-CI chez 7 malades atteints de cancer prostatique sur 23. Cependant, ce résultat n'a pas orienté l'homme de l'art vers la recherche d'une surexpression du RM6P-CI provenant du tissu cancéreux pour deux raisons: d'une part, comme décrit précédemment le RM6P-CI était considéré comme un gène suppresseur de tumeur, dont l'expression se trouvait donc diminuée dans les cancers, et d'autre part il était clairement publié dans l'art antérieur que le meilleur marqueur circulant pronostique, le PSA, était produit par les cellules prostatiques saines et plus faiblement par les cellules cancéreuses¹⁷.

Après de nombreux travaux, les Inventeurs ont surmonté un préjugé technique en montrant que le gène RM6P-CI constitue un marqueur pertinent dans le dépistage ou diagnostic du cancer prostatique.

L'utilisation du nouveau marqueur de l'invention, à savoir le RM6P-CI, est spécifique du cancer de la prostate et présente de ce fait un grand intérêt pour le diagnostic dudit cancer.

La présente invention a pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* d'un cancer prostatique chez un sujet caractérisée en ce qu'elle comprend une étape de mesure du niveau d'expression du gène du RM6P-CI dans un échantillon de tissu prostatique dudit sujet, la détermination d'une surexpression dudit gène du RM6P-CI étant indicative de la présence d'un cancer prostatique chez ledit sujet.

La « méthode de diagnostic » de l'invention peut encore être dénommée « procédé de diagnostic ».

Dans un mode de réalisation particulier, la méthode de l'invention est mise en œuvre pour le diagnostic, le pronostic et/ou l'évaluation de l'évolution d'un cancer

prostatique chez un sujet, une surexpression du gène du RM6P-CI dans le tissu prostatique étant indicative du cancer prostatique.

On entend par « diagnostic » la détermination d'une affection d'une personne atteinte par une pathologie donnée, et par « pronostic » l'évaluation du degré de gravité et de l'évolution ultérieure d'une pathologie.

On entend par « surexpression du gène du RM6P-CI », une expression du gène du RM6P-CI au niveau du tissu prostatique qui est au moins trois fois supérieure à l'expression de ce gène au niveau d'un tissu prostatique non cancéreux.

Dans ce cas, lorsque l'expression du gène du RM6P-CI est augmentée d'un facteur d'au moins 3 dans un échantillon de tissu prostatique, alors on pourra conclure que ledit échantillon de tissu prostatique est un échantillon de tissu prostatique cancéreux, autrement dit, le sujet auquel appartient ledit échantillon est atteint d'un cancer de la prostate.

Cette surexpression sera au moins trois fois supérieure, mais pourra par exemple être dix, vingt ou même cent fois supérieure par rapport à l'expression du gène du RM6P-CI dans un tissu prostatique « normal », c'est-à-dire non cancéreux.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* d'un cancer prostatique chez un sujet caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

(i) de mesure quantitative du niveau d'expression du gène du RM6P-CI dans un échantillon de tissu prostatique dudit sujet ;

(ii) de comparaison dudit niveau d'expression dudit sujet avec le niveau d'expression du gène du RM6P-CI d'un échantillon biologique de référence.

Lorsque le niveau d'expression du RM6P-CI est plus élevé quantitativement d'un facteur d'au moins 3 dans l'échantillon de tissu prostatique du sujet à diagnostiquer que dans l'échantillon biologique de référence, on peut conclure à un cancer de la prostate.

Un niveau d'expression plus élevé signifie par exemple une expression protéique (mesurée par diverses techniques telles que le Western blots, ELISA, biocapteurs, ligands spécifiques du récepteur ou toute méthode de quantification d'une protéine ou d'un récepteur) au minimum 3 fois supérieure à celle un échantillon biologique de référence correspondant par exemple à du tissu prostatique sain.

Outre l'évaluation quantitative telle que ci-dessus décrite, il est également possible d'évaluer la surexpression du gène du RM6P-CI dans un tissu prostatique par évaluation du pourcentage des cellules dudit tissu prostatique qui sont colorées par un test immunohistologique. Ainsi, dans un prélèvement de tissu prostatique, la présence d'une augmentation de 3 fois du marquage immunohisto chimique dans plus de 10% des cellules épithéliales est indicative d'un tissu prostatique cancéreux.

Le « sujet » au sens de la présente invention désigne un individu vertébré, en particulier un mammifère, plus particulièrement un homme.

Au sens de la présente invention, on entend par « échantillon de tissu prostatique », tout ou partie de la prostate prélevée chez un sujet ou un patient. Le tissu prostatique comprend des cellules prostatiques, lesdites cellules pouvant être des cellules cancéreuses ou des cellules saines.

On dispose de cet échantillon de tissu prostatique par tout type de prélèvement connu de l'homme du métier. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'échantillon de tissu prostatique prélevé chez le sujet ou le patient est issu d'une biopsie prostatique.

L'« échantillon biologique de référence » est obtenu à partir de cultures cellulaires humaines ou de prélèvements tissulaires. L'échantillon biologique de référence désigne au sens de la présente invention un échantillon biologique comme défini ci-dessus issu :

- d'une lignée cellulaire humaine (normale ou cancéreuse) en culture dont l'expression du gène RM6P-CI est connue pour être faible,
- d'un sujet sain, à savoir ne présentant pas de cancer prostatique,
- d'un sujet en rémission du cancer prostatique,
- d'un sujet dont le diagnostic de cancer est à établir par des biopsies multiples et dont une ou plusieurs de ces biopsies présente(nt) une expression faible du gène RM6P-CI, ou
- d'un sujet dont l'expression du gène RM6P-CI est connue et associée à un stade clinique particulier.

Dans ce dernier cas, l'invention permet le suivi et le monitoring d'un patient souffrant de cancer prostatique et subissant un traitement anticancéreux.

La méthode selon l'invention est encore caractérisée en ce que l'étape de mesure du niveau d'expression du gène du RM6P-CI est une étape de mesure, dans un échantillon de tissu prostatique, du niveau d'expression :

- des produits de transcription, en particulier l'ARNm et/ou
- 5 - des produits de traduction, en particulier la protéine RM6P-CI.

Une surexpression des produits de transcription, en particulier l'ARNm, et/ou une surexpression des produits de traduction, en particulier la protéine RM6P-CI, est alors indicative d'un cancer de la prostate, ladite surexpression étant telle que définie précédemment (augmentation d'un facteur d'au moins trois du niveau d'expression des produits de transcription et/ou de traduction).

La mesure du niveau d'expression du gène cible du RM6P-CI peut être réalisée par n'importe quelle technique connue de l'homme du métier.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on mesure avantageusement le niveau d'expression du gène du RM6P-CI au niveau nucléique et/ou protéique, par exemple en mesurant la quantité d'ARNm transcrit et/ou en mesurant la quantité de protéine RM6P-CI à l'aide d'au moins une méthode spécifique de mesure du niveau d'expression du RM6P-CI.

Les techniques permettant de détecter l'expression du gène du RM6P-CI au niveau nucléique sont bien connues de l'homme du métier. La détection peut notamment être réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel, une technique microfluidique, une puce à ADN, le séquençage à haut débit des ARNm, ou toute technique appropriée de quantification de l'ARNm, telle que puce à ARN, méthodes LCR (« Ligase Chain Reaction »), TMA (« Transcription Mediated Amplification »), PCE (« enzyme amplified immunoassay ») et ADNb (« branched DNA signal amplification ») etc.

Les techniques permettant de détecter l'expression du gène du RM6P-CI au niveau protéique sont également bien connues de l'homme du métier et peuvent notamment inclure la cytométrie en flux, l'immunohistochimie semi-quantitative, l'immunocytochimie quantitative, l'ELISA cellulaire, le test protéique Taqman(R) (Taqman(R) Protein Assay, Applied Biosystems), des puces à protéines ou anticorps couplés ou non à la spectrométrie de masse, la liaison de ligands, la détection sur biocapteurs, la détection par fibres optiques, etc.

Selon l'invention, dans la méthode de diagnostic *in vitro* telle que définie ci-dessus, la surexpression du gène du RM6P-CI, et en particulier la surexpression des produits de transcription et/ou des produits de traduction du gène du RM6P-CI, est déterminée (établie) lorsque l'expression dudit gène du RM6P-CI est au moins trois fois supérieure à celle dudit gène dans un tissu prostatique non cancéreux.

Selon l'invention, dans la méthode de diagnostic *in vitro* telle que définie ci-dessus, l'étape de mesure du niveau d'expression des produits de traduction du gène du RM6P-CI, en particulier la protéine RM6P-CI, se fait par analyse du marquage immunohistochimique desdits produits de traduction du RM6P-CI dans ledit échantillon de tissu prostatique dudit sujet.

Plus particulièrement, l'analyse du marquage immunohistochimique des produits de traduction est évaluée par coloration des cellules de l'échantillon de tissu prostatique, une coloration de plus de 10% desdites cellules étant indicative d'une surexpression desdits produits de traduction dudit gène.

Le marquage immunohistochimique permet la détection spécifique du gène du RM6P-CI sur du matériel cytologique ou sur des coupes tissulaires. Typiquement, cette étape s'effectue sur une puce. Préférentiellement, ladite puce est une puce de type « Tissu Multi Array ».

L'utilisation de puce en diagnostic permet, sur un format miniaturisé, de la taille d'une lame de verre, l'analyse et la visualisation de cibles moléculaires dans un grand nombre d'échantillons tissulaires simultanément, au niveau de l'ADN, de l'ARN ou de la protéine. Typiquement, l'utilisation d'une puce permet d'obtenir des profils d'expression par immunohistochimie (IHC) à partir de tissus archivés fixés, inclus en paraffine mais également à partir de tissus frais ou congelés. L'utilisation d'une telle puce tombe dans les compétences normales de l'homme du métier.

Plus particulièrement, l'étape de mesure du niveau d'expression de la protéine RM6P-CI, dans un échantillon de tissu prostatique, se fait à l'aide de l'anticorps polyclonal IgY 415.

Cet anticorps IgY 415 a été établi chez la poule¹⁸ et préalablement décrit pour l'analyse immunohistochimique¹⁹.

L'invention a encore pour objet un anticorps spécifique du RM6P-CI pour son utilisation dans une méthode de diagnostic *in vitro* du cancer prostatique chez un sujet, ledit anticorps permettant de mesurer le niveau d'expression du gène du

RM6P-CI dans un échantillon de tissu prostatique dudit sujet, la détermination d'une surexpression dudit gène du RM6P-CI étant indicative de la présence d'un cancer prostatique chez ledit sujet.

5 Ainsi qu'évoqué précédemment, l'expression du gène du RM6P-CI pourra par exemple être également détectée par la liaison de ligands. Par exemple, la liaison spécifique d'analogues du mannose 6-phosphate sur les récepteurs RM6P-CI peut être quantifiée⁹. Par ailleurs, ce récepteur RM6P-CI est une protéine multifonctionnelle car il est aussi le récepteur spécifique de l'IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2)⁴. La liaison de l'IGF2 sur son site spécifique de très grande affinité
10 constitue un moyen efficace de quantifier l'expression de ce récepteur RM6P-CI dans le tissu prostatique.

L'expression du gène du RM6P-CI peut encore être détectée par des biocapteurs soit sur des tissus prostatiques prélevés par biopsies, soit directement *in situ* sur des tissus prostatiques du sujet.

15 Pour une détection *in situ*, ces biocapteurs peuvent être, à titre d'exemple, constitués de fibres optiques introduites dans la prostate par des techniques connues de l'homme de l'art. Il est également possible, pour une détection *in situ*, d'injecter par voie intraveineuse, chez le sujet à diagnostiquer, des nanoparticules. Une fois injectées, ces nanoparticules s'accumuleront préférentiellement dans le tissu
20 cancéreux.

La présente invention a également pour objet une méthode de diagnostic *in vivo* d'un cancer prostatique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape de mesure du niveau d'expression du gène du récepteur du mannose 6-phosphate cation indépendant (gène du RM6P-CI) dans le tissu prostatique dudit sujet, la
25 détermination d'une surexpression dudit gène du RM6P-CI dans ledit tissu de la prostate étant indicative de la présence d'un cancer de la prostate chez ledit sujet.

Dans une telle méthode de diagnostic, l'étape de mesure du niveau d'expression du gène du RM6P-CI dans le tissu prostatique sera par exemple une étape de mesure du niveau d'expression des produits de traduction, en particulier la protéine RM6P-
30 CI dans ledit tissu.

L'invention a encore pour objet un anticorps spécifique du RM6P-CI pour son utilisation dans une méthode de diagnostic *in vivo* du cancer prostatique chez un sujet, ledit anticorps permettant de mesurer le niveau d'expression du gène du

RM6P-CI dans le tissu prostatique dudit sujet, la détermination d'une surexpression dudit gène du RM6P-CI étant indicative de la présence d'un cancer prostatique chez ledit sujet.

5 Un autre objet de l'invention porte sur l'utilisation d'un kit comprenant au moins un réactif spécifique du produit de l'expression du gène du RM6P-CI, choisi de préférence parmi :

- un anticorps monoclonal ou polyclonal ;
- un ligand, naturel ou synthétique du RM6P-CI;
- tout autre type de molécules ou macro-molécules capables d'interagir de
10 manière spécifique avec la protéine RM6P-CI ;
- une séquence nucléique capable de s'hybrider spécifiquement avec un fragment de l'ARNm codant pour RM6P-CI,

pour le diagnostic et/ou le pronostic et/ou l'évaluation de l'évolution d'un cancer prostatique chez un sujet.

15

La présente invention a encore pour objet une méthode de traitement thérapeutique du cancer prostatique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- A) une méthode de diagnostic *in vitro* ou *in vivo* du cancer prostatique chez un
20 sujet comprenant une étape de mesure du niveau d'expression du gène du RM6P-CI, la détermination d'une surexpression dudit gène du RM6P-CI étant indicative de la présence d'un cancer prostatique chez ledit sujet,
- B) le traitement du cancer ainsi diagnostiqué.

Typiquement, l'étape B) est une étape classique de traitement du cancer de la
25 prostate. On peut citer à titre d'exemple:

- la chirurgie,
- la radiothérapie (telle que la radiothérapie externe et la curiethérapie),
- l'hormonothérapie,
- la chimiothérapie,
- le traitement par ultrasons focalisés de haute intensité,
- 30 - la cryothérapie,
- la prostatectomie,
- la thérapie photodynamique.

Le choix de la stratégie thérapeutique mise en œuvre dans l'étape B) dépend, entre autre, des caractéristiques du cancer telles que diagnostiquées en étape A).

Les praticiens pourront également considérer d'autres critères tels que :

- la taille de la tumeur,
- 5 - l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques voisins par des cellules cancéreuses, et/ou
- la présence ou non de métastases dans d'autres parties du corps,
- la présence de récepteurs des androgènes ou d'autres biomarqueurs (PSA, AMACR[®], etc.).

10

L'invention sera mieux comprise à la lumière des exemples non limitatifs et purement illustratifs suivants, et des figures 1 et 2.

La figure 1 illustre les profils d'expression du récepteur RM6P-CI dans différents tissus prostatiques cancéreux (Fig. 1a) et dans des tissus prostatiques sains (Fig. 1b).

15
L'échelle indiquée représente 500 μ m.

La figure 2 montre deux types de marquages immunohistochimiques du gène du RM6P-CI. L'échelle indiquée représente 100 μ m.

20
Les figures 2a et 2b illustrent la surexpression du RM6P-CI dans les tissus prostatiques cancéreux du fait de leur marquage (coloration symbolisée par des flèches pleines) à l'aide de l'anticorps anti-RM6P-CI IgY 415. Les noyaux cellulaires sont signalés par des flèches creuses.

Les figures 2c et 2d illustrent des tissus prostatiques sains.

25
Les figures 2e et 2f illustrent l'analyse immunohistochimique de deux parties du même échantillon en l'absence (Fig. 2e) ou en présence (Fig. 2f) d'un excès du RM6P-CI purifié afin de bloquer l'immunomarquage.

Exemple 1 : Etude de l'expression tissulaire du RM6P-CI par méthode immunohistochimique dans des échantillons inclus en paraffine.

30
Cet exemple décrit de manière détaillée la technique de marquage immunohistochimique du RM6P-CI sur des lames "Tissu Multi Array" (TMA) de tissus prostatiques cancéreux ou sains. En effet, le caractère tissulaire du nouveau marqueur

RM6P-CI de l'invention nécessite une analyse par immunomarquage de biopsies prostatiques selon le même protocole que celui utilisé sur les lames TMA.

Les biopsies sont réalisées en routine et finalisent le diagnostic dès lors que le toucher rectal est suspect ou que le taux de PSA total est supérieur à 4.

5 L'urologue réalise au préalable une échographie endorectale afin de localiser l'endroit où va être effectuée la biopsie qui est ensuite réalisée sous forme d'une série de 10 à 12 (ou davantage si nécessaire) prélèvements à l'aide d'une aiguille à déclenchement automatique.

10 La durée du prélèvement est très courte (5-15 minutes) et l'examen peu douloureux. Les complications survenant après une biopsie sont rares et un traitement antibiotique est réalisé en prévention d'une éventuelle infection.

L'anatomopathologiste examine ensuite les biopsies par examen histopathologique afin d'établir ou non la présence de cellules cancéreuses et/ou par examen immunohistochimique afin d'étudier l'expression du marqueur RM6P-CI
15 recherché.

1. Protocole du marquage

L'anticorps polyclonal dénommé « anti-RM6P-CI IgY 415 » ou plus simplement « IgY 415 » dans ce qui suit, est utilisé afin de mesurer les niveaux d'expression du RM6P-CI dans les tissus prostatiques humains.

20 Cet anticorps de haute affinité, purifié à partir d'œufs de poule immunisée avec le RM6P-CI, est dirigé spécifiquement contre le récepteur humain RM6P-CI¹⁸. La spécificité de cet anticorps pour le récepteur RM6P-CI a été préalablement démontrée par les études immunohistochimiques dans les cancers du sein¹⁹.

25 L'analyse de l'expression tissulaire prostatique a été réalisée par marquage immunohistochimique du RM6P-CI sur huit lames TMA provenant du service de pathologie du CHU de Toulouse (Dr Catherine Mazerolles). Chacune de ces lames comporte 16 échantillons prostatiques cancéreux ou sains appartenant à 8 patients différents (2 échantillons par patient).

30 Les tissus sont déparaffinés, réhydratés puis traités par la pronase à 0,1% dans une solution saline de phosphate (PBS) durant 10 mn à 37°C. Entre chaque étape les échantillons sont lavés à l'aide d'une solution de PBS-Tween 20 à 0,1%. Les peroxydases endogènes sont bloquées grâce à une solution d'eau oxygénée 1% durant 15 mn. Les lames sont ensuite incubées 30 mn à 37°C avec une solution de PBS +

Gamma Globuline Bovine (BGG) 0,5% + sérum de chèvre dilué à 1/40 afin de saturer les sites aspécifiques. L'anticorps primaire IgY 415 est dilué à 1/1800 dans une solution de PBS + 0,5 % BGG et incubé sur les tissus durant une nuit à 4°C.

5 Les anticorps IgY 415 fixés spécifiquement au RM6P-CI sont révélés à l'aide d'un anticorps secondaire polyclonal anti-poule fait chez le lapin et couplé à la peroxydase (Sigma). L'anticorps secondaire dilué à 1/300 est incubé durant 30 mn à température ambiante. Enfin, un substrat de la peroxydase, le tétrachlorure de 3,3' diaminobenzidine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), est incubé durant 20 mn et sa précipitation aboutit à un précipité brun/marron. Les échantillons sont contre-colorés par l'hématoxyline puis déshydratés à nouveau.

10 Les noyaux cellulaires sont ainsi colorés en bleu/violet par l'hématoxyline et sont symbolisés dans la figure 2 par des flèches creuses. La surexpression du RM6P-CI est indiquée par la coloration marron et est symbolisée dans la figure 2 par des flèches pleines.

15 2. Quantification de l'immunomarquage

Les lames ont été scannées au Nanozoomer-XR (Hamamatsu) et le marquage immunohistochimique du RM6P-CI a été analysé.

Les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage de cellules colorées et du type de coloration (périnucléaire ou dispersée dans le cytoplasme).

20 Le tissu analysé est considéré comme positif (*i.e.* tissu cancéreux) si plus de 10% des cellules sont colorées en marron.

Toutes les coupes de tissu sont analysées et quantifiées par deux pathologistes différents.

3. Résultats de l'analyse du marquage immunohistochimique du RM6P-CI

25 Au total une collection de 167 échantillons de prostate humaine recueillis par prostatectomie et fixés en paraffine a été sélectionnée par un anatomopathologiste. Parmi ceux-ci, 126 échantillons étaient clairement identifiés comme tissus cancéreux et 41 étaient identifiés comme tissus non cancéreux sur la base de leur analyse histologique. Les échantillons non cancéreux comprennent 39 tissus prostatiques normaux et 2 hypertrophies bénignes.

30

Chaque échantillon a été à la fois analysé par un pathologiste pour déterminer les scores de Gleason correspondant à la gravité du cancer et immunocoloré en utilisant

un anticorps anti-M6PR (anticorps IgY 145). Les noyaux cellulaires ont été colorés par l'hématoxyline.

La Figure 1 illustre les profils d'expression du récepteur RM6P-CI dans trois cancers de la prostate différents (Fig. 1a) et dans trois tissus prostatiques sains (Fig. 1b). La différence de marquage immunohistochimique du RM6P-CI entre les tissus sains et cancéreux est très importante à ce grossissement. Dans les tissus sains, seul le marquage des noyaux par l'hématoxyline est visible.

La Figure 2 montre à un fort grossissement les caractéristiques du marquage immunohistochimique par l'anticorps anti-RM6P-CI. Les tissus prostatiques cancéreux sont marqués de manière différente puisque la coloration des tissus de cancer de la prostate a indiqué deux types de marquage forts (deux profils d'expression) considérés comme positifs (Fig. 2a et 2b).

Le premier type de coloration, observé dans 23% des échantillons, est granulaire et périnucléaire. Cette coloration est la plus classique (Fig. 2a) et est généralement observée dans les tissus normaux riches en RM6P^{13, 14, 15}.

Le deuxième type de coloration, observé dans 61% des échantillons, est également granulaire mais plus diffusé dans le cytoplasme de la cellule (Fig. 2b).

Ces deux types de marquages indiquent une surexpression des RM6P-CI.

En revanche, les cellules épithéliales ne sont pas colorées dans les tissus prostatiques normaux, ce qui suggère que la surexpression est spécifique des cellules malignes (Fig. 2c, 2d).

En conclusion des figures 1 et 2, on note de manière surprenante que les cellules épithéliales des tissus prostatiques sains ne sont pas marquées par l'anticorps, ces tissus expriment donc peu le RM6P-CI, tandis que les tissus prostatiques cancéreux surexpriment le récepteur RM6P-CI.

Le tableau 1 ci-dessous indique le pourcentage de cellules marquées dans des tissus prostatiques cancéreux et sains.

Tableau 1

% de cellules RM6P-CI marquées	Tissu prostatique cancéreux (126) (%)	Tissu prostatique non cancéreux (41) %
0 – 3 %	0 (0)	41 (100)
3 – 10 %	20 (16)	0 (0)
10 – 30 %	28 (22)	0 (0)
30 – 60 %	39 (31)	0 (0)
60 – 100 %	39 (31)	0 (0)

Pour rappel, un taux supérieur de 10% de cellules marquées a été fixé par les Inventeurs comme indicateur d'un tissu prostatique cancéreux. Les cellules marquées sont encore désignées par « cellules RM6P-CI marquées » ou « cellules RM6P-CI colorées ».

Sur 126 échantillons prostatiques cancéreux, 106 échantillons au total - soit 84% d'échantillons prostatiques cancéreux - présentent plus de 10% de cellules marquées.

Sur 31% d'échantillons prostatiques cancéreux, plus de 60% des cellules sont marquées. En contraste, sur l'ensemble des 41 échantillons sains, moins de 3% des cellules sont marquées.

Le tableau 2 ci-dessous indique la surexpression du récepteur RM6P-CI (% RM6P-CI positif) dans 126 échantillons prostatiques cancéreux en fonction du grade de Gleason. Le terme « % RM6P-CI positif » indique que le pourcentage d'échantillons possédant un taux de cellules marquées pour le RM6P-CI est supérieur à 10%.

La gravité et le risque d'évolution des cancers de la prostate sont estimés notamment grâce au grade de Gleason encore appelé score de Gleason (Score allant de 2 à 10) prenant en compte la modification de la morphologie des glandes prostatiques vers une indifférenciation croissante.

Tableau 2

Grade de Gleason (nombre d'échantillons)	% RM6P-CI positif
Grade 4 (2)	100
Grade 5 (8)	75
Grade 6 (30)	90
Grade 7 (56)	80
Grade 8 (23)	83
Grade 9 (6)	100
Grade 10 (1)	100
Total : 126 échantillons	84%

5 L'analyse du marquage immunohistochimique du RM6P-CI selon les scores de Gleason indique que le RM6P-CI est surexprimé (coloration positive) aussi bien pour des faibles grades de cancer (tel que le grade 4) que pour des forts grades de cancer (tel que le grade 10).

En conclusion, l'analyse immunohistochimique de 126 cancers de la prostate montre une surexpression du RM6P-CI dans 84 % des cas alors que la surexpression de ce récepteur est non détectable dans 41 biopsies prostatiques saines ou hyperplasiques bénignes.

Ces résultats permettent d'envisager le RM6P-CI pour son utilisation comme biomarqueur dans le diagnostic d'un cancer prostatique chez un sujet.

4. Spécificité de l'immunomarquage

15 Afin de valider la spécificité de l'immunomarquage et les résultats obtenus, une expérience de réversion du marquage immunohistochimique a été réalisée par saturation préalable de l'anticorps IgY 415 par un excès d'antigène RM6P-CI.

20 Des échantillons de tissus prostatiques cancéreux, fournis par le Dr Xavier Rébillard (Clinique Beausoleil, Montpellier), ont été fixés par du paraformaldéhyde 4%, inclus en paraffine et coupés au microtome Leica (Leica Biosystems) en sections de 5 μ m d'épaisseur. Deux sections consécutives d'un même échantillon ont été utilisées. Le protocole de marquage reste identique mais l'anticorps IgY 415 (1/1000) est incubé au préalable pendant 90 mn à 37°C avec une solution de RM6P-CI fortement concentrée (1,24 mg/ml) dans du PBS ou avec une solution de PBS contenant 1,24 mg/ml de gamma-globuline bovine (témoin).

L'analyse des deux conditions a permis de valider la spécificité du marquage RM6P-CI car la saturation de l'anticorps IgY 415 avec un excès de récepteur RM6P-CI a bloqué la coloration immunohistochimique (Fig. 2f) observée sur la lame témoin (Fig. 2e).

5

Exemple 2 : Marquage immunohistochimique des RM6P-CI par immunohistochimie de biopsies cancéreuses congelées et de tissu normal congelé.

10 Les biopsies sont issues de prostatectomies réalisées pour le traitement de cancers avancés. Le tissu prélevé est congelé à -80°C puis fixé par incubation pendant 20 secondes dans le méthanol à une température de -20°C. Les sections congelées de 6 µm sont réalisées et incubées pendant 30 min à température ambiante avec les anticorps (dilution 1/300) dans le tampon phosphate.

15 Le niveau d'expression du RM6P-CI a été mesuré à l'aide d'un analyseur d'image informatisé (SAMBA, Alcatel Grenoble France) selon la méthode décrite dans Berthe¹⁹.

Les résultats sont exprimés en « valeurs arbitraires » obtenues par la formule du « QIC score » (« Quantitative Immuno Cytochemical score ») = (Pourcentage de surface colorée des cellules épithéliales) X (Moyenne de l'intensité de coloration) X
20 10.

Le marquage spécifique est obtenu en utilisant l'anticorps IgY 415 (dilution 1/1000).

25 Le marquage non spécifique est évalué en utilisant une concentration identique d'un anticorps IgY provenant d'un animal non immunisé (témoin négatif).

Le tableau 3 ci-dessous décrit le niveau d'expression du RM6P-CI dans des coupes congelées de 5 prélèvements selon la détermination du « QIC score » avec l'anticorps RM6P IgY 415 ou l'anticorps témoin (non spécifique).

Tableau 3 :

30 Dosage du niveau d'expression du RM6P-CI sur des coupes à congélation provenant de trois prélèvements de cancers de la prostate et de deux prélèvements de tissus prostatiques normaux par la méthode du « QIC score ».

Cancers prostatiques	Anticorps anti RM6P-CI QIC Score (moyenne \pm écart-type)	Anticorps non spécifique QIC Score (moyenne \pm écart-type)
Patient 1	95 \pm 15	20 \pm 4
Patient 2	85 \pm 10	17 \pm 5
Patient 3	110 \pm 10	18 \pm 5
Tissu normal 1	22 \pm 5	19 \pm 6
Tissu normal 2	22 \pm 5	22 \pm 4

Ces résultats montrent une expression quantifiable et intense dans les cellules cancéreuses.

Dans les tissus cancéreux, le marquage immunohistochimique est de 3,4 à 5 fois plus élevé que celui des tissus normaux. Le marquage des cancers obtenu avec l'anticorps anti RM6P-CI est spécifique car il est de 4,75 à 6 fois plus élevé que celui obtenu pour la même concentration d'un anticorps IgY non spécifique.

Le dosage par immunohistochimie peut donc être réalisé sur des coupes à congélation du tissu prostatique. Ce type de coupe permet avantageusement d'établir un diagnostic rapide (précoce) après le prélèvement par le clinicien. On dispose ainsi selon l'invention d'un diagnostic « extemporané », ayant lieu immédiatement après le prélèvement de tissu prostatique d'un sujet à diagnostiquer.

CONCLUSION

L'expression du RM6P-CI a précédemment été observée dans des lignées de cellules cancéreuses isolées en culture, y compris dans une lignée cancéreuse prostatique¹⁶. Il a ainsi été montré dans Huang *et al.*¹⁶ que la lignée cellulaire cancéreuse prostatique LNCaP exprime RM6P-CI, tandis que les autres lignées cellulaires prostatiques cancéreuses PC-3 et DU-145 n'expriment pas ou très peu RM6P-CI.

Cependant, le marquage sur une lignée cellulaire prostatique cancéreuse isolée ne peut en aucun cas laisser présager une surexpression du RM6P-CI dans l'ensemble des tissus prostatiques cancéreux. En effet, une lignée cellulaire est un système artificiel soumis à des artefacts de culture, comme par exemple la présence de sérum de veau fœtal indispensable à la survie de la lignée cellulaire, et donc les résultats

obtenus avec une lignée cellulaire ne peuvent pas être généralisés d'autant plus si les résultats obtenus avec d'autres lignées cellulaires comparables sont différents.

Par ailleurs, ainsi que décrit précédemment, le RM6P-CI était considéré comme un gène suppresseur de tumeur puisque de nombreux travaux ont décrit une
5 diminution de l'expression du RM6P-CI dans plusieurs types de cancers.

Pour finir, l'homme de l'art savait aussi que le meilleur marqueur circulant pronostique, le PSA, était produit essentiellement par les cellules prostatiques saines.

Ainsi, de par l'enseignement de l'état de la technique, aucune analyse de l'expression du RM6P-CI et comparaison du tissu d'une prostate « saine » et d'une
10 prostate « cancéreuse » n'ont été réalisées jusqu'à ce jour.

Les résultats de la surexpression du RM6P-CI dans les tissus prostatiques cancéreux sont donc très inattendus puisqu'ils vont à l'encontre des connaissances de l'art antérieur et permettent de vaincre un préjugé technique.

La surexpression du RM6P-CI dans les tissus prostatiques cancéreux permet
15 d'envisager l'utilisation dudit RM6P-CI comme outil de diagnostic pour le dépistage des cancers de la prostate par les anatomopathologistes.

L'absence de surexpression du RM6P-CI par les tissus prostatiques sains exclut avantageusement les problèmes récurrents de faux positifs et de sur-diagnostics observés avec d'autres marqueurs potentiels (comme par exemple AMACR)⁷.

Ce nouveau marqueur RM6P-CI de dépistage et de diagnostic du cancer de la
20 prostate selon l'invention permet donc avantageusement de pallier les déficiences et les limites des outils de diagnostic actuels.

La présente invention propose un marqueur spécifique des cellules tumorales prostatiques puisque le RM6P-CI est surexprimé uniquement dans les cellules
25 cancéreuses des tissus prostatiques (et non dans les tissus prostatiques sains).

La présente invention propose encore un nouveau marqueur des cellules cancéreuses qui peut être mesuré sur le tissu prostatique *in situ* chez le patient par des méthodes utilisant des biocapteurs de type fibres optiques ou nanoparticules.

Afin de compléter le diagnostic anatomopathologique, la méthode de l'invention
30 pourra encore comprendre, outre la mesure du niveau d'expression du gène RM6P-CI, la mesure du niveau d'expression d'un ou plusieurs marqueurs immunohistochimiques connus à ce jour.

A titre d'exemple de marqueurs immunohistochimiques, on pourra citer des marqueurs de cellules de type basales (encore appelé « marqueur de type basal »), notamment choisis parmi p63, CK 903 ou CK 5/6, ou d'autres marqueurs de cellules cancéreuses, notamment choisis parmi AMACR[®], GST1 méthylé[®] ou TMPRSS2-ETS[®].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Andriole G. L. et al J Nat Cancer Inst 104 : 1-8 (2012).
2. Schröder F. H. et al., N Engl J Med **360**: 1320-1328 (2009).
- 5 3. Schröder F. H. et al., N Engl J Med **366**: 981-990 (2012).
4. Valeri A. et al., Bull Cancer **12**: 1499-1515 (2010).
5. Molinié V. et al., Prog Urol **4**: 611-615 (2005).
6. Makarov D. V. et al, Annu Rev. Med **60**: 139-151 (2009).
7. Rubin M. A. et al. Jama **287**: 1662-1670 (2002).
- 10 8. Chikezie O. et al., J Cancer **1** : 150-177 (2010).
9. Gary-Bobo M. et al., Curr Med Chem **14** (28): 2945-2953 (2007).
10. Hebert E., Biosci Rep **26**: 7-17 (2006).
11. Da Costa S. A. et al., J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**: 85-94 (2000).
12. Yamada T. et al., Proc Natl Acad Sci USA **94**: 10351-10355 (1997).
- 15 13. Hebert E. et al., Br J Cancer **69**: 120-124 (1994).
14. Lee J. S. et al., Int J Cancer **107**: 564-570 (2003).
15. Chen Z. et al., BMC Cancer **2**: 18-27 (2002).
16. Huang Y. et al., Clin Immunol 111 : 202-209 (2004).
17. Leong A.S.Y. et al., Manual of Diagnostic Cytology, 2nd edition, Greenwish
20 Medical Media. 79-80 (2003).
18. Lemamy G. et al., Int J Cancer **80**: 896-902 (1999).
19. Berthe M.L. et al., Eur J Cancer **39**: 635-642 (2003).

REVENDICATIONS

1. Méthode de diagnostic *in vitro* d'un cancer prostatique chez un sujet caractérisée en ce qu'elle comprend une étape de mesure du niveau d'expression du gène du récepteur mannose 6-phosphate cation indépendant (gène du RM6P-CI) dans un échantillon de tissu prostatique dudit sujet, la détermination d'une surexpression dudit gène du RM6P-CI étant indicative de la présence d'un cancer prostatique chez ledit sujet.
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'étape de mesure du niveau d'expression du gène du RM6P-CI est une étape de mesure du niveau d'expression des produits de transcription, en particulier l'ARNm.
3. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'étape de mesure du niveau d'expression du gène du RM6P-CI est une étape de mesure du niveau d'expression des produits de traduction, en particulier la protéine RM6P-CI.
4. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la surexpression du gène du RM6P-CI est déterminée lorsque l'expression du gène du RM6P-CI est au moins trois fois supérieure à celle dudit gène dans un tissu prostatique non cancéreux.
5. Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'étape de mesure du niveau d'expression des produits de traduction du gène du RM6P-CI se fait par analyse du marquage immunohistochimique des produits de traduction du RM6P-CI dans un échantillon de tissu prostatique dudit sujet.
6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'analyse du marquage immunohistochimique des produits de traduction est évaluée par coloration des cellules de l'échantillon de tissu prostatique, une coloration de plus de 10% desdites cellules étant indicative d'une surexpression des produits de traduction du gène du RM6P-CI.

7. Méthode selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que ladite étape de mesure du niveau d'expression des produits de traduction du RM6P-CI se fait à l'aide de l'anticorps polyclonal IgY 415.

5

8. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre la mesure, chez ledit sujet, du niveau d'expression d'un marqueur de cellules de type basales, notamment choisi parmi p63, CK 903 ou CK 5/6, ou d'un marqueur de cellules cancéreuses, notamment choisi parmi AMACR[®], GST1 méthylé[®] ou TMPRSS2-ETS[®].

10

9. Anticorps spécifique du récepteur mannose 6-phosphate cation indépendant (RM6P-CI) pour son utilisation dans une méthode de diagnostic *in vitro* d'un cancer prostatique chez un sujet, ledit anticorps permettant de mesurer le niveau d'expression du gène du RM6P-CI dans un échantillon de tissu prostatique dudit sujet, la détermination d'une surexpression dudit gène du RM6P-CI étant indicative de la présence d'un cancer prostatique chez ledit sujet.

15

Figure 1

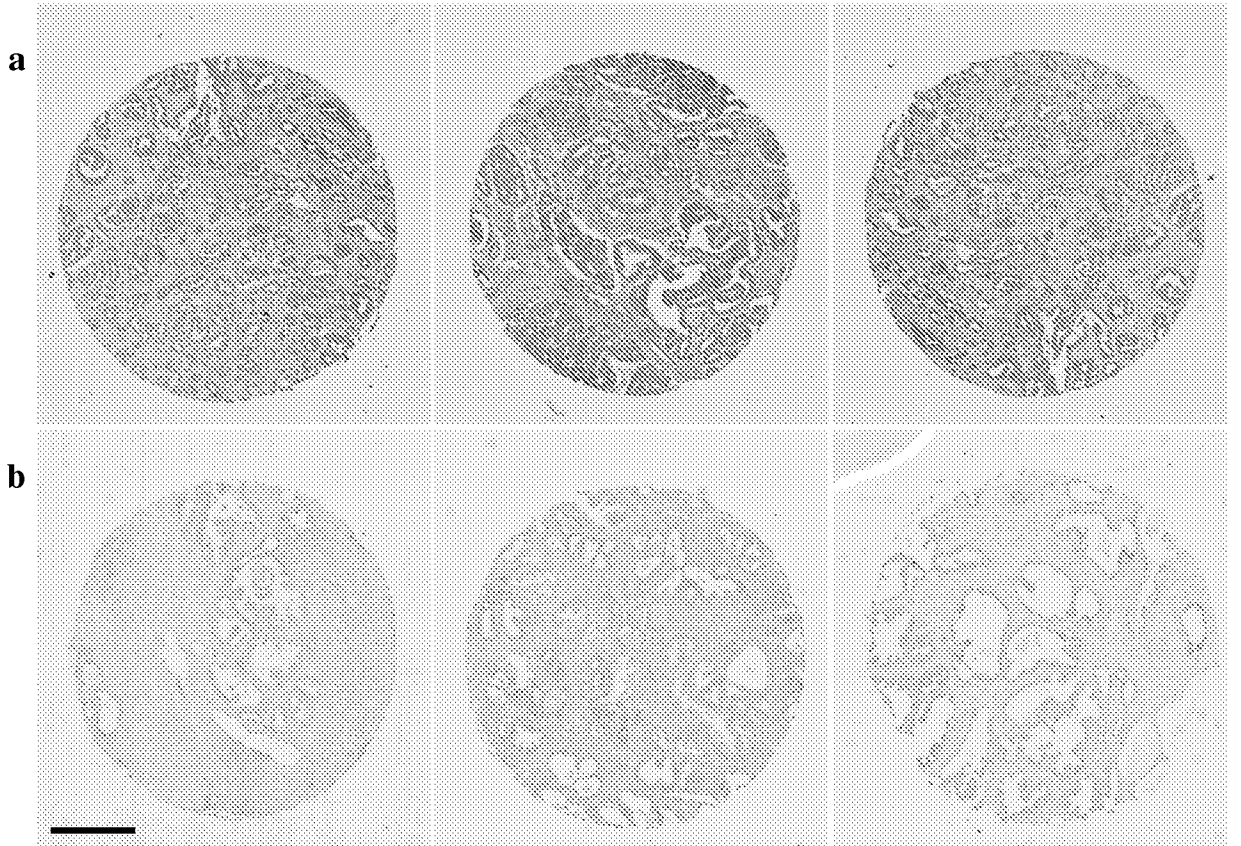
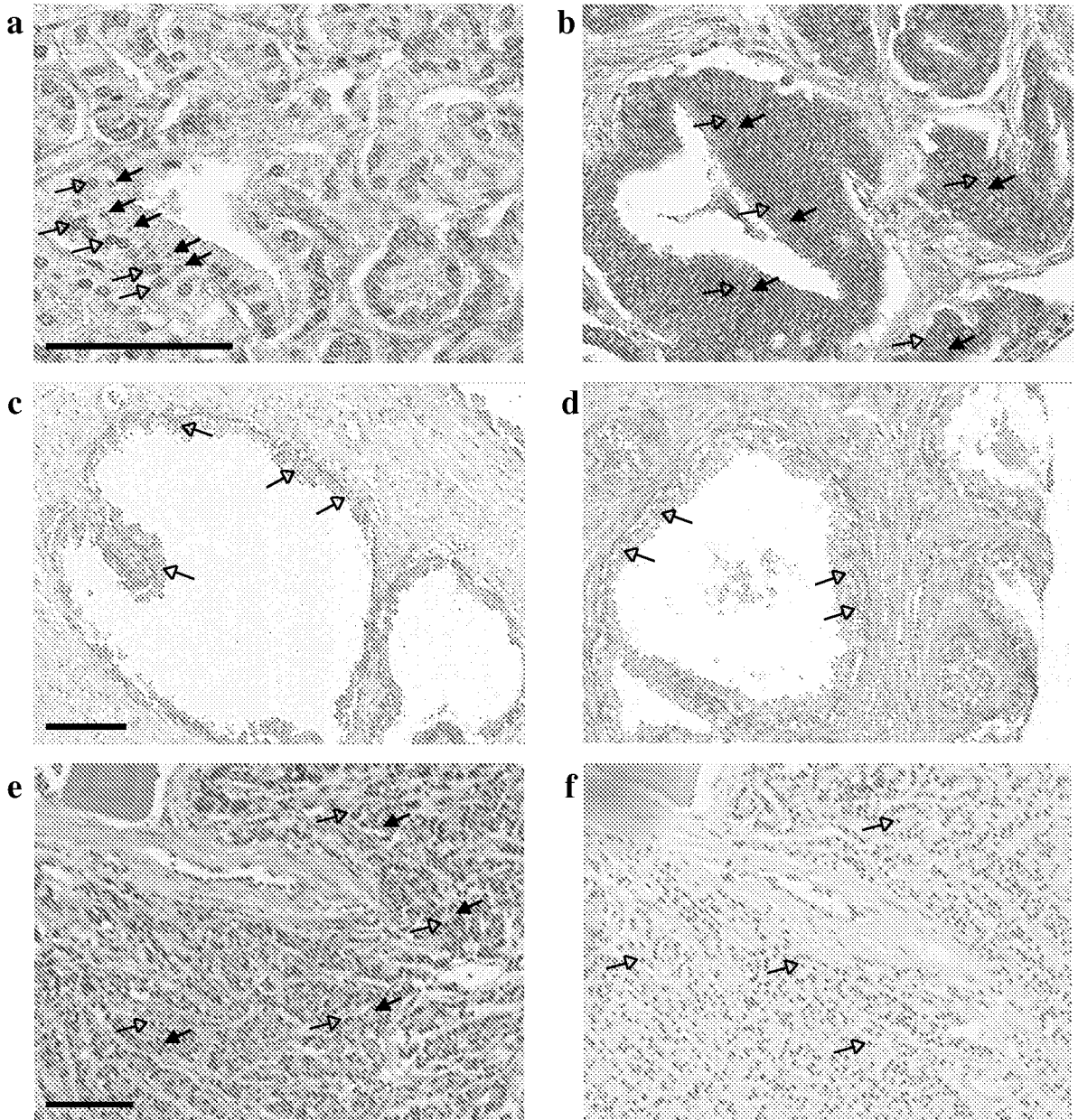


Figure 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/050153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68 G01N33/574
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/60860 A2 (MILLENNIUM PREDICTIVE MEDICINE [US]) 23 August 2001 (2001-08-23)	1-6,8,9
Y	claims 5,14,20-24,30 page 3, line 17 - page 5, line 23 page 20, line 29 - page 21, line 1 sequences 23237,29110 -& DATABASE EMBL [Online] 30 January 2004 (2004-01-30), "Sequence 23237 from Patent W00160860.", XP002728499, retrieved from EBI accession no. EM PAT:CQ491370 Database accession no. CQ491370 sequence -/--	7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 8 April 2015	Date of mailing of the international search report 20/04/2015
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schmitt-Humbert, C
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/050153

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& DATABASE EMBL [Online] 30 January 2004 (2004-01-30), "Sequence 29110 from Patent W00160860.", XP002728500, retrieved from EBI accession no. EM_PAT:CQ497243 Database accession no. CQ497243 sequence	
X	----- YINYIN HUANG ET AL: "A high-throughput proteo-genomics method to identify antibody targets associated with malignant disease", CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 111, no. 2, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 202-209, XP055134423, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1016/j.clim.2003.12.009 cited in the application abstract page 208, column 1, paragraph 4 page 207, column 1, paragraph 2	9
X	----- GUY-JOSEPH LEMAMY ET AL: "High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): Characterization and potential use in clinical cancer studies", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 80, no. 6, 15 March 1999 (1999-03-15) , pages 896-902, XP055134465, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19990315)80:6<896: :AID-IJC16>3.3.CO;2-A cited in the application abstract page 897, column 1, paragraph 3 - paragraph 4	9
Y A	----- BERTHE M L ET AL: "Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression levels during the progression from normal human mammary tissue to invasive breast carcinomas", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON, vol. 39, no. 5, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 635-642, XP004413244, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/S0959-8049(02)00627-5 page 636, column 2, paragraph 3 abstract	7 1-6,8
X	----- BERTHE M L ET AL: "Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression levels during the progression from normal human mammary tissue to invasive breast carcinomas", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON, vol. 39, no. 5, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 635-642, XP004413244, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/S0959-8049(02)00627-5 page 636, column 2, paragraph 3 abstract	9
Y A	----- page 636, column 2, paragraph 3 abstract	7 1-6,8
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/050153

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHIKEZIE O. MADU ET AL: "Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer", JOURNAL OF CANCER, vol. 10914100410, 6 October 2010 (2010-10-06), page 150, XP055134787, ISSN: 1837-9664, DOI: 10.7150/jca.1.150 abstract page 162 - page 163 page 167, column 2, last paragraph - page 168, column 1, paragraph 2 page 168, column 2, last paragraph -----</p>	1-8
A	<p>MAZZOLA C R E ET AL: "Les biomarqueurs émergents du diagnostic, du staging et du pronostic du cancer de la prostate = Emerging biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer", PROGRES EN UROLOGIE, ASSOCIATION FRANCAISE D'UROLOGIE, PARIS, FR, vol. 21, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 1-10, XP009148897, ISSN: 1166-7087, DOI: 10.1016/J.PUROL.2010.07.004 [retrieved on 2010-08-14] abstract page 7, column 2, last paragraph - page 9, column 1, paragraph 1 -----</p>	1-8
A	<p>WO 2008/090177 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; CT PAUL STRAUSS [FR]; UNIV PASTEUR [FR];) 31 July 2008 (2008-07-31) claims 1-11 -----</p>	1-8
A	<p>P J Kaplan ET AL: "The insulin-like growth factor axis and prostate cancer: lessons from the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model", Cancer research, 1 May 1999 (1999-05-01), page 2203, XP055134380, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/59/9/2203 abstract figure 5 -----</p>	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/050153

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0160860	A2	23-08-2001	
		AU 4154101 A	27-08-2001
		US 2004259086 A1	23-12-2004
		WO 0160860 A2	23-08-2001

WO 2008090177	A2	31-07-2008	
		AT 531822 T	15-11-2011
		CA 2676436 A1	31-07-2008
		EP 2126136 A2	02-12-2009
		US 2011165178 A1	07-07-2011
		WO 2008090177 A2	31-07-2008

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/050153

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12Q1/68 G01N33/574 ADD.				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB				
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE				
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12Q G01N				
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche				
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, Sequence Search				
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
X	WO 01/60860 A2 (MILLENNIUM PREDICTIVE MEDICINE [US]) 23 août 2001 (2001-08-23)	1-6,8,9		
Y	revendications 5,14,20-24,30 page 3, ligne 17 - page 5, ligne 23 page 20, ligne 29 - page 21, ligne 1 séquences 23237,29110 -& DATABASE EMBL [Online] 30 janvier 2004 (2004-01-30), "Sequence 23237 from Patent W00160860.", XP002728499, extrait de EBI accession no. EM PAT:CQ491370 Database accession no. CQ491370 séquence -/--	7		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</td> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités:				
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention			
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément			
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier			
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	"&" document qui fait partie de la même famille de brevets			
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée				
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale			
8 avril 2015	20/04/2015			
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé			
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schmitt-Humbert, C			

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
	-& DATABASE EMBL [Online] 30 janvier 2004 (2004-01-30), "Sequence 29110 from Patent W00160860.", XP002728500, extrait de EBI accession no. EM_PAT:CQ497243 Database accession no. CQ497243 séquence -----	
X	YINYIN HUANG ET AL: "A high-throughput proteo-genomics method to identify antibody targets associated with malignant disease", CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 111, no. 2, 1 mai 2004 (2004-05-01), pages 202-209, XP055134423, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1016/j.clim.2003.12.009 cité dans la demande abrégé page 208, colonne 1, alinéa 4 page 207, colonne 1, alinéa 2 -----	9
X	GUY-JOSEPH LEMAMY ET AL: "High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): Characterization and potential use in clinical cancer studies", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 80, no. 6, 15 mars 1999 (1999-03-15), pages 896-902, XP055134465, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19990315)80:6<896: :AID-IJC16>3.3.CO;2-A cité dans la demande abrégé	9
Y A	page 897, colonne 1, alinéa 3 - alinéa 4 -----	7 1-6,8
X	BERTHE M L ET AL: "Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression levels during the progression from normal human mammary tissue to invasive breast carcinomas", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON, vol. 39, no. 5, 1 mars 2003 (2003-03-01), pages 635-642, XP004413244, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/S0959-8049(02)00627-5 page 636, colonne 2, alinéa 3 abrégé -----	9
Y A		7 1-6,8
	----- -/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CHIKEZIE O. MADU ET AL: "Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer", JOURNAL OF CANCER, vol. 10914100410, 6 octobre 2010 (2010-10-06), page 150, XP055134787, ISSN: 1837-9664, DOI: 10.7150/jca.1.150 abrégé page 162 - page 163 page 167, colonne 2, dernier alinéa - page 168, colonne 1, alinéa 2 page 168, colonne 2, dernier alinéa -----</p>	1-8
A	<p>MAZZOLA C R E ET AL: "Les biomarqueurs émergents du diagnostic, du staging et du pronostic du cancer de la prostate = Emerging biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer", PROGRES EN UROLOGIE, ASSOCIATION FRANCAISE D'UROLOGIE, PARIS, FR, vol. 21, no. 1, 1 janvier 2011 (2011-01-01), pages 1-10, XP009148897, ISSN: 1166-7087, DOI: 10.1016/J.PUROL.2010.07.004 [extrait le 2010-08-14] abrégé page 7, colonne 2, dernier alinéa - page 9, colonne 1, alinéa 1 -----</p>	1-8
A	<p>WO 2008/090177 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; CT PAUL STRAUSS [FR]; UNIV PASTEUR [FR];) 31 juillet 2008 (2008-07-31) revendications 1-11 -----</p>	1-8
A	<p>P J Kaplan ET AL: "The insulin-like growth factor axis and prostate cancer: lessons from the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model", Cancer research, 1 mai 1999 (1999-05-01), page 2203, XP055134380, UNITED STATES Extrait de l'Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/59/9/2203 abrégé figure 5 -----</p>	1-8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/050153

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 0160860	A2	23-08-2001	AU	4154101	A	27-08-2001
			US	2004259086	A1	23-12-2004
			WO	0160860	A2	23-08-2001

WO 2008090177	A2	31-07-2008	AT	531822	T	15-11-2011
			CA	2676436	A1	31-07-2008
			EP	2126136	A2	02-12-2009
			US	2011165178	A1	07-07-2011
			WO	2008090177	A2	31-07-2008
