

Université de Montréal

Implication de la voie alternative NF-kappaB dans le cancer de la prostate

par

Ingrid Labouba

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et post-doctorales
en vue de l'obtention du grade de Ph.D
en Biologie moléculaire

Aôut, 2013

© Ingrid Labouba, 2013

Résumé

Le cancer de la prostate (CaP) est le plus diagnostiqué chez les hommes au Canada et représente le troisième cancer le plus meurtrier au sein de cette population. Malgré l'efficacité des traitements de première ligne, de nombreux patients finiront par développer une résistance et, le cas échéant, verront leur CaP progresser vers une forme plus agressive. Plusieurs paramètres, essentiellement cliniques, permettent de prédire la progression du CaP mais leur sensibilité, encore limitée, implique la nécessité de nouveaux biomarqueurs afin de combler cette lacune. Dans cette optique nous nous intéressons au facteur de transcription NF- κ B.

Des études réalisées au laboratoire et ailleurs, associent RelA(p65) à un potentiel clinique dans le CaP, soulignant ainsi l'importance de la voie classique NF- κ B. L'implication de la voie alternative NF- κ B dans la progression du CaP a aussi été suggérée dans une de nos études illustrant la corrélation entre la distribution nucléaire de RelB et le score de Gleason. Alors que la voie classique est largement documentée et son implication dans la progression du CaP établie, la voie alternative, elle, reste à explorer. La présente thèse vise à clarifier l'implication de la voie alternative NF- κ B dans le CaP et répond à deux objectifs fixés dans ce but.

Le premier objectif fut d'évaluer l'impact de l'activation de la voie alternative NF- κ B sur la biologie des cellules cancéreuses prostatiques. L'étude de la surexpression de RelB a souligné les effets de la voie alternative NF- κ B sur la prolifération et l'autophagie. Étant ainsi impliquée tant dans la croissance tumorale que dans un processus de plus en plus associée à la progression tumorale, quoique potentiellement létal pour les cellules cancéreuses, son impact sur la tumorigénèse du CaP reste encore difficile à définir.

Il n'existe, à ce jour, aucune étude permettant de comparer le potentiel clinique des voies classique et alternative NF- κ B. Le second objectif de ce projet fut donc l'analyse conjointe de RelA(p65) et RelB au sein de mêmes tissus de patients atteints de CaP afin de déterminer l'importance clinique des deux signalisations NF- κ B, l'une par rapport à l'autre. Le marquage immunofluorescent de RelA(p65) et RelB en a permis l'analyse quantitative et objective par un logiciel d'imagerie. Nos travaux ont confirmé le potentiel clinique associé à RelA(p65). La variable RelA(p65)/RelB s'est, elle, avérée moins informative que RelA(p65). Par contre, aucune corrélation entre RelB et les paramètres cliniques inclus dans l'étude n'est ressortie.

En définitive, mon projet de thèse aura permis de préciser l'implication de la voie alternative NF- κ B sur la biologie du CaP. Son impact sur la croissance des cellules cancéreuses prostatiques ainsi que sur l'autophagie, dénote l'ambivalence de la voie alternative NF- κ B face à la tumorigénèse du CaP. L'étude exhaustive de la signalisation NF- κ B souligne davantage l'importance de la voie classique dont l'intérêt clinique est principalement associé au statut de RelA(p65). Ainsi, bien que RelB n'affiche aucun potentiel en tant que biomarqueur exploitable en clinique, l'analyse de l'intervention de la voie alternative NF- κ B sur la biologie des cellules cancéreuses prostatiques reste d'intérêt pour la compréhension de son rôle exact dans la progression du CaP.

Mots-clés : Cancer de la prostate, NF- κ B, RelB, RelA(p65), autophagie, immunofluorescence

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed cancer and represents the third cause of cancer-death in Canadian men. Despite effective first-line therapies, many patients experience disease recurrence where PCa progresses toward a more aggressive form. Several parameters, largely clinical, have been used to predict the progression of PCa but their accuracy is still limited and implies the need for new biomarkers to fill this gap. Previous research from the laboratory has demonstrated that the transcription factor NF- κ B, and its nuclear localization, could be such a prognostic biomarker.

Studies in our laboratory and elsewhere have correlated RelA(p65) with a clinical progression in PCa, underlining the importance of the classical NF- κ B pathway. The involvement of the alternative NF- κ B pathway in the progression of PCa was also suggested in one of our studies showing the correlation between the nuclear distribution of RelB and Gleason score. While the classical pathway is well documented and its involvement in the PCa progression established, the alternative NF- κ B pathway remains largely unexplored. This thesis describes two research objectives that aims to clarify the involvement of the alternative NF- κ B pathway in PCa.

The first objective assessed the impact of the alternative NF- κ B pathway activation on the biology of PCa cells. RelB overexpression in 22RV1 PCa cells highlighted an effect of the alternative NF- κ B pathway on cell proliferation and autophagy. Its dual role in cell growth and a form of cell death requires further study to understand the balance of these in PCa tumorigenesis.

To date no study has addressed the comparative prognostic potential of both the classical and alternative NF- κ B pathways simultaneously. Therefore the second objective of this research project was to analyze both RelA(p65) and RelB at a cellular level in the same tissue of patients with PCa to determine their unique and combined contribution to predicting biochemical recurrence in patients. This analysis was possible through immunofluorescent labeling of RelA (p65) and RelB, and was followed by a quantitative and objective analysis using an appropriate software. Our work confirmed the predictive value of RelA(p65) for biochemical recurrence. Combining RelA(p65) with RelB weakened the association, and RelB on its own was not found to predict biochemical recurrence.

Ultimately, the research presented here has clarified the involvement of the alternative NF- κ B pathway on the biology of PCa. Its impact on the growth of PCa cells as well as autophagy reveals the dual role of the alternative NF- κ B pathway in PCa tumorigenesis. This exhaustive study of NF- κ B in PCa tissues further underscores the importance of the classical pathway whose clinical interest is mainly associated with RelA(p65) status. Thus, although RelB shows no potential as a clinically exploitable biomarker, further studies are needed to determine whether RelB contributes, either positively or negatively, and in a temporal fashion, to PCa progression.

Keywords: Prostate cancer, NF- κ B, RelB, RelA(p65), autophagy, immunofluorescence

Table des matières

Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
1. La prostate	1
1.1. Anatomie.....	1
1.2. Types cellulaires.....	4
1.3. Fonctions.....	6
2. Le cancer de la prostate	7
2.1. Épidémiologie	8
2.1.1. Statistiques	8
2.1.2. Facteurs de risque.....	11
2.1.2.1. Âge	11
2.1.2.2. Historique familial	11
2.1.2.3. Facteur ethnique.....	12
2.1.2.4. Facteur diététique.....	13
2.2. Considérations cliniques	14
2.2.1. Diagnostic	14
2.2.1.1. Test de l'APS et touché rectal.....	15
2.2.1.2. Échographie transrectale et biopsies	15
2.2.1.3. Avancement du cancer de la prostate.....	16
2.2.2. Progression.....	23
2.2.2.1. Pathologies non cancéreuses de la prostate.....	23
2.2.2.2. Cancer de la prostate.....	25
2.2.3. Traitements.....	30
2.2.3.1. Traitements de cancers de la prostate localisés.....	30
2.2.3.2. Traitements de cancers de la prostate avancés.....	38

2.2.4. Gestion clinique du cancer de la prostate.....	39
2.2.4.1. «Sur-diagnostic» ou «Over-diagnosis».....	39
2.2.4.2. Résistance à la castration et rechute biochimique.....	41
2.2.5. Prédiction de la progression du cancer de la prostate	43
2.2.5.1. Outils pronostics	43
2.2.5.2. Marqueurs biomoléculaires.....	46
3. Le facteur de transcription NF-κB	48
3.1. Protéines de signalisation NF-κB.....	48
3.2. Voies de signalisation NF-κB	54
3.2.1. Voie de signalisation classique NF-κB	56
3.2.2. Voie de signalisation alternative NF-κB	58
3.2.3. Fonctions associées à la signalisation NF-κB	60
3.3. NF-κB et cancer de la prostate	61
3.3.1. Signalisation classique NF-κB et cancer de la prostate	62
3.3.2. Signalisation alternative NF-κB et cancer de la prostate	65
4. Projet de thèse : Implication de la voie alternative NF-κB dans le cancer de la prostate.....	69
4.1. Problématiques et hypothèses de travail	69
4.2. Objectifs de recherche.....	70
<u>Chapitre 1</u> : Impact fonctionnel de la voie alternative NF-κB sur la biologie des cellules cancéreuses prostatiques	72
1. Article #1 : Résumé en français	72
2. Article #1 : Version originale soumise à Cancer cell international.....	74
<u>Chapitre 2</u> : Étude conjointe des voies classique et alternative NF-κB par immunofluorescence	108
Article #2 : Résumé en français	108
Article #2 : Version originale en préparation.....	110
<u>Chapitre 3</u> : Discussion générale	139
1. Impact de la voie alternative dans la biologie du cancer de la prostate.....	139
1.1. RelB et autophagie.....	139
1.2. RelB et diversité des lignées cellulaires prostatiques	142

1.3. Voie alternative NF- κ B, cancer et inflammation	144
1.4. NF- κ B et thérapies anti-cancer	146
1.5. Voie classique et voie alternative NF- κ B dans le cancer.....	149
2. Étude de NF-κB par immunofluorescence sur micro-étalage de tissus.....	152
2.1. Limites de l'immunohistochimie pour des études de co-distribution et de co-localisation	152
2.2. Immunofluorescence sur micro-étalages de tissus : considérations techniques....	154
2.2.1. Autofluorescence	155
2.2.2. Utilisation de plusieurs anticorps de même isotype pour un marquage multiple en immunofluorescence	157
2.2.3. Analyse quantitative de la fluorescence.....	159
Conclusion	164
Bibliographie.....	166
Annexes.....	i

Liste des tableaux

Tableau I : Système de classification TNM.....	22
Tableau II : Risque de progression du cancer de la prostate	40
Tableau III : NF- κ B et cancer : fonctions pro- et anti-tumorales	63

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du système reproducteur male et des voies urinaires.....	2
Figure 2 : Anatomie zonale de la prostate.....	3
Figure 3 : Principaux types cellulaires de la prostate.....	5
Figure 4 : Statistiques sur le cancer au Canada, 2012.....	10
Figure 5 : Diagramme schématique du système de gradation de Gleason.....	19
Figure 6 : Illustration des stades de progression du cancer de la prostate	21
Figure 7 : Progression du cancer de la prostate et principaux événements moléculaires associés.....	28
Figure 8 : Couche basale épithéliale prostatique dans la néoplasie intra-épithéliale prostatique et le cancer de la prostate.	29
Figure 9 : Exemples de marges positives et négatives dans le cancer de la prostate après prostactomie radicale	32
Figure 10 : Principales hormonothérapies dans le cancer de la prostate.....	37
Figure 11 : Exemples de modèle de prédiction du risque de progression du cancer de la prostate.....	45
Figure 12 : Différents ypes de biomarqueurs dans le suivi de patients atteints du cancer de la prostate.	47
Figure 13 : Protéines de signalisation NF- κ B	51
Figure 14 : Dimérisation des protéines NF- κ B	53
Figure 15 : Signalisation générale NF- κ B	55
Figure 16 : Signalisation classique NF- κ B	57
Figure 17 : Signalisation alternative NF- κ B	59
Figure S1 : RelB au sein des lignées cancéreuses prostatiques	166
Figure S2 : Répression de RelB dans les cellules DU145	167
Figure S3 : Effets de la répression de RelB sur la prolifération des cellules DU145	168
Figure S4 : Test de migration par blessure (Scratch assay).....	169

Liste des abréviations

A488/546	Alexa fluor 488/546
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANK	Domaine de répétition ankyrine
ARN	acide ribonucléique
CAPRA	Cancer of the prostate risk assessment
CK	Cytokératines
DD	Dimerization domain
DHT	5-alpha-déhydrotestostérone
FFPE	Formalin-fixed paraffin embedded
HBP	Hyperplasie bénigne de la prostate
HT	Hormonothérapie
IF	Immunofluorescence
IHC	Immunohistochimie
IKB	Inhibitor kappa B
IL	Interleukine
LH	Luteinizing hormon
LHRH	LH-releasing hormon
NF-KB	Nuclear factor kappa B
NIK	NF-kB inducible kinase
NLS	Nuclear localization domain
NTD	N-terminal domain
PR	Prostatectomie radicale
RA	Récepteur aux androgènes
RB	Rechute biochimique
RC	Résistan(t)ce à la castration
RHD	Rel-homology domain
RTUP	Résection transurétrale de la prostate
SBB	Sudan black B

SG	Score de Gleason
TINA	Taux d'incidence normalisé selon l'âge
TNF	Tumor necrosis factor
TNM	Tumor Nodes Metastasis
TNMA	Taux de mortalité normalisé selon l'âge
TR	Toucher rectal

*À ma fille Iniva pour qui j'espère être une
source d'inspiration autant que ma mère et mon
père l'ont été pour moi.*

Remerciements

C'est avec toute ma reconnaissance que je remercie mes directeurs de thèse, Dre Anne-Marie Mes-Masson et Dr Fred Saad, qui, en m'accueillant au sein de leur équipe, de cette grande famille, m'ont permis de réaliser ce doctorat au cours duquel j'aurais appris, grandi et mûri. Je remercie également tous les membres du laboratoire, présents et passés, qui, à travers leurs conseils et leur amitié, m'ont permis d'avancer tout au long de cette aventure.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de doctorat, Dr Philippe Roux et Dre Manuela Santos, dont les conseils et suggestions m'ont été d'une grande aide. Je remercie également les membres du jury d'évaluation de la présente thèse pour le temps et les efforts qu'ils ont consentis à investir dans l'étape finale de mon doctorat.

Je remercie tous les organismes subventionnaires sans lesquels ce projet n'aurait pu voir le jour : *la chaire en cancer de la prostate de l'université de Montréal, le ministère des finances et de l'économie (MFE), la fondation Terry Fox, le CUOG (Canadian urologic oncology group), la faculté des études supérieures et post-doctorales de l'université de Montréal (FESP), la fondation Marc Bourgie, le centre de recherche du CHUM (centre hospitalier de l'Université de Montréal) et l'institut du cancer de Montréal (ICM).*

Enfin, je remercie ma famille et mes amis qui, bien qu'à des milliers de kilomètres, ont su m'encourager et m'entourer de tout leur amour dont le réconfort a été essentiel tout au long de mon parcours universitaire au Canada.

Introduction

1. La prostate

1.1. Anatomie

La prostate est un organe appartenant à l'appareil urogénital masculin. De forme ovoïde, elle mesure 3 cm de long sur 4 de large pour une profondeur de 2 cm chez un adulte de 25-30 ans. Chez des hommes plus âgés (> 40 ans) sujets au phénomène d'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP), ses proportions sont revues à la hausse. (Saunders, 1998c)

Directement située sous la vessie, la base de la prostate, orientée vers le haut, est en contact étroit avec le plancher vésical. Son apex, orienté vers le bas, est, quant à lui, prolongé par le sphincter urétral par lequel ressort l'urètre qui traverse la prostate dans sa portion antérieure. Sa face postérieure, surmontée des vésicules séminales, est séparée du rectum par de microscopiques bandes de muscle lisse, le fascia de Denonvilliers (Figure 1). (Saunders, 1998c)

La prostate est entourée d'une capsule qui revêt un intérêt clinique particulier dans des cas de pathologies tels que le cancer de la prostate (CaP). Composée de collagène, d'élastine et de tissus musculaires lisses, celle-ci maintient dans un ensemble cohésif de nombreuses unités glandulaires exocrines séparées les unes des autres par le stroma fibromusculaire dont la composition rejoint celle de la capsule prostatique. La prostate est ainsi constituée à 70% de tissu glandulaire et à 30% de tissu fibromusculaire. (Saunders, 1998c)

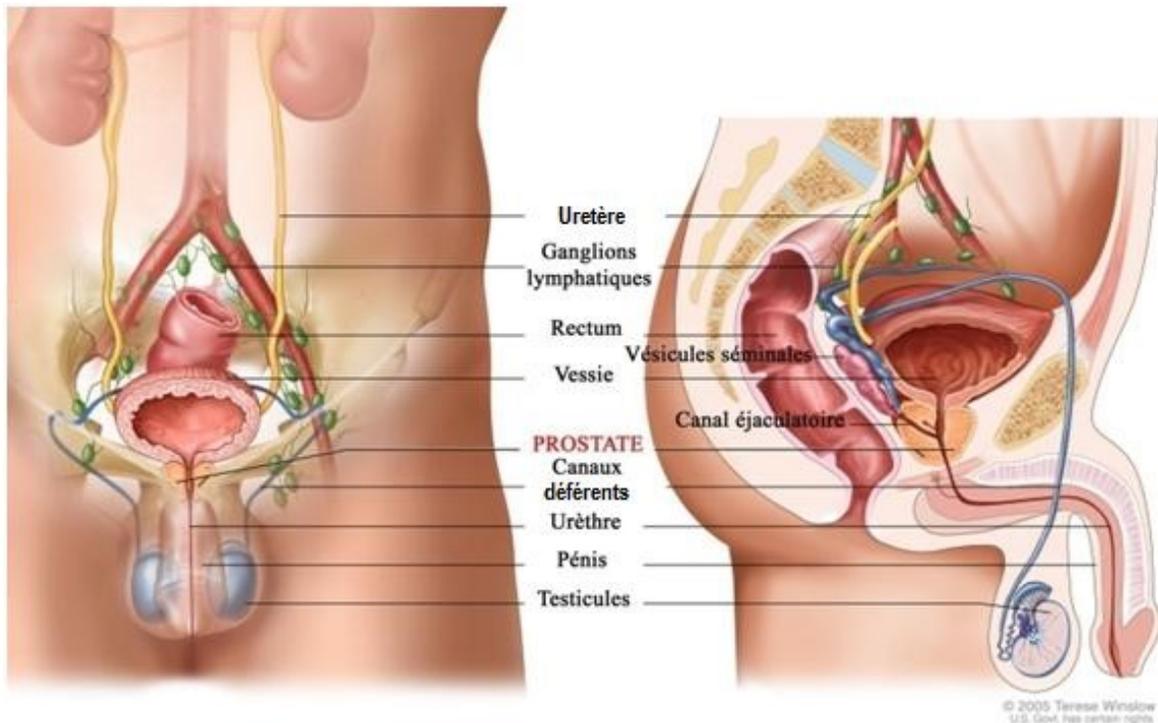


Figure 1 : Anatomie du système reproducteur male et des voies urinaires.

Sont, entre autres, illustrés la prostate, la vessie, le rectum et les vésicules séminales (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032722/>).

La prostate est subdivisée en zones selon des critères anatomiques tels que la position des conduits glandulaires par rapport à l'urèthre, et selon des considérations clinico-pathologiques telles que les pathologies associées aux différentes régions de la prostate. Quatre zones, pouvant être mises en évidence par échographie transrectale, ont ainsi été définies (Figure 2) (McNeal, 1981). La zone périphérique constitue 70% du tissu glandulaire prostatique. Elle est le siège le plus commun de l'HBP et du CaP dont on estime que près de 70% y prendront naissance. La zone centrale, quant à elle, entoure les conduits éjaculatoires qui prolongent les canaux déférents naissant des vésicules séminales situées au-dessus de la base de la prostate. Cette zone représente 25% du tissu glandulaire prostatique. Elle est le siège de 1-5% des CaP qui, bien que moins fréquents, sont associés à un très mauvais

pronostic. La zone de transition représente les 5% de tissu glandulaire prostatiques restant. Bien qu'elle soit principalement associée à l'HBP, 20% des CaP prennent leur origine de cette région de la prostate. Enfin, la 4^e et dernière zone est le stroma fibromusculaire antérieur qui, à l'instar de la capsule prostatique, se compose de collagène, d'élastine et de muscle lisse, mais aussi de muscle strié, à sa jonction avec le sphincter urétral qui en est principalement constitué. (Saunders, 1998c)

La relation anatomique entre la prostate et le reste de l'appareil urogénital laisse d'ores et déjà entrevoir l'impact des pathologies prostatiques potentielles sur les fonctions urinaire et érectile de l'homme, et ce indépendamment de la fonction biologique qui lui est associée. Cela souligne l'enjeu clinique que revêt le traitement des pathologies prostatiques tant sur le plan curatif que sur la qualité de vie des patients. (Saunders, 1998c)

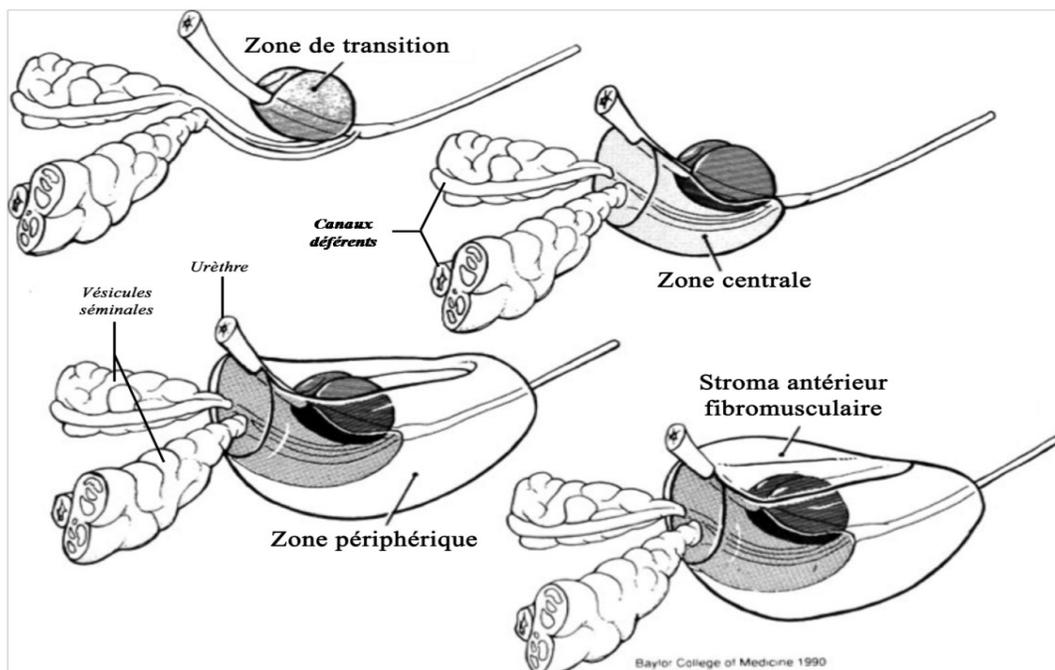


Figure 2 : Anatomie zonale de la prostate. Telle que définie par McNeal en 1981 (McNeal, 1981)

1.2. Types cellulaires

Les glandes qui parsèment la prostate sont de type tubulo-alvéolaires. Ce sont des glandes à embranchements relativement simples dont les conduits sont constitués d'un épithélium cylindrique pseudostratifié. Les **cellules épithéliales** qui le composent, dites sécrétrices, constituent la couche luminale de la glande et produisent les sécrétions prostatiques. Elles sont séparées du stroma par une couche de **cellules basales** pluripotentes responsable de la régénération de l'épithélium glandulaire prostatique. Des **cellules neuroendocrines**, disséminées au sein de l'épithélium glandulaire prostatique, sont associées à la différenciation et à la croissance des cellules épithéliales prostatiques (Figure 3). (Saunders, 1998c)

Les deux populations cellulaires prédominant dans le stroma sont les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Kassen et al., 1996). Les **fibroblastes** (Figure 3) produisent, non seulement, la matrice extracellulaire essentiellement composée de collagène et d'élastine, mais sécrètent aussi de nombreux facteurs de croissance et cytokines, agissant ainsi indirectement sur la croissance et la différenciation du tissu épithélial prostatique. Les **cellules musculaires lisses** (Figure 3), également présentes dans le stroma prostatique, facilitent l'expulsion de sécrétions des cellules épithéliales prostatiques vers la lumière glandulaire en se contractant durant le phénomène d'éjaculation. L'important réseau de vascularisation et d'innervation de la prostate implique la présence de cellules endothéliales et nerveuses imbriquées dans le stroma et ce, dans des proportions moindres comparées aux fibroblastes et aux cellules musculaires lisses. Enfin, le stroma prostatique contient de des cellules immunitaires telles que macrophages, polymorphonucléaires et lymphocytes dont la quantité varie selon le contexte pathologique. (Bianchi-Frias et al., 2010)

Chacun des types cellulaires représentés dans la prostate intervient, dans des proportions qui leur sont propres, dans la fonction de cet organe ainsi que dans le développement de pathologies telles que le CaP qui résulte de la transformation des cellules prostatiques d'origine épithéliale.

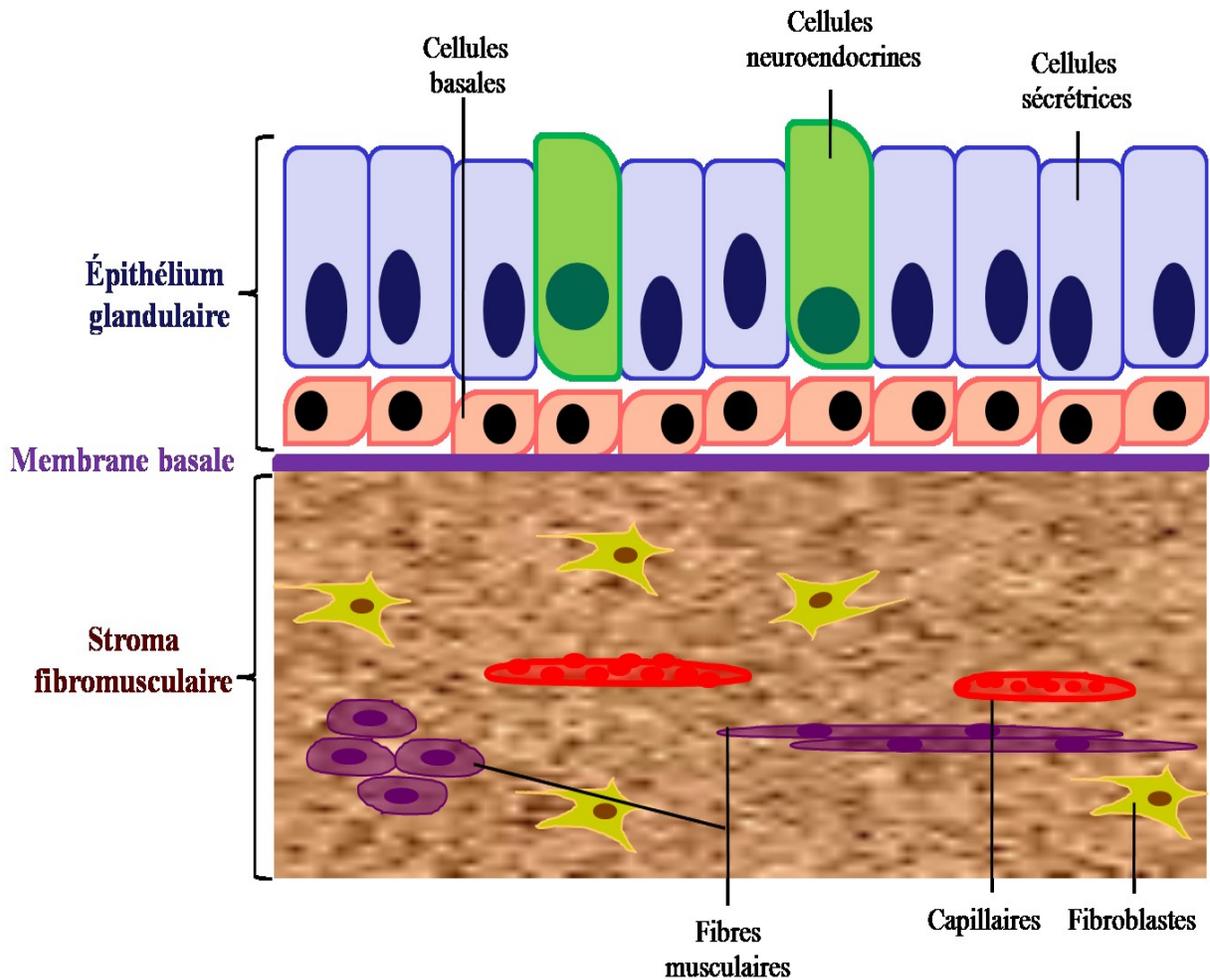


Figure 3 : Principaux types cellulaires de la prostate. L'épithélium glandulaire contient une couche de cellules luminales, les cellules sécrétrices et neuroendocrines, qui repose sur une couche de cellules basales qui, elle, le sépare du stroma fibromusculaire dans lequel sont retrouvés des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales des capillaires sanguins ainsi que des fibroblastes. Par Ingrid Labouba.

1.3. Fonctions

Les glandes prostatiques sont exocrines. Leurs cellules épithéliales luminales produisent des sécrétions qui, grâce à l'action contractile des cellules musculaires lisses du stroma, sont déversées dans l'urèthre au moment de l'éjaculation. L'éjaculat humain représente un volume approximatif de 3 mL de sperme. Ce dernier se compose de spermatozoïdes qui, produits par les testicules, représentent 2-5 % du volume éjaculatoire, et de plasma séminal. Le plasma séminal se compose essentiellement de liquide séminal et de sécrétions prostatiques qui représentent respectivement 65-75 % et 25-30 % du volume éjaculatoire. (Saunders, 1998b)

La teneur du liquide séminal en aminoacides, fructose et prostaglandines en fait une source trophique pour les spermatozoïdes mais également un milieu immunosuppresseur nécessaire à leur séjour dans le tractus génital féminin. (Saunders, 1998b)

Les **sécrétions prostatiques** ont une teneur particulièrement élevée en citrate (500-1000 fois plus que dans le plasma) et en zinc. Le rôle du citrate dans ce contexte est encore inconnu. Le zinc est, lui, associé à des fonctions antiseptiques. Les sécrétions prostatiques contiennent également de nombreuses enzymes ainsi que des polyamines qui confèrent au sperme son pH basique protecteur contre le pH vaginal acide nocif pour les spermatozoïdes. Les sécrétions prostatiques contiennent également des protéines dont les principales sont la phosphatase acide prostatique (PAP) et l'antigène prostatique spécifique (APS). (Saunders, 1998b)

L'**APS**, initialement identifiée comme étant la α -semipoprotéine, est une glycoprotéine de 33 kDa contenant 7 % de carbohydrates (m/m). C'est une protéine à

laquelle sont associées différentes activités enzymatiques, notamment sérine protéase et estérase. Des activités «chymotrypsine-like» et «trypsine-like» lui sont également attribuées. Bien qu'étant essentiellement une composante des sécrétions prostatiques, l'APS est également présente sous forme circulante dans le plasma. Dans ce cas-ci, l'APS est irréversiblement liée à l' α -antichymotrypsine, un inhibiteur endogène de sérine phosphatase. Privé de toute activité enzymatique sous sa forme complexée, il est néanmoins possible d'en mesurer la quantité dans le plasma. De plus, l'APS est une protéine exclusivement exprimée par les cellules sécrétrices prostatiques; ce qui lui confère un intérêt clinique particulier dans le contexte du CaP. En effet, depuis plus de 10 ans, le dosage sérique de l'APS permet non seulement le diagnostic de cette maladie mais également le suivi de sa progression chez les patients atteints. (Saunders, 1998b)

2. Le cancer de la prostate

Les CaP sont, dans plus de 90 % des cas, des adénocarcinomes acinaires tandis que seulement 5-10 % d'entre eux sont des carcinomes de type non acinaire. Chacune de ces deux variantes histologiques inclue différents histotypes identifiés selon des caractéristiques morphométriques (taille et forme nucléaire, texture cytoplasmique) et immunohistochimiques (expression de biomarqueurs) (Humphrey, 2012). Cependant, la plupart des travaux portant sur le CaP étudient ce dernier dans son ensemble, sans faire la distinction entre les différents histotypes existant.

2.1. Épidémiologie

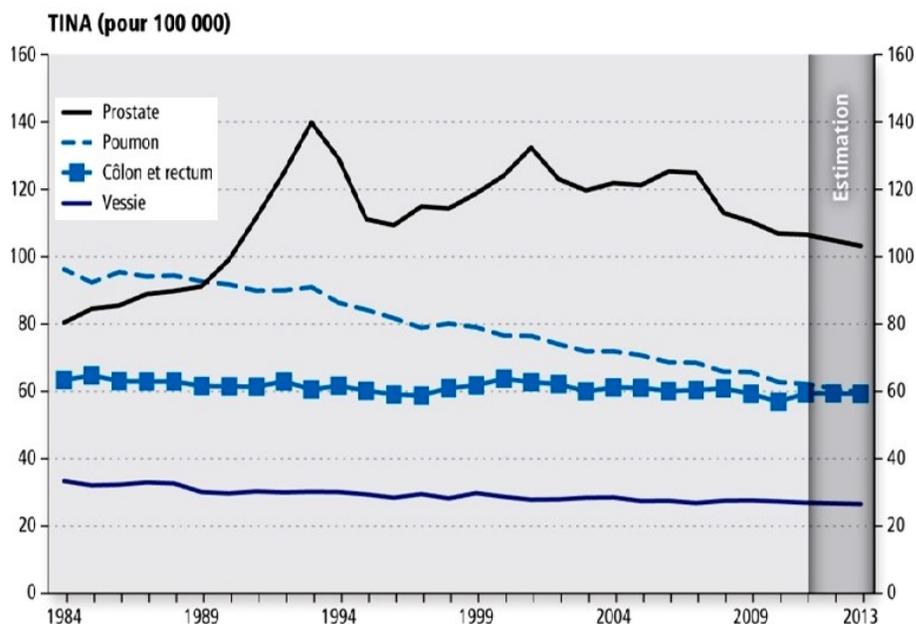
2.1.1. Statistiques

Le CaP est le cancer le plus diagnostiqué chez les hommes au Canada et en Amérique du Nord (Société canadienne du cancer (cancer.ca/statistiques); Siegel et al., 2013). Avec 27 000 nouveaux cas estimés en 2013, soit 24,7 % de tous les nouveaux cas de cancers au sein de cette population, le CaP se place en tête de liste devant les cancers du poumon et du colon/rectum respectivement (Figure 4). Il est ainsi estimé qu'un homme canadien sur 7 développera un CaP au cours de sa vie. L'avènement du dosage sérique de l'APS à des fins diagnostiques est un facteur important dans le protocole de dépistage du CaP. C'est, en effet, en 1993 que l'on note un pic important dans l'incidence de ce cancer au Canada (Figure 4). Alors que l'APS a été approuvé par la FDA (US Food and Drug Administration), en 1986, en tant qu'outil de suivi de progression du CaP ; c'est en 1994 qu'il a été validé pour le diagnostic de CaP précoces (Charatan, 1998; Venderbos and Roobol, 2011) . Rendu disponible au Canada depuis 1986, le test d'APS a permis le dépistage à grande échelle du CaP autour des années 90 (Levy et al., 1998). L'existence de tests permettant un dépistage précoce et systématique du CaP explique, au moins en partie, qu'il soit le cancer le plus important en incidence au Canada.

En termes de mortalité, le CaP constitue la 3^e cause de mort par cancer chez les hommes au Canada. En 2013, le nombre de décès causés par le CaP a été estimé à 4000 hommes, soit 10 % de la mortalité globale imputable au cancer. Ces chiffres le placent à la suite des cancers du poumon et du colon/rectum respectivement 1^{er} et 2^e cancers les plus meurtriers. Bien que légère, une diminution constante a été observée dans le taux de mortalité

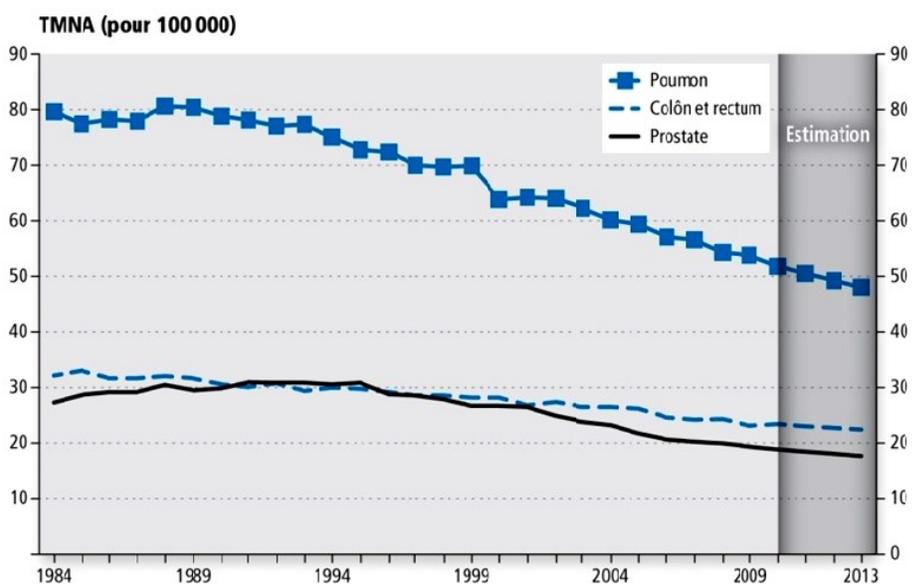
dû au CaP, et ce, depuis les années 90. La mortalité associée au CaP, alors de 30 pour 100 000 hommes, est aujourd'hui estimée à 19 pour 100 000 (Figure 4) (Société canadienne du cancer (cancer.ca/statistiques)).

Le taux de survie relative à 5 ans associé au CaP, tous stades et grades confondus, a été évalué à 95 % entre 2004 et 2006 chez les hommes âgés entre 15 et 99 ans. Là encore, une amélioration constante a été notée depuis 1992-1994 où les chiffres étaient alors de 86 % (Société canadienne du cancer (cancer.ca/statistiques); Ellison and Wilkins, 2010).



Hommes
96 200
Nouveaux cas

Prostate	24,5 %
Poumon	13,8 %
Côlon et rectum	13,8 %
Vessie	6,1 %
Lymphome non hodgkinien	4,4 %
Rein	3,8 %
Leucémie	3,4 %
Mélanome	3,4 %
Cavité buccale	2,9 %
Pancréas	2,4 %
Estomac	2,2 %
Encéphale	1,7 %
Foie	1,6 %
Oesophage	1,6 %
Myélome multiple	1,5 %
Thyroïde	1,3 %
Testicule	1,0 %
Larynx	0,9 %
Maladie de Hodgkin	0,6 %
Sein	0,2 %
Tous les autres cancers	8,9 %



Hommes
39 400
Décès

Poumon	27,2 %
Côlon et rectum	12,7 %
Prostate	10,0 %
Pancréas	5,5 %
Leucémie	3,8 %
Vessie	3,8 %
Oesophage	3,8 %
Lymphome non hodgkinien	3,6 %
Estomac	3,2 %
Encéphale	2,9 %
Rein	2,8 %
Foie	2,0 %
Cavité buccale	2,0 %
Myélome multiple	1,8 %
Mélanome	1,6 %
Larynx	0,8 %
Sein	0,2 %
Tous les autres cancers	12,3 %

Figure 4 : Statistiques sur le cancer au Canada, 2013. Sont illustrés : les taux d'incidence (TINA) et de mortalité (TMNA) (pour 100 000 hommes) standardisés selon l'âge pour les cancers colorectal, du poumon et de la prostate, chez les hommes au Canada de 1984 à 2013, ainsi que les pourcentages de distribution des nouveaux cas et des décès estimés pour les cancers sélectionnés en 2013 (Société canadienne du cancer (cancer.ca/statistiques)).

2.1.2. Principaux facteurs de risque

2.1.2.1. Âge

Le CaP est une maladie dont la survenue est étroitement liée à l'âge du patient qui constitue le principal facteur de risque de cette maladie. Il s'agit en effet d'un cancer dont l'incidence, la prévalence et la mortalité sont significativement augmentées chez les hommes de 70 ans et plus en comparaison d'individus âgés de 40 à 50 ans. Le risque de voir apparaître un CaP, très faible chez un homme de 40 ans, augmente progressivement avec son âge et devient maximal autour de 70-80 ans. Cependant, il est important de noter que l'augmentation de ce risque est compensée par l'espérance de vie des sujets qui, elle, décroît avec l'âge (Levy et al., 1998).

L'étude du risque de développer un CaP selon l'âge dans une population d'hommes de 40 à 90 ans illustre bien le lien étroit existant entre son apparition et le vieillissement des sujets (Levy et al., 1998). Aujourd'hui, la présence de cellules cancéreuses de la prostate est associée au vieillissement normal des hommes et les travaux réalisés à partir de sujets autopsiés tendent à corroborer cette idée. En effet, il a été rapporté que 15 à 30 % des autopsies d'hommes de 50 ans illustrent des caractéristiques histologiques du CaP qui, dans la plupart des cas, est de faible volume et de bas grade. Cette proportion atteint 60 à 70% pour des individus de 80 ans (Pienta and Esper, 1993).

2.1.2.2. Historique familial

De nombreuses études identifient l'historique familial comme facteur de risque du CaP cliniquement détectable. En effet, la présence d'hommes ayant eu un CaP au sein d'une

famille augmente considérablement le risque d'en développer un pour la parenté mâle (Pienta and Esper, 1993). Ce fait, largement documenté dans les années 90s, a servi de base essentielle pour des études plus poussées, à l'échelle génomique visant à préciser les composantes héréditaires en cause.

Des études réalisées sur l'ensemble du génome humain, ces six dernières années, ont permis d'associer 46 loci de susceptibilité au CaP. Ces derniers, bien qu'affectant peu le risque de survenue du CaP lorsque considérés individuellement, pourraient expliquer près de 25 % des cas de CaP héréditaires lorsque combinés (Castro and Eeles, 2012).

Comme dans le cas du cancer du sein, la présence de mutations au sein des gènes BRCA1 et BRCA2 constitue un facteur de risque héréditaire associé au CaP. En 1974, une étude a mis en évidence la forte incidence du CaP chez les hommes dont les familles comprenaient des femmes ayant eu un cancer du sein (Pienta and Esper, 1993; Thiessen, 1974). Aujourd'hui, diverses études démontrent que la présence de mutations BRCA1 ou BRCA2 augmente le risque de développer un CaP, particulièrement pour BRCA2 chez les sujets de moins de 65 ans (Castro and Eeles, 2012).

2.1.2.3. Facteur ethnique

La composante ethnique représente également un facteur de risque important dans le CaP. La population américaine, d'un riche hétéroclisme, a permis de nombreuses études concernant l'impact des origines ethniques sur le CaP. L'ensemble d'entre elles s'accordent à associer des origines africaines (populations noires) à un risque plus important de développer un CaP comparativement aux autres populations ; tandis que des origines asiatiques sont, elles,

associées à un risque moindre (Pienta and Esper, 1993; Powell, 2011). Des origines latines confèreraient également un risque accru à développer le CaP, bien que moins important que celui associé aux origines africaines. L'incidence du CaP au sein des populations blanches (origines scandinave et caucasienne) est intermédiaire et sert couramment de référence pour étudier celles associées aux autres populations ethniques (Kleinmann et al., 2012; Powell, 2011). Cependant, les différentes réalités socio-économiques auxquelles sont confrontées ces différentes populations aux États-Unis d'Amérique (É-U) soulèvent un questionnement quant à l'importance des facteurs socio-économiques dans ce contexte.

Les études réalisées sur les populations américaines présentent l'avantage d'amoinrir le biais environnemental puisqu'il s'agit de populations étudiées au sein de régions géographiques similaires. Néanmoins, des études conduites au sein de populations africaines n'ayant pas immigrées aux É-U indiquent un risque plus faible de développer un CaP en comparaison avec des populations afro-américaines. Ce constat suggère un possible impact de l'environnement sur le CaP (Powell, 2011).

2.1.2.4. Facteur diététique

Les comportements alimentaires ont aussi un impact sur le CaP ; particulièrement concernant la consommation de matières grasses. Il a été rapporté de diverses études que non seulement la prise importante de lipides constituait un facteur risque pour le CaP mais également, que leur origine (animale versus végétale), et donc leur nature, aurait un impact. En effet, il est apparu que la haute consommation de graisses animales aurait un effet néfaste sur le CaP tandis que celle de graisses végétales n'aurait aucun effet notable. Le fait que les

hommes d'origine asiatique, donc à faible risque de CaP, aient, aux É-U, la diète la plus pauvre en gras conforte l'idée qu'il existe bel et bien un lien entre métabolisme lipidique et CaP (Pienta and Esper, 1993). Dans le même ordre d'idée, le risque de CaP s'est révélé augmenté chez les hommes obèses, tendant ainsi à faire le lien entre les métabolismes lipidique et glucidique et le CaP (Wilson et al., 2012).

La consommation de lipides influe sur le métabolisme et la production d'hormones tels que les androgènes. En effet, des études ont rapporté qu'une diète riche en fibres et pauvre en gras affectait le métabolisme de la testostérone dont les quantités sériques étaient alors diminuées. Le CaP étant étroitement associé aux hormones sexuelles, il est raisonnable de suggérer que l'apport alimentaire en lipides puisse influencer son développement (Pienta and Esper, 1993).

2.2. Considérations cliniques

2.2.1. Diagnostic

Le diagnostic du CaP est un processus clinique en plusieurs étapes. La première est le dépistage du CaP suite au dosage sérique de l'APS en combinaison avec l'examen clinique du toucher rectal. La deuxième étape, elle, consiste à confirmer la présence de la tumeur ainsi que son caractère malin par échographie transrectale en combinaison avec un examen biopsique. Enfin, la dernière étape est de déterminer l'état d'avancement du CaP en le classant selon son grade et son stade. Et c'est selon ces informations que le clinicien définira l'approche thérapeutique la plus appropriée pour les patients concernés.

2.2.1.1. Test de l'APS et toucher rectal (TR)

Le dosage sérique de l'APS est exploité à des fins diagnostiques pour le CaP depuis 1986. Initialement utilisé comme outil de suivi de progression de la maladie, le test de l'APS a été approuvé dans le protocole de diagnostic conjointement au TR. L'APS étant exclusivement produit par les cellules sécrétrices prostatiques, dont le CaP tire son origine, il constitue un marqueur de choix permettant d'en évaluer le surnombre ou la sur-stimulation. Néanmoins une hausse dans le taux sérique d'APS n'est pas pathognomonique d'un CaP. En effet, l'APS peut s'avérer élevé à cause d'une hypertrophie bénigne de la prostate et dans des cas d'infection ou d'inflammation. (Saad and McCormack, 2008)

La prostate se situe sous la vessie, juste devant le rectum (Saunders, 1998c). Ce dernier, par sa proximité avec la prostate, constitue une voie d'accès de choix pour un examen par palpation. Ainsi le TR est l'examen auquel procède le clinicien afin d'évaluer la texture, la taille et la forme de la prostate. Dans le cas d'un CaP suffisamment avancé, la tumeur peut être détectée par palpation. (Saad and McCormack, 2008)

La combinaison de ces deux tests fournit aux cliniciens suffisamment d'indices orientant la suspicion d'un CaP dont le diagnostic doit être confirmé par biopsies pour une confrontation histologique. (Saad and McCormack, 2008)

2.2.1.2. Échographie transrectale et biopsies

L'échographie transrectale consiste en la production d'images de la prostate à partir de données générées grâce à des ultrasons produits par une petite sonde insérée dans le rectum.

Ce test permet parfois de détecter et localiser des masses tumorales au niveau de la prostate (Saad and McCormack, 2008).

En cas de suspicion de CaP le caractère malin ou bénin de la tumeur doit être confirmé par des tests de microscopie optique à partir d'échantillons de tissus, les **biopsies**. Généralement 10 - 14 petits échantillons de prostate sont prélevés en vue d'analyses histologiques subséquentes (Patel and Stephenson, 2011). La coloration chimique à l'hématoxyline et à l'éosine (H/E) permet de procéder à une analyse morphométrique tandis que des marquages immunohistochimiques plus spécifiques permettent de définir le caractère malin des tissus présents dans les différents échantillons. Les cytokératines de haut poids moléculaire sont couramment utilisées comme marqueur pour évaluer l'intégrité de la couche basale des glandes prostatiques qui est altérée dans des pathologies telles que la néoplasie intra-épithéliale prostatique (NIP) ou le CaP. D'autres marqueurs, comme le Ki67, y sont conjointement utilisés et évalue l'indice de prolifération, décuplé dans ces mêmes conditions pathologiques. De nombreux autres marqueurs peuvent être utilisés et l'ensemble des données alors recueillies sont autant d'outils exploités par le pathologiste pour statuer sur l'histopathologie des différents échantillons biopsiques (Madu and Lu, 2010). La majorité des cancers n'est pas visualisée à l'échographie mais plutôt détectée suite à des biopsies faites de façon aléatoire au niveau de la prostate.

2.2.1.3. Stratification du cancer de la prostate

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour définir le niveau de progression d'un cancer ; notamment le niveau de différenciation tissulaire et cellulaire de l'organe affecté

ainsi que l'extension du cancer à d'autres organes. Il s'agit respectivement du grade histologique et du stade clinique de la maladie.

a) Grade et score de Gleason

Dans le cas du CaP l'évaluation du grade histologique est faite selon le système de Gleason, mis au point en 1966 par Donald F. Gleason. Ce système implique une échelle de gradation allant de 1 à 5 selon le niveau de différenciation tissulaire de la tumeur. Le grade de Gleason évalue l'organisation des cellules tumorales au sein de la prostate, et ce, à partir de coupes de tissus colorés à l'H/E dont l'observation, par un pathologiste, se fait au microscope optique à grossissement relativement faible (10 - 40X). Ainsi, la valeur 1 est attribuée à un CaP très bien différencié, dont l'architecture glandulaire prostatique est encore appréciable ; tandis que 5 correspond à un CaP pauvrement différencié dont le tissu n'a plus aucune organisation définie (Figure 5) (Andreoiu and Cheng, 2010; Humphrey, 2004).

Le CaP est un cancer majoritairement multifocal dans lequel il est courant de retrouver plusieurs masses tumorales réparties en différents endroits de la prostate. Chacune des masses tumorales peut présenter des caractéristiques histologiques qui lui sont propres. Il n'est pas rare d'observer, pour un même CaP, deux grades représentés, voire plus (Andreoiu and Cheng, 2010). Selon Gleason, cette hétérogénéité histologique fait que, contrairement aux autres types de cancers, le grade le plus élevé observé ne régit pas l'agressivité biologique du CaP (Maygarden and Pruthi, 2005). Le système de Gleason, dont l'utilisation est propre au CaP, attribue un score calculé à partir des deux grades le plus observés au sein de la tumeur. Le grade primaire prédomine au sein de la tumeur et représente plus de 50% du tissu tumoral,

tandis que le grade secondaire est le deuxième plus observé et représente entre 5 et 50% du tissu tumoral. Le **score de Gleason** (SG) est la somme de ces deux grades. L'ordre dans lequel sont additionnés les grades primaire et secondaire en permet l'identification : $SG = \text{Grade primaire} + \text{Grade secondaire}$. Lorsqu'un seul grade est observé, il est additionné à lui-même pour définir le SG. Lorsque plus de deux grades sont identifiés, il est possible que le grade tertiaire soit élevé (4 ou 5), et puisse donc avoir un impact sur le pronostic de la maladie. Dans ce cas-ci, le SG reste déterminé de la même manière mais il est tout de même fait mention de la présence du dit grade tertiaire dans le rapport de pathologie. En fin de compte, le SG varie de 2 à 10, mais est reporté dans les rapports de pathologies sous forme de somme (Andreoiu and Cheng, 2010; Humphrey, 2004).

Au cours du diagnostic, le score de Gleason est évalué à partir des différentes biopsies prélevées. Bien que la taille des spécimens soit limitée, le système de Gleason peut être appliqué, en autant qu'il y ait suffisamment de tissu tumoral représenté, soit au moins un millimètre par échantillon (Humphrey, 2004). Les grades et SG sont alors reportés pour chacune des biopsies contenant de la tumeur. Les cliniciens tiennent compte, en général, du SG le plus élevé dans leur décision concernant la prise en charge du patient (Maygarden and Pruthi, 2005).

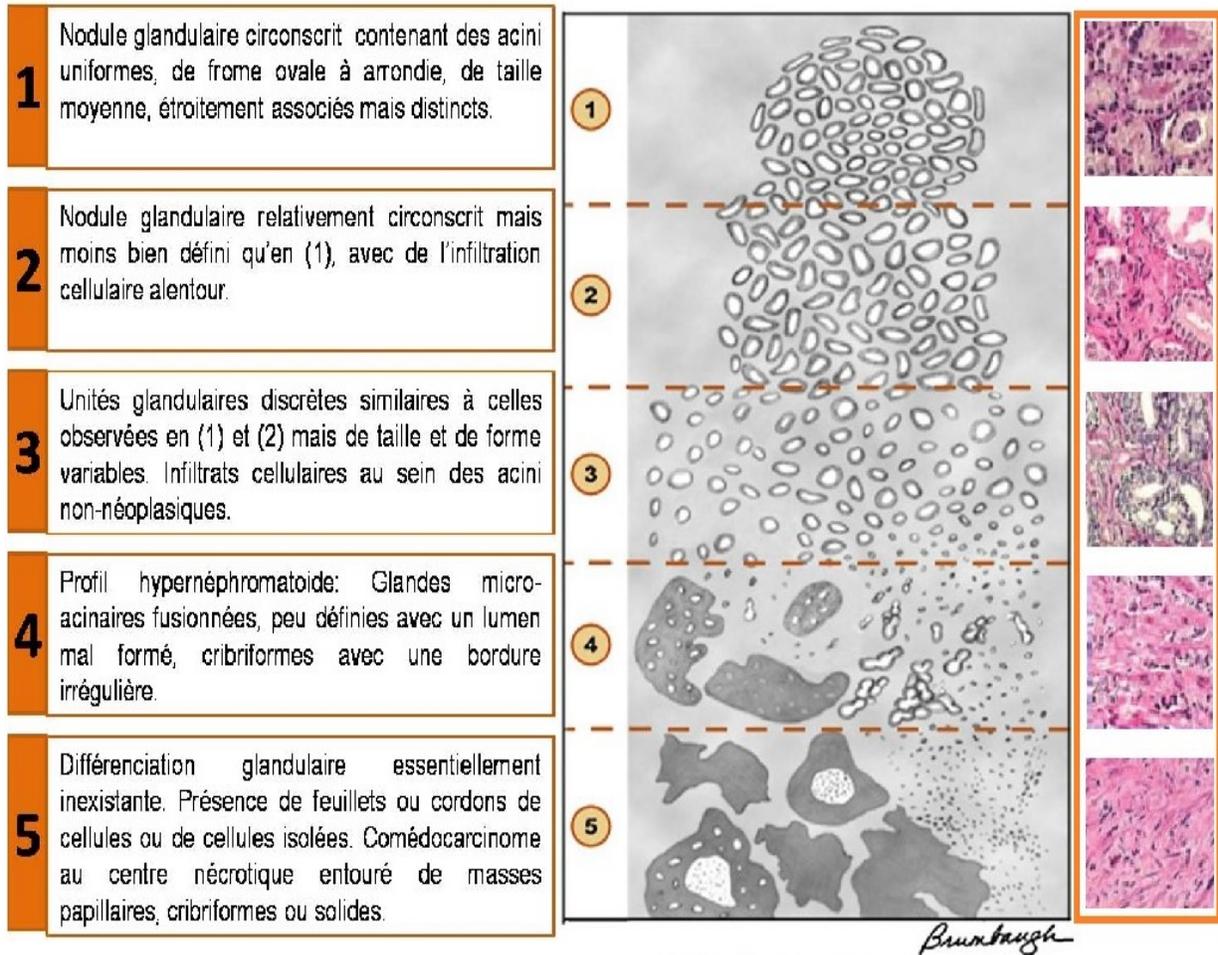


Figure 5 : Diagramme schématique du système de gradation de Gleason. À droite, la description histologique des 5 grades de Gleason (notés de 1 à 5) illustrés à gauche (Epstein, 2010; Montironi et al., 2011a). Adapté par Ingrid Labouba.

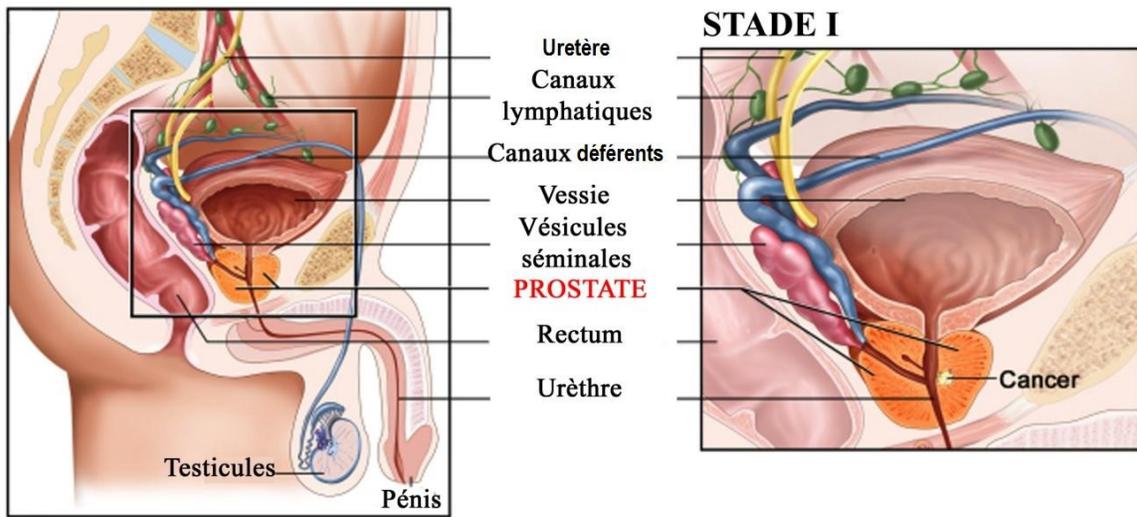
b) Stade clinique et pathologique

Le stade d'un cancer est le paramètre qui évalue l'étendue du dit cancer dans l'organisme. Il permet, en effet, de déterminer s'il s'agit d'un cancer localisé, localement avancé ou métastatique et, le cas échéant, d'évaluer combien d'organes sont touchés par l'invasion tumorale. Le CaP peut être classé de T1 à T4 selon l'étendue de la tumeur primaire.

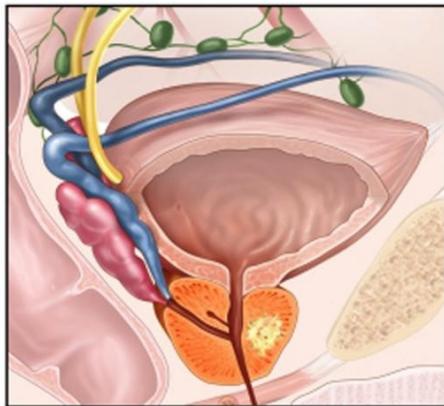
Un stade T1 correspond à un CaP localisé sans évidence clinique au moment du TR ou de l'échographie transrectale. Un stade T2 indique également un CaP confiné à l'intérieur de la capsule prostatique cependant la masse tumorale est alors cliniquement détectable au TR ou par échographie transrectale. Lorsque le CaP franchit la capsule prostatique et atteint les tissus proximaux, le stade est noté T3. Un stade T4 est attribué lorsque le CaP s'étend au-delà des tissus proximaux et indique la présence de métastases (Figure 6) (Cheng et al., 2012; Hoedemaeker et al., 2000).

Comme pour les autres types de cancers, le système TNM (T = primary tumor; N = lymph nodes; M = distant metastasis) est utilisé pour évaluer le stade du CaP (Tableau I). On parle de stade clinique ou pathologique. Bien que les deux incluent sensiblement les mêmes variables, le stade clinique est défini au moment du diagnostic et noté TNM, tandis que l'évaluation du stade pathologique, noté pTNM, requiert la totalité du tissu prostatique et périprostatique (Cheng et al., 2012; Hoedemaeker et al., 2000; Saad and McCormack, 2008).

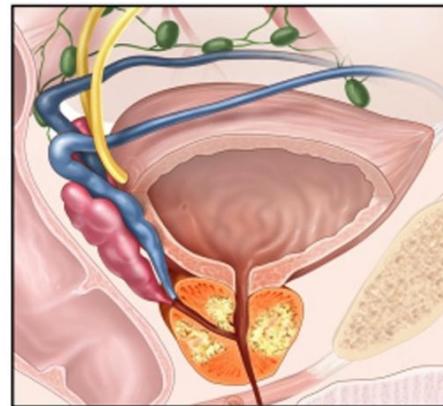
Lors du diagnostic, les examens visant à explorer le stade du CaP sont essentiellement des tests d'imagerie tels que l'imagerie à résonance magnétique, la tomодensitométrie par rayon-X ou encore la tomographie d'émission par positrons. Le stade clinique ainsi déterminé, en combinaison avec le score de Gleason, constitue des données cruciales pour la prise en charge thérapeutique du patient mais également pour son pronostic.



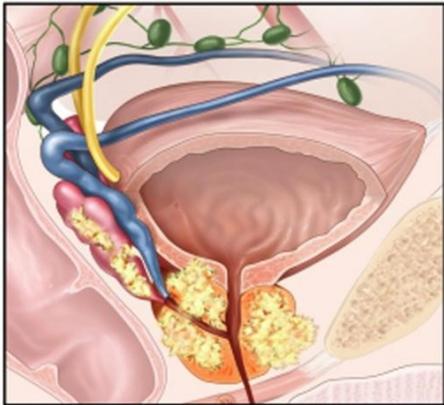
STADE IIA



STADE IIB



STADE III



STADE IV



© 2010 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

Figure 6 : Illustration des stades de progression du cancer de la prostate. Traduit par Ingrid Labouba. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032722/>)

<u>T (Tumor = Tumeur)</u>	TX: ne pouvant être évaluée T0: aucune évidence de tumeur primaire
T1: cliniquement indétectable	T1a: détection suite à une RTUP (<5%) T1b: détection suite à une RTUP (>5%) T1c: détection suite à une biopsie prescrite pour cause de PSA élevée
T2: confinée à la prostate	T2a: atteinte d'un lobe prostatique T2b: atteinte des 2 lobes prostatiques
T3: palpable, s'étendant au-delà de la capsule	T3a: atteinte uni- ou bilatérale, extension extra-capsulaire T3b: atteinte des vésicules séminales
T4: extension à des organes autres que la prostate et les vésicules séminales	
<u>N (Node = Ganglions)</u>	NX: ne pouvant être évaluée N0: aucune atteinte ganglionnaire N1: atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
<u>M (Metastasis = Métastases)</u>	MX: métastase à distance ne pouvant être évaluées M1: détection de métastases à distance M1a: atteintes des ganglions lymphatiques non régionaux M1b: détection de métastases osseuses M1c: atteintes d'autres organes à distance

Tableau I: *Système de classification TNM.* Traduit par Ingrid Labouba (Calabrese, 2004)

2.2.2. Progression

2.2.2.1. Pathologies non cancéreuses de la prostate

a) Hyperplasie bénigne de la prostate

L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) est caractérisée par une augmentation du nombre de cellules prostatiques, épithéliales et stromales, qui résulte en une augmentation globale de la taille de la prostate (Roehrborn, 2008). En effet, tandis que la masse normale de la prostate chez un jeune adulte avoisine 20 g (\pm 6 g), cette dernière augmente progressivement avec l'âge pour atteindre 33 g (\pm 16 g) autour de 70 ans, voire même 100 g dans une petite proportion des cas (Harik and O'Toole, 2012). Bien que son étiologie soit encore peu connue, il semble que la présence d'androgènes a une action permissive sur son développement, en influant sur la balance prolifération / mort cellulaire des cellules prostatiques (Roehrborn, 2008).

Les principaux symptômes associés à l'HBP sont d'ordre urinaire et ne nécessitent, que dans une faible proportion des cas, un traitement. Lorsque l'HBP est traitée, la médication est la première option, mais une chirurgie telle qu'une résection transurétrale de la prostate (RTUP) peut tout de même s'avérer nécessaire (Chen, 2007). Des CaP de stade T1a ou T1b peuvent ainsi être dépistés de façon fortuite au cours d'une RTUP effectuée dans ce contexte.

L'HBP est une pathologie étroitement associée au vieillissement puisque, à l'instar du CaP, son incidence augmente avec l'âge. Cette dernière, de 19 – 30 % autour de 60 ans, atteint 70 % pour les hommes de 70 ans et plus (Chen, 2007; Harik and O'Toole, 2012). Quoique bénigne, l'HBP est une condition pathologique. Elle correspond à un état des plus courants au sein de la population la plus touchée par le CaP. Il est donc raisonnable, au cours d'études de

biomarqueurs, d'utiliser comme référence un tissu prostatique hyperplasique bénin, lorsque possible, plutôt qu'un tissu tout bonnement normal plus représentatif de populations beaucoup plus jeunes.

b) Néoplasie intra-épithéliale prostatique

La néoplasie intra-épithéliale prostatique (NIP) est caractérisée par la présence de cellules atypiques aux niveaux des canaux et acini glandulaires. Principalement localisée dans la zone périphérique de la prostate tout comme le CaP (75 – 80% des cas), elle peut également prendre naissance, quoique plus rarement, dans la zone de transition (10 – 10%) ou même dans la zone centrale (5 – 10%). Initialement catégorisée en trois grades (de 1 à 3), la NIP est aujourd'hui classée en bas grade (1-2) et haut grade (3). Cette classification se fait selon la cytologie des cellules sécrétrices ; notamment l'aspect de leurs noyaux. Dans la NIP de bas grade, ces cellules ont des noyaux de taille variable, légèrement plus gros que la norme, possédant un petit nucléole et dont le contenu en chromatine est légèrement augmenté. Dans une NIP de haut grade, par contre, les noyaux, également plus gros, sont de taille plus uniforme, ont un nucléole proéminent, un contenu en chromatine augmenté et irrégulièrement réparti (Bostwick and Cheng, 2012; Montironi et al., 2011b).

D'autres caractéristiques histologiques distinguent les NIP de bas et de haut grades. Des études immunohistochimiques sur les cytokératines de haut poids moléculaire et la localisation nucléaire de p63 révèlent que l'intégrité de la couche de cellules basales est compromise dans le NIP de haut grade. L'indice de prolifération, évalué par marquage immunohistochimique au Ki67 est augmenté en cas de NIP et affiche un patron différent selon le grade. Ainsi pour une

NIP de bas grade, l'essentiel de la prolifération est observé au niveau des cellules basales tandis que dans une NIP de haut grade elle est prédominante au sein des cellules luminales sécrétrices. Bien que la présence d'androgènes ne soit pas considérée comme un agent causal de la NIP, il est cependant très clair que la stimulation androgénique l'entretient, et donc que la NIP est une affection androgéno-dépendante (Bostwick and Cheng, 2012; Montironi et al., 2011b).

Aujourd'hui la NIP de haut grade est reconnue comme étant une lésion précurseur du CaP. Des caractéristiques telles que sa zone de prédilection au sein de la prostate (zone périphérique), sa morphométrie, son profil de prolifération, toutes communes au CaP, les relie indéniablement l'un à l'autre. De plus, dans 85 - 100% de spécimens de prostatectomies radicales effectuées suite à un diagnostic de CaP, des zones de NIP sont identifiées à proximité du tissu tumoral. Bien que l'hyperplasie atypique adénomateuse et l'atrophie proliférative inflammatoire constituent de potentiels précurseurs du CaP, la NIP de haut grade reste la seule lésion précancéreuse reconnue à ce jour (Bostwick and Cheng, 2012; Montironi et al., 2011b).

2.2.2.2. Cancer de la prostate

Le CaP est une maladie généralement dite à progression lente. En effet, des études réalisées sur des populations de jeunes hommes indiquent la présence de foci cancéreux dans la prostate autour de 20 – 30 ans, et ce, bien que le CaP soit indéniablement associé au vieillissement.

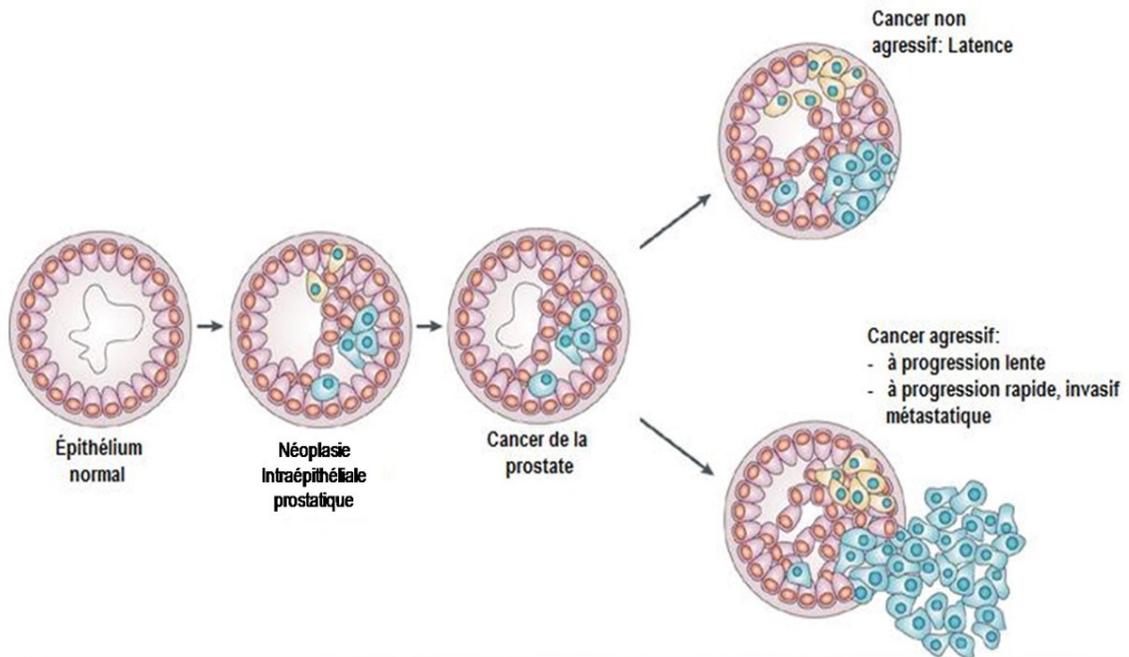
D'un point de vue clinique, le CaP est l'unique cancer solide auquel sont associées une forme histologique (ou latente) et une forme clinique évidente (Saunders, 1998a). La forme latente du CaP est souvent indétectable et « ne progresse pas » vers une forme cliniquement détectable. Il est souvent découvert de façon fortuite dans un contexte clinique différent (ex : RTUP pour une HBP) ou tout simplement au cours de biopsies. Des études réalisées à partir de sujets sains biopsiés démontrent une forte prévalence de lésions cancéreuses prostatiques n'ayant jamais été cliniquement diagnostiquées. En effet, il a été estimé que 15 – 30% des hommes de 50 ans présenteraient des foci de CaP tandis que pour ceux de plus de 80 ans cette proportion est évaluée à 80% (Ruijter et al., 1999).

La forme clinique évidente du CaP est, elle, cliniquement détectable et progresse dans le temps. Sa progression peut-être lente ; le CaP est alors dit indolent. Dans ce cas-ci, le CaP, de bas grade (score de Gleason de 2 – 3), reste localisé et répond efficacement aux traitements locaux dispensés. Les récurrences sont peu nombreuses, quoique présentes dans un faible pourcentage, et une surveillance active suffit, en général, au suivi du patient. Néanmoins, la progression du CaP peut également s'avérer rapide. Alors plus agressif, il évolue, devient invasif et s'étend d'autres organes où il entraîne la formation de métastases. Les réponses aux traitements sont variables et les récurrences plus courantes.

Le CaP est un adénocarcinome qui se développe à partir des cellules épithéliales glandulaires prostatiques dont la transformation progressive les aura conduites à une prolifération anarchique et, ultimement, à la formation de tumeurs malignes. Plusieurs altérations moléculaires et génétiques affectant la prolifération et la croissance cellulaire ainsi que l'apoptose sont, comme dans bien d'autres cancers, en cause dans développement du CaP (Figure 7). Le CaP est un cancer hormono-dépendant étroitement lié à la stimulation

androgénique qui, elle, est fonction de la présence d'androgènes dans le milieu extracellulaire ainsi que de l'expression de leur récepteur spécifique au sein des cellules cancéreuses. La sur-activation de la signalisation androgénique dans le CaP est courante, voire incontournable, et en constitue un événement moléculaire important.

Le CaP implique, dans la plupart des cas, la présence de plusieurs foci tumoraux au sein de la prostate. Les caractéristiques histologiques et génétiques propres à chaque foyer tumoral sont à l'origine de la grande hétérogénéité observée dans le CaP. D'un point de vue histologique, le CaP possède de nombreux points communs avec la NIP de haut grade, particulièrement en ce qui concerne la morphométrie des cellules épithéliales sécrétrices dont l'aspect nucléaire est très similaire dans les deux pathologies. La différence la plus flagrante est l'absence totale de couche de cellules basales dans le CaP alors que, bien que discontinue, elle demeure présente dans la NIP de haut grade (Figure 8) (Shen and Abate-Shen, 2010).



	INITIATION	PROGRESSION	TRAITEMENT
PROCESSUS	<p>Inflammation</p> <p>Domage oxydatif/ADN</p> <p>Raccourcissement des télomères</p>	<p>Sénescence</p> <p>Réactivation de signalisation du développement</p>	<p>Résistance à la castration</p> <p>EMT</p>
GÈNES	<p>Sous-régulation NKX3.1</p> <p>Sur-expression MYC</p> <p>Fusion TMPRSS2-ERG</p>	<p>Inactivation PTEN</p>	<p>Activation ERK/MAPK</p> <p>Sur-expression EZH2</p>

Figure 7 : Progression du cancer de la prostate et principaux événements moléculaires associés. (Shen and Abate-Shen, 2010; Witte, 2009). Adapté par Ingrid Labouba.

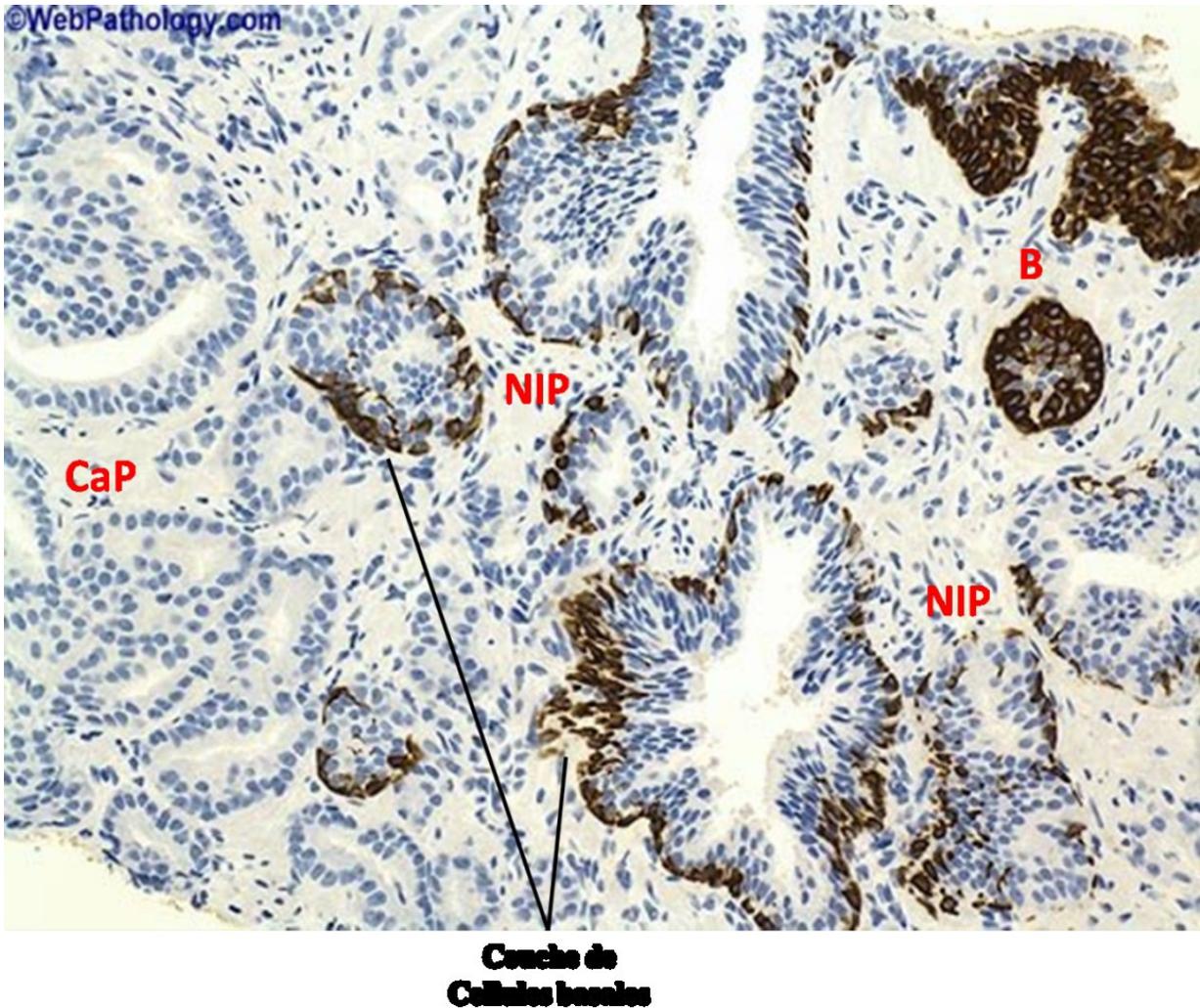


Figure 8 : *Couche basale épithéliale prostatique dans la néoplasie intra-épithéliale prostatique et le cancer de la prostate.* Marquage immunohistochimique des cytokératines de haut poids moléculaire (anticorps 34BE12) d'un spécimen de prostate contenant du tissu bénin, de la NIP et du CaP. Noter la perte progressive de la couche basale (de droite à gauche). La couche basale est intacte dans les glandes bénignes (B), fragmentées dans les glandes NIP de haut grade (NIP) et totalement absente dans les adénocarcinomes (CaP) (<http://www.webpathology.com/image.asp?case=26&n=5>).

2.2.3. Traitements

Chaque étape du diagnostic du CaP vise à réunir un maximum d'informations concernant l'étendue de la tumeur afin de déterminer les traitements les plus appropriés pour les patients. Les considérations cliniques telles que le grade (score de Gleason), le stade et le taux sérique d'APS sont à prendre en compte pour orienter le choix des traitements et surtout la façon dont ils doivent être appliqués (seuls, en séquence ou en combinaison).

2.2.3.1. Traitements de cancers de la prostate localisés

Lorsque le CaP est localisé, les traitements de première ligne sont la chirurgie qui consiste en une prostatectomie radicale (PR), la radiothérapie (RT) dont le but est d'irradier la tumeur afin d'en éliminer les cellules, et l'hormonothérapie (HT) qui cible le caractère androgéno-dépendant du CaP. Pour les CaP confinés à la prostate, et donc considérés comme précoces, la chirurgie et la radiothérapie s'avèrent très efficaces. Pour les CaP à faible risque de progression, cependant, un traitement curatif immédiat n'est pas nécessaire. Une simple surveillance active est priorisée afin de préserver le patient des effets secondaires de ces traitements qui seraient alors plus dommageables qu'autre chose. Pour des CaP dits localement avancés, où une extension extra-prostatique sans métastases est observable, la PR et la RT combinés la HT sont généralement requises.

a) Prostatectomie radicale

La PR est une pratique chirurgicale visant à retirer entièrement la prostate et ses tissus environnants (vésicules séminales, canaux déférents). Elle est préconisée pour les CaP

confinés à la prostate afin d'ôter tout tissu tumoral avant qu'il n'ait eu le temps de s'étendre au reste de l'organisme. Il s'agit d'une intervention particulièrement indiquée pour les CaP de bas stade clinique (T2). Cependant, un bas stade déterminé au moment du diagnostic s'avère, dans 1/3 des cas, réévalué à la hausse après la PR. L'analyse des spécimens prostatiques révèle alors une atteinte, voire même une pénétration, capsulaire par la tumeur. Dans de nombreux cas les patients demeurent avec des marges chirurgicales positives qui suggèrent la présence de cellules tumorales résiduelles après la PR. Outre le stade du CaP, un défaut dans l'exécution de la PR peut également occasionner des marges positives chez le patient et, ainsi, en augmenter le risque de récurrence (Figure 9) (Kuyu et al., 1999).

Les marges chirurgicales sont les limites anatomiques d'un tissu ou d'un organe ôté par chirurgie. Dans un contexte de cancer, ces marges constituent des repères permettant d'évaluer si la totalité des cellules tumorales a été, ou non, retirée. Ainsi, lorsque les marges chirurgicales contiennent l'ensemble de la tumeur elles sont dites négatives ; tandis que si elles échouent à circonscrire les cellules tumorales, il s'agit de marges positives (Figure 9). Une coloration à l'encre de l'explant prélevé permet de visualiser ces marges chirurgicales et, ainsi, d'en déterminer le statut (positif ou négatif). Ce paramètre revêt une grande importance clinique pour le patient, pour son pronostic face au CaP et son suivi thérapeutique (Kuyu et al., 1999).

Les marges chirurgicales positives sont associées à un plus mauvais pronostic en comparaison des marges négatives auxquelles est associé un risque de progression moindre. Différentes stratégies thérapeutiques sont utilisées pour pallier aux problèmes causés par les marges positives. L'une d'entre elles est l'utilisation de RT adjuvante appliquée post-prostatectomie. Il s'agit là de l'option la plus courante. Une autre consiste en l'utilisation

néoadjuvante de HT dont le but est de limité l'apparition de marges positives. En effet, l'administration de HT pré-prostatectomie agit sur la croissance et la taille de la tumeur de sorte que son extension limitée au moment de la chirurgie diminue les chances d'avoir des marges chirurgicales positives (Kuyu et al., 1999).

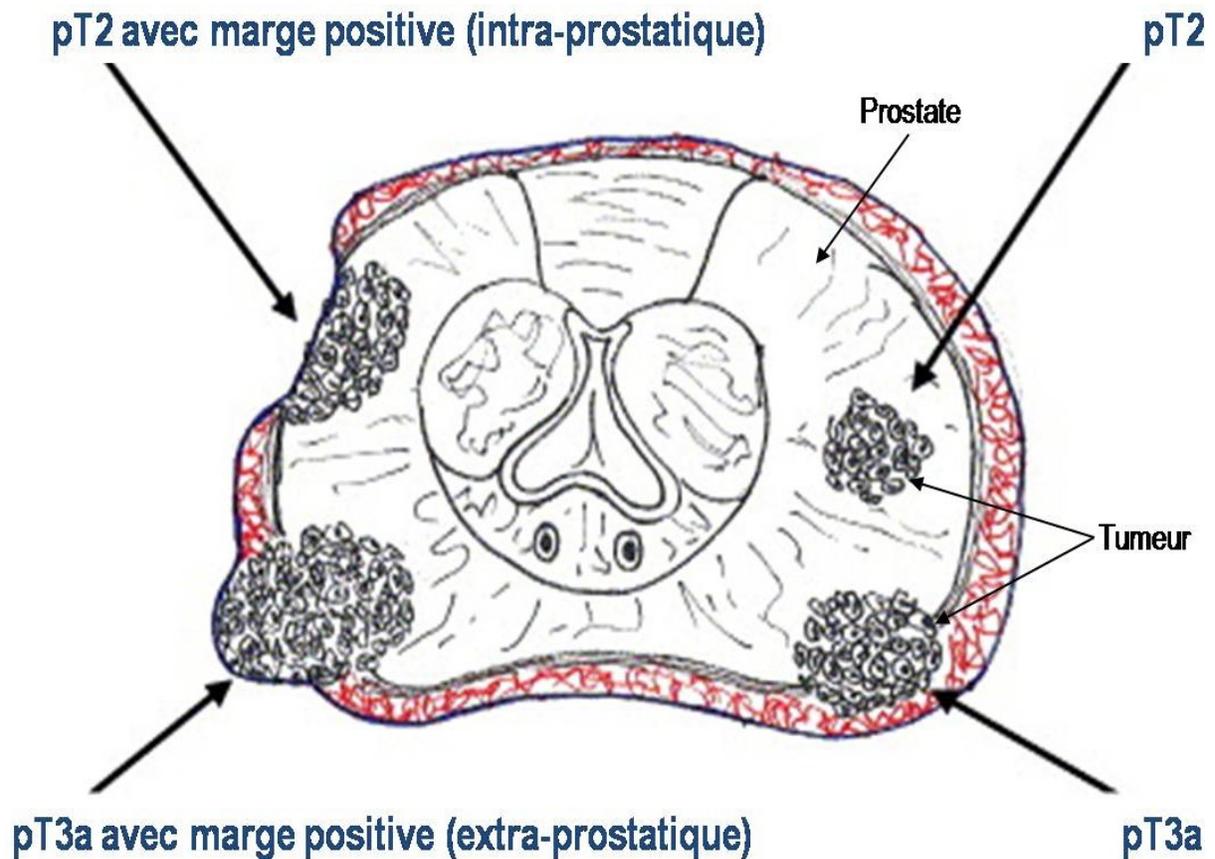


Figure 9 : Exemples de marges positives et négatives dans le cancer de la prostate après prostatectomie radicale. Diagramme illustrant un pT2 (cancer confiné à la prostate) et un pT3a (cancer avec une extension extra-prostatique) avec **marge négative** : la tumeur est contenue à l'intérieur de la limite d'encre. **pT2 avec une marge positive** due à une incision capsulaire causant une transection intra-prostatique de la tumeur. **pT3a avec marge positive** de cause non-iatrogénique due à une excision extra-prostatique pas assez large de la tumeur (<http://www.europeanurology.com/platinum-slide-series/zoom/9893>).

b) Radiothérapie

La RT consiste en l'utilisation de radiations ionisantes pour compromettre la prolifération, voire provoquer la mort, des cellules cancéreuses en y induisant une quantité létale de dommages à l'ADN. L'effet statique ou létal de la RT dépend de la radiosensibilité des cellules ciblées, elle-même fonction du type de cancer considéré. Dans le cas du CaP, comme dans de nombreux autres cancers épithéliaux, la radiosensibilité des cellules tumorales, considérée comme moyenne comparativement à d'autres types cellulaires, est variable. Les effets de la RT peuvent, dans le meilleur des cas, s'avérer létaux pour les cellules ciblées ou, se limiter à un effet statique. Les radiations ionisantes peuvent être administrées de façon externe ou de façon interne par brachythérapie. Cette dernière implique une implantation chirurgicale au site du CaP. Les implants consistent alors en de petits grains radioactifs (de la taille de grain de riz), permanents ou temporaires, qui irradient les cellules cancéreuses en continu pendant une durée limitée (Saad and McCormack, 2008).

La RT est souvent utilisée à titre de thérapie adjuvante après une PR. Dans ce cas, les radiations ionisantes sont administrées dans les 6 mois suivant la PR dépendamment de la récupération post-chirurgicale du patient, de manière à limiter les chances de récurrence du CaP. Cependant, lorsqu'elle est appliquée suite à des évidences cliniques de rechute, telles que l'augmentation du taux sérique d'APS post-prostatectomie, la RT est alors dite de rattrapage (salvage therapy). Les radiations ionisantes sont, en fin de compte, pour le CaP, utilisées dans le but de minimiser le risque que représente la présence potentielle de maladie résiduelle, de cellules cancéreuses ayant échappé à la PR.

c) Hormonothérapies ou déplétion androgénique

Le CaP est un cancer hormono-dépendant. Comme les cellules épithéliales prostatiques normales, les cellules tumorales dépendent étroitement de la signalisation androgénique, et donc autant de la présence d'androgènes dans le milieu environnant que de l'expression du récepteur aux androgènes (RA). Il n'est donc pas étonnant que cette signalisation soit exploitée à titre de cible thérapeutique en vue d'enrayer le CaP (Shen and Abate-Shen, 2010).

La testostérone est l'androgène le plus présent au niveau de l'appareil urogénital masculin. Produite et sécrétée au niveau des testicules, elle est convertie en 5 α -dihydrotestostérone (DHT), son métabolite le plus actif. La testostérone et le DHT sont les principaux ligands du RA qui, lui, est exprimé au sein des cellules épithéliales prostatiques saines et cancéreuses. Bien que tous deux soient à même d'activer le RA, la DHT possède une affinité bien plus forte pour ce dernier. Le RA est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Son activation dépend, certes, de sa liaison avec ses ligands spécifiques, mais aussi de son interaction avec des protéines co-régulatrices et avec des co-facteurs qui régissent son activité transcriptionnelle (Lonergan and Tindall, 2011).

Au sein d'une prostate normale, les androgènes sont impliqués dans la morphogénèse de l'organe durant l'embryogénèse. Chez l'adulte, ils interviennent dans le maintien et la survie des cellules épithéliales sécrétrices. Dans un contexte tumoral, bien que les androgènes n'en soient pas la cause, leur effet sur le développement du CaP et sa progression ne fait aucun doute. La croissance des cellules cancéreuses prostatiques dépend, pour la plupart d'entre elles, de la présence d'androgènes. Néanmoins, la progression du CaP d'un état androgéno-

sensible vers un état androgéno-résistant, dit également résistant à la castration, tend à suggérer la présence ou l'apparition de cellules androgéno-indépendantes au sein de la tumeur.

L'HT consiste à diminuer, voire bloquer, la stimulation androgénique chez les patients atteints de CaP de manière à entraver la croissance des cellules tumorales prostatiques. La privation d'androgènes diminue le taux de prolifération globale des cellules cancéreuses prostatiques et y induit de l'apoptose ; résultant ainsi en la régression de la tumeur dans son ensemble (Heinlein and Chang, 2004). S'il est vrai que l'HT s'avère un traitement de choix dans le CaP, l'apparition de CaP résistant à la castration semble être une conséquence de cette dernière. En effet, bien que le processus de progression du CaP d'un état hormono-sensible à un état de résistance à la castration ne soit pas encore élucidé, il ne fait aucun doute que l'HT a un effet de sélection en faveur des cellules cancéreuses prostatiques dont la croissance est indépendante des androgènes.

Les différentes thérapies utilisées exploitent la régulation de la production d'androgènes, et ce à différents niveaux (Figure 10). La testostérone est produite dans les testicules sous l'action d'une gonadotrophine, la LH (luteinizing hormone), dont la sécrétion par la glande pituitaire est elle-même sous le contrôle d'une hormone hypothalamique, la LHRH (LH-releasing hormone). Après avoir gagnée la prostate, la testostérone est, en partie, convertie en DHT par la 5 α -réductase. Testostérone et DHT peuvent dès lors agir en se liant au RA exprimé par les cellules prostatiques. Chacune de ces étapes de régulation peut être exploitée en HT pour limiter, voir abolir la production d'androgènes (Figure 10).

L'HT peut être appliquée en traitement néoadjuvant avant une PR, tel que précédemment discuté, ou en combinaison avec une radiothérapie. Dans un cas comme dans

l'autre, le but est de diminuer la masse tumorale pour augmenter l'efficacité des traitements ultérieurs. Elle peut également être utilisée à titre d'adjuvant, après la PR et la RT qui sont des traitements localisés, afin de cibler les cellules cancéreuses s'étendant au-delà de la prostate, disséminées à travers l'organisme et difficilement détectables (Rosenthal and Sandler, 2010).

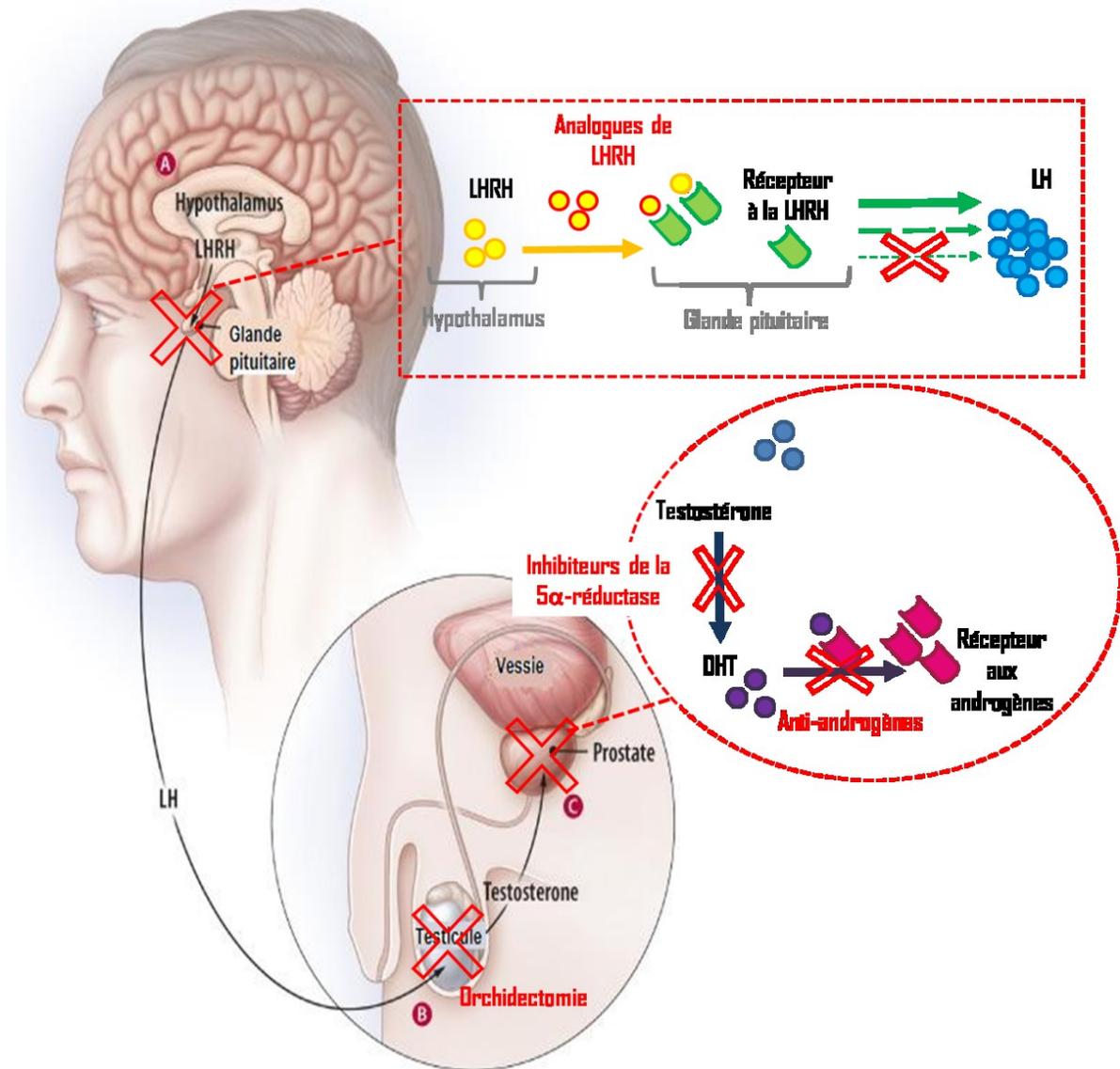


Figure 10 : Principales hormonothérapies dans le cancer de la prostate. Différents niveaux de régulation androgénique ciblés par l’HT. Les croix rouges indiquent l’organe ciblé. **A)** La glande pituitaire, source de LH (disques bleu clair), est sur-stimulée jusqu’à épuisement sous l’action d’un agoniste (disques jaunes cerclés de rouge) du récepteur LHRH (cylindres verts) qui s’ajoute à celle de la LHRH endogène (disques jaunes). **B)** Castration chirurgicale par ablation testiculaire (Orchidectomie). **C)** L’action des androgènes est bloquée au niveau de la prostate soit en inhibant la 5 α -réductase, arrêtant ainsi la conversion de la testostérone (disque bleu foncé) en DHT (disques violets), soit en bloquant l’accès des androgènes au RA (cylindres roses) (Garnick; Saad and McCormack, 2008). Adapté par Ingrid Labouba.

2.2.3.2. Traitements de cancers de la prostate avancés

Comme pour de nombreux cancers, la progression du CaP dans sa forme la plus agressive implique la formation de métastases dont les sites préférentiels sont les ganglions lymphatiques (régionaux et à distance), les os, les poumons et le foie (Disibio and French, 2008). La présence de métastases est associée à un très mauvais pronostic et les chances de guérison des patients sont alors très faibles, voire nulles. Les traitements administrés dans ces cas-ci ne visent plus des fins curatives, mais ont plutôt pour but de prolonger autant que possible l'espérance de vie du patient tout en maintenant la qualité de vie. Ainsi, pour des CaP avancés, les traitements sont essentiellement palliatifs (Droz et al., 2002).

L'HT est utilisée pour contenir la progression tumorale chez les patients avec un CaP avancé hormono-sensible. Il s'agit essentiellement de patients dont le diagnostic a été fait à un stade avancé. 80 - 90 % des patients répondront à l'HT. Il est alors possible d'observer une normalisation du taux d'APS sérique ainsi qu'une amélioration générale de la qualité de vie. (Dawson and Ryan, 2013).

Malheureusement, l'évolution de la maladie implique, dans la majorité des cas, l'apparition d'une résistance à la castration des cellules cancéreuses qui peuvent alors croître malgré l'absence de stimulation androgénique. Toutefois, chez la plupart des patients résistants à la castration, le RA demeure actif et le maintien de l'HT est recommandé. L'HT de nouvelle génération, la chimiothérapie et l'immunothérapie constituent alors des options thérapeutiques. Ainsi, les patients peuvent être soumis à une thérapie systémique aux corticostéroïdes (Prednisone, Dexaméthasone) en combinaison avec une chimiothérapie systémique, couramment le docétaxel (anti-mitotique), qui affecte l'indice de prolifération des

cellules cancéreuses. Depuis peu, l'immunothérapie par administration de cellules T anti-CaP (Sipuleucel T) est également indiquée pour les CaP avancés (Carles et al., 2012; Hotte and Saad, 2010). Mais les traitements les plus efficaces contre le CaP résistant à la castration sont les HT de nouvelle génération telles que l'Abiraterone, un inhibiteur de CYP17 (cyto- chrome p450 17), ou encore l'Enzalutamide, puissant inhibiteur du RA (Grassi et al., 2013).

2.2.4. Gestion clinique du cancer de la prostate

2.2.4.1. «Sur-diagnostic» ou «Over-diagnosis»

L'avènement du dosage sérique de l'APS, non seulement comme outil de suivi clinique du CaP, mais également comme outil diagnostique, a été une révolution. Le diagnostic précoce du CaP, dès lors rendu possible, est un atout de taille pour un traitement efficace de la maladie.

Le CaP, associé à une forme latente et une forme clinique qui, elle, peut être indolente, ou au contraire progresser très rapide. Le dépistage précoce et à grande échelle, malgré ses avantages pour la prise en charge des patients, présente l'inconvénient de détecter toutes les formes de CaP, qu'elles soient, latentes ou cliniques, agressives ou non. Aujourd'hui, le dépistage systématique du CaP permet la détection de formes non-évolutives, qui n'auraient jamais provoqué l'apparition du moindre symptôme chez le patient dont le décès aurait sans doute été causé par d'autres événements. Cela illustre la notion de «**sur-diagnostic**» («**overdiagnosis**»). L'hétérogénéité histologique et génétique du CaP, rend difficile la discrimination de ses différentes formes à un stade aussi précoce que celui auquel il peut être détecté à ce jour.

Étant donnée la progression et l'issue possible du CaP pour le patient, l'option la plus sûre était encore, il y a peu de temps, de traiter systématiquement chaque CaP ; ce qui donne inévitablement lieu à un phénomène de «sur-traitement». Il s'agit là, sans aucun doute, de l'option thérapeutique la plus prudente, mais qui présente de nombreux inconvénients. Les traitements disponibles pour le CaP peuvent s'avérer très invasifs (chirurgie), et sont associés à de nombreux effets secondaires (incontinence, dysfonctions érectiles...) qui peuvent considérablement affecter la qualité de vie des patients. L'aspect économique, car ces traitements sont très coûteux, et l'aspect humain, car un diagnostic de cancer bouleverse une vie, sont également à prendre en considération (Klotz, 2012).

La **surveillance active** est une alternative qui semble particulièrement adaptée. Une fois le diagnostic posé, des paramètres cliniques tels que l'APS sérique, le score de Gleason et le stade clinique permettent de classer le CaP selon son risque de progression (Tableau II).

Risque	APS		Score de Gleason		Stade clinique
Faible	< 10 ng/mL	ET	< 6	ET	T1 – T2a
Intermédiaire	10 – 20 ng/mL	OU	7	OU	T2b
Élevé	> 20 ng/mL	OU	8 – 10	OU	T2c – T3

Tableau II : Risque de progression du cancer de la prostate. Classification faite selon l'APS sérique, le score de Gleason et le stade clinique de la maladie sur une échelle de 3 niveaux : faible, intermédiaire et élevé (D'Amico et al., 1998).

La problématique réside dans les CaP dont le risque estimé est intermédiaire, qui peuvent adopter le comportement d'un CaP à faible risque de progression ou au contraire s'avérer agressifs. Pour ceux-là, un suivi régulier et constant permet de vérifier la potentielle progression du CaP et, ainsi, d'adapter les décisions thérapeutiques selon le besoin. Ce suivi repose sur des examens tels que des biopsies à répétition, l'évaluation de la cinétique de progression du taux d'APS sérique et des examens d'imagerie comme l'IRM. Il est estimé qu'en moyenne 30% des patients diagnostiqués avec un CaP seront réévalués à haut risque de progression pendant leur surveillance active, et donc traités en conséquence. Dans de nombreux cas ce sont les biopsies répétées qui révèlent des foyers tumoraux de grades plus élevés. Cela tend à suggérer que, plus qu'une véritable progression, il s'agirait d'un manque de sensibilité des tests initiaux lors du diagnostic ; ce qui soulève le point que la proportion des cas réévalués serait fonction de la rigueur de l'évaluation initiale du risque associé au CaP. Il survient néanmoins de réelles rechutes détectées par une hausse dans le taux d'APS sérique ; ce qui met l'accent sur l'importance d'utiliser biopsies et APS conjointement lors de la surveillance active. Tout ceci démontre d'ores et déjà la nécessité de marqueurs à même de discriminer au plus tôt, parmi les patients à risque de progression intermédiaire, ceux dont le CaP est indolent de ceux appelés à progresser rapidement.

2.2.4.2. Résistance à la castration et rechute biochimique

La plupart des patients souffrant d'un CaP localisé répondent efficacement aux traitements de première ligne, à savoir la PR, la RT et l'HT. Toutefois, plus du tiers des CaP traités progressent vers une forme de résistance à la castration (RC). La RC d'un CaP implique

que, malgré l'absence de stimulation androgénique provoquée par l'HT, les cellules tumorales prostatiques continuent à croître, résultant ainsi en une résurgence de la tumeur. Suite à la chute initialement observée du taux d'APS sérique consécutive aux traitements, une augmentation progressive dont la vitesse est fonction de la progression du CaP est observée : c'est la **rechute biochimique** (RB). En clinique, une RB du patient implique l'augmentation de l'APS sérique dans deux, voire trois, mesures successives (dépendamment des centres hospitaliers) chez le patient sans évidence clinique de métastases. La cinétique de l'APS sérique est un paramètre clé dans l'observation d'une RB. Son temps de doublement est directement proportionnel à la croissance tumorale et, lorsqu'il est élevé, il est associé à un haut risque de formation de métastases. Sur l'ensemble des patients atteints de CaP ayant subi une RB, environ le tiers développera des métastases (Darwish and Raj, 2012).

Les patients dont le CaP est considéré à haut risque de progression sont pris en charge et traités de manière à anticiper et limiter autant que possible la RB. Mais pour les patients à risque intermédiaire, discriminer ceux qui progresseront et subiront une RB, de ceux qui guériront constitue tout un défi. L'une des préoccupations des cliniciens et chercheurs est de trouver des outils pronostics à ajouter à ceux déjà existant à même d'améliorer le pouvoir de prédiction pour déterminer la progression la plus probable d'un CaP ; et ce, dans le but ultime de dispenser les traitements appropriés aux patients concernés.

2.2.5. Prédiction de la progression du cancer de la prostate

2.2.5.1. Outils pronostics

L'estimation du risque de progression du CaP est d'une importance capitale pour la prise en charge thérapeutique des patients. Au même titre que la surveillance active, elle constitue une solution au problème de sous- et sur-traitement du CaP. L'acuité et la fiabilité de cette estimation dépendent directement des paramètres cliniques et biologiques pris en considération. Aujourd'hui différents systèmes de classification sont exploités et mis à profit pour le suivi des patients atteints de CaP.

Le CaP peut être catégorisé selon son risque de progression grâce à des systèmes combinant des paramètres cliniques dont le risque individuel est intégré dans un modèle multivarié afin de déterminer un risque global. Les principaux paramètres cliniques utilisés sont l'APS sérique et le score de Gleason en combinaison avec d'autres. Par exemple, le modèle de Partin largement utilisé dans le CaP, permet de déterminer le risque de progression post-chirurgie en évaluant la probabilité d'une extension extra-prostatique de la tumeur (Partin et al., 1997). L'analyse du risque de progression à travers des modèles statistiques multivariés simples est courante ; il existe néanmoins d'autres systèmes de classification plus complexes appelés nomogrammes.

Un **nomogramme** est un outil pronostic objectif qui, grâce à un algorithme ou une formule mathématique, permet de prédire la probabilité de survenue d'un événement en combinant de multiples variables (Shariat et al., 2008). Dans le cadre du CaP, les différentes variables intégrées aux nomogrammes sont des paramètres cliniques, biologiques ou histologiques dont la combinaison permet d'évaluer la probabilité d'un événement

pathologique important pour le suivi du patient, comme la RB. Selon les variables incluses et l'événement à prédire, il existe différents types de nomogrammes. D'un point de vue pratique, cela consiste en un diagramme permettant d'attribuer un score à chacune des variables incluses dont la somme définit un score final qui, lui, est associé à une probabilité liée à l'événement à prédire. Celui publié par Kattan et al. (Kattan, 2008) (Figure 11A), par exemple, inclut l'APS sérique, le score de Gleason déterminé à la biopsie ainsi que le stade clinique du patient, et évalue le risque de RB à 5 ans. Il existe différents nomogrammes qui incluent des variables additionnelles et permettent de prédire d'autres événements tels que l'apparition de métastases ou la mortalité spécifique au CaP (Cooperberg, 2010).

Le **score CAPRA** (Cancer of the Prostate Risk Assessment) représente une approche simplifiée visant à évaluer le risque de progression du CaP. Il combine l'acuité des nomogrammes à une méthode de calcul beaucoup plus simple que celle exploitée par les algorithmes intégrés dans les nomogrammes. Le score CAPRA implique l'assignation d'une valeur numérique aux différentes variables incluses, et ce, en deux étapes. Les variables primaires, l'APS sérique et le score Gleason, ont un impact plus important sur le score final, que les variables secondaires que sont le stade clinique, le pourcentage de biopsies positives ainsi que l'âge des patients (Figure 11B) (Cooperberg, 2010).

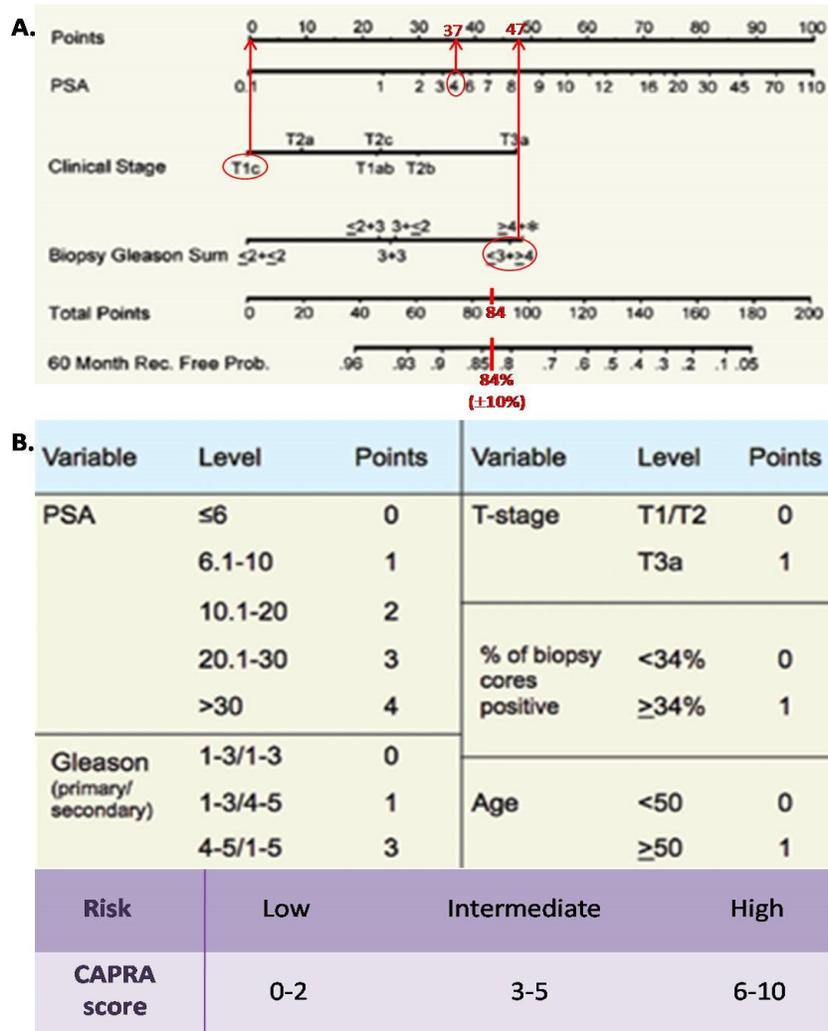


Figure 11 : Exemples de modèle de prédiction du risque de progression du cancer de la prostate. **A. Nomogramme publié selon Kattan *et al.* (1998) :** Chaque paramètre clinique peut être reporté sur l'échelle de points (première ligne) allant de 0 à 100 de manière à être associé à une valeur. Le total des points obtenu par la somme des scores de chaque variable (avant dernière ligne) est reporté sur une échelle de probabilité (dernière ligne) qui définit le risque de rechute biochimique à 5 ans. Un patient avec un APS de 4, un stade clinique T1c et un Gleason 3+4 obtient un score de 84 associé à une probabilité de 84% de développer une rechute biochimique à 5 ans. **B. Score CAPRA :** Obtenu par la somme des points attribués à chaque paramètre. Un total de point de 0-2 est associé à un faible risque, 3-5 à un risque intermédiaire et 6-10 à un haut risque de progression. Adapté par Ingrid Labouba. (Cooperberg, 2010)

2.2.5.2. Marqueurs biomoléculaires

Les paramètres utilisés dans les nomogrammes et autres modèles multivariés de prédiction sont essentiellement cliniques alors que de plus en plus de marqueurs biologiques sont caractérisés dans le CaP. L'inclusion de biomarqueurs supplémentaires pourrait en augmenter l'acuité et s'avérer d'un grand intérêt clinique.

Un biomarqueur est, selon le National Cancer Institute, une molécule biologique retrouvée dans des tissus, dans le sang ou d'autres fluides corporels, qui peut caractériser un processus normal ou non, une condition ou encore une maladie donnée. Il peut s'agir, dépendant du contexte, d'hormones, d'enzymes, de gènes, de protéines, mais également de cellules spécifiques. Selon le potentiel clinique qui lui est associé, un biomarqueur peut être pronostic, prédictif ou encore pharmacodynamique (Figure 12).

Un biomarqueur **pronostic** renseigne sur la progression naturelle de la maladie, donc sans intervention thérapeutique. Dans le contexte du CaP, ce type de marqueurs permettrait de discriminer les patients nécessitant un traitement (PR, radiothérapie...) de ceux pour qui une surveillance active serait plus appropriée. Un biomarqueur **prédictif**, quant à lui, est exploité en clinique pour déterminer le risque de progression du CaP suite aux traitements de première ligne, et ce, afin de définir l'option thérapeutique la plus adaptée pour le suivi du patient. Enfin, un biomarqueur **pharmacodynamique** permet non seulement d'évaluer la réponse des patients à diverses drogues qui leur sont administrées; mais également d'en confirmer les cibles cellulaires, d'identifier les voies de signalisation affectées et d'en préciser le mode d'action. Ainsi, à chaque étape du suivi des patients atteints du CaP, les biomarqueurs peuvent

être mis a profit afin d'orienter les décisions cliniques pour assurer une prise en charge individuellement appropriée.

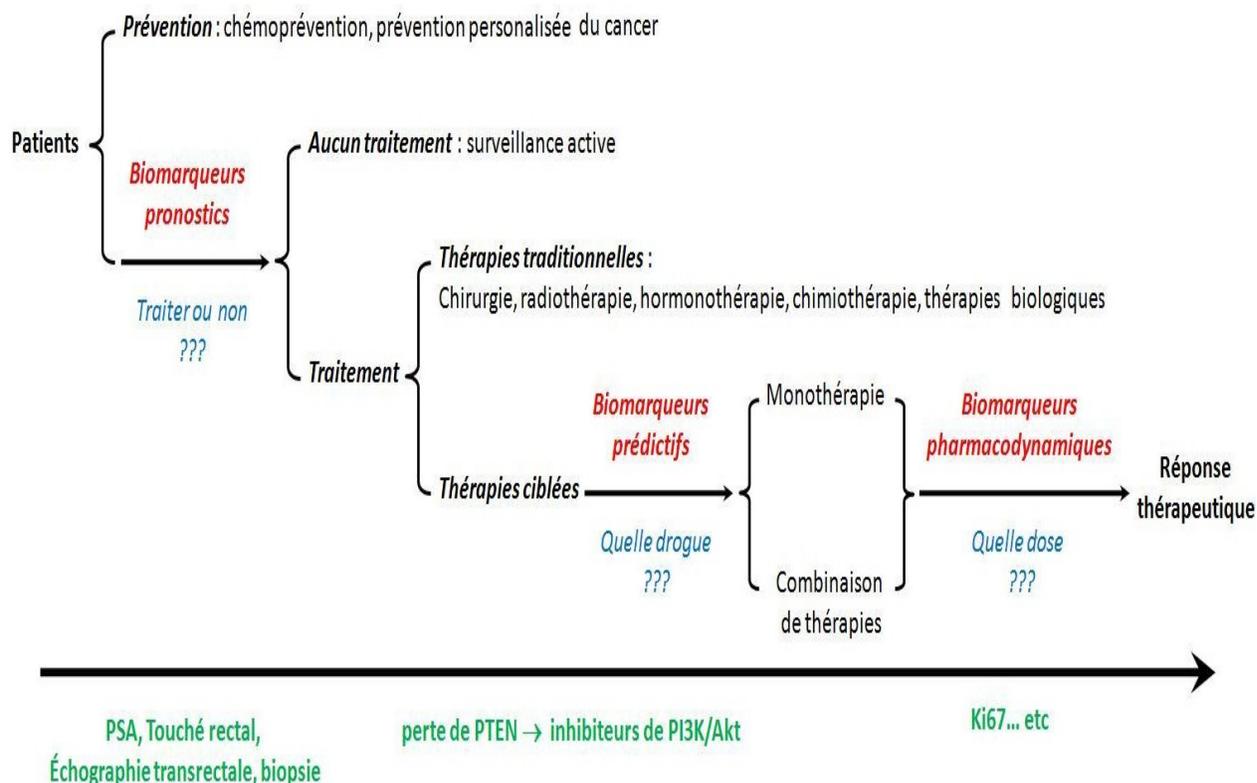


Figure 12 : Différents types de biomarqueurs dans le suivi de patients atteints du cancer de la prostate. Les biomarqueurs peuvent être utilisés pour prédire la progression naturelle de la maladie (pronostic), aider le clinicien dans son choix de thérapies (prédictifs) et l'ajustement de la posologie de drogues (pharmacodynamiques). En rouge, les différents types de biomarqueurs, en bleu les décisions auxquels ils sont associés et en vert des exemples illustratifs d'événements (Liu et al., 2012b). Adapté par Ingrid Labouba

Dans un souci d'offrir aux patients des traitements personnalisés, de plus en plus de marqueurs prédictifs et pharmacodynamiques sont recherchés. Il s'agit pour la plupart de molécules impliquées dans des voies de signalisation cellulaires potentiellement importantes pour la réponse ou la résistance à certaines thérapies. Outre leur utilité en tant que

biomarqueurs, le profil d'expression de ces molécules constitue également un élément essentiel à la compréhension de la pathogénèse du CaP. C'est le cas de nombreux biomarqueurs tels PTEN, mTOR, c-Myc, Ras et bien d'autres qui s'avèrent être associés à un fort potentiel prédictif. Dans ce contexte, au laboratoire, nous nous intéressons particulièrement aux facteurs de transcription NF-kappa B (NF-κB) qui se sont révélés être des biomarqueurs prometteurs dans le CaP. C'est ce sur quoi portent l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit. (Liu et al., 2012b)

3. Le facteur de transcription NF-κB

3.1. Protéines de la signalisation NF-κB

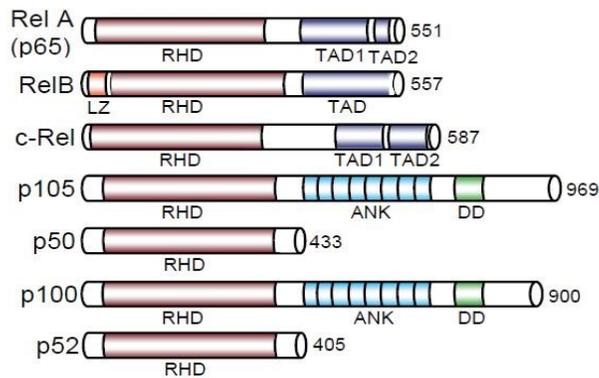
Les facteurs de transcription NF-κB se constituent d'une famille de sous-unités protéiques structurellement liées par la présence d'un domaine d'homologie Rel (RHD) au sein de leur séquence (Figure 13). Au niveau génique, ce domaine RHD, hautement conservé entre les espèces, a une taille d'environ 300 pb (paires de bases) et comprend un domaine N-terminal (NTD), un domaine de dimérisation (DD) ainsi qu'un signal de localisation nucléaire (NLS). Chaque domaine confère aux protéines NF-κB différentes propriétés essentielles à l'exercice de leur fonction de facteur de transcription. Grâce au DD, les protéines NF-κB dimérisent entre elles tandis que le NLS permet leur localisation nucléaire. La liaison à l'ADN fait intervenir le domaine RHD alors que sa portion C-terminale permet de lier les protéines inhibitrices I-κB, essentielles à la régulation de la signalisation NF-κB (Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

Les protéines NF- κ B peuvent être subdivisées en deux classes selon leur structure. La première classe inclut les protéines Rel porteuses d'un domaine de transactivation ; il s'agit des sous-unités RelA (encore notée p65), RelB et c-Rel. La seconde classe regroupe les protéines NF- κ B p105 et p100. Ces dernières sont caractérisées par la présence d'un domaine de répétition ankyrine (ANK) qui leur confère des propriétés inhibitrices NF- κ B. Le clivage de ce domaine, par protéolyse partielle, via le protéasome, produit les sous-unités p50 et p52 qui sont fonctionnellement actives et à même de lier l'ADN, contrairement à leurs précurseurs respectifs p105 et p100 (Figure 13) (Ghosh et al., 2012; Gilmore, 2006). Les différentes protéines de la famille NF- κ B sont associées en homo- et hétérodimères au sein de la cellule (Figure 14). C'est donc sous forme de dimères que les protéines NF- κ B assument leur fonction de facteur de transcription NF- κ B.

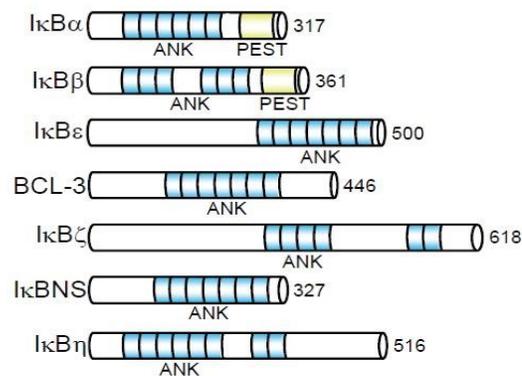
Étant donné le nombre de processus cellulaires influencés par les facteurs NF- κ B, ils sont soumis à une régulation rigoureuse essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire. Cette régulation fait appel à d'autres molécules spécifiques de la signalisation NF- κ B. Les protéines inhibitrices κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ and Bcl3) sont principalement composées du domaine ANK également retrouvé au sein des sous-unités p105 et p100. C'est en se liant aux dimères NF- κ B, grâce à leur domaine ANK, qu'elles exercent leur fonction inhibitrice. Les I κ B sont principalement régulées par phosphorylation qui en permet ainsi l'ubiquitinylation et la protéolyse protéasomale. Cela implique des kinases spécifiques, les IKK (I κ B kinases), dont il existe plusieurs isoformes, notamment IKK α , IKK β et IKK γ encore noté NEMO. Ces kinases, pour être fonctionnelles, doivent s'associer en complexes. Tandis qu'IKK α et IKK β sont structurellement similaires et possèdent un domaine catalytique kinase, NEMO, qualifiée de régulatrice, n'en possède pas et n'en demeure pas moins un acteur

important dans la signalisation NF- κ B (Figure 13) (Liu et al., 2012a; Yamamoto and Gaynor, 2004). L'ensemble de ces protéines interagit de concert avec d'autres molécules cellulaires qui, bien que non spécifiques à NF- κ B, en influencent la signalisation.

NF- κ B



I κ B



IKK

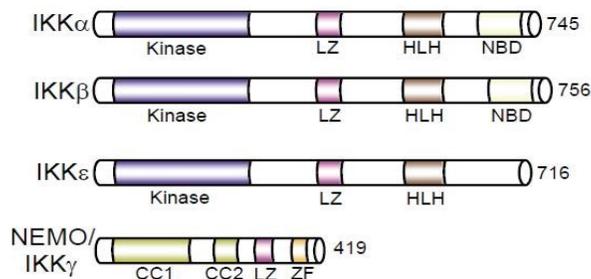


Figure 13 : Protéines de signalisation NF- κ B. Les domaines caractérisant chaque famille sont illustrés : RHD pour les protéines NF- κ B, ANK pour les I κ B et kinase/LZ/HLH pour les IKK (noter que la structure de NEMO est atypique). RHD: Rel homology domain; ANK: motif de répétition ankyrine; CC : coiled-coil; DD : death domain; HLH: helix-loop-helix; LZ: motif leucine zipper ; NBD : NEMO binding domain; PEST: domaine enrichi en proline (P), glutamate (E), sérine (S) et thréonine (T) ; TAD : transactivation domain ; ZF : Zinc-finger (Espinosa et al., 2011).

L'association des protéines NF- κ B en homo- et hétérodimères constitue la base même du fonctionnement et de la régulation de la signalisation NF- κ B. Tandis que les dimères impliquant p105 sont transitoires au sein de la cellule, p105 étant constitutivement converti en p50 par protéolyse protéasomale, ceux mettant en jeu p100 sont considérés comme transcriptionnellement inactifs, étant données les propriétés inhibitrices que lui confère son domaine ANK (encore dit « κ B-like»). Ainsi, les sous-unités fonctionnelles de la signalisation NF- κ B sont les dimères composés des sous-unités RelA(p65), RelB, c-Rel, p50 et p52 (Figure 14). La composition même de chaque dimère NF- κ B définit le type de fonction transcriptionnelle à laquelle il peut être associé et constitue, en soi, un premier niveau de régulation. Les hétérodimères comprenant une sous-unité transactivatrice (RelA(p65), RelB, c-Rel) associée à p50 ou p52 sont associées à une activité transcriptionnelle activatrice; tandis que les dimères n'incluant que p50 ou p52 sont plus volontiers reliés à une activité répressive. Cependant, des interactions avec diverses protéines co-régulatrices (co-répresseurs ou co-activateurs) peuvent affecter, voire même changer, la nature de cette activité. De plus, selon les sous-unités impliquées, les séquences de liaison à l'ADN varient, influençant ainsi directement leur affinité de liaison. Enfin, chaque dimère est à même de subir des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, qui, en en modifiant la conformation, ont un impact important sur les interactions entre dimères, protéines co-régulatrices et ADN (Hoffmann et al., 2006; Smale, 2012).

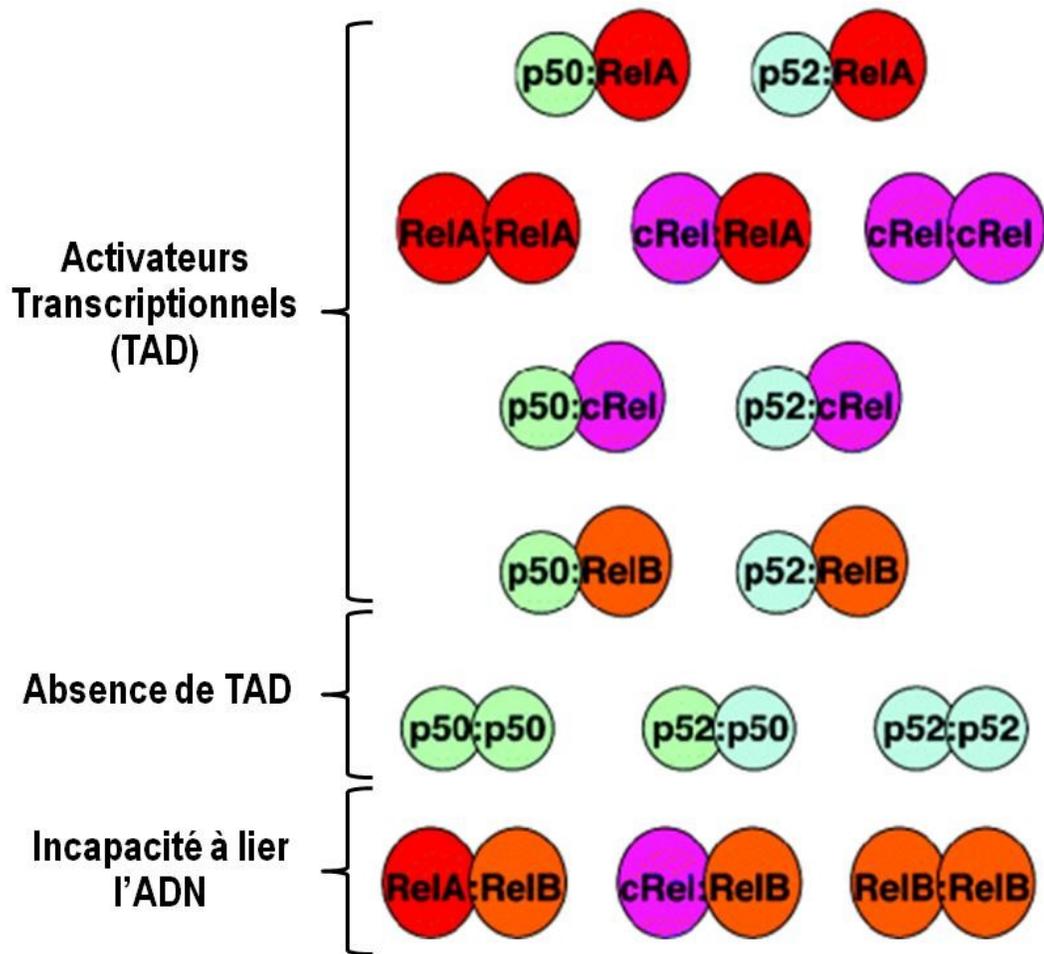


Figure 14 : Dimérisation des protéines NF- κ B. Différentes combinaisons de dimères de protéines NF- κ B. Les activateurs transcriptionnels contiennent au moins une protéine portant un domaine de transactivation de l'ADN (TAD). Les dimères exempts de TAD sont transcriptionnellement inactifs de même que les dimères impliquant RelB avec une autre protéine possédant un TAD (RelA, RelB ou c-Rel) (Hoffmann et al., 2006). Adapté par Ingrid Labouba.

3.2. Voies de signalisation NF- κ B

Les facteurs de transcription NF- κ B influent sur la biologie de la cellule à travers deux principales voies de signalisation qui, bien que similaires en de nombreux points, se distinguent, non seulement par les intervenants moléculaires, mais également par les voies d'activation ainsi que les réponses cellulaires induites. Il s'agit des voies de signalisation **classique** et **alternative** NF- κ B.

Pour l'une comme pour l'autre, en absence de stimulation adéquate, les dimères NF- κ B sont séquestrés dans le cytoplasme où ils sont maintenus inactifs par leur interaction avec les protéines inhibitrices I κ B qui, en plus d'en masquer le NLS, interfèrent avec leur affinité de liaison à l'ADN. De nombreux stimuli extracellulaires peuvent activer la signalisation NF- κ B. La transduction d'un signal approprié induit l'activation en cascade de kinases dont les IKKs. Les complexes multimériques IKK, activés par phosphorylation, phosphorylent à leur tour les I κ B. Suite à leur phosphorylation, les I κ B sont alors ubiquitinylées puis dégradées par le protéasome. Les dimères NF- κ B, libérés de leur association avec les I κ B, sont redistribués vers le compartiment nucléaire où ils exerceront leur activité transcriptionnelle au niveau de gènes-cibles (Figure 15) (Li and Stark, 2002; Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

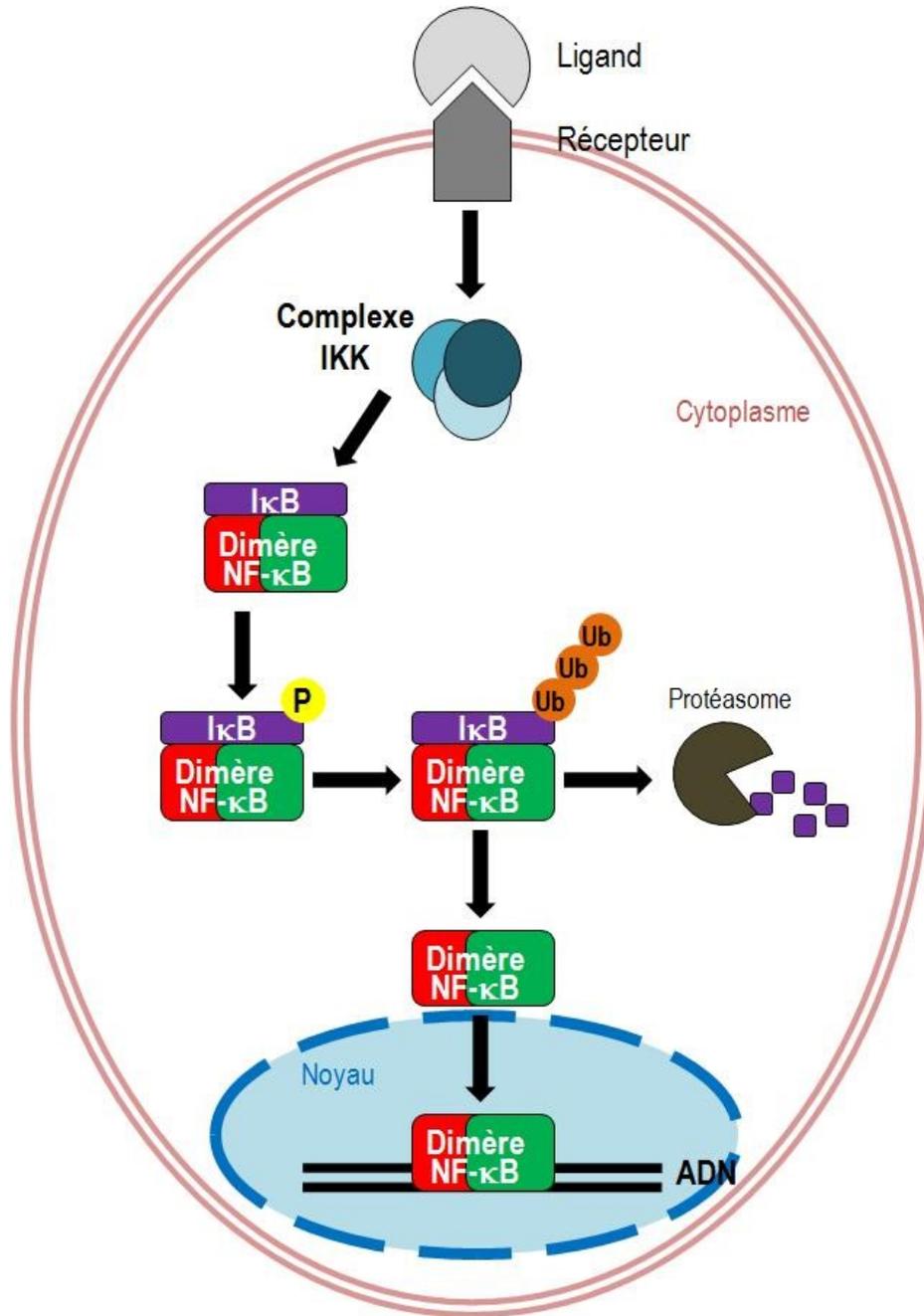


Figure 15 : Signalisation générale NF-κB. L'absence d'activation implique la rétention des dimères NF-κB au cytoplasme par les IκB. De nombreux signaux activateurs, transduits via des récepteurs cellulaires, conduisent à l'activation du complexe IKK par phosphorylation. Le complexe IKK activé phosphoryle (P) les IκB qui, une fois ubiquitinylés (Ub), sont dégradés par le protéasome. Les dimères NF-κB libres se relocalisent au noyau où ils régulent l'expression de gènes-cibles. Par Ingrid Labouba.

3.2.1. Voie de signalisation classique NF- κ B

La voie de signalisation classique NF- κ B est la mieux connue des deux. Elle fut la première découverte et par conséquent, la plus étudiée. Sa principale unité fonctionnelle est l'hétérodimère RelA(p65)/p50 qui, en absence de stimulation, est maintenu inactif au niveau du cytoplasmique grâce à son interaction avec I κ B α . De nombreux stimuli extracellulaires peuvent activer la voie classique NF- κ B. Des stress cellulaires tels que l'exposition à des radicaux libres, aux UV ou encore aux irradiations gamma en sont de puissants inducteurs ; de même que des produits viraux ou bactériens tels que les LPS et les ARN double-brin. De nombreuses cytokines peuvent également activer la voie classique NF- κ B, notamment IL-1 et TNF- α . L'induction de la voie classique NF- κ B implique l'activation d'un complexe IKK comprenant IKK α , IKK β et IKK γ (NEMO) qui phosphoryle I κ B α dont la dégradation protéasomale subséquente conduit à la libération puis à la translocation nucléaire de RelA(p65)/p50 (Figure 16). La grande variété de stimuli inducteurs de la voie classique NF- κ B, qui nécessite chacun des réponses cellulaires adaptées, laisse déjà entrevoir un grand nombre de gènes-cibles pour le dimère RelA(p65)/p50 (Sun and Andersson, 2002).

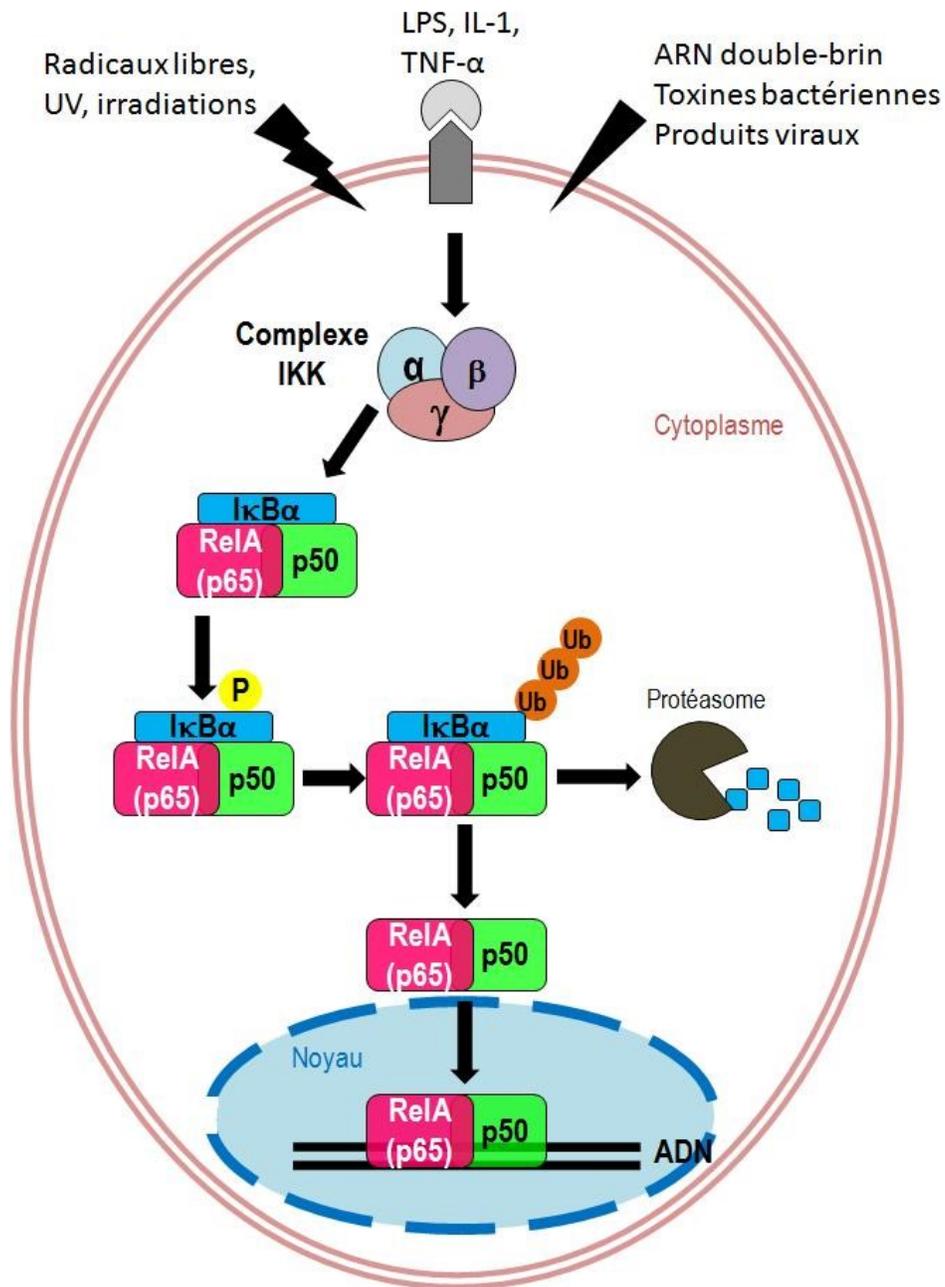


Figure 16 : Signalisation classique NF-κB. Lorsqu'inactifs RelA(p65)/p50 sont séquestrés au cytoplasme par IκBα. Les stimuli activateurs induisent l'activation du complexe multimérique IKKα/IKKβ/IKKγ. Ce dernier phosphoryle (P) IκBα qui est alors ubiquitinylé (Ub) puis dégradé par le protéasome. RelA(p65)/p50 libres se relocalisent au noyau où ils régulent l'expression de gènes-cibles. Par Ingrid Labouba.

3.2.2. Voie de signalisation alternative NF- κ B

Les principaux acteurs moléculaires de la voie alternative NF- κ B sont les sous-unités RelB, p100 et p52. En absence de stimulation, les dimères RelB/p100 sont maintenus inactifs dans le cytoplasme par l'action inhibitrice du domaine ANK de la sous-unité p100. En effet, contrairement à la conversion de p105 en p50 qui est constitutive, celle de p100 en p52 nécessite l'activation de la voie alternative NF- κ B de sorte que c'est p100 qui fait office d'inhibiteur NF- κ B. Ses inducteurs sont les cytokines de la superfamille des TNF tels que RANK, lymphotoxin- β , BAFF, CD40-L et leurs récepteurs respectifs. L'activation de la voie alternative NF- κ B implique l'intervention de NIK (NF- κ B inducible kinase) qui active le complexe homodimérique IKK α . Ce dernier phosphoryle la sous-unité p100 qui est alors partiellement dégradée par la protéasome en réponse à son ubiquitinylation préalable. Ceci permet la conversion de RelB/p100 en RelB/p52 qui, libéré de l'action inhibitrice de p100, peut transloquer au noyau où il régulera l'expression de gènes-cibles (Figure 17) (Dejardin, 2006; Xiao et al., 2006).

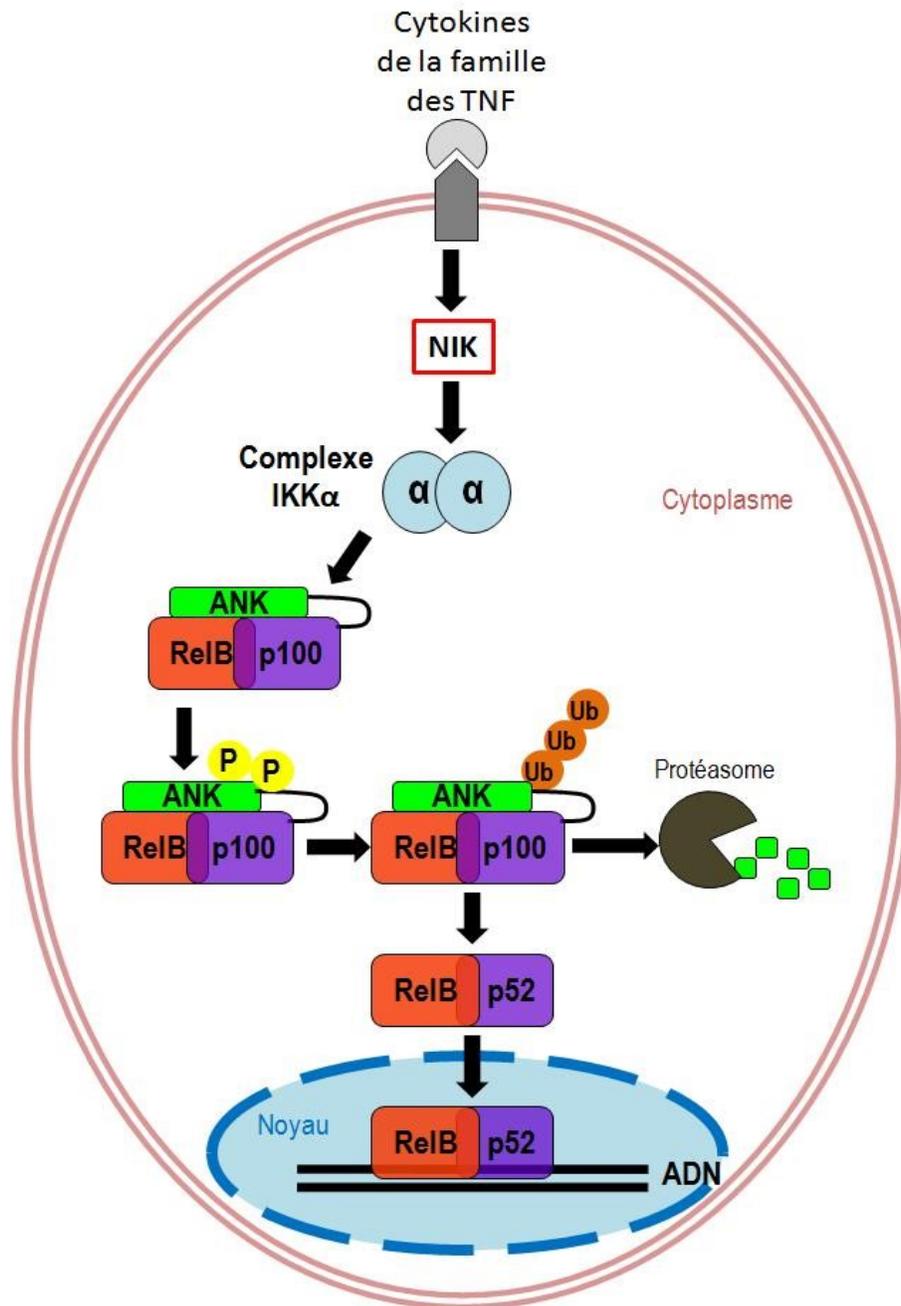


Figure 17 : Signalisation alternative NF- κ B. Lorsqu'inactifs RelB/p100 sont séquestrés au cytoplasme sous l'action inhibitrice de p100. Les stimuli activateurs transduits par les récepteurs de la superfamille des TNF-R induisent l'activation de NIK qui, elle, active l'homodimère IKK α . Ce dernier phosphoryle (P) p100 qui est alors ubiquitinylé (Ub) puis converti en p52 via le protéasome. RelB/p52 ainsi générés se relocalisent au noyau où ils régulent l'expression de gènes-cibles. Par Ingrid Labouba.

3.2.3. Fonctions associées à la signalisation NF- κ B

Les facteurs de transcription NF- κ B ont largement été associés au système immunitaire au sein duquel ils sont aujourd'hui reconnus pour intervenir non seulement dans la maturation des organes lymphoïdes et des cellules immunitaires, mais également dans les fonctions immunitaires effectrices telles que l'inflammation.

La voie classique NF- κ B, impliquée dans la maturation des cellules B et T est également mise à contribution pour répondre à des situations de stress faisant intervenir l'immunité. Ainsi, activée par des stimuli tels que le LPS ou des produits de dégradations cellulaires (corps nécrotiques ou apoptotiques) elle régule l'expression de facteurs (cytokines) essentiels à l'initiation de l'inflammation et au recrutement de leucocytes (Newton and Dixit, 2012). La voie classique NF- κ B intervient également dans des processus biologiques tels l'hématopoïèse (Gerondakis et al., 2012) ou encore l'angiogénèse (Tabruyn and Griffioen, 2007).

La voie alternative, quant à elle, est impliquée dans le développement d'organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer ainsi que dans la maturation des cellules B et dendritiques (Weih and Caamano, 2003). Plus récemment, il a été suggéré que cette voie de signalisation interviendrait aussi dans la différenciation des cellules T (Moore et al., 2007). Comme la voie classique, la voie alternative NF- κ B est aussi impliquée dans le processus inflammatoire, quoique régulant des cibles différentes. Outre ses rôles dans le système immunitaire, la voie alternative NF- κ B est également reconnue pour jouer un rôle majeur dans le métabolisme osseux via la signalisation RANK-L/OPG/RANK (Soysa et al., 2010; Sun, 2012; Xiao et al., 2006).

Bien qu'initialement étudiés dans un contexte immunitaire, les facteurs de transcription NF- κ B sont ubiquitaires et associés à des fonctions cellulaires s'étendant bien au-delà de la régulation de l'immunité. À l'échelle cellulaire, ils interviennent dans de nombreux processus tels la survie et la croissance, la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la migration et l'invasion (Sethi et al., 2008). L'implication de la signalisation NF- κ B, classique et alternative, dans autant de fonctions biologiques rend cruciale sa régulation dont le moindre défaut peut engendrer des pathologies lourdes de conséquences. C'est le cas dans diverses maladies inflammatoires où sa sur-activation est observée, comme par exemple, dans l'arthrite rhumatoïde (Makarov, 2001). La signalisation NF- κ B est également dérégulée dans divers types de cancers dont celui de la prostate.

3.3. NF- κ B et cancer de la prostate

Les fonctions régulées par les facteurs de transcription NF- κ B en font des marqueurs particulièrement intéressants à étudier dans un contexte de tumorigénèse. De nombreux travaux publiés durant ces 20 dernières années illustrent, en effet, la dérégulation de la signalisation NF- κ B dans des cancers d'origine lymphoïde et myéloïde ou des cancers solides tels que des carcinomes. Des processus biologiques dans lesquels la signalisation NF- κ B est impliquée comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration et l'invasion cellulaires, l'angiogénèse, sont tous potentiellement tumorigènes. Aussi a-t-elle été associée au phénomène de transformation cellulaire qui initie l'apparition de cancer, ainsi qu'à la formation de métastases qui en représente la progression (Foo and Nolan, 1999).

Outre l'influence que la signalisation NF- κ B peut exercer sur la biologie de la cellule cancéreuse, elle peut également avoir un impact sur la croissance tumorale en intervenant dans le milieu environnant la tumeur. Par exemple, le processus inflammatoire au sein duquel elle joue un rôle clef est aujourd'hui étroitement associé au développement de cancers pour lesquels il constitue un facteur aggravant (Ben-Neriah and Karin, 2011). Le lien entre les facteurs de transcription NF- κ B et le cancer ne fait plus le moindre doute aujourd'hui, cependant, étant donné la multitude de gènes qu'ils régulent, il est difficile de définir s'ils s'avèrent être un atout pour la tumeur (pro-tumoral) ou pour le patient (anti-tumoral) (Tableau III).

3.3.1. Signalisation classique NF- κ B et cancer de la prostate

La plupart des études réalisées sur la signalisation NF- κ B dans un contexte de cancer ont porté sur la voie classique, plus particulièrement sur RelA(p65), la sous-unité transactivatrice. RelA(p65) est dérégulée dans plusieurs cancers où une surexpression, ou encore une sur-distribution nucléaire, ont été observées chez les patients. Étant des facteurs de transcription, la localisation nucléaire de protéines NF- κ B est un bon indice de son activation, particulièrement lorsqu'il s'agit d'études *in situ* à partir d'échantillons de tissus provenant de patients. La sur-activation de la signalisation NF- κ B est toutefois confirmée *in vitro* dans des lignées cellulaires issues de divers cancers qui constituent. Ainsi, RelA(p65) a été impliqué dans de nombreux cancers dont ceux du colon (Sakamoto et al., 2009), du poumon (Chen et al., 2011), du pancréas (Arlt et al., 2012), du sein (Shostak and Chariot, 2011), du rein (Morais et al., 2011) et, bien entendu, celui de la prostate (Domingo-Domenech et al., 2005; Fradet et

al., 2004; Gannon et al., 2013; Koumakpayi et al., 2010; Lessard et al., 2003; McCall et al., 2012).

Promotion tumorale		Suppression tumorale	
Survie cellulaire : Induction de gènes anti-apoptotiques (Bcl-xL, XIAP, cIAP 1/2) Suppression de l'activité JNK			Mort cellulaire : RelA(p65) réprime l'expression de gènes sensibilisant les cellules à l'apoptose Induction de gènes pro-apoptotiques (Fas, Fas-R, DR4/5)
Métastase : Régulation de l'expression de molécules d'adhésion (ICAM1, VCAM1, ELAM1)			Suppresseurs de tumeur : RelA(p65) stimule l'apoptose p53-induite p53 induit la répression p52-dépendante de la cycline D1 Régulation de l'expression de gènes et d'activité apoptotiques modulées par ARF
Angiogenèse : Régulation de VEGF, TNF, IL-1 et IL-8	NF-κB		Effets anti-prolifératifs : Inhibition de JNK qui prévient la prolifération des cellules dermiques Induction de l'expression de p21WAF1/CIP1 dans les kératinocytes
Prolifération : Expression de proto-oncogènes (Cycline D1, c-Myc)			Suppression de la transformation : RelA(p65) réprime le phénotype transformé des MEFs RelA -/-
Immortalité : Régulation de l'expression des télomérases			
Inflammation : Sécrétion de cytokines pro-inflammation par les cellules tumorales ou des macrophages agissant sur la croissance tumorale Régulation de gènes pro-inflammatoires (COX2, iNOS)			Autres : Répression de l'activité NF-κB par d'autres oncogènes (β-caténine) aux fonctions anti-tumorales dans certains types cellulaires.

Tableau III : NF-κB et cancer : fonctions pro- et anti-tumorales. À gauche, un résumé des processus tumorigènes influencés par une activation aberrante de la signalisation NF-κB. À l'inverse, à droite, sont répertoriées des évidences indiquant des circonstances dans lesquelles l'activation de la signalisation NF-κB peut inhiber la croissance tumorale et la survie cellulaire (Perkins and Gilmore, 2006). Adapté par Ingrid Labouba

Les premières études réalisées au laboratoire portant sur RelA(p65) dans le CaP ont été initiées par Laurent Lessard (Ph.D). Ses travaux, essentiellement des analyses immunohistochimiques effectuées à partir de tissus provenant de patients atteints de CaP à différents stades de la maladie, ont mis en évidence la dérégulation de la voie classique NF- κ B. En effet, à partir de différentes cohortes de patients, il a été démontré que la distribution nucléaire de RelA(p65) au sein des cellules cancéreuses prostatiques (Lessard et al., 2005; Lessard et al., 2003). La présence nucléaire de RelA(p65) s'est de plus révélée d'un intérêt clinique puisqu'elle s'est avérée prédictive de la rechute biochimique (Domingo-Domenech et al., 2005; Fradet et al., 2004; Gannon et al., 2013). Initialement faite à partir d'échantillons de spécimens de PR d'une cohorte de 45 patients, cette observation s'est confirmée au fil des études impliquant des cohortes plus importantes de patients atteints du CaP (Gannon et al., 2013). Outre sa valeur prédictive sur la rechute biochimique, la distribution nucléaire de RelA(p65) a également été associée à la progression de la maladie. Par exemple, la distribution nucléaire de RelA(p65) apparaît significativement plus importante au niveau des métastases ganglionnaires (Ismail et al., 2004). De plus, la fréquence nucléaire de RelA(p65) au niveau des cellules de la tumeur primaire est hautement prédictive de l'apparition de ce type de métastases (Lessard et al., 2006a). Il a également été rapporté que la signalisation classique NF- κ B est sur-régulée chez des patients RC atteint de CaP (McCall et al., 2012). Notre groupe a été le premier mettre en évidence le potentiel clinique de RelA(p65) en tant que biomarqueur prédictif qui a également été confirmée par d'autres groupes dont les travaux supportent la valeur prédictive de RelA(p65) sur la rechute biochimique seul ou inclus dans des modèles multivariés (Domingo-Domenech et al., 2005; MacKenzie et al., 2012).

La dérégulation observée *in situ* au sein de tissus cancéreux prostatiques se confirme *in vitro* au sein de diverses lignées cellulaires où l'activation constitutive de la voie classique NF- κ B a été observée. Cela est particulièrement vrai pour les lignées cellulaires PC3 et DU145 respectivement issues de métastases osseuses et de métastases cérébrales. Celles-ci, représentatives de CaP avancés, ont un potentiel métastatique élevé et sont résistantes à la castration (androgéno-indépendantes). Les lignées cellulaires LNCaP et 22Rv1, respectivement androgéno-dépendante et androgéno-sensible, ont été dérivées à partir de métastases ganglionnaires pour les LNCaP, et de la xénogreffe androgéno-dépendante CWR22 de souris pour les 22Rv1. Toutes deux, à faible potentiel métastatique, illustrent un stade précoce du CaP. Comparativement aux cellules PC3 et DU145, l'activité classique NF- κ B y est moindre, voir même nulle pour ce qui est de la lignée 22Rv1 (voir Chapitre I). Le profil d'activation de la voie classique NF- κ B au sein de ces lignées corrobore les observations faites à partir d'échantillons de patients et en font des modèles de choix pour en étudier le rôle biologique dans un contexte de CaP. La sur-activation de la voie classique NF- κ B dans les cellules cancéreuses prostatiques est associée à un potentiel tumorigène en influant sur leur prolifération, leur survie, leurs capacités invasives mais également en intervenant sur le milieu environnant à travers des processus biologiques tels que l'angiogénèse et l'inflammation (Huang et al., 2001; Prasad et al., 2010; Sethi et al., 2008).

3.3.2. Signalisation alternative NF- κ B et cancer de la prostate

La voie de signalisation alternative NF- κ B, bien que moins documentée que la voie classique, est de plus en plus étudiée. L'impact de la voie classique sur la tumorigénèse, de

même que les fonctions générales associées à la voie alternative NF- κ B, notamment dans l'inflammation, justifie l'intérêt grandissant qu'elle suscite, particulièrement dans un contexte de cancer.

Suite aux travaux du Dr Lessard portant sur le potentiel clinique de RelA(p65), une étude immunohistochimique a été réalisée afin de définir le profil d'expression de chacune des sous-unités NF- κ B au sein des tissus cancéreux prostatiques de patients atteints de CaP. Des échantillons de tissus provenant de spécimens de PR de patients ont été montés en micro-étalages de tissus (Tissue microarray _ TMA) qui ont permis le simple marquage immunohistochimique de chaque sous-unité NF- κ B à partir de coupes successives. À l'exception de c-Rel dont la localisation cellulaire est strictement cytoplasmique, toutes les autres sous-unités NF- κ B (RelA(p65) et p50, RelB et p52) ont une distribution à la fois cytoplasmique et nucléaire au sein des cellules cancéreuses prostatiques. Cette observation y suggère la possible activation des voies classique et alternative NF- κ B. Cette éventualité a été explorée à travers une analyse corrélative visant à extrapoler les présences conjointes des différentes sous-unités, deux à deux, dans le compartiment nucléaire de cellules de tissus cancéreux (Lessard et al., 2005).

La combinaison RelA(p65)/RelB dans le noyau des cellules cancéreuses majoritairement observée chez les patients tend à suggérer l'activation potentielle des deux voies de signalisation NF- κ B. Ainsi, la combinaison RelA(p65)/p50 y est représentée tout comme l'est celle RelB/p52. La distribution nucléaire de RelB/p52 s'avère, cependant, plus observée chez les patients que celle de RelA/p50, suggérant donc une activation potentiellement plus importante de la voie alternative NF- κ B. Cette observation illustre, pour la première fois, la possible implication de la voie alternative NF- κ B dans le CaP. Il a de

plus été rapporté, dans cette étude, que la fréquence nucléaire de la sous-unité transactivatrice alternative, RelB, est en corrélation avec le score de Gleason des patients, liant ainsi la voie alternative NF- κ B à la progression du CaP. L'ensemble de ces observations confirment, non seulement la potentielle activation de la voie classique NF- κ B au sein des tissus cancéreux prostatiques, mais souligne également celle de la voie alternative NF- κ B qui, sur la base de la distribution nucléaire conjointe des sous-unités RelB et p52, pourrait avoir son importance dans le CaP (Lessard et al., 2005). Cette étude a été le point de départ de plusieurs autres portant sur l'implication de la signalisation alternative NF- κ B dans le CaP.

La voie alternative NF- κ B a été associée à divers types de cancers (Dejardin, 2006; Shostak and Chariot, 2011; Xiao et al., 2006). Quelques travaux sur la voie alternative NF- κ B et le cancer ont été réalisées à partir de la sous-unité p100/p52 qui s'avère associée à la tumorigénèse via l'induction constitutive de p52 (Connelly et al., 2007; Sun, 2012). D'autres acteurs moléculaires, également impliqués dans la signalisation alternative NF- κ B, ont été étudiés pour en explorer l'impact biologique. Par exemple, c'est à la kinase NIK, en amont de IKK α dans la transduction de signal (Figure 17), que l'on attribue, du moins en partie, l'activation constitutive de la voie alternative NF- κ B observée dans le cancer du pancréas et les lignées cellulaires d'origine pancréatique (Nishina et al., 2009; Sun, 2012; Vallabhapurapu et al., 2013). Toutefois, RelB est à la signalisation alternative NF- κ B ce que RelA(p65) est à la signalisation classique, à savoir, sa sous-unité transactivatrice. Au contraire des sous-unités p50 et p52 qui peuvent intervenir dans la régulation de gènes propres aux deux voies de signalisation NF- κ B par leur interaction avec RelA(p65) ou RelB, RelB est spécifique de la voie alternative. Et bien qu'à même de former des hétérodimères avec RelA et c-Rel, ces derniers, étant incapables à lier l'ADN, n'ont aucun impact transcriptionnel (Figure 14)

(Hoffmann et al., 2006; Jacque et al., 2005). Les études portant donc sur RelB reflètent plus spécifiquement la biologie inhérente à la voie alternative NF- κ B que celles axées sur ses partenaires moléculaires directs ou indirects.

Les études concernant la voie alternative NF- κ B sont encore émergentes mais l'associent déjà à un potentiel tumorigène. Dans le cancer du sein l'expression de RelB est associée à la survie des cellules cancéreuses mammaires et leur confèrerait des propriétés invasives (Demicco et al., 2005; Fritz and Radziwill, 2010; Wang et al., 2007). La surexpression de RelB a également été rapportée dans le cancer du pancréas (Wharry et al., 2009). Il a, de plus, été rapporté que l'activation constitutive de la voie alternative NF- κ B au sein de lignées cellulaires pancréatiques leur octroie un avantage prolifératif (Schneider et al., 2006).

Dans le CaP, des études ont également été réalisées et corroborent le potentiel tumorigène associé à la voie alternative NF- κ B, et ce, à travers l'analyse de l'expression de RelB. Celles-ci reposent sur des essais fonctionnels visant à explorer l'impact de RelB sur la biologie des cellules cancéreuses prostatiques, mais aussi à déterminer les mécanismes moléculaires qui en sous-tendent la tumorigénicité. Il a ainsi été rapporté que l'expression de RelB stimule la capacité des cellules PC3 et LNCaP à former des tumeurs *in vivo* au sein de modèles murins, et ce, à travers la régulation de l'expression de l'IL-8 et de l'APS (Xu et al., 2012; Xu et al., 2009). L'expression de RelB apparait aussi comme étant un facteur de résistance des cellules tumorales aux radiations ionisantes (Holley et al., 2010; Xu et al., 2008). L'ensemble de ces propriétés lie clairement la voie alternative NF- κ B à un potentiel tumorigène. Néanmoins, bien que précisant son implication dans le CaP, les processus biologiques par lesquels La voie alternative intervient dans le CaP restent encore à explorer.

4. Projet de thèse : *Implication de la voie alternative NF-κB dans le cancer de la prostate*

La problématique que pose la progression du CaP nous a conduits, au laboratoire, à nous intéresser aux facteurs de transcription NF-κB, non seulement, à titre de biomarqueurs moléculaires, mais également pour améliorer notre compréhension de la biologie du CaP. La littérature entourant l'implication de la voie classique NF-κB dans le CaP, et les différentes percées concernant la voie alternative NF-κB nous ont amenés à réaliser le présent projet de recherche.

4.1. Hypothèse et problématiques de travail

L'étude portant sur le profil d'expression et de distribution des sous-unités NF-κB au sein de tissus cancéreux prostatiques a été la base du présent projet de recherche. La localisation nucléaire de RelB et de p52 au sein des cellules cancéreuses y suggère une potentielle activation de la voie alternative NF-κB. Cette observation, ainsi que la corrélation entre la fréquence nucléaire de RelB et le score de Gleason des patients nous ont conduits à émettre l'hypothèse suivante : *la voie de signalisation alternative NF-κB serait impliquée dans la tumorigénèse du CaP*. Cette dernière soulève ces deux problématiques:

1. Par quels mécanismes biologiques la voie alternative NF-κB interviendrait-elle dans le CaP ?
2. Dans quelle mesure l'activation des deux voies de signalisation NF-κB au sein des cellules cancéreuses de patients atteints de CaP pourrait – elle en influencer le pronostic ?

4.2. Objectifs de recherche

Deux principaux objectifs ont été posés afin de répondre aux problématiques précédemment citées.

Le premier objectif consiste à déterminer les processus biologiques qui confèrent à la voie alternative NF- κ B son potentiel tumorigène dans le CaP. Pour se faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire prostatique androgéno-sensible 22Rv1 dont les niveaux d'expression de RelB sont très faibles, voire nuls. Par transduction lentivirale, nous y avons introduit l'ADNc de RelB en vue d'induire sa surexpression constitutive. À partir des lignées cellulaires 22Rv1 RelB dérivées, nous avons procédé à différents essais fonctionnels *in vivo* et *in vitro* en vue d'évaluer l'impact de la surexpression de RelB sur la tumorigénicité des cellules 22Rv1.

Le second objectif vise, quant à lui, à évaluer la présence conjointe des deux voies de signalisation NF- κ B au sein de spécimens de PR de patients atteints du CaP. L'étude de la distribution subcellulaire des sous-unités NF- κ B, précédemment réalisée au laboratoire, repose sur de simples marquages immunohistochimiques qui ont été réalisées à partir de coupes sériées successives de TMA. Cette méthodologie, ne permettant que des analyses corrélatives, elle ne s'avère, en réalité, informative que de la présence conjointe des différentes sous-unités NF- κ B globalement au sein de mêmes tissus tumoraux de mêmes patients, mais pas de mêmes cellules. Nous avons donc procédé à une étude par immunofluorescence qui, contrairement à l'immunohistochimie traditionnelle, permet le marquage de plusieurs protéines sur un seul et même échantillon de tissu. Il devient alors possible d'effectuer des analyses de co-distribution de RelA(p65) et de RelB afin d'évaluer la potentielle activation des voies de signalisation NF- κ B au sein de mêmes cellules prostatiques. Il ne s'agit, non plus d'étudier les voies de

signalisation classique et alternative NF- κ B individuellement, mais plutôt conjointement en tant que variable unique afin d'en évaluer le potentiel clinique. La majeure partie de ce sous-projet a consisté en la mise point d'un protocole de marquage immunofluorescent multiple faisant intervenir quatre filtres d'émission distincts. Celui-ci a été développé, non seulement pour s'adapter à l'usage de tissus conservés en paraffine, notamment de TMAs ; mais également afin de rendre possible l'analyse semi-automatisée de la fluorescence des tissus marqués par un logiciel d'imagerie spécifique.

Chapitre 1.

Impact de la voie alternative NF- κ B sur la biologie des cellules cancéreuses prostatiques

1. Article #1 : Résumé en français

Titre en français :

La sous-unité NF- κ B RelB favorise l'autophagie dans les cellules cancéreuses prostatiques 22Rv1 *in vitro* et affecte la croissance tumorale de xénogreffes en souris *in vivo*.

Contexte: L'implication de la signalisation NF- κ B dans le CaP a largement été démontrée à travers l'étude de la sous-unité classique p65. La localisation nucléaire de p65 au sein de tissus prostatiques de patients atteints de CaP est, en effet, en corrélation avec la rechute biologique. De plus, de nombreuses études *in vitro* ont montré l'implication la voie classique NF- κ B dans la progression du CaP. Plus récemment, la localisation nucléaire de RelB, principale sous-unité NF- κ B alternative, a également été corrélée avec le score de Gleason. La présente étude vise à clarifier le rôle de la voie alternative NF- κ B dans la biologie du CaP en explorant, *in vitro* et *in vivo*, les effets de la surexpression de RelB au sein des cellules cancéreuses prostatiques.

Méthodes: L'utilisation d'un système de transduction lentivirale, a permis la surexpression constitutive de RelB ou GFP dans les cellules 22Rv1 au sein desquelles l'activité

transcriptionnelle de NF- κ B a été mesurée. *In vivo*, la croissance tumorale a été évaluée après injection de populations cellulaires 22Rv1 dérivées dans des souris SCID. *In vitro*, les effets de RelB sur la prolifération cellulaire 22Rv1 ont été évalués en culture monocouche tandis que leur capacité de croissance cellulaire indépendante de l'ancrage a été évaluée par un test de croissance en agar mou. L'apoptose et l'autophagie ont été évaluées par analyse Western blot à partir de cellules 22Rv1 dérivées cultivées en suspension grâce à l'utilisation des plats pré-traités avec du poly-HEMA.

Résultats: La surexpression de RelB dans les cellules 22Rv1 induit l'activation constitutive de la voie alternative NF- κ B. *In vivo*, l'expression de RelB cause un retard dans l'initiation des tumeurs 22Rv1 induites dans les souris SCID. *In vitro*, RelB stimule la prolifération des cellules 22Rv1 et réduit leur capacité à croître en agar mou. Ces observations peuvent être reconciliés par nos observations selon lesquelles, lorsque cultivées en suspension sur des supports pré-traités au poly-HEMA, les cellules 22Rv1 exprimant RelB deviennent plus sensibles à la mort cellulaire, et plus particulièrement par autophagie.

Conclusions: Cette étude met en évidence le rôle de la voie alternative NF- κ B dans la prolifération cellulaire et l'autophagie. Ainsi, en intervenant dans ces deux processus, la voie alternative NF- κ B pourrait contribuer à la survie des cellules tumorales dans des conditions de stress tout en favorisant leur croissance. De cette façon la voie alternative NF- κ B pourrait influencer sur le potentiel tumorigène de cellules cancéreuses prostatiques.

2. Article #1 : Version originale soumise à *Cancer cell international*

The RelB alternative NF-kappaB subunit promotes autophagy in 22Rv1 prostate cancer cells *in vitro* and affects mouse xenograft tumor growth *in vivo*.

Ingrid Labouba¹, Alexis Poisson¹, Julie Lafontaine¹, Nathalie Delvoye¹, Philippe O.Gannon¹, Cécile Le Page¹, Fred Saad^{1,2*} and Anne-Marie Mes-Masson^{1,3}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) / Institut du cancer de Montréal, Montreal, Canada; ²Division of Urology, CHUM, Université de Montréal, Canada; ³Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada.

Short title: RelB modulates the growth and death of 22Rv1 cells.

Key words: RelB, tumor initiation, proliferation, anchorage-independent cell growth.

ABSTRACT

Background: The involvement of NF- κ B signaling in prostate cancer (PCa) has largely been established through the study of the classical p65 subunit. Nuclear localization of p65 in PCa patient tissues has been shown to correlate with biochemical recurrence, while *in vitro* studies have demonstrated that the classical NF- κ B signaling pathway promotes PCa progression and metastatic potential. More recently, the nuclear location of RelB, a member of the alternative NF- κ B signaling, has also been shown to correlate with the Gleason score. The current study aims to clarify the role of alternative NF- κ B in PCa cells by exploring, *in vitro* and *in vivo*, the effects of RelB overexpression on PCa biology.

Methods: Using a lentivirus-expression system, we constitutively overexpressed RelB or control GFP into 22Rv1 cells and monitored alternative transcriptional NF- κ B activity. *In vivo*, tumor growth was assessed after the injection of 22Rv1-derived cells into SCID mice. *In vitro*, the impact of RelB on 22Rv1 cell proliferation was evaluated in monolayer culture. The anchorage-independent cell growth of derived-22Rv1 cells was assessed by soft agar assay. Apoptosis and autophagy were evaluated by Western blot analysis in 22Rv1-derived cells cultured in suspension using poly-HEMA pre-coated dishes.

Results: The overexpression of RelB in 22Rv1 cells induced the constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway. *In vivo*, RelB expression caused a lag in the initiation of 22Rv1-induced tumors in SCID mice. *In vitro*, RelB stimulated the proliferation of 22Rv1 cells and reduced their ability to grow in soft agar. These observations may be reconciled by our findings that, when cultured in suspension on poly-HEMA pre-coated dishes,

22Rv1 cells expressing RelB were more susceptible to cell death, and more specifically to autophagy controlled death.

Conclusions: This study highlights a role of the alternative NF- κ B pathway in proliferation and the controlled autophagy. Thus, the interplay of these properties may contribute to tumor survival in stress conditions while promoting PCa cells growth contributing to the overall tumorigenicity of these cells.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed cancer and the second cause of cancer-related death in men in the United States (Siegel et al., 2012). Advanced or recurrent PCa are usually treated with androgen deprivation therapy (ADT). While the majority of patients will initially respond, a significant proportion will eventually become refractory to ADT. This castration resistant state of the disease is ultimately fatal. Despite numerous reported studies, there remains many unanswered questions regarding biological mechanisms of PCa progression and the parameters to predict disease progression (Pomerantz and Kantoff, 2007). Based on previous work reported by our group, and supported by others, nuclear factor kappa B (NF- κ B) appears to be a central molecular player in PCa progression and may represent a potential prognostic biomarker (Domingo-Domenech et al., 2005; Fradet et al., 2004; Ismail et al., 2004; Lessard et al., 2006a; Lessard et al., 2003; McCall et al., 2012; Ross et al., 2004).

NF- κ B is a family of transcription factors encompassing structurally related proteins characterized by their Rel-homology domain and that have to form dimers to be functional.

The RelA (p65), RelB and c-Rel proteins carry a transactivation domain. The p105 and p100 subunits are characterized by an ankyrin-repeat domain whose cleavage produces the p50 and p52 subunits, respectively. NF- κ B subunits dimers are retained inactive in the cytoplasm due to the binding with inhibitory proteins I κ B. Upon cell stimulation, the I κ B undergo proteasomal degradation and NF- κ B dimers translocate into the nucleus to transactivate their target genes. NF- κ B transduce its signal through two major pathways: the classical and the alternative. Activation of the classical NF- κ B pathway involves the proteasomal degradation of I κ B protein and the release of p65/p50 dimer. In the alternative pathway, p100 acts as an I κ B-like protein by retaining RelB/p100 dimer in the cytoplasm. The activation signal leads to p100 phosphorylation and its partial proteasomal degradation, thereby producing RelB/p52 dimers (Gilmore, 2006; Perkins, 2012). The cellular responses leading to the activation of either the classical or the alternative pathway depend on a variety of cytokines and cellular stress responses. While several receptors can initiate classical NF- κ B signaling, only TNFRSF (Tumor necrosis factor-receptor superfamily) can induce the alternative pathway activation (Sun, 2011).

While the classical pathway has been extensively studied and its involvement in tumorigenesis is well established, the alternative pathway has been less extensively studied. Studies have nonetheless associated the alternative NF- κ B pathway with increased tumorigenic potential. For instance, data from our group suggest that the nuclear distribution of the alternative NF- κ B subunits RelB and p100/p52 in tumor tissues of PCa patients correlates with an activation of the alternative NF- κ B pathway and potentially involved in PCa progression (Lessard et al., 2005). Moreover, RelB expression in LNCaP and PC3 PCa cell lines increase their ability to form tumors in a mouse model through the

modulation of IL-8 and PSA expression (Xu et al., 2012; Xu et al., 2009). In breast cancer, RelB stimulates cell proliferation (Demicco et al., 2005), invasion (Wang et al., 2007) and increases resistance to anti-cancer therapies (Holley et al., 2010; Mineva et al., 2009). While our understanding of the alternative NF- κ B pathway is growing, the cell mechanisms impacted by the alternative NF- κ B pathway within cancer cells remains to be further explored.

Here, we used the 22Rv1 PCa cell line to explore the role of RelB expression and the alternative NF- κ B pathway on cell functions. We derived 22Rv1 cell populations overexpressing RelB leading to a constitutively active alternative NF- κ B pathway. We found that RelB expression caused a lag in 22Rv1 cells tumor initiation, although overall tumor growth in SCID mice was not affected. Additional *in vitro* functional assays revealed that RelB reduced anchorage-independent cell growth in soft agar, but increased the proliferative potential of 22Rv1 cells in adherent conditions. We also demonstrated that RelB appeared to sensitize 22Rv1 cells to autophagy. This is the first report to suggest a regulatory effect of the alternative NF- κ B pathway on autophagy. The integration of our *in vitro* and *in vivo* results lead us to propose a model of RelB function during tumor initiation and progression in the xenograft mouse model.

MATERIEL & METHODS

Cell line and culture conditions

22Rv1 human prostate carcinoma epithelial cells were obtained from ATCC and cultured in RPMI-1640 complete media (Wisent, Montreal, Qc) containing 10% FBS (Fetal Bovine

Serum) (Wisent, Montreal, Qc), 2.5 µg/mL amphotericin B and 50 µg/mL gentamicin (Gibco, Grand Island, NY), at 37 °C with 5% CO₂. The 22Rv1 derivatives cells expressing GFP or RelB were grown under selection in RPMI-1640 complete media supplemented with 1.5 µg/mL of puromycin (Sigma, St. Louis, MO).

Lentiviral production and transduction

RelB (NM_006509, from OriGene, Rockville, MD, USA) was inserted in pENTR/D-TOPO (Invitrogen, NY, USA). The generated pENTR-RelB vector was recombined in the 670-1 vector (pLenti CMV/TO Puro DEST, Addgene 17293) (Campeau et al., 2009) using recombination-cloning technology from Invitrogen. The eGFP was used for control cell population and has previously been described elsewhere (Lafontaine et al., 2012; Rodier et al., 2009). Lentiviruses were produced by co-transfecting vectors containing RelB or eGFP cDNA and using the ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) in the 293FT packaging cell line. The lentiviral constructs were harvested from cell supernatants, concentrated by ultracentrifugation (20,000 rpm) and stored at -80 °C until use. For viral infection, cells were plated in 6-well plates containing 2 ml of culture media and cultured until 50-70% confluence. Infections were performed in RPMI 1640 media containing 5 µg/ml polybrene (Sigma, St. Louis, MO). Culture media was changed 16 hrs after the infection and puromycin selection was performed two days post-infection.

Xenograft tumor assays

Six week old male SCID CB17 mice (Charles River, Montreal, QC, Canada) were injected subcutaneously with 2.5×10^5 cells resuspended in a mix of 1:1 PBS 1X and matrigel (BD

Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Six mice were used for each experimental group. Controls included one group of mice injected with a mixed population of 22Rv1-GFP cells and another with a clonal population of 22Rv1-GFP cells. Three other experimental groups were injected with three independent 22Rv1-RelB clonal populations. Data on the weight of the mice and dimensions of the tumors were collected twice a week. Mice were housed under sterile conditions during all experimentations and were sacrificed when neoplastic lesions reached the limit point (2500 mm³) established by the Institutional Committee on Animal Protection (ICAP) according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC). The tumors were then harvested, fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE tissues) for subsequent histological analyses.

Immunohistochemistry

The 22Rv1-induced tumors and 22Rv1 cells were stained by immunochemistry to monitor RelB expression, as previously described by our group (Le Page et al., 2006). *In vitro*, cells were cultured directly on sterile slides to reach 70-80% of confluence. After two washes with 1X PBS, they were fixed for 20 min in formalin (ACP Chemicals Inc., Montreal, QC, Canada) before a 15 min blocking step with serum-free blocking reagent. Subsequent steps were the same for FFPE tissues and cells samples.

Anti-RelB antibody (C-19, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa-Cruz, CA, USA) was used at a dilution 1:500 (FFPE tissue samples) or 1:750 (cell samples) in 1X PBS. Substitution of the primary antibody with 1X PBS served as a negative control.

Protein extraction and immunoblotting analyses

For total protein extracts, cells were lysed with cold lysis buffer for 30 min on ice [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM NaF, 0.5% NP-40, 10 mM sodium orthovanadate/complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada)]. The cytoplasmic/nuclear extracts were prepared as previously described by our group (Lessard et al., 2007). Protein extracts were analyzed by Western blot using SDS-polyacrylamide gels (10 or 12.5%) and transferred onto nitrocellulose membranes (Biorad), and signal was revealed using ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Membranes were probed with anti- β -Actin antibodies as a loading control. GAPDH was used as a purity indicator for nuclear extracts. The antibodies used for protein expression analyses were: anti-RelA (sc-8008), anti-RelB (sc-226), anti-PARP-1/2 (sc-7150) antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA); anti-p100/p52 (05-361) (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA); anti-LC3 (NB100-2220) (Novus biological, Oakville, ON); anti-GAPDH (AB9485-100) and anti- β -Actin (AB6276-100) (Abcam, San Francisco, CA).

Immunoprecipitation of RelB

Protein samples were incubated with protein A/G agarose (sc-2003, Santa-Cruz Biotechnology Inc) and normal rabbit IgG (sc-2027, Santa-Cruz Biotechnology.inc) for a pre-clearing step. *ImmunoCruz™ IP/WB Optima F System* (sc-45043, Santa-Cruz Biotechnology Inc) was used for immunoprecipitations. The matrix (25 μ L / sample) and anti-RelB (1 μ g / sample) antibody were pre-incubated in 1X PBS for antibody / matrix complex formation required for subsequent steps. Pre-cleared protein samples (250 μ g)

were then incubated with 500 μ L of matrix / anti-RelB complexes overnight at 4°C to precipitate RelB protein. The immunoprecipitated fraction was washed with cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT/1 mM NaF/10 mM sodium orthovanadate / protease inhibitor cocktail). Immunoprecipitated proteins still associated with matrix were then denatured prior to loading for Western blot analyses as described above.

NF- κ B gene reporter assay

The transcriptional activity of NF- κ B was addressed using a Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI). The p3enh- κ b-CONAluc, carrying a *Firefly* luciferase gene downstream of the κ B consensus sequence trimer, was used as previously described (Le Page et al., 2005). The phRL-CMV vector used as internal control contains the CMV promoter upstream of a synthetic *Renilla* luciferase gene (Promega, Madison, WI).

The 22Rv1 cell lines, either wild type (WT), RelB or GFP transduced, were co-transfected with p3enh- κ b-CONAluc and phRL-CMV reporter vectors. The *Firefly* and *Renilla* luciferase luminescence were measured 48 hrs post-transfection. The relative NF- κ B transcriptional activity was expressed according to the ratio of luciferase activity in the samples under study (RelB and GFP expressing cells) normalized against 22Rv1 WT control cells values. The experiment was repeated three times.

Soft agar assay

The ability to grow in anchorage-independent conditions was assessed by culturing 22Rv1 cells in soft agar. Cells were trypsinized, suspended in 0.33% agar in RPMI 1640 complete

media and plated in 6-well plates pre-coated with 0.66% agar. Cells were then incubated in soft agar for two weeks at 37°C and 5% CO₂. Cell culture media was added weekly. The colonies were photographed and manually counted after coloration step with 0.1% crystal violet in 2% methanol. Three independent experiments in duplicate were performed.

Cell growth assay

A total of 1×10^5 cells were seeded onto 6-well plates at day 0. Starting at day 1, we counted the cells every 48 hrs until day 9 using the *CASY Model TT cell counting* device (Roche Innovatis AG, Basel, Switzerland). Each experiment was performed in duplicate and repeated three times.

Suspension culture and cell death assay

Tissue culture plates were coated with poly-2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA) (Sigma, St. Louis, MO). The poly-HEMA solution (20 mg/mL) was dissolved at 65°C in 95% ethanol under stirring condition. Plates underwent two coating steps with poly-HEMA before use. After rinsing the wells with 1X PBS, 2×10^3 (96-well plates for apoptosis assay) or 2×10^5 (6-well plates for protein extraction) cells were plated and cultured for seven days. The cell death rate was determined using the CytoTOX-Glo bioluminescent cytotoxicity assay according to manufacturer instructions (Promega Inc, WI, USA). Bioluminescence was read using a *Wallac 1420 multilabel counter* (PerkinElmer, Turku, Finland).

Statistical analysis

The Anova one-way followed by Tukey's post-test was used for multiple comparisons, while Mann-Whitney U-test was used for comparison of one variable between two groups. The Kruskal-Wallis test was used for comparisons of multiple variables, at each time point for an experiment, and between different groups. All statistical tests were carried out using SPSS 16.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). *P*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Exogenous RelB expression in 22Rv1 cells induced the activation of the alternative NF- κ B pathway.

We performed Western blot analysis to confirm the RelB expression profile in 22Rv1 PCa cells (Fig.1A). Based on a lentiviral expression system, we derived three independent clonal populations (C1, C2 and C3) of 22Rv1 cells that efficiently overexpressed RelB at different levels (low, medium to high expression in C1, C2 and C3 clones respectively) (Fig.1A-B). Using this lentiviral system, we also derived two GFP control populations, one polyclonal population (MP) and one independent clonal population (clone), which did not express exogenous RelB (Fig.1A-B). By immunocytochemistry, RelB expression appeared homogenous in the C2-RelB and C3-RelB clonal populations but not in the C1-RelB clone where we observed many cells with a very weak staining (Fig.1B).

We tested the functionality of exogenous RelB in 22Rv1 cells by assessing its sub-cellular distribution and its association with other NF- κ B subunits. By immunohistochemical

assays on cultured cells, RelB distributed into both cytoplasmic and nuclear cell compartments in C1, C2 and C3 populations thereby suggesting a constitutive activation of the alternative pathway (Fig. 1B). As expected, RelB was not detected in 22Rv1 GFP control cells (Fig.1B). Western blot analyses of fractionated cell extracts confirmed that RelB was distributed in both cytoplasmic and nuclear compartments of 22Rv1-RelB clones (Fig.2A). The principal molecular partners of RelB, p100 and p52, were also localized in both cell compartments of 22Rv1-RelB clones C1, C2 and C3 and in the GFP control populations (Fig.2A). Conversely, we noted that the main NF- κ B subunit of the classical pathway, p65, was only cytoplasmic (Fig.2A). Immunoprecipitation assays showed a physical interaction between RelB, and both p100 and p52 in the cytoplasm. In the nuclear compartment, only p52 appeared physically linked to RelB, thus formed RelB/p52 dimers (Fig.2B). The presence of RelB / p52 in the nuclear compartment suggested a constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway, whereas the absence of nuclear p65 indicates a lack of classical NF- κ B pathway activation.

We further measured NF- κ B transcriptional activity by a luciferase gene reporter assay. We observed a significantly higher NF- κ B transcriptional activity in the 22Rv1-RelB clones than in GFP control populations (Fig.2C). Since the classical NF- κ B p65 subunit was not nuclear in 22Rv1 cells, our data suggest that the increased κ B transactivation in RelB clones was exclusively due to the alternative NF- κ B activity. Together, these observations illustrate that the exogenous RelB expression induced an efficient activation of the alternative NF- κ B pathway in transduced 22Rv1 cells.

RelB caused a lag the tumor growth of 22Rv1 cells in mice.

To assess the impact of RelB on the tumorigenicity of 22Rv1 cells *in vivo*, we performed subcutaneous injections of 22Rv1-RelB clones or 22Rv1-GFP cells into SCID mice and monitored the rate of tumor growth (Fig.3). Our data showed that RelB expression in C2-RelB and C3-RelB cells increased significantly the time of tumor initiation compared to GFP-control cells. Indeed, at day 23 post-injection, we observed that the size of GFP control mixed population (MP) tumors reached $453.46 (\pm 88.97) \text{ mm}^3$ while the sizes of C2-RelB and C3-RelB tumors were $101.37 (\pm 12.53)$ and $171.37 (\pm 43.88) \text{ mm}^3$, respectively ($P < 0.05$, Kruskal-wallis test). In contrast, we noted that C1-RelB tumors grew similarly to the GFP clone control tumors (Fig.3A).

To confirm the expression of RelB in the xenografts we performed histological analyses of harvested tumors. Immunohistochemical assays showed that RelB expression was maintained in C2-RelB and C3-RelB tumors (Fig.3B). C1-RelB tumors have only a few scattered cells expressing RelB and the overall RelB expression appeared very low as observed with *in vitro* cultured C1-RelB 22Rv1 cells (Fig.1). As expected, there was no RelB expression in the control GFP tumors (Fig.3B). RelB expression in C2- and C3-RelB tumors was respectively moderate and strong, as observed by immunoblot and immunocytochemical assays of cultured 22Rv1 clones (Fig.1).

The observed lag in tumor growth of C2-RelB and C3-RelB xenografts was mainly observable during the first phase of tumor formation (i.e. the first 23-34 days post-injection) corresponding to the tumor initiation phase (Fig.3A). Indeed, C2- and C3-RelB tumors reached a size of 500 mm^3 in $38 (\pm 1.34)$ and $37.5 (\pm 1.74)$ days respectively, while endpoints (2500 mm^3) were reached in $26.2 (\pm 2.67)$ and $31.2 (\pm 1.5)$ days for the GFP

control tumors (MP, clone), and in $29.7 (\pm 0.9)$ days for C1-RelB xenografts (Fig.3C). The difference in the initial tumor growth rate between 22Rv1 RelB xenografts (C2 and C3) and MP GFP control was statistically significant ($P < 0.001$, Tukey's test). Due to one extreme value in GFP clone group, the difference with C2- and C3-clones tumors was not significant (GFP clone / C2: $p = 0.065$; GFP clone / C3: $p = 0.078$). The statistically significant variation in 22Rv1-RelB tumors between C2 or C3 and C1 that weakly expressed RelB (Fig.3B) supported the role of RelB in the tumor growth rates (respective comparison C1 / C2 and C1 / C3; $P = 0.019$ and $P = 0.021$, Tukey's test) (Fig.3C).

Once 22Rv1-induced tumors reached 500 mm^3 , their growth rates increased notably and did not vary significantly between different groups except for C3-RelB tumors ($P < 0.05$ compared to all others groups, Tukey's test). Whereas C1-, C2- RelB clones and GFP control tumors took 9.8 to 15.3 additional days to reach 2500 mm^3 , C3-RelB tumors required 20.2 days ($P < 0.05$, Tukey's test) (Fig.3D). Nevertheless, at the end, all 22Rv1 cells, including the C3-RelB clone, induced an important tumor growth (Fig.3A). This observation suggested that RelB expression did not inhibit the tumor growth despite the lag in the initial phase of 22Rv1 tumor formation. Together, these results suggest that the overexpression of RelB caused a lag in tumor initiation without affecting the overall tumor growth.

RelB stimulated proliferation but inhibited the anchorage-independent growth of 22Rv1 cells.

The *in vivo* observations on tumor initiation and progression led us to explore different *in vitro* cell processes to better understand the impact of RelB in PCa cells. We first assessed

the anchorage-independent cell growth of 22Rv1 cells and the effect of RelB expression in a soft agar assay. The 22Rv1-RelB clones formed an average of 2.3 to 3.4 fewer colonies than the GFP control cells (MP and clone), ($P < 0.001$, Mann-Whitney U test) (Fig.4A, B). Thus, RelB expression in 22Rv1 cells decreased their ability to grow independently to anchorage with extracellular matrix.

Because the anchorage-independent cell growth is tightly related to cell proliferation, we also addressed the impact of RelB on proliferation rate of 22Rv1 cells cultured in monolayer. We performed a cell counting assay using the RelB clones (C1, C2 and C3) and GFP control cells. Surprisingly, from day 5 of cell culture until the end of the assay, we observed a significant increasing of cell proliferation of the three 22Rv1-RelB clones compared to GFP control cells ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test) (Fig.4C) indicating that RelB expression stimulated the proliferation of 22Rv1 cells in monolayer conditions. Altogether, these results suggest that the RelB-induced inhibition of anchorage-independent cell growth was not caused by an inhibition of the cell proliferation.

RelB increased susceptibility of cells to undergo cell death

The anchorage-independent cell growth is a cell process dependent on the ability to proliferate while resisting cell death induced by the loss of cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions (Taddei et al., 2012). We thereby addressed whether RelB had an effect on cell death induced by the loss of anchorage to ECM, which might explain their reduced growth in soft agar (Fig.4). To do so, we cultured 22Rv1-derived cells in suspension (Fig.5A) to mimic anchorage-independent cell growth conditions and used adherent conditions as controls. Under adherent conditions, 22Rv1 RelB clones underwent

slightly more cell death ($0,040 - 0,048 \pm 0,001 - 0,003$) compared to GFP control cells ($0,030 - 0,031 \pm 0,001 - 0,004$) (Fig.5B; white bars: $P < 0.05$, Mann – Whitney U test). Furthermore, under non-adherent conditions, we observed that RelB increased dramatically the rate of cell death by 2.5 - 3 fold in 22Rv1-RelB clones ($0,232 - 0,307 \pm 0,054 - 0,057$) compared to the GFP control cell populations ($0,089 - 0,090 \pm 0,006 - 0,017$) (Fig.5B; black bars: $P < 0.05$, Mann – Whitney U test).

It is known that in response to the loss of link with ECM, cells undergo caspase-dependent apoptosis, also known as anoikis (Chiarugi and Giannoni, 2008; Taddei et al., 2012). To characterize the cell death mechanisms involved in our model, we first assessed PARP (Poly-ADP-Ribose polymerase) cleavage (from p116 to p85), a commonly used caspase-dependent apoptosis marker on 22Rv1 cells cultured in suspension. Under suspension cell culture conditions, we did not observe any p85 PARP fragment in 22Rv1-RelB clones comparatively to 22Rv1-GFP control cells where p85 PARP was detected (Fig.5C). The absence or very low level of PARP cleavage in 22Rv1-RelB cells indicated that, despite an increase cell death ratio (Fig.5B), 22Rv1-RelB clones underwent a low rate of apoptosis.

The loss of anchorage can also trigger compensatory mechanisms to overcome anoikis. Autophagy has been described as an alternative mechanism that can be triggered after matrix detachment of adherent cells (Guadamillas et al., 2011; Horbinski et al., 2010). We explored the possibility that RelB could regulate autophagy after loss of anchorage to ECM by analyzing the LC3 protein, whose conversion from cytoplasmic LC3-I to autophagosomal LC3-II is a specific marker of autophagy (Kabeya et al., 2000). As shown in Figure 5C, under suspension cell culture conditions, we observed LC3-I conversion into LC3-II in 22Rv1-RelB clones when compared to GFP control cells indicating that

expression of RelB sensitized 22Rv1 cells to autophagy. These observations also suggest that RelB could protect 22Rv1 cells against anchorage-dependent apoptosis by triggering autophagy. *In vitro*, the observed autophagy might ultimately induce 22Rv1 cell death due to the length of the assay without restoring adherent conditions (7 consecutive days under suspension culture conditions).

DISCUSSION

Our previous study regarding the expression profile of different NF- κ B subunits in PCa tissues from patients illustrated the nuclear localization of alternative NF- κ B subunits RelB and p52, thereby suggesting a potential activation of the alternative NF- κ B pathway (Lessard et al., 2005). These results led us to further investigate the role of the alternative NF- κ B pathway in PCa.

Different cell lines are currently used as models to study PCa and can be classified according to their response to androgen stimulation and their castration-resistance status. Previous studies on the NF- κ B alternative pathway in PCa used the PC3 and LNCaP cell lines (Xu et al., 2012; Xu et al., 2009). PC3 is a castration-resistant cell line with a high metastatic potential whereas LNCaP is an androgen-dependent non-metastatic cell line (Dumont et al., 1993; Stephenson et al., 1992). Both PC3 and LNCaP have a constitutive NF- κ B activity. Indeed, in PC3 cells classical and alternative NF- κ B pathways are strongly and constitutively activated (Le Page et al., 2005). In contrast, in LNCaP cell line the classical NF- κ B pathway is moderately active compared to PC3, whereas the alternative NF- κ B activity is low, possibly due to the low levels of the alternative NF- κ B subunit

RelB, which can nonetheless be induced by a TNF- α stimulation (Lessard et al., 2007). Despite the fact that PC3 and LNCaP cell lines are currently used to study the functions of the NF- κ B pathways in aggressive or non-aggressive PCa context, the constitutive presence of classical NF- κ B activity could influence any interpretation on the effect of alternative NF- κ B pathway in these cell lines. Just like the most differentiated prostate tumors derived LNCaP cells, 22Rv1 can respond to androgen stimulation (androgen-sensitive). The 22Rv1 cells can also grow in hormone-depleted conditions as the castration-resistant PC3 cells (Sramkoski et al., 1999). Like LNCaP cells, the 22Rv1 cell line has no basal alternative NF- κ B activity, due to very low basal level of RelB expression. However, 22Rv1 have also the particularity to lack the classical NF- κ B pathway as opposed to LNCaP cells (Lessard et al., 2007; Peant et al., 2007). These last characteristics make 22Rv1 cell line a particularly interesting model to study the alternative NF- κ B pathway, with no interference of the classical NF- κ B activity found in other common PCa cell lines. Therefore, in the present study we used the 22Rv1 cell line to specifically analyze the alternative NF- κ B pathway and to define its role in tumorigenesis of PCa.

Our *in vivo* experiments with RelB transduced 22Rv1 PCa cells demonstrated that RelB expression caused a lag in tumor initiation, but only weakly affected the tumor growth rate once tumors had reach a volume of 500-mm³. *In vitro* results showed that RelB expression decreased the anchorage-independent growth of 22Rv1 cells, which correlated with the lag of tumor initiation of RelB-expressing xenografts. Indeed, cells lose cell-matrix attachment when they are trypsinized and suspended in a semi-solid environment at the time of injection, a condition that could mimic the stress cells undergo in the *in vitro* soft agar

assay. In accordance with these results, we observed that in prolonged anchorage-independent culture conditions RelB promotes cell death through autophagy.

The lag in the tumor initiation observed with RelB-22Rv1 cells is in contrast with previous studies reporting that LNCaP xenografts expressing RelB grow faster than the parental LNCaP cells (Xu et al., 2012; Xu et al., 2009). Furthermore, LNCaP cells overexpressing RelB have an increased ability to grow in anchorage-free conditions (McCall et al., 2012). These contrasting results suggest that the effect of RelB is highly contextual, and also suggest the interplay of several critical regulators of cell growth and death in PCa cell lines. Considering the different molecular phenotypes of both cell lines, the observed differences with 22Rv1 cells brings supplemental information as to the impact of RelB on PCa cell biology. Several molecular mechanisms are involved in the resistance to anoikis of tumor cells, including survival signaling driven by PI3K and NF- κ B pathways, the expression of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, and the hyperactivation of tyrosine kinase receptors such as EGFR and ErbB2 (Taddei et al., 2012). LNCaP cells constitutively present a strong basal PI3K activity, as observed by the phosphorylation of Akt compared to 22Rv1 cells (Skjoth and Issinger, 2006). The overexpression of RelB in these contexts may also promote distinct pro- or anti-survival pathways that make LNCaP and 22Rv1 cells behave differently during tumorigenesis.

To date, several reports have described how autophagy can impact NF- κ B signaling by inducing the degradation of IKK (Inhibitor κ B kinases) and NIK (NF- κ B-induced kinase), upstream regulators of both the classical and alternative NF- κ B pathways (Xiao, 2007). Furthermore, it is also reported that the classical NF- κ B pathway (p65 subunit) can regulate autophagy through the transcription of target-genes such as BECN1, coding for

Beclin-1, an important protein involved in autophagy signaling (Copetti et al., 2009a; Copetti et al., 2009b; Nivon et al., 2009). This is the first study to show a role of the alternative NF- κ B pathway as an upstream regulator of autophagy. Our results support the notion that, in absence of the classical NF- κ B signaling, the alternative pathway could compensate by modulating the expression of target-genes specifically involved in autophagy and thereby regulate autophagy processes in certain stress conditions.

Many studies have demonstrated a link between autophagy and cancer (Hippert et al., 2006). Based on its dual roles in survival and cell death, autophagy's impact in tumorigenesis is still difficult to establish and may depend on the cancer cell microenvironment (Eskelinen, 2005; Ferraro and Cecconi, 2007; Hippert et al., 2006). For adherent epithelial cells such as 22Rv1, the loss of anchorage with ECM constitutes to a loss of growth signals transduced through integrin/src signaling, inducing a stress able to trigger autophagy (Desgrosellier et al., 2009; Zhong and Rescorla, 2012). Normally, the loss of cell anchorage with ECM induces anoikis (Chiarugi and Giannoni, 2008; Desgrosellier et al., 2009). We observed that the parental 22Rv1 cells appear to be resistant to the apoptotic cell death associated with anoikis, as suggested by their robust growth in the soft agar assay (Fig.4). The failure of RelB overexpressing 22Rv1 cells to efficiently grow in soft agar may reflect a cell protective response where autophagy is induced to promote cell survival but at the expense of cell growth.

For the *in vivo* assays, 22Rv1 cells were suspended in a semi-solid matrigel solution that mimics a low anchorage environment. In these conditions, we propose that, in the initial steps, autophagy would be preferentially triggered in 22Rv1-RelB expressing cells. Through this pathway, the tumor-initiating cells would be maintained in dormancy until

anchorage in the mouse ECM is initiated and optimal cell growth conditions are restored. This would correspond to the observed lag during the *in vivo* assay. This longer tumor initiation step would be followed by 22Rv1-RelB cell proliferation leading to tumor formation. The fact that the tumor growth rate becomes similar between 22Rv1-RelB and 22Rv1 GFP control xenografts once tumor size reached 500 mm³ supports this notion. Thus, we propose the model in Figure 6 to explain dual RelB roles in tumorigenesis of PCa in mice. By inducing autophagy in 22Rv1 cells RelB provides an alternative protective process against anchorage free conditions allowing cells to integrate mouse ECM. By transposing this model to the human PCa context, RelB could be involved in the metastatic process and protect cells during their transit towards metastatic sites.

The current study highlights the tumorigenic potential of the alternative NF- κ B pathway in PCa cells. While previous reports show that RelB could intervene in potential tumorigenic cell processes as proliferation, invasion and resistance to several anti-cancer therapies, this is the first study to show that the alternative NF- κ B pathway can regulate autophagy in an anchorage-free assay. This new function associated with the alternative NF- κ B signaling brings additional knowledge about the tumorigenic mechanisms involved in progression of PCa. Supplemental studies are necessary to define the molecular actors involved in the autophagy regulated by the alternative NF- κ B pathway.

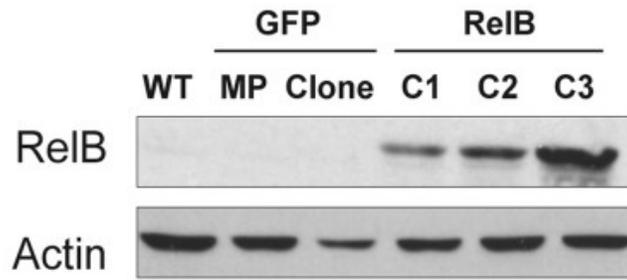
AUTHOR'S CONTRIBUTION

IL designed the study, carried out all cell biology experiments and drafted the manuscript. AP produced the plasmid constructs. JL carried out the lentiviral infection. AP and JL had an equivalent contribution in the current study. ND carried out the selection of clonal cell populations. PG participated in the design of the study. CLP participated to draft the manuscript. FD and AMM conceived of the study and participated in its coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Eric Campeau who generously provided all vectors for cloning and lentivirus production. We are also grateful to Kim Leclerc-Desaulniers for her technical assistance with mice. And finally, we thank the funding sources that supported this work: the University of Montreal Endowed Chair in Prostate Cancer Research and the Canadian Urologic Oncology Group (CUOG)-AstraZeneca Fellowship Award.

A.



B.

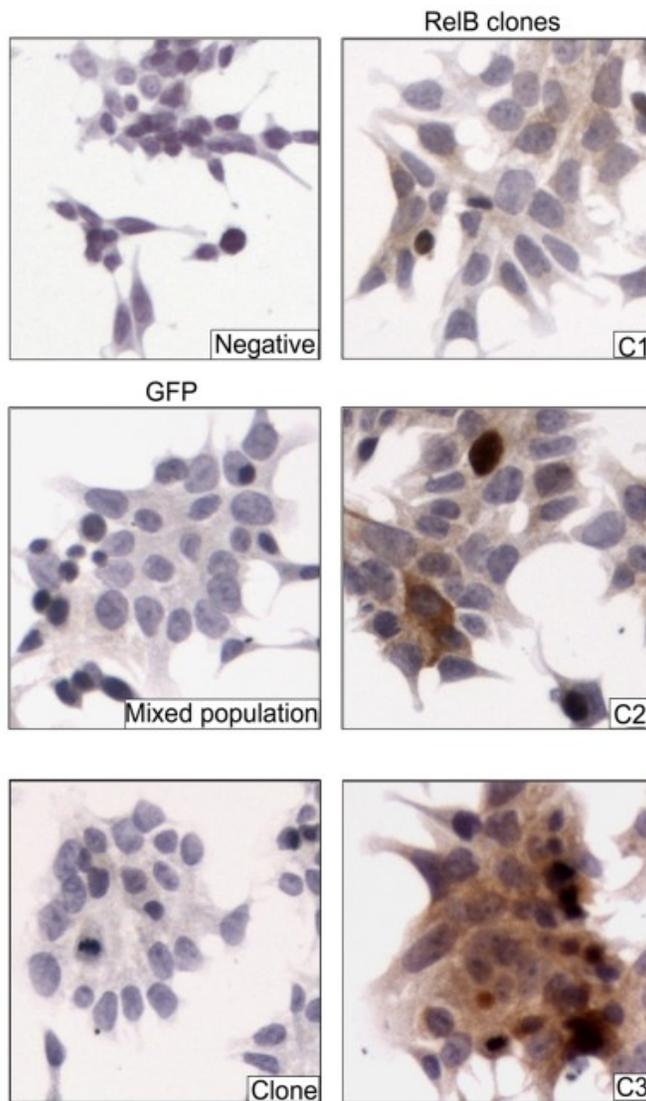


Figure 1: RelB expression profile in 22Rv1-derived cells.

Figure 1: RelB expression profile in 22Rv1-derived cells. **A)** RelB immunoblotting from whole protein extracts of wild type (WT) and transduced (RelB, GFP) 22Rv1 cells. **B)** Immunohistochemical staining of RelB on 22Rv1-derived cells: RelB clones (C1, C2, and C3) and GFP control cells (mixed population and clone). In the negative control, 1X PBS replaced RelB antibody.

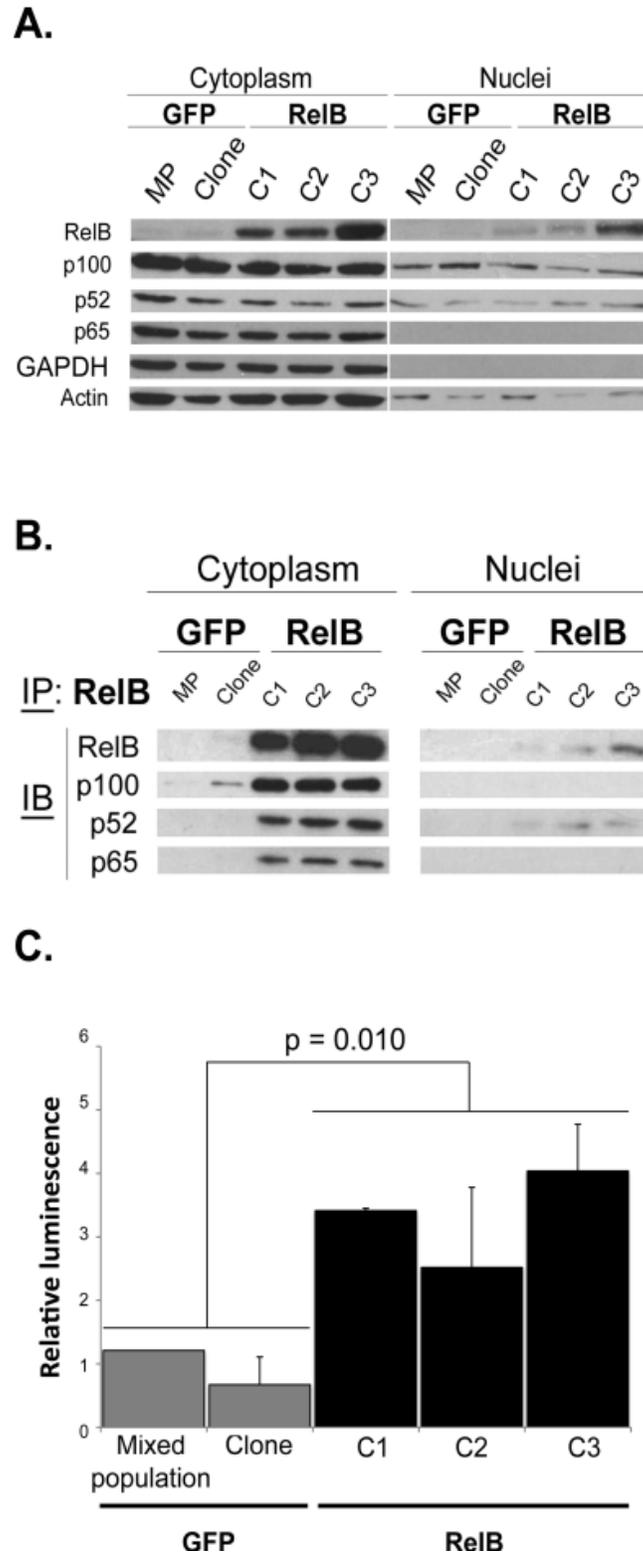


Figure 2: RelB sub-cellular localization and alternative NF- κ B activity in transduced 22Rv1 cells. **A)** Cellular distribution of the main NF- κ B subunits analyzed by immunoblotting on protein extract of cytoplasmic and nuclear compartments from 22Rv1 RelB clones and 22Rv1 GFP control cells. Actin was used as loading control for both cytoplasmic and nuclear protein extracts whereas GAPDH was used as a purity indicator for nuclear protein extracts. **B)** Immunoprecipitation of RelB from cytoplasmic and nuclear compartments protein extracts from 22Rv1 RelB clones and 22Rv1 GFP control cells. Immunoblot analyses of p100, p52 and p65 were performed from immunoprecipitated RelB fraction. **C)** NF- κ B transcriptional activity by luciferase gene-reporter assay. 22Rv1 RelB clones and 22Rv1 GFP control cells were co-transfected with p3enh- κ B-CONAluc (Firefly luciferase) and pRL-CMV (Renilla luciferase). Normalized data represented for each 22Rv1 cell population were the luminescence ratio *Firefly luc/ Renilla luc*. Experiments were done three times in triplicate. Error bar represent the standard deviation of the mean and $p < 0.05$ was considered a significant variation (Mann- Whitney U test).

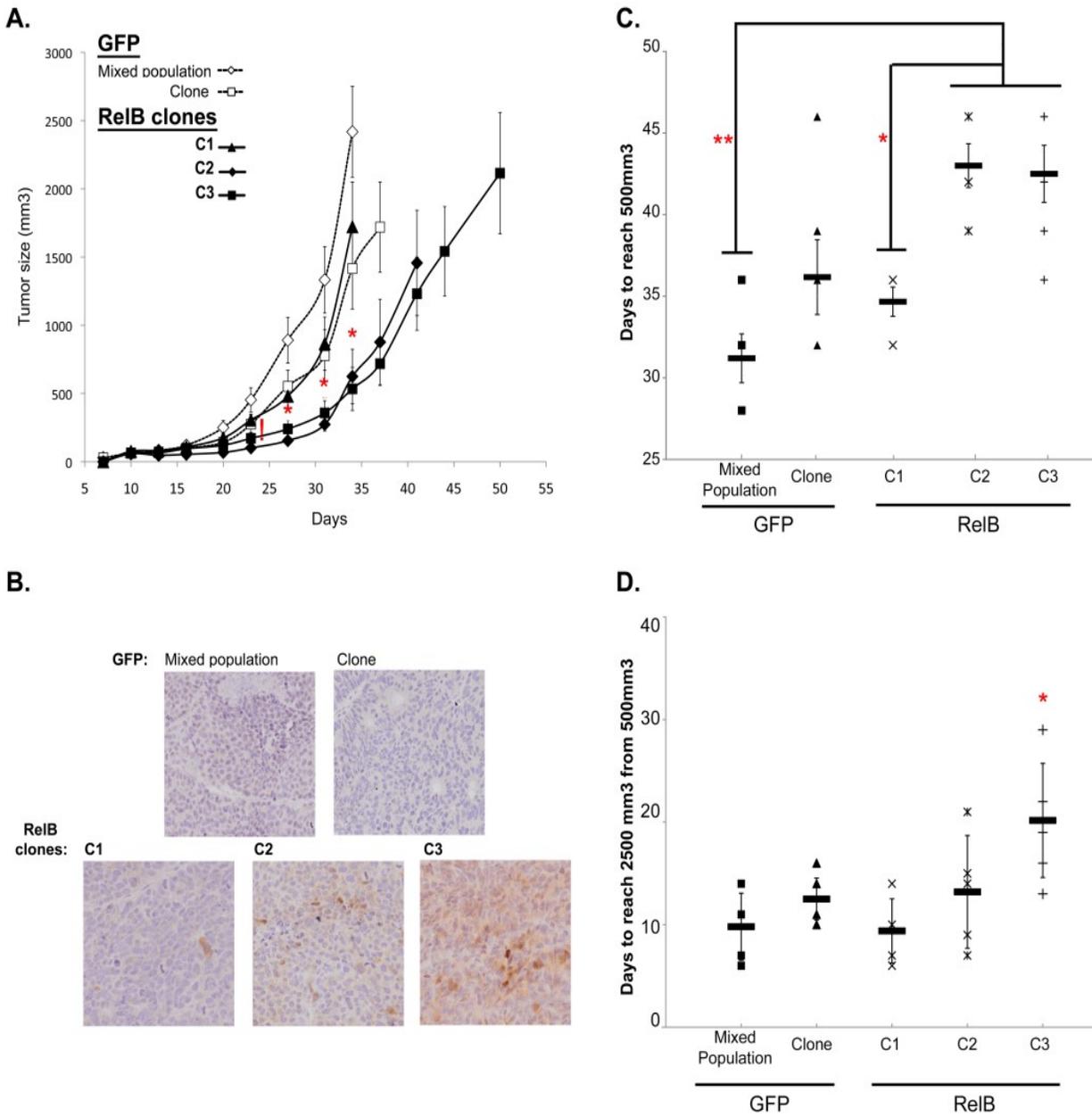


Figure 3: RelB expression effect on 22Rv1 induced-tumor formation in a SCID mouse model.

Figure 3: RelB expression effect on 22Rv1 induced-tumor formation in a SCID mouse model. Analysis of 22Rv1-induced tumor growth. 250,000 22Rv1 RelB or GFP cells suspended in matrigel solution (5mg/mL) were injected subcutaneously in the flank of 6-weeks old SCID mice. For each 22Rv1 cell population, 6 mice were injected. **A)** Tumor size was graphically represented across time. For each group of mice, the last point of the curve corresponds to the time of the first mouse sacrifice. Error bars represent the standard error of the mean. Significant variation between C2 and C3 RelB mouse groups individually compared to each GFP control and C1 RelB mouse groups is illustrated by (*) on graph whereas (!) represents a significant variation between C2 and C3 RelB mice individually compared to each GFP mixed population control group (Kruskal-Wallis test). **B)** Immunohistochemical staining of RelB illustrating its expression status on harvested 22Rv1-induced tumors. **C)** Time for 22Rv1-induced tumors to reach 500 mm³. On graph, (*) illustrated a p < 0.05; (**) p < 0.001. **D)** Time for 22Rv1-induced tumors to grow from 500 mm³ to 2500 mm³. (*) illustrated p < 0.05. Error bars represent the standard error of the mean (Anova one-way test followed by a Tukey post-test).

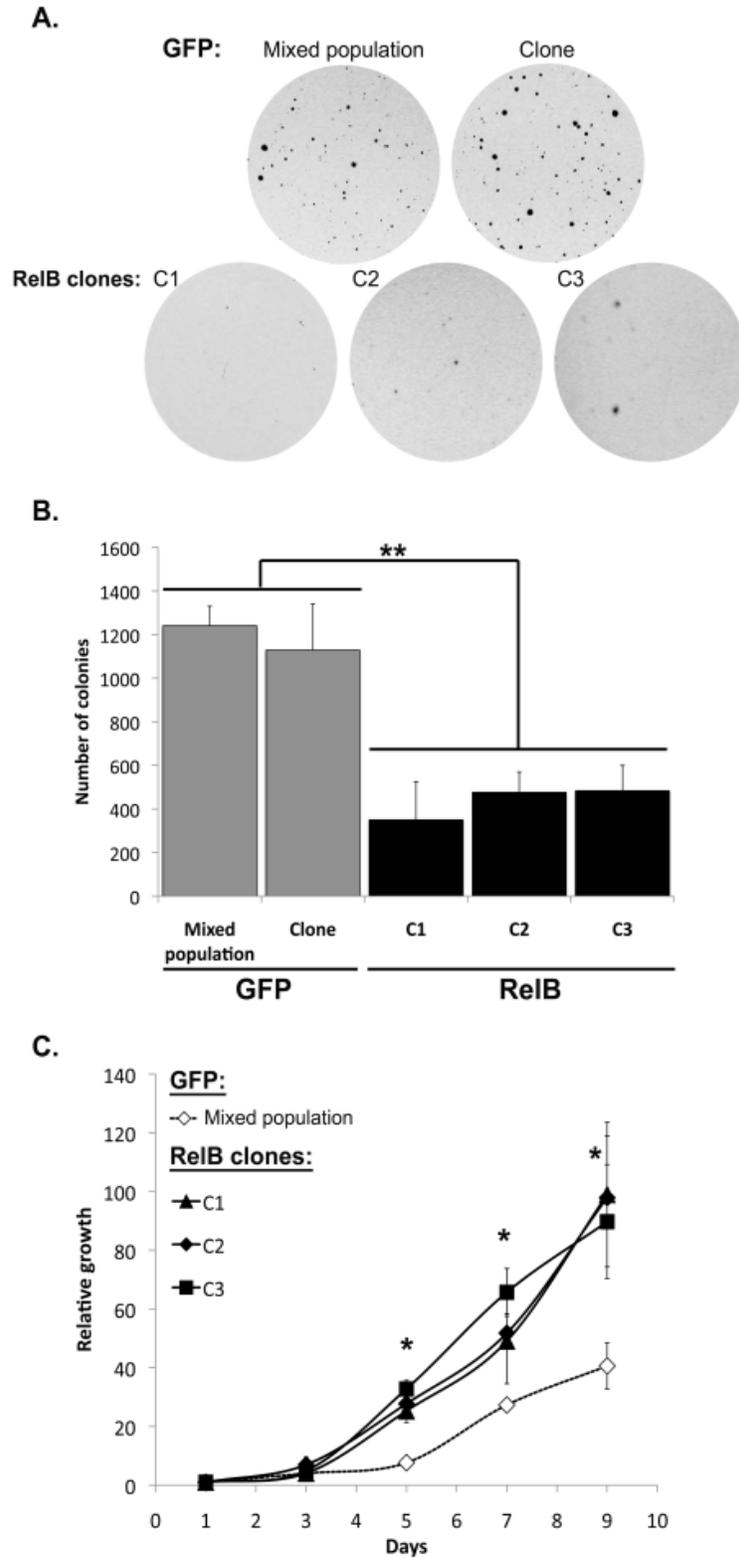


Figure 4: Effect of RelB expression on cell proliferation and anchorage-independent cell growth of 22Rv1 cells.

Figure 4: Effect of RelB expression on cell proliferation and anchorage-independent cell growth of 22Rv1 cells. **A)** Representative field of 22Rv1 colonies (macroscopic view) illustrating 22Rv1 RelB and GFP cells grown in soft agar. **B)** Soft agar growth assay. 22Rv1 cells were seeded in soft agar and incubated for 2 weeks. Colonies were stained with crystal violet. The graph represents the number of colonies in soft agar. Experiments were done three times in duplicate. Error bars represent the standard deviation of the mean and $p < 0.05$ was considered a significant variation (Mann-Whitney U test). **C)** Growth curves by cell counting. 22Rv1 RelB clones and GFP control cells were seeded at day 0. The first cell count was done at day 1 and after, cells were counted every 2 days until day 9 (10 days after cell seeding). The relative cell growth was obtained by normalizing data to the cell count of day 1. Experiments were done three times in duplicate. Error bars on the graph represent the standard deviation of the mean and we consider a $p < 0.05$ as significant variation (Anova one-way followed by Tukey post-test).

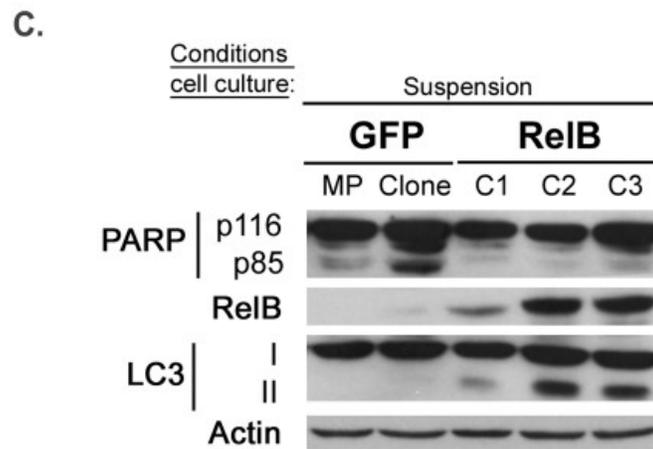
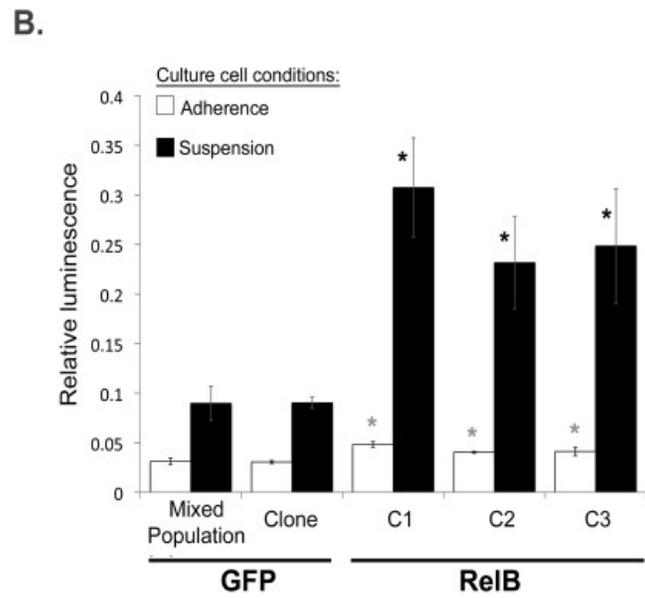
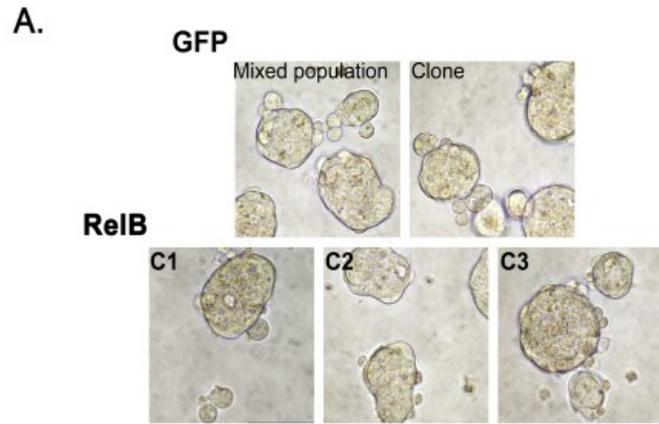


Figure 5: RelB effects on cell death of 22Rv1 cells.

Figure 5: RelB effects on cell death of 22Rv1 cells. **A)** Illustration of 22Rv1-derived cells cultured in suspension on poly-HEMA pre-coated plates. Representative fields at 200X magnification. **B)** Cell death evaluation in suspension cell culture of 22Rv1-derived cells. Cells were cultured 7 days in 96-well plates pre-coated with poly-HEMA or not (as controls). Cell death was evaluated by bioluminescence using the CytoTOX-Glo cytotoxicity assay. Data represents the ratio of basal cell death / total cell death after complete lysis with digitonin reagent. Cell death in suspension cell culture conditions are illustrated in black bars and adherence control cell culture conditions in empty bars. The variation was significant at $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test). (*) illustrates significant variations with both GFP control populations. Error bars represent the standard deviation of the mean. **C)** Immunoblot analyses of cell death from whole protein extracts of 22Rv1-derived cells following 7-day suspension cell culture RelB status, PARP cleavage (apoptosis) and LC3-I to LC3-II conversion (autophagy) were evaluated. Actin was used as loading control.

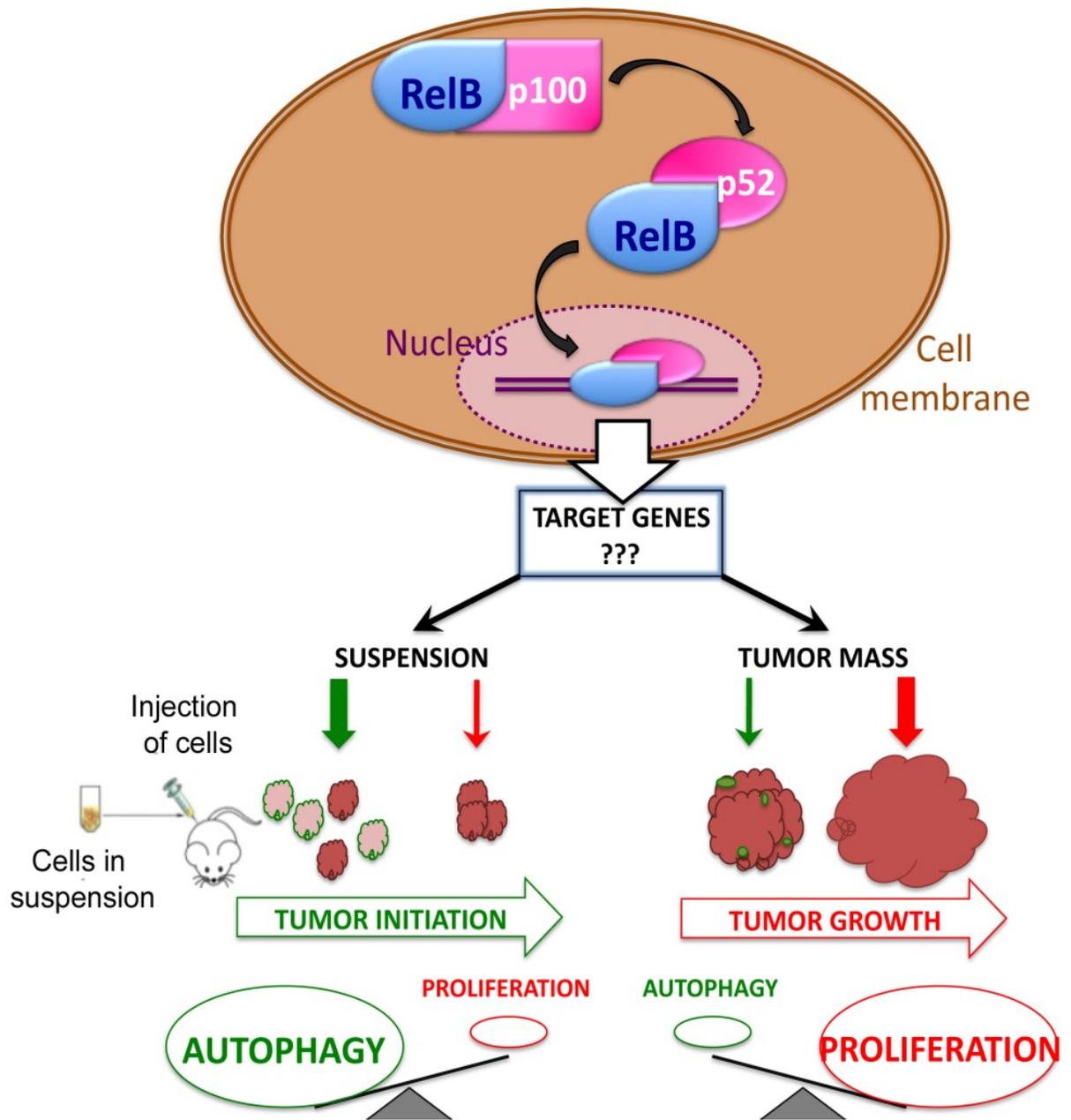


Figure 6: Model of RelB influence in 22Rv1 cells in xenograft assays.

Figure 6: Model of RelB influence in 22Rv1 cells in xenograft assays. In 22Rv1 cells, exogenous RelB induces the activation of alternative NF- κ B pathway, resulting in undetermined target-genes and specific cell responses. The tumor growth initiation *in vivo*, cells are suspended in semi-solid media, mimicking anchorage free conditions that trigger autophagy in the RelB expressing cells (green lined pink colonies). At this time there is a low proportion of proliferating cells (red colonies) and the balance autophagy / proliferation weighs in favor of autophagy. Triggered autophagy then protects 22Rv1-RelB cells from stress induced by suspension conditions until they recover optimal growth conditions once they anchored the murine ECM. The colonies continue to grow through cell proliferation and form the tumor mass (until 500 mm³ of tumor size) where adherent conditions predominate. From this time the balance autophagy / proliferation weighs in favor of proliferation resulting in increase of tumor growth rate.

Chapitre 2.

Étude conjointe des voies classique et alternative NF- κ B par immunofluorescence chez des patients atteints de cancer de la prostate

1. Article #2 : Résumé en français

Titre en français :

Analyse de co-expression des sous-unités NF-kappaB p65 et RelB chez des patients atteints de cancer de la prostate

Introduction: L'implication des signalisations classique et alternative NF- kappaB (NF- κ B) dans le cancer de la prostate (CaP) est maintenant largement acceptée. La sous-unité classique p65 est clairement impliquée dans la progression du CaP et associée à un mauvais pronostic pour les patients; alors que le rôle de la protéine alternative RelB n'est pas aussi bien défini. De précédentes études ont exploré chaque voie NF- κ B individuellement au sein de patients et à partir des modèles cellulaires sans explorer l'impact de leur expression conjointe. Dans la présente étude, nous étudions la co-expression des deux voies de signalisation NF- κ B, non seulement chez le même patient, mais aussi, sur le même échantillon de tissu, en vue d'analyser leur activation concomitante au sein de tissus de CaP et d'étudier la corrélation de leur expression au paramètres cliniques usuels.

Méthodes : Des échantillons de prostatectomies radicales fixés à la formaline et montés en bloc de paraffine (n = 300) ont été collectés et utilisés pour construire des microétalages de tissus (TMA = tissues microarray). Les expressions et distributions nucléaires de p65 et RelB ont été explorées simultanément par immunofluorescence. La fluorescence a été analysée à partir des images numérisées des différents TMAs. L'épithélium a été marqué grâce à un masque adéquat et puis coloré au DAPI. Les intensités moyennes de fluorescence associées à p65 et RelB ont été mesurées spécifiquement au niveau de l'épithélium et des noyaux qui y sont inclus.

Résultats: p65 et RelB sont préférentiellement exprimés au sein de l'épithélium prostatique. Bien que l'expression épithéliale de p65 soit significativement augmentée dans les tissus tumoraux ($p = 0,017$, T-test), sa distribution nucléaire moyenne est similaire dans les tissus de CaP et normaux adjacents. Les deux variables p65 seul et p65/RelB sont en corrélation avec la rechute biologique ($p < 0,05$, test de Pearson ; Kaplan Meier ; régression de Cox). En revanche, RelB ne corrèle avec aucun des paramètres clinico-pathologiques testés.

Conclusion/Impact: Nous avons mis au point des conditions permettant l'analyse simultanée des sous-unités classique et alternative NF- κ B dans le compartiment épithélial de tissus de CaP. Bien que nos résultats confirment le potentiel clinique de p65, nous avons également démontré que RelB ne possède pas de valeur pronostique sur la rechute biochimique et n'améliore aucunement le potentiel pronostique de p65 lorsqu'il est inclus dans un modèle multivarié.

2. Article #2 : Version originale en préparation

Co-expression analysis of p65 and RelB NF-kappaB subunits in prostate cancer patients

¹Ingrid Labouba, ¹Cécile Le Page, ¹Laudine Communal, ²Torbjoern Kristessen, ¹Xiaotian You,

¹Véronique Barrès, ¹Philippe O. Gannon, ^{1,3}Anne-Marie Mes-Masson and ^{1,4,*}Fred Saad

¹Institut du cancer de Montréal / Centre de recherche du Centre hospitalier de l'université de Montréal (CRCHUM), Montreal, Canada

²Visiopharm, Argen, Denmark

³Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada

⁴Division of Urology, CHUM and Department of Surgery, Université de Montréal, Montreal, Canada

Short title: p65 and RelB expression in prostate cancer tissues.

Key words: NF-kappaB, RelB, p65, prostate cancer, biochemical recurrence, prognostic biomarker.

ABSTRACT

Introduction: The implication of both classical and alternative NF-kappa B (NF- κ B) signaling in prostate cancer (PCa) is now widely accepted. The classical p65 subunit is clearly involved in PCa progression and associated with poor patient outcomes, while the role of RelB alternative protein is not as well defined. Previous studies explored each NF- κ B pathways individually in patient specimens and cellular models without exploring the impact of their simultaneous expression. Here we study the co-expression of both NF- κ B pathways, both in the same patient and on the same tissue sample, to define the concomitant activation of both NF- κ B pathways in PCa and correlate their expression with clinical features of the disease.

Methods: Radical prostatectomy formalin fixed and paraffin embedded samples (n=300) were collected and used to construct tissue microarrays (TMAs). Immunofluorescence was employed to concomitantly explore the nuclear localization of p65 and RelB. Immunofluorescent signals were analyzed from scanned images of each TMA. Epithelia were defined using an appropriate mask and were stained with DAPI. The mean fluorescence intensities associated with p65 and RelB within the epithelial area and the nuclear specific portion of this staining was measured.

Results: Both p65 and RelB are preferentially expressed in prostatic epithelium. While overall p65 expression was significantly increased in tumor tissues ($p = 0.017$, t-test), its mean nuclear distribution was similar in PCa cores and non-tumor cores. Both the variables p65 alone, and combined p65/RelB were correlated with biochemical recurrence (BCR) ($p < 0.05$, Pearson test; Kaplan-Meier; Cox regression). By contrast, RelB did not correlate with any clinico-pathological parameter tested.

Conclusion/impact: Here we define conditions that allow the simultaneous interrogation of classical and alternative NF- κ B family members in the epithelial compartment of PCa tissues. While our results confirm the BCR prognostic potential of p65, we also demonstrated that RelB by itself is not prognostic, nor does it improve the prognostic potential of p65 in multivariate analysis.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed cancer in Canadian men and is the third deadliest cancer in males after lung and colon cancers (Siegel et al., 2013). PCa is a cancer that can either progress slowly and stay localized within the prostate gland or progress aggressively beyond the prostate capsule leading to metastasis formation (Shen and Abate-Shen, 2010). While for some PCa patients, an active monitoring of the disease may be recommended, for others more radical treatments are required to control the PCa (Sartor et al., 2008; Van der Kwast and Roobol, 2013). Currently, all patients with localized PCa undergo surgery, radiotherapy and hormone-therapy as first line treatments (Fournier et al., 2004). However, despite the high success level obtained with these treatments, 25% of patients develop a biochemical recurrence (BCR) and progress to a more aggressive disease (Harris et al., 2009; Karantanos et al., 2013). Thus a major challenge in PCa is the discrimination of patients with a latent or low progressive disease from those with a more aggressive cancer in order to appropriately tailor treatment. To better stratify PCa patients by prognosis, the identification of specific molecular biomarkers able to predict outcome would represent an

important advancement over existing clinical tools. In this context, our group has been the first to address the prognostic value of the Nuclear Factor (NF)- κ B in PCa (Lessard et al., 2003).

The NF- κ B family includes five transcription factor proteins characterized by their Rel-homology domain and are subdivided into two groups. Proteins of the first group, named RelA (p65), RelB, and c-Rel, carry a transactivation domain. The second group contains p105 and p100 proteins that are characterized by an inhibitory C-terminal ankyrin-repeat domain. This domain is cleaved to create transcriptionally active p50 and p52 proteins respectively. Two major pathways define NF- κ B signaling: the classical pathway in which p65/p50, the main active dimer, is rendered inactive by I κ B inhibitors (I κ B α and I κ B β) and the alternative pathway with RelB/p52 as the active dimer. Normally, the activation of NF- κ B requires the activation of the I κ B-Kinase complex (IKK α , IKK β and IKK γ) by multiple signals including cytokine binding to cell surface receptors, DNA damage, hypoxic conditions, oxydative stress amongst others (Sun and Andersson, 2002). In the canonical pathway (IKK β -dependent), the IKK complex phosphorylates I κ Bs that are then ubiquitinated and degraded by proteasomes. In the non-canonical pathway (IKK α -dependent), the IKK complex regulates the processing of the p100 precursor. Subsequently, the NF- κ B complex translocates to the nucleus and activates the expression of specific target genes (Gilmore, 2006; Perkins, 2012). Although p65/p50 represents the main functional unit of the classical NF- κ B pathway, p65 also forms transcriptionally active dimers with p52. In the same way, RelB/p52 constitutes the main alternative functional unit, however, RelB can also dimerize with p50 resulting in other alternative NF- κ B functional units (Hoffmann et al., 2006).

Numerous molecular and biological functions such as inflammation (Hoesel and Schmid, 2013; Lawrence, 2009), angiogenesis (Tabruyn and Griffioen, 2007), survival,

migration, invasion (Sethi et al., 2008) are associated with NF- κ B nuclear factors. While significant work has focused on the study of the classical NF- κ B pathway, more recently attention has been directed on the alternative NF- κ B pathway, particularly in regards to its influence on inflammation. Despite their functional differences, members of the classical and alternative NF- κ B pathways have demonstrated a potential as biomarkers in PCa, although their respective and relative impact NF- κ B pathway on PCa cell biology and PCa progression still needs to be determined.

Our previous work implicates the classical NF- κ B pathway in PCa. We observed that elevated amounts of the nuclear NF- κ B subunit p65 is associated with aggressive PCa (Lessard et al., 2003). Subsequently, we showed that the nuclear localization of p65 is highly predictive of lymph node invasion (Lessard et al., 2006a) and could be associated with poor prognosis whether alone or in combination with activated form of ErbB/ NF- κ B/Akt (Koumakpayi et al., 2010). Finally, we, and other groups have highlighted the prognostic value of nuclear localization of p65 on the BCR of PCa patients (Domingo-Domenech et al., 2005; Fradet et al., 2004; McCall et al., 2012). These different observations make the NF- κ B subunit p65 a particularly interesting biomarker in PCa and led us to characterize the activation of other NF- κ B subunits in PCa patients. We then performed an immunohistochemical study of NF- κ B subunits to associate their expression and cellular localization in PCa tissues with various clinical parameters. The correlative analysis of the nuclear localization of NF- κ B subunits (p65, RelB, p50 and p52) showed that the percentage of double positive patients for RelB/p52 is higher than the double positive patients for p65/p50 (Lessard et al., 2005). These observations highlight the presence of the alternative NF- κ B pathway in PCa patients, and suggest its potential implication in PCa.

In the current study we describe a large-scale immunofluorescence (IF) study to assess the presence of both NF- κ B pathways in PCa patient samples. By simultaneously staining for p65 and RelB, we were able to score nuclei for the presence of either or both subunits at the cellular level. While confirming the prognostic potential of p65, our results show that RelB does not contribute to higher predictive values, either alone or in combination with p65.

MATERIAL AND METHODS

Cohort of patients

The current study was based on a cohort of 300 PCa patients whose paraffin-embedded primary prostate cancer specimens were used to construct tissue microarrays (TMAs). All patients had surgical intervention between 1992 to 2006 and provided informed consent. The criterion for this retrospective cohort study was the absence of treatment before the radical prostatectomy (RP). After a review of the clinical data, 21 patients were excluded from the study as they did not meet the inclusion criterion. The average patient follow-up was 107 months. BCR was defined based on a PSA relapse above 0.3 ng.ml^{-1} after date of surgery (RP). Recurrence-free interval was defined as the time between RP and the date of first PSA prostate specific antigen (PSA) increase above 0.3 ng.ml^{-1} . The final staging, grading and histological diagnosis was based on the clinical pathology report from the Hopital Notre-Dame, (Montreal, QC, Canada). Ethics approval was obtained from the appropriate review body (Comité d'éthique de la recherche du CHUM). The main clinical parameters of the cohort are listed in Table 1.

Tissue microarrays (TMAs)

From formalin fixed paraffin embedded (FFPE) human tissue samples, tumor areas were selected based on reviews of hematoxylin/eosin (H/E) -stained slides by a pathologist. FFPE tumor blocks were then biopsied using a 0.6 mm diameter tissue arrayer and resultant cores were arrayed into a grid in a recipient paraffin block. All patients were distributed on three TMAs in an amount of 100 per TMA. Each TMA was produced in duplicate and contained, per patient, one core of tumor sample and one core of normal prostatic glandular tissue. These TMAs were then sectioned, stained by H/E and immunohistochemistry (IHC) of high molecular cytokeratin (HMCK) and underwent an independent pathology review to confirm the histology of each core.

Immunohistochemistry

IHC was performed using the Benchmark XT automated stainer (Ventana Medical System Inc. (VMSI), Tucson, USA). Antigen retrieval was carried out with the Ventana Cell Conditioning 1 reagent (VMSI #950–124). The primary antibodies used were: anti-p65 (sc-8008), anti-RelB (sc-226), anti-cytokeratin (CK) 18 (sc-6259), anti-PSA (sc-7638) from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) and anti-CK19 (ms-198-P0) from Thermo Scientific Lab Vision (Ottawa, ON, Canada), were diluted 1:25 – 1:1000 in antibody diluent buffer (VMSI #ADB250), except for anti-PSA that was diluted in phosphate buffered saline (PBS). Diluted antibodies were manually dispensed on the slides and incubated at 37°C for 60 min. Reactions were carried out using the UltraView DAB detection kit (VMSI #760–500). Slides were counterstained with hematoxylin and bluing reagent (VMSI #760–2021 and #760-

2037). All sections were scanned with a 20x 0.75NA objective with a resolution of 0.3225 mm using the VS-110 slide scanner (Olympus, Richmond Hill, ON, Canada).

Immunofluorescence

We produced an epithelial mask using several specific epithelial antigens to distinguish stromal and epithelial components within tissue. To ensure coverage of all PCa cells, even in their most undifferentiated state, we used a cocktail of cytokeratin 18 (CK18), cytokeratin 19 (CK19) that were all labeled to emit in the orange channel. Slides were also stained with DAPI (blue) to identify nuclei. P65 and RelB were labeled to emit in red and green channels respectively. This allowed us to define epithelial specific staining of p65 and RelB, and to define whether this staining was nuclear or cytoplasmic.

Specifically, antigen retrieval was first carried out with Cell Conditioning 1 (VMSI; #950–124) using the Bench Mark XT automated stainer (Ventana Medical System Inc., Tucson, USA). Primary antibodies for p65 and RelB were diluted 1:125 in PBC and manually applied to slides returned to the automated stainer, and incubated at 37°C for 60 min. Reactions were carried out using the iView DAB detection kit (VMSI #760–091). All following steps were manually done on the bench under conditions to protect slides from light. Secondary fluorescent antibodies were incubated simultaneously for 45 min at room temperature (RT): anti-mouse Cy5 (#A10524, Life Technologies Inc., ON, CANADA) for p65 and anti-rabbit Alexa Fluor 488 (A488) (#A11008, Life Technologies Inc., ON, CANADA) for RelB, both were diluted 1:250 in 1X PBS. After two successive 5-min rinses, TMAs slides were blocked 60 min with Mouse-On-Mouse blocking reagent (MKB-2213, Vector Laboratories, CA, USA) (1 drop for 250 µL of 1X PBS) and then incubated 90 min at RT with

anti-PSA diluted at 1:100 in 1X PBS. After two successive 5-min rinses, TMA slides were incubated 45 min at RT with secondary fluorescent anti-goat Cy3 (#705-165-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, USA) diluted at 1:250 in 1X PBS. After two more successive 5-min rinses, TMA slides were blocked once again with Mouse-On-Mouse blocking reagent overnight at 4°C. Subsequently, they were incubated 90 min at RT with a mix of anti-CK18 and anti-CK19, both at 1:100 in PBS 1X. After two successive 5-min rinses, TMA slides were incubated 45 min at RT with secondary fluorescent antibody anti-mouse Alexa Fluor 546 (A546) (#A10036, Life Technologies Inc., ON, CANADA) TMA slides were rinsed three successive times and incubated 15 min at RT with a 0.1% (w/v) solution of Sudan Black in 70% ethanol, to quench tissue auto-fluorescence. Finally, after three successive 5-min rinses, TMA slides were mounted with anti-fade mounting medium containing DAPI for nuclei staining. Slides were stored at 4°C and scanned the next day. A negative TMA slide was done in parallel and incubated with PBS 1X to replace all primary antibodies.

Staining quantification

Fluorescent staining was quantified by the ViosiomorphDP software (Visiopharm, Denmark). The IF staining of epithelium via CK18/CK19/PSA was used to limit the analysis to epithelial areas as the region of interest #1 (ROI #1) while DAPI nuclear staining served to assess the p65 and RelB associated fluorescence in epithelial nuclei (ROI #2) (Fig.1). Continuous values of fluorescence intensity were collected for both ROI #1 and #2 and used to define epithelial and nuclear NF-κB variables. The positive and negative cores were based on pre-defined threshold values as described below.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SPSS software 11.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Comparison between non-malignant cores and matched tumor cores were assessed using a t-test. The correlation with clinico-pathological variables was estimated with a Pearson correlation coefficient test. We used receiver operative characteristic (ROC) curves or the median calculation to determine the threshold value for each NF-kB variables. BCR-free survival curves were plotted using the Kaplan–Meier estimation and the log-rank test was used to evaluate significant differences. Univariate and multivariate proportional hazard models (Cox regression) were used to estimate the hazard ratios for each NF-kB variable. Multivariate analysis was performed using a forward stepwise hazard model on univariate analysis required for entry into the model. Additional clinico-pathological variables included pre-operative PSA, Gleason score, surgical margin status, extra-prostatic extension and seminal vesicles involvement.

RESULTS

Immunofluorescent multistaining analysis of p65 and RelB.

The current study aimed to analyze p65 and RelB; specifically in normal or malignant epithelial tissues on the same TMA slide by a semi-automated process. CK18 was used to identify PCa cells in tissues due to its constitutive expression in prostatic epithelial cells (Long et al., 2005). However, tissue samples stained by IHC possessed variable CK18 expression levels and staining was weaker in poorly differentiated cancer tissue samples (data not shown),

thus reducing the accuracy of tumor cell identification in advanced PCa tissues. To overcome this deficiency, additional epithelial antigens expressed in prostatic epithelial cells were selected. CK19, normally expressed in simple epithelium, was found to be increased in prostatic neoplastic and cancer lesions (Nagle et al., 1991), while PSA is specifically expressed by prostatic secretory epithelial cells (Long et al., 2005). IHC of CK18, CK19 and PSA illustrated distinct profiles whose epithelial coverage is complementary in TMAs (Supp Fig.1). The simultaneous staining of CK18, CK19 and PSA, by IHC and IF, confirmed the epithelial coverage efficiency of these antigens (SuppFig.1). Thus, the combined use of CK18/CK19/PSA as an epithelial mask ensured the required sensitivity and specificity to identify prostatic epithelial cells for subsequent analyses regardless of the level of tissue differentiation.

The epithelial mask was used jointly with DAPI nuclei detection to allow the discrimination of overall epithelial specific staining p65 and RelB as well as nuclei specific staining. While epithelium was sequentially labeled with the complementary orange fluorescent dyes Cy3 and A546, p65 and RelB were stained with Cy5 (red) and A488 (green) fluorescence respectively (Fig.1A, 1E-F). From quadruple IF staining we performed a quantitative analysis of p65 and RelB fluorescence from scanned images using appropriate software (VisiomorphDP). The pre-defined epithelial mask was used to select specifically the prostatic epithelium as the first ROI from which it was possible to assess the overall epithelial intensity of staining for p65 and RelB (Fig.1C). The DAPI blue staining was used to identify prostatic epithelial cell nuclei (Fig.1B, 1D) and allowed the subsequent evaluation of the nuclear intensity of both p65 and RelB within the epithelium.

Analysis of overall levels of p65 and RelB in PCa tissues

TMA, containing patient matched cores from tumor and non-tumor (herein referred to as adjacent normal) prostatic tissue, were stained, scanned and evaluated for overall p65 and RelB staining based on fluorescence. Both p65 and RelB were preferentially expressed in epithelium. However, while p65 was poorly expressed in stroma, we did observe stromal expression of RelB although at levels below those within the epithelium (Fig.1F). Fluorescence analysis revealed that the epithelial mean intensity of p65 was significantly higher in PCa tumor cores compared to matched adjacent normal cores ($p = 0.017$). In contrast, RelB mean intensity was similar in PCa tumor and matched adjacent normal cores (Fig. 2B).

Multiple IF staining permits the simultaneous analysis of p65 and RelB in the epithelial nuclear compartment. Negative, single red (Cy5), single green (A488) and double (Cy5/A488) stained nuclei were observed (Fig. 2A) providing an overview of the nuclear distribution of both p65 and RelB in epithelial prostatic tissues. However, the analysis of fluorescence mean intensity in nuclei did not show any significant variation in p65 or RelB nuclear distribution between tumor and adjacent normal cores (Fig. 2B). The fluorescence results indicate that p65 expression was increased in prostatic tumor cells while its nuclear distribution was similar in normal adjacent and PCa tissues. No variation was observed in RelB expression and distribution profiles between adjacent normal and PCa tissues.

Correlation of p65 and RelB staining with clinico-pathological parameters.

The analysis of fluorescence mean intensity for p65 and RelB generated continuous data from which we defined cut off values to stratify the patient cohort based on p65 and RelB expression. Intensities were calculated either throughout the epithelia, or from nuclei within

the epithelia. This generated two groups corresponding to epithelial (positive or negative) and nuclear (positive or negative) staining. Epithelial expression of p65 correlated with seminal vesicle involvement ($p = 0.012$, Pearson test) and this was also true for dichotomized values (Epithelial/nuclear) ($p = 0.016$, Pearson test) (Table 2) demonstrating that the correlation remains when combining overall intensity with nuclear distribution. The nuclear distribution of p65 itself correlated with bone metastasis development ($p = 0.025$, Pearson test). Moreover, all p65-associated variables correlated with BCR in PCa patients (epithelial; $p = 0.015$, nuclear; $p = 0.022$, Epithelial/nuclear; $p = 0.010$, Pearson test) (Table 2). In contrast, despite the expression and nuclear distribution of RelB in prostatic epithelial tissues, no correlation was noted with any evaluated clinical parameters of PCa patients of this cohort (Table 2).

To conduct clinical correlations of both the classical and the alternative NF- κ B pathways we also derived a dichotomized variable in order to simultaneously access the contribution of p65 and RelB. Correlation analyses revealed that the p65/RelB variable, epithelial and nuclear status, was associated with a BCR event (respectively $p = 0.016$ and $p = 0.018$, Pearson test) while only epithelial status correlated with seminal vesicle involvement ($p = 0.018$, Pearson test) (Table 2). Furthermore, we noted that the correlation coefficient with a BCR event was comparable between p65/RelB (epithelial; corr.coeff. = 0.130, nuclear; corr.coeff. = 0.120) and p65 (epithelial; corr.coeff. = 0.132, nuclear; corr.coeff. = 0.122) (Table 2). Thus, both p65 alone and the combination of p65/RelB were associated with BCR, but this was not observed with RelB alone, suggesting that the p65/RelB correlation is principally driven by the p65 contribution.

To assess the predictive potential of each NF- κ B variable we performed a Kaplan Meier estimation on based on BCR. As illustrated by Kaplan-Meier graphics (Fig. 3A), PCa

patient scoring positively for p65, at the epithelial and nuclear level, had a 3.9 times higher risks of developing a BCR compared to patients with cores under threshold values ($p \leq 0.050$). In contrast, RelB status did not predict BCR (Fig. 3B). These observations were confirmed by Cox regression analyses that showed the predictive value of p65 in a univariate model while RelB was not significant (Table 3). However in a multivariate model including clinical parameters such as Gleason score, extra-prostatic extension and seminal vesicles involvement, we noted that p65 was not retained as a predictive variable (Table 3) suggesting that it is not independent of these variables.

The p65/RelB variable generated four groups of PCa patients relative to their p65 and/or RelB status: double negative, single positive and double positive. Kaplan-Meier analyses did not show any significant difference when all groups were considered (Fig.3C). However, we noted that double positive PCa patients for p65 and RelB tended to have a BCR earlier than patients whose tissues were scored as double negative (Epithelial; $p = 0.093$, Nuclear; $p = 0.172$) (Fig.3D). Cox regression also illustrated this tendency in the univariate model where epithelial and nuclear p65/RelB were not significantly predictive of the BCR with respective p values of 0.061 and 0.089. In the multivariate model p65/RelB was not included when predicting in BCR in PCa patients (Table 3).

DISCUSSION

The implication of NF- κ B p65 in cancer progression has been extensively studied. In PCa, the frequency of p65 nuclear distribution as evaluated by IHC in prostatic tumor cells has been reported to correlate with Gleason score and the presence of lymph node metastasis

(Fradet et al., 2004; Lessard et al., 2003). Moreover, the presence of nuclear p65 in radical prostatectomy tissues predicts BCR in PCa patients (Domingo-Domenech et al., 2005; Gannon et al., 2013; Lessard et al., 2006b). Using a different IF-based approach, the current study further confirmed the value of nuclear p65 as a prognostic factor in PCa. In addition, we were able to demonstrate that global IF p65 intensities within tumor epithelia, irrespective of its cellular location, was also prognostic. These results suggest that the p65 activation, as judged by its nuclear localization, is also associated with concomitant higher protein levels within PCa cells. In line with our observations, higher p65 expression in colon cancer progression using an RNA-based approach has also been reported (Balcerczak et al., 2007).

While RelB has been reported to be involved in the progression of some cancers such as breast cancer (Cormier et al., 2013; Lee et al., 2013; Wang et al., 2007), very few studies have accessed this protein in PCa. In vitro based-studies show that the level of RelB expression correlates with PCa PC3 and LNCap tumorigenesis as monitored by xenograft growth in mice, and would suggest an association between the alternative NF- κ B pathway and PCa progression (Xu et al., 2012; Xu et al., 2009). We have previously reported that nuclear frequency of RelB, as judged by IHC on PCa tissues correlates with Gleason score and may thus be associated with PCa progression (Lessard et al., 2005). However, in the current study using a larger patient cohort and an IF-based approach, we were unable to correlate the intensity of nuclear RelB with any clinico-pathological parameters. The discrepancy between these two studies could be due to differences in sample size, but they may also reflect the fact that one study looked at nuclear frequency while the current study evaluated nuclear intensity. Our recent report that nuclear frequency versus overall intensity affects the growth of 22RV1 PCa xenograft suggests that these parameters need to be evaluated individually (Labouba et

al., xxxx). Further refinements to the imaging software would be required in order to judge nuclear frequency using an IF-based approach, but this would be useful in helping resolve confounding variables.

By IF staining p65 and RelB NF- κ B co-staining on TMAs, we were able to access simultaneously the classical and alternative pathways subunits within the same tissue. We evaluated nuclear fluorescence for both subunits, and categorized samples as negative, singly-positive or double-positive. This categorization was then correlated with clinico-pathological parameters. When accessed together, p65 continued to correlate with BCR (negative versus single- and double-positive). However, by comparison, p65/RelB does not have a significantly stronger prognostic value than p65 alone, and indeed appears to weaken the value of p65 alone. While these results clearly demonstrate the higher prognostic significance of p65, they do little to inform us on the potential role of RelB in PCa progression. Further studies looking throughout the evolution of the cancer may be more informative in understanding how RelB contributes to PCa.

In PCa tumorigenesis, the classical NF- κ B signaling has been associated with biological processes involved in tumorigenesis such as proliferation, migration, invasion and inflammation (Hoesel and Schmid, 2013; Lawrence, 2009; Sethi et al., 2008). It would appear that the classical NF- κ B pathway, via the overexpression and nuclear distribution of p65, contributes to tumorigenesis. In vitro breast cancer studies associate RelB with proliferation, migration and invasion (Demicco et al., 2005; Wang et al., 2007), while in contrast RelB has an anti-proliferative role in a fibroblast based model via p53 activation (Jacque et al., 2013) and a pro-apoptotic function in renal epithelial cells (Benedetti et al., 2013). Our recent results suggest that while RelB increases the proliferation of 22RV1 cells, it also stimulates cell

autophagy (Labouba et al., xxxx) which confers a pro-survival cell response against stress but may also be lethal for cells (Dalby et al., 2010). Therefore the overall influence of RelB appears to be complex and context specific and our failure to associate RelB nuclear expression with clinico-pathological parameters in RP samples does not preclude a role for this protein in PCa.

CONCLUSION

We are the first to report on the use of IF to study both the classical and alternative NF- κ B pathways within the epithelial component of RP PCa tissues simultaneously. Going forward this approach can be applied to interrogate other pathways simultaneously and provides observational evidence to better understand the development and progression of PCa. In contrast to IHC, IF studies have the potential for higher automation and can eventually be refined to permit co-localization studies at the cellular level. Here we provide further evidence of the prognostic value of p65 for BCR in PCa, and demonstrate that the addition of RelB nuclear staining fails to improve upon the predictive value of p65 alone.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Liliane Meunier for IF and IHC technical support and Dr Mathieu Latour for pathology. This work was supported by the Terry Fox Research Institute and Astra Zeneca. IL, CLP, LC, POG, A-MM-M and FS are researchers at the CRHUM, which receives funding from the Fonds de recherche Québec - Santé (FRQS). Biobanking is done in collaboration

with the Réseau de recherche sur le cancer (FRQS) that is affiliated with the Canadian Tumor Repository Network. FS is supported by the Université de Montréal's Chair in Prostate Cancer. IL received studentships from the Canadian Uro-Oncology Group, the Faculty of Graduate Studies of the Université de Montréal, and the Canderel fund of the Institut du cancer de Montréal. POG, received a studentship from the FRQS.

TABLES

Patients	300
Included	278
Excluded	21
<hr/>	
Follow up (month)	
Average	107
<hr/>	
PSA pre-operative	
Average	110
<hr/>	
Mortality (PCa/Total)	12 / 31
<hr/>	
Gleason score	
<7	137
=7	112
>7	29
<hr/>	
Seminal vesicles involvement	
Positive	33
Negative	238
Not available	7
<hr/>	
Extraprostatic extension	
Positive	80
Negative	181
Not available	17
<hr/>	
Surgical margin	
Positive	94
Negative	174
Not available	10
<hr/>	

Table 1. Description of PCa patient cohort. After TMA construction, patients were excluded from analysis based on pre-operative treatments. Mortality represents the number of PCa specific deaths compared to all deaths. Missing are parameters whose values were not available.

Parameters	p65			RelB			p65/RelB	
	Epithelial	Nuclear	Epithelial /nuclear	Epithelial	Nuclear	Epithelial/nuclear	Epithelial	Nuclear
BCR								
Pearson correlation	0.132*	0.122*	0.140*	0.060	0.072	0.067	0.130*	0.120*
P value	0.015	0.022	0.010	0.162	0.118	0.134	0.016	0.018
Gleason score								
Pearson correlation	0.068	-0.028	0.039	-0.082	-0.077	-0.085	0.021	-0.054
P value	0.132	0.320	0.261	0.087	0.102	0.082	0.362	0.188
Surgical margin status								
Pearson correlation	0.015	-0.031	0.000	-0.027	-0.001	-0.019	0.001	-0.026
P value	0.403	0.308	0.498	0.331	0.491	0.377	0.491	0.340
Extra-prostatic extension								
Pearson correlation	0.093	0.033	0.079	0.053	0.071	0.062	0.096	0.055
P value	0.069	0.298	0.103	0.200	0.129	0.163	0.063	0.188
Seminal vesicles involvement								
Pearson correlation	0.139*	0.084	0.132*	0.044	0.035	0.043	0.129*	0.081
P value	0.012	0.087	0.016	0.240	0.285	0.244	0.018	0.095
Lymph nodes invasion								
Pearson correlation	0.053	0.044	0.055	0.106	0.056	0.093	0.085	0.059
P value	0.224	0.265	0.219	0.065	0.214	0.092	0.113	0.202
Bone metastasis development								
Pearson correlation	0.050	0.118*	0.079	0.056	-0.006	0.037	0.063	0.093
P value	0.205	0.025	0.096	0.177	0.460	0.270	0.151	0.063

Table 2. Correlation between NF- κ B variables and clinico-pathological parameters. Pearson correlations were considered significant at a $p < 0.05$. Significant Pearson correlations are indicated in bold with an asterisk and significant p values are highlighted in bold.

Univariate model	Hazard ratio (e ^β)	p value
Clinical parameters:		
Pre-operative PSA	1.062	2.10⁻⁵
Gleason score	1.812	<10⁻⁶
Surgical margin status	2.582	4.10⁻⁶
Extra-prostatic extension	3.550	<10⁻⁶
Seminal vesicles involvement	4.950	<10⁻⁶
NF-κB variables:		
p65		
Epithelial	1.503	0.049
Nuclear	1.491	0.052
Epithelial/nuclear	1.172	0.033
RelB		
Epithelial	1.168	0.446
Nuclear	1.072	0.734
Epithelial/nuclear	1.047	0.516
p65/RelB		
Epithelial	1.166	0.061
Nuclear	1.150	0.089
Multivariate model		
Clinical parameters:		
Pre-operative PSA	1.026	0.216
Gleason score	1.466	0.002
Surgical margin status	1.205	0.460
Extra-prostatic extension	1.947	0.020
Seminal vesicles involvement	2.212	0.008
NF-κB variables :		
p65 : Epithelial/nuclear	1.073	0.752
p65/RelB : Epithelial	0.952	0.804
Nuclear	1.125	0.435

Table 3. Prognostic factors predicting PSA relapse in prostate cancer cohort. Cox regression models: significance ($p < 0.05$.) and Hazard ratio are indicated. PSA: Prostate Specific Antigen. NF-κB variables (p65, RelB and p65/RelB): status in cancer tissues. Combined overall epithelial intensity coupled to nuclear intensity (epithelial/ nuclear) was also evaluated. Significant Hazard ratios and p values are highlighted in bold.

FIGURES

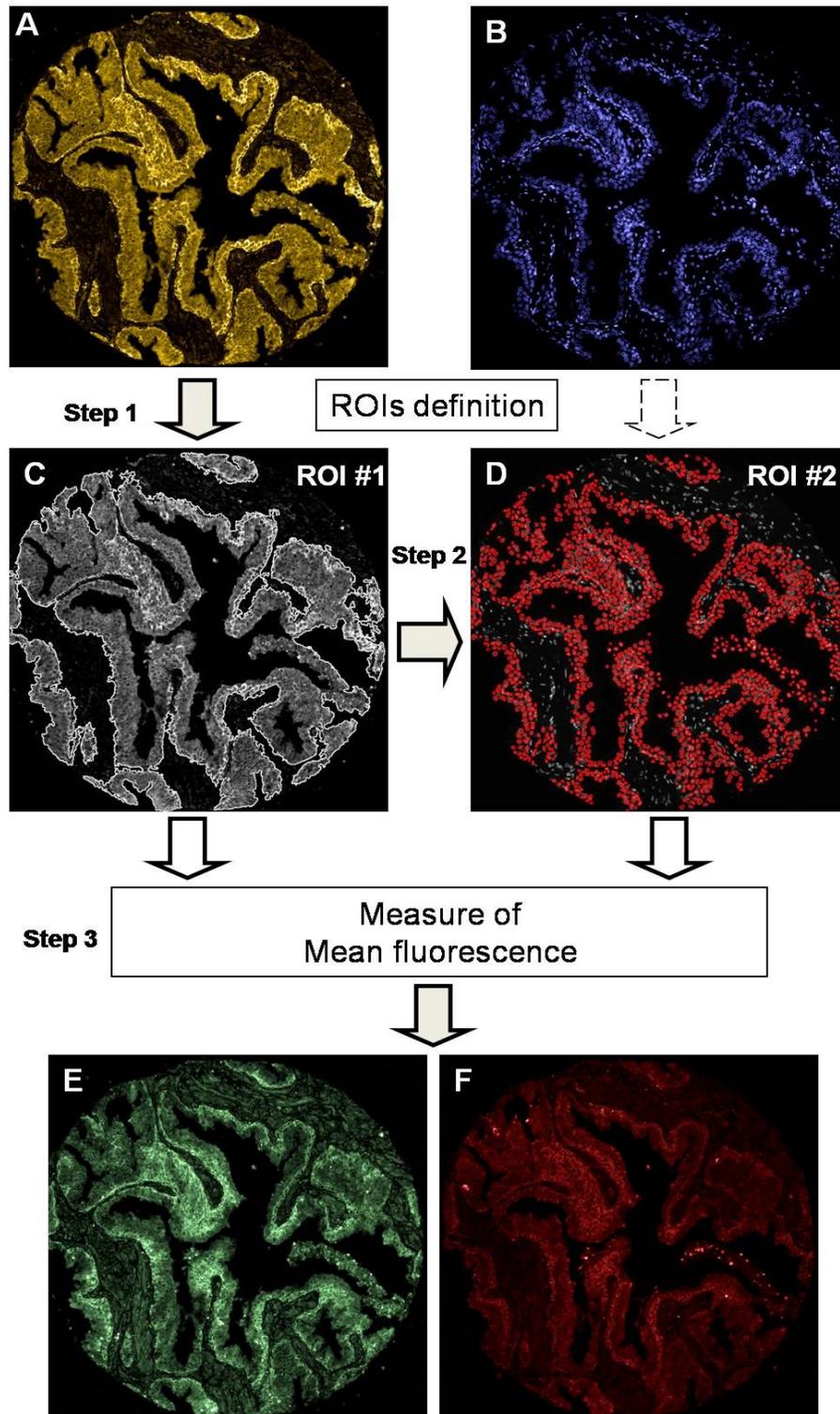
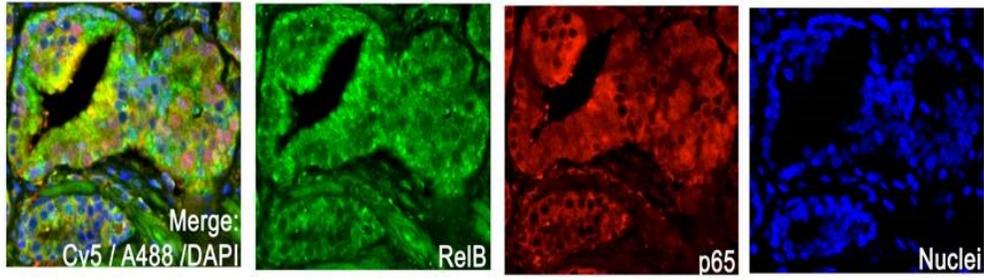


Figure 1. Example of immunofluorescent multiple staining in one TMA core.

Figure 1. Example of immunofluorescent multiple staining in one TMA core.

A. Epithelial staining with CK18, CK19 and PSA defines the epithelial mask using orange fluorochromes (A546, Cy3). **B.** Nuclei staining with DAPI. **C.** Identification of epithelial area (presented in grey for superior contrast in subsequent analyses) as ROI #1 (region of interest #1) with Viosomorph DP software. **D.** Identification of nuclei (grey surrounded by red tracing) as ROI#2 from pre-defined ROI#1. p65 and RelB fluorescence were subsequently evaluated separately in ROI#1 and #2. **E.** RelB staining with green fluorescent dye (A488). **F.** p65 staining with red fluorescent dye (Cy5). Steps 1, 2 and 3 correspond to analysis process of fluorescence by Visiomorph DP software.

A.



B.

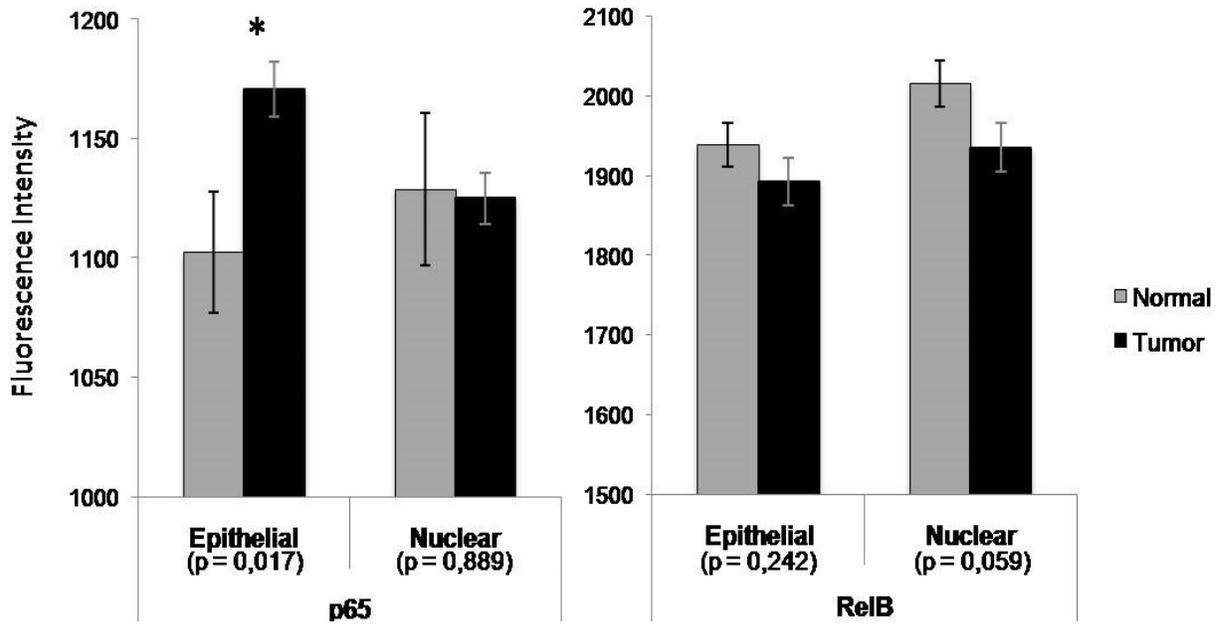


Figure 2. Immunofluorescence of p65 and RelB.

Figure 2. Immunofluorescence of p65 and RelB.A. 40X magnification highlighting glandular structures in PCa tissue. Merge: superimposed images of RelB (A488) in green, p65 (Cy5) in red and nuclei (DAPI) in blue. **B.** Mean intensity of fluorescence for both p65 and RelB. Epithelial: mean of fluorescence in total epithelial tissue as defined by the epithelial mask. Nuclear: mean of fluorescence in nuclear compartment as defined with DAPI. Values on Y-axis represent arbitrary units of fluorescence defined by Visiomorph software. Bars on graph represent the standard deviation of the mean. The comparison between adjacent normal and tumor cores was conducted using a T-test and significance (marked with asterisk) was defined as $p < 0.05$.

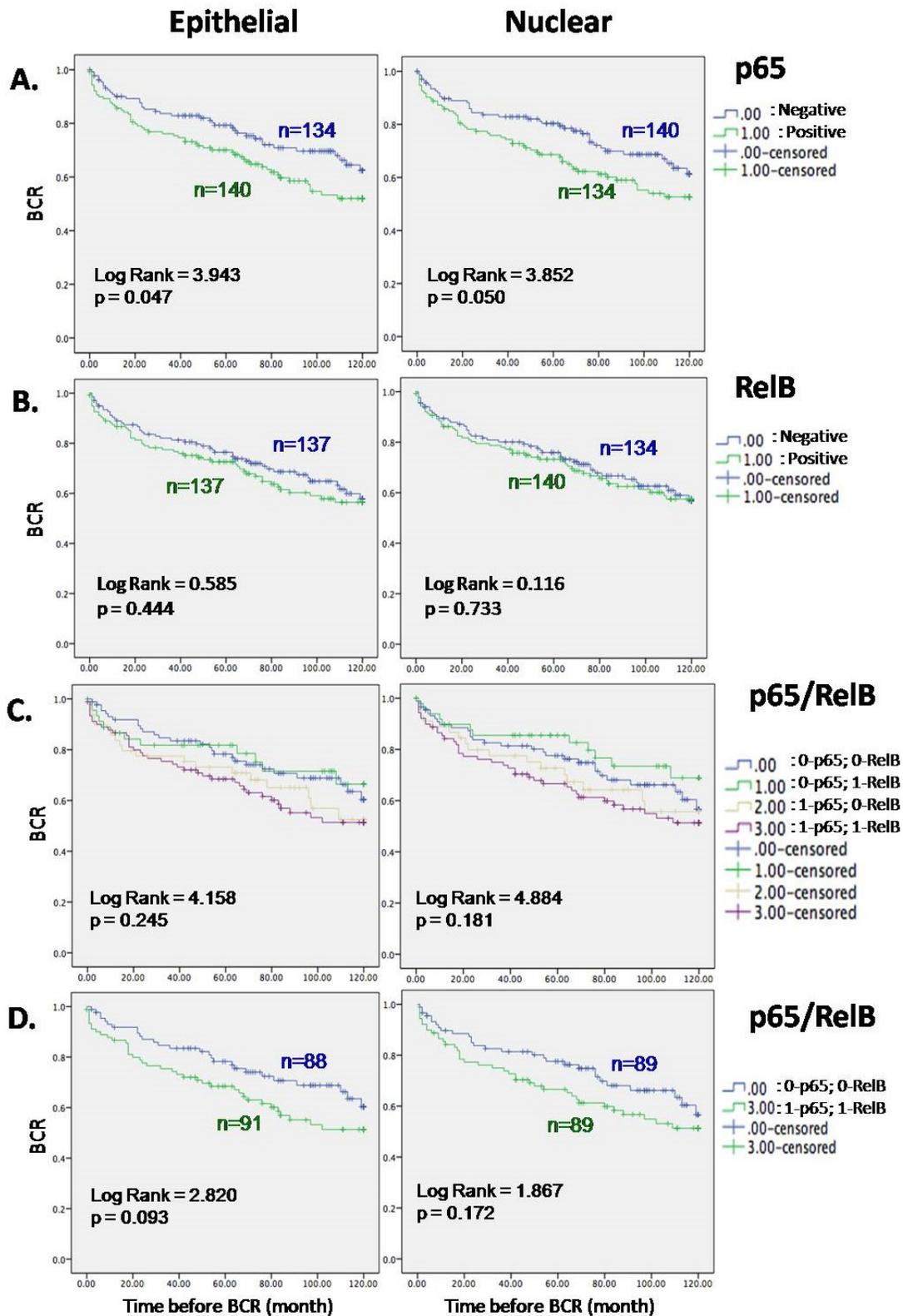


Figure 3. Kaplan–Meier PSA recurrence-free survival curve in patients with PCa.

Figure 3. Kaplan–Meier PSA recurrence-free survival curve in patients with PCa. *n*=Number of patients. Significance (*p*) and log rank value are indicated. **A.** Epithelial and nuclear p65 in cancer tissues. **B.** Epithelial and nuclear RelB in cancer tissues. **C.** Epithelial and nuclear p65/RelB in cancer tissues. The dichotomized p65/RelB variable integrates both overall and nuclear intensities of p65 and RelB (both defined by cut-offs as 0 or 1). **D.** Analysis of epithelial and nuclear double negative and double positive cores for p65/RelB.

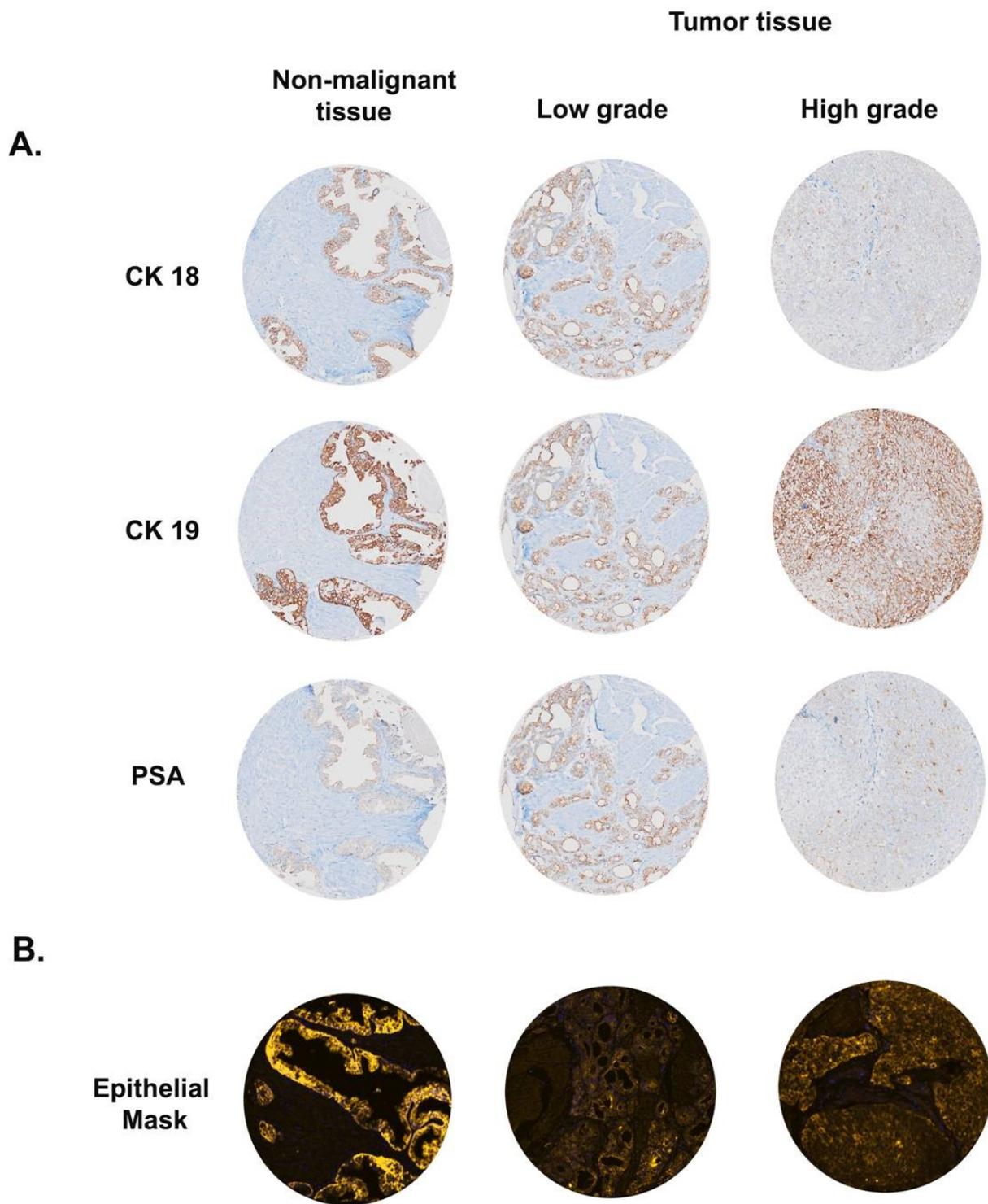


Figure S1. Definition of epithelial mask.

Figure S1. Definition of epithelial mask. **A.** IHC illustrating a differential expression of CK18, CK19 and PSA in normal prostate tissue and tumor tissues cores from patients with either low or high grade disease. **B.** Simultaneous IF staining with CK18, CK19 and PSA in normal prostate tissue and tumor tissues cores from patients with either low or high grade disease. Secondary antibodies were conjugated with A546 (CK18 and CK19) or Cy3 (PSA), each emitting fluorescence recognized in the orange range. All images at a 10X magnification. CK: cytokeratin, PSA: Prostate specific antigen.

Chapitre 3.

Discussion générale

1. Impact de la voie alternative NF- κ B dans la biologie du cancer de la prostate

1.1. RelB et autophagie

La littérature entourant l'étude de la voie alternative NF- κ B dans un contexte de cancer l'associe à un potentiel tumorigène. Par exemple, dans le cancer du sein, l'expression de la sous-unité transactivatrice RelB confère aux cellules cancéreuses des propriétés pro-prolifératives via la régulation de la cycline D1 ainsi que pro-invasives et anti-apoptotiques à travers l'expression de gènes-cibles tels que CNK1 et BCL2 (Demicco et al., 2005; Fritz and Radziwill, 2010; Mineva et al., 2009; Wang et al., 2007). Dans le CaP, des études *in vivo* réalisées en modèles murins ont montré que l'expression de RelB au sein de lignées cellulaires prostatiques en exacerbe la capacité à former des tumeurs, liant ainsi la voie alternative NF- κ B à des propriétés pro-tumorales (Xu et al., 2012; Xu et al., 2009). La résistance aux radiations ionisantes associée à l'expression de RelB au sein de cellules cancéreuses prostatiques constitue une propriété supplémentaire qui relie la voie alternative NF- κ B à un potentiel tumorigène (Josson et al., 2006; Xu et al., 2010).

Les travaux présentés ici suggèrent que définir le potentiel tumorigène de la voie alternative NF- κ B s'avère plus complexe que sa simple association à divers processus cellulaires pro-tumoraux. Si, comme le suggère la littérature et nos travaux, RelB augmente l'indice de prolifération de cellules cancéreuses prostatiques telles que les 22Rv1, elle n'en interfère pas moins avec leur capacité à induire des tumeurs *in vivo* en retardant la

formation. Cette simple observation pourrait remettre en question le seul potentiel pro-tumoral jusqu'à présent associé à la voie alternative NF- κ B. Son intervention dans la régulation de l'autophagie, dont l'implication dans la tumorigénèse est elle-même ambivalente, supporte que le rôle de la voie alternative NF- κ B dans la biologie du CaP puisse être plus complexe.

L'autophagie constitue une réponse cellulaire à divers stress auxquels peut être soumise la cellule (Choi et al., 2013; Murrow and Debnath, 2013). Initialement identifiée comme un processus de mort par autodigestion du contenu cellulaire, l'autophagie peut s'avérer fatale pour la cellule dont la mort vise ultimement le maintien structural et fonctionnel de tissus soumis à des conditions de stress (Marino et al., 2011). Plus récemment, l'autophagie a également été définie comme étant un processus promouvant la survie des cellules soumises à un ou plusieurs stress. Dans ce dernier cas, la dégradation progressive du contenu cellulaire, qui caractérise l'autophagie, vise à maintenir la survie cellulaire jusqu'à ce que le(s) stress soit(en)t endigué(s) et les conditions de croissance optimale restaurées. Ces propriétés, pour le moins antagonistes (mort versus survie cellulaires) rendent le rôle de l'autophagie difficile à cerner dans un contexte de cancer. Cependant de nombreux rapports tendent à l'associer à la tumorigénèse (Choi et al., 2013; Kroemer et al., 2010; Murrow and Debnath, 2013).

Dans notre étude, nous suggérons que l'activation de la voie alternative NF- κ B rendrait les cellules 22Rv1 plus susceptibles de subir l'autophagie lorsque cultivées en suspension. Ce genre de conditions exemptes de matrice extracellulaire constitue un stress pour les cellules dites adhérentes dont la croissance dépend, normalement, de leur capacité à former des liens physiques autant entre elles qu'avec le milieu environnement. La réponse classique déclenchée lorsque des cellules adhérentes, comme les cellules épithéliales, sont privées d'ancrage à la matrice extracellulaire est l'induction d'une apoptose particulière, l'anoïkis (Taddei et al.,

2012). Les cellules 22Rv1, d'emblée résistantes à l'anoïkis, montrent un délai dans l'initiation de tumeurs une fois implantées dans un modèle *in vivo* lorsqu'elles expriment RelB. Le fait qu'il ne s'agisse que d'un délai, et non d'une inhibition complète de la formation de tumeurs, nous a amenés à supposer que l'autophagie ainsi privilégiée constituerait, dans ce contexte, une voie supplémentaire de résistance à l'anoïkis pour les cellules 22Rv1 (Chapitre 1).

Dans de nombreux cancers solides, la présence de cellules tumorales circulantes (CTCs) dans le sang de patients est de plus en plus avérée. Bien que particulièrement difficile à détecter à cause de leur faible proportion et du nombre limité de technologies de détection dans le sang des patients atteints de cancer, leur présence a été rapportée comme étant un marqueur de mauvais pronostic. La difficulté de détection des CTCs implique également d'importantes lacunes pour les isoler et produire des fractions suffisamment pures et importantes pour en permette une caractérisation complète (Yu et al., 2011). Les travaux néanmoins réalisés en ce sens tendent à rapporter que les CTCs auraient un profil similaire à celles de la tumeur primaire (Helzer et al., 2009). Ainsi, il est aujourd'hui assumé que les CTCs sont en fait des cellules qui se seraient désolidarisées de la tumeur primaire et causeraient la formation de métastases. Ce dernier point est appuyé par l'observation que le nombre de CTCs est significativement plus important chez les patients avec un cancer avancé présentant des métastases (Yu et al., 2011). Et ce n'est que très récemment que la présence de sous-populations de CTCs initiatrices de métastases dotées de la capacité à coloniser un nouvel environnement tissulaire a été montrée. Il est évident que la viabilité des CTCs dépend étroitement de leur capacité à survivre en suspension dans le sang ou le flux lymphatique jusqu'à un site potentiellement colonisable. Des travaux réalisés sur des lignées cancéreuses prostatiques montrent, par exemple, que les CTCs sont plus résistantes à l'anoïkis grâce à

l'expression de gènes anti-apoptotiques de la famille des IAPs (Berezovskaya et al., 2005). Plusieurs stratégies de résistance à l'anoïkis ont été montrées et l'autophagie est l'une d'entre elles (Kim et al., 2012). Si, comme nous le suggérons, l'expression de RelB promeut l'autophagie des cellules cancéreuses prostatiques lorsqu'elles sont privées d'ancrage, la voie alternative NF- κ B pourrait alors être mise à profit par les CTCs prostatiques et donc être impliquée dans la formation de métastases. L'utilisation de modèles appropriés pour l'étude de la formation de métastases serait idéale afin d'évaluer le statut et l'implication potentielle de la voie alternative NF- κ B au sein des CTCs et de la formation de métastases.

1.2. RelB et diversité des lignées cellulaires prostatiques

Les études réalisées jusqu'alors sur la voie alternative NF- κ B et le CaP sont essentiellement basées sur l'utilisation des lignées cellulaires LNCaP, PC3 et DU145. Notre idée initiale était d'effectuer des analyses à partir d'un modèle additionnel particulièrement approprié pour l'étude de la voie alternative NF- κ B, les cellules 22Rv1, mais également de confirmer les observations faites par d'autres groupes sur ces autres lignées cellulaires dont nous disposons au laboratoire. Ainsi, notre choix s'étant porté, dans un premier temps, sur l'étude de la voie alternative NF- κ B à travers la surexpression de RelB, nous avons opté pour les cellules 22Rv1, notre modèle actuel, et les cellules LNCaP. En effet, l'analyse du profil d'expression de RelB au sein de nos lignées cancéreuses prostatiques par immunobuvardage de type Western (Annexe I, Figure S1) indique que les lignées 22Rv1 et LNCaP, respectivement androgéno-sensibles et androgéno-dépendantes, expriment de très faibles niveaux protéiques en comparaison des lignées PC3 et DU145 qui elles, sont androgéno-

indépendantes. Bien qu'ayant simultanément travaillé avec les cellules 22Rv1 et les cellules LNCaP pour y induire une surexpression de RelB, il nous a été impossible de dériver des populations LNCaP RelB viables. En effet, suite à de nombreux essais successifs de transduction lentivirale et même de transfection de plasmides comprenant l'ADNc de RelB, nous n'avons pu maintenir en culture des cellules LNCaP surexprimant RelB ; contrairement aux cellules 22Rv1 dont les transductions lentivirales ont été un franc succès. Il nous est à ce jour difficile d'expliquer comment d'autres groupes ont pu travailler à partir de populations cellulaires LNCaP surexprimant RelB. Il serait raisonnable de penser que les lignées LNCaP alors utilisées diffèrent de la nôtre. Il n'est, certes, pas rare d'observer un phénomène de sélection imputable aux conditions de culture sensiblement différentes d'un laboratoire à l'autre.

Nous avons étendu l'étude fonctionnelle de la voie alternative NF- κ B à un modèle de répression de l'expression de RelB à travers l'utilisation d'ARNsh (en «short hairpin» ou épingle à cheveux) sur la lignée cellulaire DU145 qui exprime des niveaux importants de RelB, à l'instar des cellules PC3 (Annexe I, Figure S1). Suite à la transduction lentivirale de quatre ARNsh distincts spécifiques à l'ARNm de RelB, nous avons dérivé huit populations clonales (deux par ARNsh) au sein desquelles l'expression de RelB était efficacement réprimée (Annexe I, Figure S2). Ainsi, nous avons évalué l'effet de la perte de RelB sur la prolifération et la migration des cellules DU145. De façon surprenante, aucun effet notable imputable à la diminution de RelB n'a été observé dans chacun des processus cellulaires évalués (Annexe I, Figure S3 et S4). Les travaux réalisés sur les PC3 illustrent pourtant bien que la perte de RelB en diminue la capacité à former des tumeurs *in vivo* (Xu et al., 2009). La différence entre les approches expérimentales utilisées rend difficile la comparaison entre les

deux lignées; l'une étant essentiellement *in vitro*, l'autre clairement *in vivo*. S'il est vrai que les études réalisées à partir des cellules PC3 associent l'activation de la voie alternative NF- κ B à un potentiel tumorigène, nos travaux indiquent, pour leur part, que ce dernier ne serait pas en lien avec de quelconques effets sur la prolifération, la migration ou l'invasion des cellules DU145. Il serait également raisonnable de supposer que les PC3 et les DU145, bien qu'étant toutes deux des lignées prostatiques androgéno-indépendantes, possède chacune des caractéristiques propres impliquant des rôles distincts de la voie alternative NF- κ B dans leur biologie et leur tumorigénicité.

La comparaison de nos travaux avec la littérature existant sur l'implication de la voie alternative NF- κ B dans le CaP illustre la diversité au sein des lignées cellulaires prostatiques. Ces dernières constituent finalement autant de modèles d'étude permettant d'explorer les différents aspects de la biologie des cellules cancéreuses prostatiques, et reflètent l'hétérogénéité cellulaire, histologique, biologique et clinique qui caractérise le CaP.

1.3. Voie alternative NF- κ B, cancer et inflammation

L'activation de la signalisation NF- κ B au sein de cellules cancéreuses est un facteur important dans le processus de tumorigénèse puisqu'elle en modifie la biologie en stimulant leurs propriétés prolifératives, anti-apoptotiques, invasives et migratoires (Sethi et al., 2008). Loin de se limiter à la tumeur à proprement parler, les facteurs de transcriptions NF- κ B sont également exprimés et activés au sein des cellules du microenvironnement tumoral; parmi elles, les cellules immunitaires infiltrant la tumeur responsables des différentes réactions immunitaires observées dans ce microenvironnement dont l'inflammation.

L'inflammation chronique, par la quantité de chémokines sollicitées et impliquées, est de plus en plus reconnue pour fournir un terrain favorable à la progression tumorale. En effet de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8 auraient un effet pro-tumoral sur les cellules cancéreuses prostatiques (Grivennikov et al., 2010). De plus, l'activation de la signalisation NF- κ B au sein des cellules tumorales induit un profil de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui favorise, par un effet autocrine et paracrine, leur croissance, mais aussi, facilite le recrutement de cellules immunitaires dont les sécrétions s'ajoutent à celles des cellules tumorales, augmentant ainsi l'effet pro-tumoral (Wong et al., 2009).

L'infiltration de cellules immunitaires, comme les macrophages, au sein de la tumeur constitue un paramètre qui en influence la progression. Une étude visant à caractériser l'infiltrat immunitaire dans la tumeur primaire de patients atteints de CaP a montré que la présence de macrophages est associée à un risque élevé de développer une rechute biochimique, tandis qu'à l'inverse, celle des cellules NK («Natural killer») aurait un effet protecteur (Gannon et al., 2009). L'activation de la signalisation NF- κ B dans les macrophages infiltrant la tumeur, reconnue comme étant impliquée dans la progression tumorale, constitue un facteur important dans leur phénotype pro- ou anti-inflammatoire (Mancino and Lawrence, 2010). Le phénotype M1 associé à la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6, pourraient avoir un effet pro-tumorigène sur les cellules cancéreuses bien que, globalement, ces macrophages M1, par leur effet de promotion du système immunitaire, soient considérés comme bénéfiques pour les patients atteints. Le phénotype M2 associé à un effet anti-inflammatoire est, quant à lui, considéré comme pro-tumorigène par le biais de ses effets immunosuppresseurs. Cependant, la sécrétion de l'IL-10 attribué aux macrophages M2, leur

conférant, du moins en partie, leurs propriétés anti-inflammatoires, tend à inhiber la signalisation NF- κ B au sein des cellules en exprimant les récepteurs spécifiques (Mantovani et al., 2004). De ce fait, les macrophages M2 pourraient également avoir des effets anti-tumoraux sur les cellules cancéreuses. Ces observations soulignent la complexité de l'implication de la signalisation NF- κ B dans la progression tumorale. Elles mettent l'emphase sur l'importance des types cellulaires au sein desquelles elle est sollicitée ainsi que sur l'impact qu'elle peut avoir sur les interactions entre cellules cancéreuses prostatiques et cellules stromales. La présence de macrophages ayant déjà été démontrée comme étant de mauvais pronostic pour les patients atteints de CaP, il pourrait être intéressant d'en évaluer le profil de différenciation (M1 versus M2) et d'en faire la comparaison avec le profil d'activation de la signalisation NF- κ B dans les cellules cancéreuses prostatiques.

1.4. NF- κ B et thérapies anti-cancer

Le potentiel tumorigène associé à la voie classique et à la voie alternative NF- κ B soulève la question de leur utilisation à titre de cibles thérapeutiques pour lutter contre le cancer. Différents inhibiteurs NF- κ B ont été développés à des fins thérapeutiques et sont utilisés pour traiter certains cancers mais aussi des pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde. Certains de ces inhibiteurs abolissent la dégradation de I- κ B en neutralisant l'activité kinase des complexes IKK (PS-1145) (Yemelyanov et al., 2006) ou encore en affectant directement le protéasome (PS-341, bortezomide) (Adams et al., 1999; Chen et al., 2011; Yamamoto and Gaynor, 2004). D'autres agissent directement sur l'import nucléaire des dimères NF- κ B (SN50, SN52) (Lin et al., 1995; Xu et al., 2008).

Ces inhibiteurs NF- κ B, dont l'efficacité en monothérapie est discutable pour traiter le cancer, ont été testés en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques à l'action statique tels que les taxanes (docétaxel) qui affectent la division cellulaire, ou encore, le temozolomide (agent alkylant) qui endommage l'ADN. L'effet combiné des inhibiteurs NF- κ B et des radiations ionisantes sur la croissance tumorale a également été étudié. Les résultats observés sont variables et dépendent non seulement de l'inhibiteur utilisé, de sa cible et de sa spécificité d'action, mais aussi de l'agent avec lequel il est utilisé en multi-thérapie ainsi que des processus cellulaires ciblés. La signalisation NF- κ B influence de nombreux processus cellulaires et peut tout aussi bien être associée à des effets pro-prolifératifs que pro-apoptotiques selon les conditions d'activation ou le type de stress déclencheur. Ainsi, il a été rapporté que l'inhibition de la signalisation NF- κ B sensibilise les cellules cancéreuses aux dommages à l'ADN induits sous l'action de radiations ionisantes (Brassesco et al., 2013; Munshi et al., 2004) ou de drogues (Temozolomide) (Brassesco et al., 2013; Caporali et al., 2012). Par contre, l'apoptose induite par des agents affectant le cycle cellulaire (docétaxel) est abolie lorsque la signalisation NF- κ B est inhibée alors que son activation s'avère pro-apoptotique au sein des cellules traitées (Canfield et al., 2006; Parrondo et al., 2010).

Initialement développés pour neutraliser la voie classique NF- κ B, les inhibiteurs NF- κ B connaissent, pour la plupart, un défaut de spécificité principalement imputable au lien structural étroit entre les principales protéines intervenant dans la signalisation NF- κ B (Figure 13) ainsi qu'à la similitude des cascades d'activation des voies classique et alternative NF- κ B (Figures 16 et 17). Cela s'illustre bien avec les inhibiteurs du protéasome comme le bortezomide qui est largement utilisé en clinique dans le traitement de cancers du système immunitaire et est considéré comme l'inhibiteurs NF- κ B le plus efficace, mais également le

moins spécifique. Le bortezomide inhibe l'ensemble de la signalisation NF- κ B (classique et alternative) en bloquant la dégradation des I- κ B nécessaire à la production de dimères NF- κ B actifs. Cependant, le protéasome constitue une machinerie cellulaire ubiquitaire impliquée dans la plupart des processus cellulaires. Aussi, est-il impossible d'attribuer les bienfaits cliniques observés avec l'utilisation du bortezomide à son seul effet inhibiteur sur la signalisation NF- κ B.

Dans un souci de cibler plus spécifiquement l'une ou l'autre des deux voies de signalisation NF- κ B, des peptides inhibiteurs ont été développés. SN50 et SN52 agissent sur la signalisation NF- κ B en bloquant respectivement l'import nucléaire des sous-unités p50 et p52, et donc de chacun des dimères NF- κ B qui contient l'une ou l'autre (Lin et al., 1995; Xu et al., 2008). Une étude *in vitro* réalisée sur des cellules cancéreuses prostatiques montre que l'action inhibitrice de SN52 sur la signalisation NF- κ B les sensibilise à l'exposition aux radiations ionisantes, associant ainsi la voie alternative NF- κ B à la résistance aux radiothérapies (Xu et al., 2008). Cependant, bien qu'ayant une action à spectre plus restreint que les inhibiteurs du protéasome, la spécificité d'inhibition de SN50 ou SN52 sur l'une ou l'autre des voies de signalisation NF- κ B demeure relative. En effet, p50 intervient principalement dans la voie classique, par son interaction avec RelA(p65), mais est également impliqué dans la régulation de gènes-cibles de la voie alternative en se liant à RelB. De même, p52 qui est le principal partenaire moléculaire de la sous-unité alternative RelB, interagit aussi avec RelA(p65). Ainsi, en ciblant p50 ou p52 il est encore difficile d'affecter uniquement la voie classique ou la voie alternative NF- κ B. Il a, par ailleurs, été rapporté que SN50 pouvait également interférer avec l'import nucléaire d'autres facteurs de transcription que NF- κ B ajoutant ainsi une réserve supplémentaire à son usage en clinique (Boothby, 2001).

En fin de compte, à quel point est-il important de n'inhiber spécifiquement que l'une ou l'autre des voies NF- κ B? De plus en plus d'études associent un potentiel tumorigène autant à la voie classique qu'à la voie alternative NF- κ B. L'inhibition partielle ou complète des deux signalisations NF- κ B devrait plutôt constituer un avantage dans le traitement des cancers. Le grand problème de spécificité de ce genre thérapie ne devrait pas être concernant la voie de signalisation NF- κ B affectée mais plutôt les cellules ciblées car, tel que précédemment discuté, l'impact de la signalisation NF- κ B peut s'avérer pro- ou anti-tumorigène selon les cellules au sein desquelles elle est activée.

Dans un contexte de cancer solide comme le CaP, l'implication de la signalisation NF- κ B dans la progression tumorale est complexe étant donné que cellules tumorales et environnement immunitaire sont à considérer. Si, dans son ensemble l'activation de la signalisation NF- κ B revêt des propriétés essentiellement tumorigènes au sein des cellules cancéreuses, elle a tendance à globalement stimuler les cellules immunitaires aujourd'hui envisagées comme outil thérapeutique dans le traitement du CaP (Madan et al., 2013). Ainsi, à moins de pouvoir administrer des thérapies anti-NF- κ B qui cibleront spécifiquement les cellules tumorales, il apparaît essentiel de tenir compte de leurs effets certes sur la tumeur même, mais également sur son environnement ainsi que sur les réactions immunitaires anti-tumorales.

1.5. Voie classique et voie alternative NF- κ B dans le cancer

L'étude fonctionnelle de RelB que nous avons réalisée à partir de la lignée 22Rv1 nous a permis de souligner l'impact de la voie alternative NF- κ B sur la biologie de cellules ayant

une faible activité classique NF- κ B constitutive. En effet, tel que discuté dans le chapitre 1 de ce manuscrit, les cellules 22Rv1 arborent une activité transcriptionnelle classique NF- κ B quasi-nulle puisque, bien que RelA(p65) soit exprimé au sein de ces cellules, sa distribution cellulaire est restreinte au cytoplasme où ses différents gènes-cibles sont hors d'atteinte. Cela fait des cellules 22Rv1 un modèle d'étude particulièrement approprié pour évaluer les effets biologiques spécifiquement imputables à la voie alternative NF- κ B mais néanmoins peu représentatif de l'activité globale NF- κ B retrouvée dans l'ensemble des modèles cellulaires où voies alternative et classique sont sollicitées.

Indépendamment l'une de l'autre, la voie classique et la voie alternative NF- κ B ont été associées à un potentiel tumorigène dans divers cancers dont celui de la prostate. Il est aujourd'hui reconnu que les deux voies de signalisation NF- κ B peuvent interagir et intervenir chacune dans la régulation de l'autre. C'est ce qui est observé, par exemple, lorsque la cellule est soumise à des stimuli tels la présence de LPS ou de TNF- α dans le milieu environnant. Ce type de stimulation induit en effet une activation immédiate et brève de la voie classique qui résulte en l'expression de novo de RelB suivie d'une activation plus tardive et prolongée de la voie alternative NF- κ B (Bren et al., 2001). Ceci est un exemple illustrant le type d'interaction et de coopération existant entre les deux voies de signalisation NF- κ B. Elles peuvent également interagir à travers l'hétérodimérisation de leurs sous-unités transactivatrices, RelA(p65) et RelB. Cela constitue une régulation réciproque entre les deux voies de signalisation NF- κ B; car en effet, les dimères RelA(p65)/RelB étant incapables de lier l'ADN sont dépourvues d'activité transcriptionnelle propre et représentent, finalement, un moyen de séquestration réciproque des deux sous-unités qui sont alors maintenues inactives (Marienfeld et al., 2003).

Les voies de signalisation classique et alternative NF- κ B régulent de nombreux processus cellulaires. Il n'est pas rare de les voir intervenir au sein de même processus cellulaires à travers la régulation de mêmes gènes-cibles ou encore de gènes-cibles différents. Leurs effets peuvent alors être similaires comme c'est le cas dans la prolifération cellulaire suite à l'expression de la cycline D1 qui peut être influencée par les deux voies de signalisation (Dahlman et al., 2009; Demicco et al., 2005; Hinz et al., 1999). Dans notre étude (chapitre 1), nous avons montré que la voie alternative NF- κ B pouvait promouvoir l'autophagie, à l'instar de la voie classique qui la régule via l'expression d'une de ses cibles, Beclin-1 (Copetti et al., 2009b). Ce genre de redondance de la signalisation NF- κ B dans la régulation de processus cellulaires laisse supposer que l'absence de l'une des deux voies pourrait être compensée par la présence de l'autre dans certains cas.

Au cours de notre étude, nous avons noté que les effets de l'activation de la voie alternative NF- κ B observés dans les cellules 22Rv1 ne concordaient pas avec ce qui avait été rapporté sur les cellules LNCaP (Xu et al., 2009). En effet, alors que dans notre modèle RelB altère la capacité à croître en absence de matrice extracellulaire, dans la lignée LNCaP, au contraire, RelB la stimule. Une des différences entre ces deux lignées cellulaires est le statut d'activation de la voie classique NF- κ B, nulle dans les 22Rv1 et constitutive dans les LNCaP. Il serait raisonnable de proposer que l'activation de la voie classique NF- κ B, en conjonction à celle de la voie alternative conférerait un avantage pour la croissance de ces lignées prostatiques en absence de matrice extracellulaire suggérant ici une coopération entre les deux voies NF- κ B en réponse au stress causé par l'absence de matrice extracellulaire.

Ainsi, l'activation des deux signalisations NF- κ B, de même que la présence conjointe de leurs acteurs moléculaires au sein de la cellule revêt une importance biologique dont il faut

tenir compte, particulièrement dans un contexte de cancer. Cela justifie largement l'intérêt de les étudier, non plus individuellement, l'une et l'autre, mais plutôt conjointement afin d'évaluer l'importance de la signalisation NF- κ B dans son ensemble dans la progression du CaP.

2. Étude de NF- κ B par immunofluorescence sur micro-étalage de tissus

L'immunohistochimie (IHC), au sens large, renvoie à l'ensemble des méthodes de détection d'antigènes reposant sur l'utilisation d'anticorps spécifiques, et ce, au sein de tissus fixés. Tel que son étymologie l'indique, elle fait le lien entre trois disciplines scientifiques exploitées pour établir une méthodologie d'analyse robuste et fiable du tissu, à savoir : l'immunologie («immuno-»), l'histologie («-histo-») et la chimie («-chimie»). Elle inclut des techniques de détection basées sur des réactions histochimiques colorées (notamment enzymatiques) visibles en microscopie optique, ou encore sur l'utilisation de fluorochromes dont l'émission fluorescente est visible aux ultra-violets (Ramos-Vara, 2005). L'IHC, dans son ensemble, constitue un outil précieux largement exploité autant en clinique qu'en recherche fondamentale, et le choix des différentes techniques auxquelles elle réfère est, non seulement, fonction des antigènes étudiés mais aussi des informations recherchées.

2.1. Limites de l'immunohistochimie pour des études de co-distribution et de co-localisation

Ici, le terme IHC fait essentiellement référence à un protocole de détection enzymatique basé sur l'utilisation de peroxydase (HRP : Horseradish peroxydase) et de son

substrat chromogène, le 3-3' diaminobenzidine (DAB). L'ensemble des études de biomarqueurs réalisés au laboratoire l'a été par IHC dont la fiabilité n'est plus à démontrer. Cependant, si l'IHC constitue une stratégie expérimentale adaptée pour l'analyse de biomarqueurs individuellement, donc en marquage simple, elle présente toutefois plusieurs lacunes concernant des études de co-distribution (au sein d'un même compartiment cellulaire) et de co-localisation (interaction entre les biomarqueurs). En effet, des protocoles de marquages multiples IHC (2-3 marqueurs) simultanés ont été développés ; cependant, il est impossible d'évaluer la co-localisation, ni même la co-distribution, de deux biomarqueurs ; si bien qu'ils sont davantage préconisés pour l'étude de protéines occupant des compartiments cellulaires distincts (co-expression). Une stratégie visant à pallier à cet inconvénient est de procéder à de multiples marquages en séquence, à partir d'un même échantillon tissulaire d'une même lame. Le principe en est relativement simple ; après chaque IHC, les lames marquées pour un antigène donné sont numérisées et réutilisées pour une autre IHC après élution des précédents anticorps (Glass et al., 2009; Pirici et al., 2009). Les images récoltées suite aux différentes IHC consécutives peuvent dès lors être traitées via des logiciels d'imagerie à partir desquelles il est alors possible de procéder à une simple superposition d'images qui permettrait de visualiser la co-expression et la co-distribution des différents biomarqueurs, mais en aucun cas leur co-localisation. Les images ainsi obtenues seraient exploitées à titre purement illustratif. Il a été rapporté que, selon ce procédé, il serait possible d'effectuer plus de cinq IHC en séquence sans perte d'immunogénicité de l'échantillon traité ni de qualité de marquage (Glass et al., 2009). Néanmoins, il devient primordial, entre chaque immunohistochimie, de s'assurer de l'élution complète de chaque anticorps hybridé afin d'éviter les questions de spécificité du signal détecté à chaque étape. De plus, si comme la

littérature l'indique, plusieurs éluions successives n'affectent que très peu l'immunogénicité de l'échantillon, il apparaît nécessaire d'inclure des contrôles de marquages IHC classiques pour attester de la validité du marquage en excluant tout bruit-de-fond résiduel. Ce dernier point revêt une importance particulière dans les cas où les intensités de signal sont prises en compte dans l'évaluation de l'expression de l'antigène étudié.

Malgré la possibilité de marquages multiples à partir d'un seul et même échantillon, l'utilisation de logiciels de traitement d'images quelconques pour obtenir la superposition des différents biomarqueurs analysés apparaît inadéquate pour des études à grande échelle. L'utilisation de matériel tel que des micro-étalages de tissus (TMAs), regroupant un nombre important d'échantillons sur une même lame, nécessiterait un traitement d'images pour chacune des carottes de tissus représentée, et ce, pour chacun des biomarqueurs à l'étude. Ainsi, le marquage multiple IHC en séquence semble être plus approprié pour des analyses qualitatives et illustratives de co-expression de deux biomarqueurs ou plus, mais inadéquat pour des études plus quantitatives impliquant un nombre important d'échantillons.

2.2. Immunofluorescence sur micro-étalages de tissus : considérations techniques

L'immunofluorescence (IF) est une alternative à l'IHC classique puisqu'elle permet le marquage simultané de plusieurs antigènes afin d'évaluer autant leur co-expression, leur co-distribution que leur co-localisation. Étant données les restrictions qu'impose l'utilisation de l'IHC dans l'étude conjointe de deux marqueurs, c'est donc par IF que nous avons choisi

étudier la signalisation NF- κ B au sein de tissus cancéreux prostatiques de patients et ce, à partir d'échantillons de PR.

2.2.1. Autofluorescence

L'utilisation de l'IF sur des tissus a longtemps été limitée à cause de leur autofluorescence dont le spectre d'émission, entre 488 et 568 nm, interfère avec celui de plusieurs fluorochromes couramment utilisés. Cette autofluorescence, imputable en grande partie à la présence de molécules intracellulaires comme la lipofuscine (produit de peroxydation de lipides) ou stromales telles que le collagène et l'élastine, varie en intensité selon le tissu considéré. Mais elle est aussi fonction du procédé de fixation et de conservation du tissu. Ainsi, pour les tissus fixés au formaldéhyde et montés en bloc de paraffine (FFPE pour «Formalin-fixed paraffin embedded»), l'autofluorescence de base est exacerbée par le procédé de fixation qui génère des produits fluorescents additionnels et par la paraffine dans laquelle la lipofuscine persiste. Pour ces raisons, l'IF est plus volontiers utilisée sur des tissus frais congelés pouvant alors être fixés à l'aide de solvants organiques tels que l'éthanol et le méthanol.

Pour des études de biomarqueurs sur d'importantes cohortes de patients, l'usage de TMAs est de mise puisqu'ils permettent d'inclure de nombreux échantillons de tissus de différents patients sur une seule et même lame. Cependant, la construction de ce type de matériel implique l'utilisation de tissus FFPE dont de minuscules portions sont prélevés et transférés dans un bloc de paraffine vierge destiné à recevoir le TMA complet. Avant de songer à utiliser ce type de matériel pour des études d'IF, il est donc crucial de diminuer

l'autofluorescence tissulaire des échantillons. Plusieurs protocoles ont été proposés dans ce but et pour les besoins de nos travaux nous avons opté pour l'utilisation du noir de Soudan (Sudan Black B noté SBB). Il a en effet été rapporté que son utilisation dans un protocole de marquage immunofluorescent permettrait de diminuer considérablement l'autofluorescence de tissus tels que ceux du foie, du rein, du pancréas, et ce, à une longueur d'onde d'émission de 488 nm mais pas à 568 nm où elle persiste (Viegas et al., 2007). Cet aspect est particulièrement intéressant puisque, dans le cadre de notre étude, nous avons eu recours, pour le marquage de RelB, au Alexa fluor 488 (A488) dont l'émission de fluorescence verte est optimale à 513 nm. Nous nous sommes ainsi assurés de minimiser les interférences de l'autofluorescence sur le signal d'intérêt de RelB afin de pouvoir en faire l'analyse quantitative.

Les fluorochromes indocarbocyanine (Cy3) et Alexa fluor 546 (A546) dont les émissions de fluorescence orange sont optimales respectivement à 570 et 572 nm ont également été utilisés. Le spectre d'émission de l'autofluorescence tissulaire s'étendant de 420 à 570 nm, il serait raisonnable de penser qu'elle pourrait également causer un problème concernant ces fluorochromes puisqu'il semble que le SBB échoue à en diminuer efficacement l'intensité à 568 nm. Dans notre étude, les Cy3 et A546 ont été utilisés afin de déterminer le masque épithélial prostatique ayant servi à définir les régions d'analyse de RelB et RelA(p65). Or, l'autofluorescence du tissu prostatique riche en fibres d'élastine et de collagène est essentiellement stromal ; ce qui aurait pu interférer avec notre capacité à spécifiquement identifier l'épithélium prostatique. Il s'avère que le masque épithélial tel que nous l'avons défini à l'aide des cytokératines 18 et 19 (CK18/19) et de l'APS nous assure une couverture optimale et suffisamment intense de l'épithélium pour se distinguer efficacement du bruit de

fond, de sorte que le logiciel d'analyse utilisé ne présente que peu de difficultés à identifier l'épithélium au sein des échantillons de tissus. Dans les quelques cas où le logiciel reconnaît des zones stromales dont le bruit de fond est trop intense nous avons pu manuellement les exclure afin de préserver la spécificité de la sélection épithéliale. Le DAPI utilisé pour le marquage de l'ADN émet une fluorescence bleue (455 nm) suffisamment intense pour se distinguer du bruit de fond et assurer l'identification des compartiments nucléaires. Enfin, l'autofluorescence de nos échantillons n'interfère aucunement concernant le signal de l'indodicarbocyanine (Cy5), émettant dans le rouge à une longueur d'onde de 670 nm, qui a été utilisé pour le marquage de RelA(p65) et quantifié pour les besoins de l'étude.

En définitive, l'autofluorescence propre aux tissus prostatiques dont le spectre d'émission de fluorescence inclut ceux de trois des fluorochromes utilisés ici (DAPI, Cy3/A546 et A488) aurait pu affecter la qualité de nos analyses et a été limitée grâce à l'utilisation du SBB.

2.2.2. Utilisation de plusieurs anticorps d'un même isotype pour un marquage multiple en immunofluorescence

Un autre facteur limitant les marquages multiples en IF est tout simplement la disponibilité d'anticorps. Une des conditions *sine qua non* de ce genre d'expérience est la disponibilité d'anticorps de différentes espèces de sorte que chaque anticorps secondaire ne reconnaisse qu'un seul et unique anticorps primaire. Pour les besoins de notre étude cependant il nous a été difficile de répondre à cette exigence. En effet, en plus de nos deux antigènes d'intérêt, RelA(p65) et RelB, dont les anticorps spécifiques sont respectivement issus de la

souris et du lapin (Chapitre 1), nous avons également dû travailler avec les antigènes utilisés pour la définition du masque épithélial prostatique ; à savoir, les CK18/19 ainsi que l'APS. Alors que l'anti-APS est un anticorps produit dans la chèvre, les anti-CK18 et anti-CK19 sont quant à eux issus de la souris, à l'instar de l'anti-RelA(p65). Malgré une recherche exhaustive d'anticorps anti-cytokératines que nous avons effectuée il nous a été impossible d'en trouver qui soient produits dans d'autres organismes que la souris ou le lapin. Aussi, nous a-t-il fallu trouver une alternative nous permettant d'utiliser tous les anticorps primaires nécessaires à notre analyse sans pour autant nuire à la qualité ni à la spécificité du marquage multiple IF.

De nombreuses études fondamentales réalisées au sein de la souris requièrent l'utilisation d'anticorps également développés chez la souris. Bien entendu, des problèmes de spécificité de marquage se posent étant donnée la présence potentielle d'immunoglobulines (Ig) endogènes de l'animal qui s'ajoutent à celle des anticorps primaires utilisés dans le cadre des études IHC ou IF. En effet, les anti-Ig utilisés à titre d'anticorps secondaires ne faisant pas la distinction entre les Ig endogènes et les Ig de marquage, produisent un important bruit de fond qui altère la qualité des analyses effectuées. Pour pallier à cet inconvénient, des solutions de blocage ayant la capacité de lier les Ig de souris ont été développées afin de limiter l'affinité de liaison des anticorps secondaires avec ceux-ci. Nous avons étendu ce principe de blocage à notre étude pour pouvoir utiliser consécutivement plus d'un anticorps primaire produit dans la souris, notamment l'anti-RelA(p65) suivi du marquages aux anti-CK18/19.

Grâce à l'alternative qu'offre cette méthode de blocage il est désormais possible d'envisager des marquages multiples impliquant un plus grand nombre d'anticorps, la limite de l'espèce (souris) ayant été repoussée grâce à ce procédé. Ainsi, selon la disponibilité d'un microscope doté du nombre approprié de filtres, par immunofluorescence, il est possible de

marquer jusqu'à trois biomarqueurs en plus du DAPI et du masque épithélial qui permettent d'en circonscrire l'analyse.

2.2.3. Analyse quantitative de la fluorescence

Les précédentes études qui ont été réalisées au laboratoire, portant sur le profil d'expression et de distribution des sous-unités NF- κ B classique et alternative, respectivement RelA(p65) et RelB, l'ont été par IHC. Notre étude IHC des différentes sous-unités NF- κ B, incluant RelA(p65) et RelB, a été réalisée à partir de coupes sériées de TMA et a donné lieu à des analyses corrélatives d'expression de celles-ci, deux à deux (Lessard et al., 2005). Les résultats rapportés s'avèrent plutôt informatifs du statut de RelA(p65) et RelB ainsi que de l'activation potentielle des voies classique et alternative NF- κ B l'une par rapport à l'autre au sein d'un même patient mais pas d'un même tissu. En procédant par IF nous avons la possibilité d'évaluer la présence conjointe de RelA(p65) et RelB au sein d'un même tissu, voire d'une même cellule, ainsi que leur distribution nucléaire qui est un indice d'activation des voies NF- κ B classique et alternative.

a) Définition des régions d'intérêt pour l'analyse de la fréquence nucléaire

S'il est aisé d'évaluer manuellement l'intensité de marquage ou même la distribution nucléaire de chaque biomarqueur individuellement, cela est beaucoup plus délicat lorsqu'il s'agit de co-distribution ou même de co-localisation ; aussi avons-nous eu recours à un logiciel d'analyse. Nous avons procédé à des analyses de co-expression et de co-distribution d'une part parce que les images numérisées sur lesquelles nous avons travaillé n'ont pas été générées à

partir d'un microscope confocal à fluorescence et, donc, ne permettent pas d'effectuer d'analyses de co-localisation ; d'autre part, parce que d'un point de vue fonctionnel, nous voulions évaluer l'activation potentielle de chacune des voies NF- κ B seule ou conjointement au sein d'un tissu épithélial prostatique.

L'utilisation d'un masque épithélial, ainsi que le marquage systématique du compartiment nucléaire au DAPI, ont permis d'intégrer différents paramètres tels que la morphologie, la taille et l'intensité de fluorescence à notre analyse. De cette façon le logiciel utilisé (VisiomorphDP, de Visiopharm) a été capable d'identifier séquentiellement le tissu épithélial prostatique (fluorescence orange) puis les noyaux (fluorescence bleue) au sein du tissu prédéfini. Malgré l'hétérogénéité structurale des échantillons de tissus des différents TMAs, essentiellement imputable aux différents types et grades histologiques rencontrés dans le CaP, ces étapes d'identification se sont révélées efficaces. Nous avons cependant relevé qu'il était rare que le logiciel reconnaisse la totalité des noyaux présents au sein des épithéliums pré-identifiés. À l'instar des tissus, les noyaux présentent une hétérogénéité non seulement dans la taille, la forme mais également dans la texture de leur chromatine, et donc dans la répartition de la fluorescence bleue qui varie selon l'organisation et la quantité de l'ADN. Ainsi, a-t-il fallu intégrer des paramètres s'appliquant à la majorité des noyaux observés pour une identification optimale des noyaux. L'un des paramètres de quantification de nos marqueurs d'intérêt étant leur présence dans le compartiment nucléaire, pour peu qu'un nombre conséquent de noyaux ait été identifié, la perte d'une minorité de noyaux ne pose pas de réel problème pour définir une distribution moyenne représentative applicable à l'ensemble du tissu. Par contre, les critères d'exclusion des noyaux par le logiciel pourraient, eux, introduire un biais difficile à contourner dans notre étude. En effet, les noyaux que le logiciel

échoue à reconnaître sont essentiellement ceux dont l'intensité de fluorescence est la plus faible. Cela inclut les noyaux appartenant à un plan spatial différent de celui ajusté pendant le processus de numérisation des lames de TMAs (hors-focus), certes, mais également ceux dont la chromatine est potentiellement décondensée ou tout simplement moins abondante. Dans ce dernier cas, cela pourrait introduire un biais de sélection parmi les cellules quantifiées dont le contenu en chromatine serait d'emblée plus important ou plus compact.

L'aneuploidie, désordre affectant la quantité globale de chromatine est associé à la carcinogénèse et conduit à de l'instabilité génomique (Gordon et al., 2012). De même, des défauts dans le profil de condensation de la chromatine sont également impliqués dans le cancer. De nombreuses études rapportent en effet des modifications importantes dans les niveaux de méthylation et d'acétylation des histones, processus épigénétiques qui régulent l'expression génique en influant sur le degré de compaction de l'ADN (Ballestar and Esteller, 2002). Bien qu'il puisse y avoir un biais de sélection nucléaire introduit dans notre analyse, la quantité de noyaux inclus dans nos analyses en constituant la majorité nous estimons que l'impact sur nos résultats devrait en être amoindri.

b) Quantification de la fluorescence

La quantification de RelA(p65) et RelB est effectuée à partir des zones d'analyse définies pour chacune des carottes de tissus de chaque TMA, à savoir le tissu épithéliale et les noyaux qu'il contient. L'utilisation d'un logiciel de quantification de la fluorescence permet d'en mesurer l'intensité correspondant au marquage de RelA(p65) et RelB. Les données brutes ainsi récoltées représentent des données brutes à partir desquels nous avons générées des

variables catégorielles illustrant le statut (positif ou négatif) de chaque patient pour chacune d'entre elles (Chapitre 3). Étant des intensités moyennes de fluorescence, ces valeurs sont représentatives du niveau d'expression globale de RelA(p65) et RelB au sein du tissu épithélial dans son ensemble, incluant cytoplasmes et noyaux, ainsi que de leur présence nucléaire moyenne au sein des cellules épithéliales. Ainsi, nos analyses se sont appuyées sur le niveau global d'expression et d'activation potentielle des signalisations NF- κ B, illustrée par la présence nucléaire de RelA(p65) et RelB. Par contre, l'ensemble des études IHC effectuées jusqu'à ce jour s'appuient sur l'analyse de la fréquence nucléaire. Donc plutôt que d'évaluer le niveau moyen d'activation des signalisations NF- κ B au sein du tissu épithélial prostatique, il s'agissait alors de déterminer la quantité de cellules dans lesquelles elles sont activées.

Déterminer la fréquence nucléaire à partir de nos données d'intensité de fluorescence associées au marquage de RelA(p65) et RelB, il est impératif de définir une valeur-seuil de positivité des noyaux marqués. C'est que réside toute la difficulté de cette approche. L'utilisation de matériel tel que des TMAs implique une quantité importante d'échantillons représentés sur une même lame qui sont alors simultanément traités selon notre protocole de marquage multiple IF. À cause, non seulement du nombre de carottes de tissus présents sur chaque TMA, mais aussi des quatre spectres d'émission de fluorescence utilisés pour notre analyse, le processus de numérisation s'est avéré long, impliquant quatre expositions successives pour chacune des régions numérisées, et ce, dans le but de générer une image incluant la superposition de chacun des filtres utilisés. Le « photoblanchiment » ou affadissement (de l'anglais « photobleaching » ou « fading ») d'un fluorochrome est un phénomène par lequel ce dernier se dégrade et perd irréversiblement sa capacité à émettre de la fluorescence. D'un point de vue pratique cela se traduit, dans notre cas, par une diminution

progressive et subtile du signal global émis à mesure que le TMA est numérisé, de sorte qu'il devient difficile de définir une seule et même valeur-seuil de positivité de signal pour RelA(p65) et RelB sur un TMA complet. Les variations imputables au photoblanchiment sont relativement faibles mais suffisamment importantes pour introduire un biais dans l'identification de noyaux faiblement marqués qui ressortiraient alors comme de faux positifs ou de faux négatifs si cette valeur est mésestimée. Afin d'amoindrir l'exposition des TMAs complet pendant la numérisation, nous avons subdivisé chaque lame en portions plus restreintes et ajuster une valeur-seuil adaptée à chacune d'entre elles. De cette façon avons-nous limité l'impact du photoblanchiment sur l'ensemble des résultats finaux. Un problème additionnel s'est néanmoins posé, à savoir la normalisation de nos résultats de sorte que les données collectées pour chacune des régions numérisées d'un même TMA puissent être comparés entre elles, de même que les données des différents TMAs inclus dans notre analyse. N'ayant trouvé, pour l'instant, de solution convenable pour contourner ce problème nous avons centré notre étude sur l'analyse des intensités de fluorescence qui constituent des valeurs objectives mesurées par le logiciel d'analyse.

En définitive, l'utilisation d'un logiciel informatique nous a permis de quantifier de façon semi-automatisée et objective la fluorescence des marquages de RelA(p65) et RelB de nos TMAs. Les données brutes générées ont été à la base de l'étude présentée dans ce manuscrit (Chapitre 3) mais méritent d'être exploitées à plein potentiel notamment pour l'analyse de la fréquence nucléaire de RelA(p65) et RelB. Car bien plus que de permettre l'étude de leur co-expression, l'IF rend possible l'étude de leur co-distribution nucléaire et donc, par le fait même, celle de la co-activation des voies classique et alternative NF- κ B au sein de mêmes cellules cancéreuses prostatiques.

Conclusion

L'implication du facteur de transcription NF- κ B dans la tumorigénèse a longtemps été associée à l'activité classique de la sous-unité RelA(p65). Les études émergentes de ces dernières années portant sur la voie alternative NF- κ B, et le cancer en général, ont depuis mis en évidence son intervention dans la tumorigénèse et la progression tumorale. Ainsi, dans nombre de cancers, la signalisation NF- κ B, tant classique qu'alternative, semble jouer un rôle non négligeable dans la tumorigénèse du CaP. Par contre, si le potentiel pro-tumorigène de la voie classique sur le CaP est maintenant bien documenté et aujourd'hui reconnu, pour ce qui est la voie alternative, plusieurs interrogations demeurent. L'activation de la voie alternative NF- κ B dans les cellules cancéreuses prostatiques est-elle pro- ou anti-tumorigène? Par quels mécanismes biologiques en influence-t-elle le comportement ? Quel en est l'impact sur le CaP et le devenir des patients ? Les travaux décrits dans ce manuscrit apportent des éléments de réponses à ces interrogations et, je l'espère, aideront à lever le voile sur l'implication de la voie alternative NF- κ B dans le CaP.

Ce projet de thèse aura permis de préciser le rôle de la voie alternative NF- κ B dans la tumorigénèse du CaP en soulignant l'impact de son activation sur la biologie de cellules cancéreuses prostatiques. Les effets prolifératifs de RelB confirment l'implication de la signalisation alternative NF- κ B dans la tumorigénèse du CaP. Son rôle dans la régulation de l'autophagie, démontrée pour la première fois ici, suggère que la voie alternative NF- κ B pourrait également intervenir dans la progression tumorale.

Notre étude de co-expression de RelA(p65) et de RelB au sein des tissus prostatiques de patients atteints de CaP a confirmé l'intérêt en clinique de RelA(p65) en tant que biomarqueur prédictif de la rechute biochimique. Cependant, malgré l'impact indéniable de la voie alternative NF- κ B sur la biologie du CaP, l'absence de corrélations entre RelB et les différents paramètres cliniques inclus dans l'étude souligne qu'en tant que biomarqueur RelB est moins informatif sur le devenir des patients que RelA(p65). Ainsi, bien que l'étude de RelB revête un intérêt particulier pour la compréhension de l'implication de la signalisation NF- κ B dans le CaP, d'un point de vue clinique, c'est RelA(p65) qui ressort comme étant le biomarqueur NF- κ B le plus prometteur.

En conclusion, notre étude de la voie alternative NF- κ B illustre bel bien son implication dans le CaP bien qu'il nous ait été difficile de l'associer à un potentiel pro- ou anti-tumorigène. Le flou demeurant sur la question dénote l'intérêt, voire le besoin, d'explorer davantage le rôle de la voie alternative NF- κ B dans le CaP pour mieux en comprendre la biologie.

BIBLIOGRAPHIE

(Société canadienne du cancer (cancer.ca/statistiques)). Statistiques sur le cancer 2013.

Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., and Elliott, P.J. (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research* 59, 2615-2622.

Andreoiu, M., and Cheng, L. (2010). Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Human pathology* 41, 781-793.

Arlt, A., Schafer, H., and Kalthoff, H. (2012). The 'N-factors' in pancreatic cancer: functional relevance of NF-kappaB, NFAT and Nrf2 in pancreatic cancer. *Oncogenesis* 1, e35.

Balcerczak, E., Balcerczak, M., and Mirowski, M. (2007). Quantitative analysis of the p65 gene expression in patients with colorectal cancer. *International journal of biomedical science : IJBS* 3, 287-291.

Ballestar, E., and Esteller, M. (2002). The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 23, 1103-1109.

Ben-Neriah, Y., and Karin, M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nature immunology* 12, 715-723.

Benedetti, G., Fokkelman, M., Yan, K., Fredriksson, L., Herpers, B., Meerman, J., van de Water, B., and de Graauw, M. (2013). The nuclear factor kappaB family member RelB facilitates apoptosis of renal epithelial cells caused by cisplatin/tumor necrosis factor alpha synergy by suppressing an epithelial to mesenchymal transition-like phenotypic switch. *Molecular pharmacology* 84, 128-138.

Berezovskaya, O., Schimmer, A.D., Glinskii, A.B., Pinilla, C., Hoffman, R.M., Reed, J.C., and Glinsky, G.V. (2005). Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer research* 65, 2378-2386.

Bianchi-Frias, D., Vakar-Lopez, F., Coleman, I.M., Plymate, S.R., Reed, M.J., and Nelson, P.S. (2010). The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PloS one* 5.

Boothby, M. (2001). Specificity of sn50 for NF-kappa B? *Nature immunology* 2, 471-472.

Bostwick, D.G., and Cheng, L. (2012). Precursors of prostate cancer. *Histopathology* 60, 4-27.

Brassescio, M.S., Roberto, G.M., Morales, A.G., Oliveira, J.C., Delsin, L.E., Pezuk, J.A., Valera, E.T., Carlotti, C.G., Jr., Rego, E.M., de Oliveira, H.F., *et al.* (2013). Inhibition of NF-kappa B by Dehydroxymethylepoxyquinomicin Suppresses Invasion and Synergistically Potentiates Temozolomide and gamma -Radiation Cytotoxicity in Glioblastoma Cells. *Chemotherapy research and practice* 2013, 593020.

Bren, G.D., Solan, N.J., Miyoshi, H., Pennington, K.N., Pobst, L.J., and Paya, C.V. (2001). Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. *Oncogene* 20, 7722-7733.

Calabrese, D.A. (2004). Prostate cancer in older men. *Urologic nursing* 24, 258-264, 268; quiz 269.

Campeau, E., Ruhl, V.E., Rodier, F., Smith, C.L., Rahmberg, B.L., Fuss, J.O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P.K., and Kaufman, P.D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PloS one* 4, e6529.

Canfield, S.E., Zhu, K., Williams, S.A., and McConkey, D.J. (2006). Bortezomib inhibits docetaxel-induced apoptosis via a p21-dependent mechanism in human prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 5, 2043-2050.

Caporali, S., Levati, L., Graziani, G., Muzi, A., Atzori, M.G., Bonmassar, E., Palmieri, G., Ascierio, P.A., and D'Atri, S. (2012). NF-kappaB is activated in response to temozolomide in an AKT-dependent manner and confers protection against the growth suppressive effect of the drug. *Journal of translational medicine* 10, 252.

- Carles, J., Castellano, D., Climent, M.A., Maroto, P., Medina, R., and Alcaraz, A. (2012). Castration-resistant metastatic prostate cancer: current status and treatment possibilities. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* *14*, 169-176.
- Castro, E., and Eeles, R. (2012). The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian journal of andrology* *14*, 409-414.
- Charatan, F.B. (1998). Prostate cancer screening reduces deaths. *Bmj* *316*, 1626.
- Chen, C.-S. (2007). Differential Diagnosis of Benign Prostate Hyperplasia with Lower Urinary Tract Symptoms. *Incont Pelvic Floor Dysfunct* *1*, 9-13.
- Chen, W., Li, Z., Bai, L., and Lin, Y. (2011). NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Frontiers in bioscience* *16*, 1172-1185.
- Cheng, L., Montironi, R., Bostwick, D.G., Lopez-Beltran, A., and Berney, D.M. (2012). Staging of prostate cancer. *Histopathology* *60*, 87-117.
- Chiarugi, P., and Giannoni, E. (2008). Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical pharmacology* *76*, 1352-1364.
- Choi, A.M., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine* *368*, 1845-1846.
- Connelly, L., Robinson-Benion, C., Chont, M., Saint-Jean, L., Li, H., Polosukhin, V.V., Blackwell, T.S., and Yull, F.E. (2007). A transgenic model reveals important roles for the NF-kappa B alternative pathway (p100/p52) in mammary development and links to tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry* *282*, 10028-10035.
- Cooperberg (2010). Understanding and Applying Risk Assessment for Prostate Cancer. *PCRI insights* *13*.

Copetti, T., Bertoli, C., Dalla, E., Demarchi, F., and Schneider, C. (2009a). p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Molecular and cellular biology* 29, 2594-2608.

Copetti, T., Demarchi, F., and Schneider, C. (2009b). p65/RelA binds and activates the beclin 1 promoter. *Autophagy* 5, 858-859.

Cormier, F., Monjanel, H., Fabre, C., Billot, K., Sapharikas, E., Chereau, F., Bordereaux, D., Molina, T.J., Avet-Loiseau, H., and Baud, V. (2013). Frequent engagement of RelB activation is critical for cell survival in multiple myeloma. *PLoS one* 8, e59127.

D'Amico, A.V., Whittington, R., Malkowicz, S.B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G.A., Tomaszewski, J.E., Renshaw, A.A., Kaplan, I., Beard, C.J., *et al.* (1998). Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 280, 969-974.

Dahlman, J.M., Wang, J., Bakkar, N., and Guttridge, D.C. (2009). The RelA/p65 subunit of NF-kappaB specifically regulates cyclin D1 protein stability: implications for cell cycle withdrawal and skeletal myogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 106, 42-51.

Dalby, K.N., Tekedereli, I., Lopez-Berestein, G., and Ozpolat, B. (2010). Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* 6, 322-329.

Darwish, O.M., and Raj, G.V. (2012). Management of biochemical recurrence after primary localized therapy for prostate cancer. *Frontiers in oncology* 2, 48.

Dawson, N.A., and Ryan, C.J. (2013). Castrate resistant prostate cancer: Treatments targeting the androgen pathway. *UpToDate.com*.

Dejardin, E. (2006). The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical pharmacology* 72, 1161-1179.

Demicco, E.G., Kavanagh, K.T., Romieu-Mourez, R., Wang, X., Shin, S.R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., and Sonenshein, G.E. (2005). RelB/p52 NF-kappaB complexes rescue an early delay in mammary gland development in transgenic mice with targeted superrepressor IkappaB-alpha expression and promote carcinogenesis of the mammary gland. *Molecular and cellular biology* 25, 10136-10147.

Desgrosellier, J.S., Barnes, L.A., Shields, D.J., Huang, M., Lau, S.K., Prevost, N., Tarin, D., Shattil, S.J., and Cheresch, D.A. (2009). An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nature medicine* 15, 1163-1169.

Disibio, G., and French, S.W. (2008). Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Archives of pathology & laboratory medicine* 132, 931-939.

Domingo-Domenech, J., Mellado, B., Ferrer, B., Truan, D., Codony-Servat, J., Sauleda, S., Alcover, J., Campo, E., Gascon, P., Rovira, A., *et al.* (2005). Activation of nuclear factor-kappaB in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse. *British journal of cancer* 93, 1285-1294.

Droz, J.P., Flechon, A., and Terret, C. (2002). Prostate cancer: management of advanced disease. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 13 Suppl 4, 89-94.

Dumont, P., Petein, M., Lespagnard, L., Tueni, E., and Coune, A. (1993). Unusual behaviour of the LNCaP prostate tumour xenografted in nude mice. *In Vivo* 7, 167-170.

Ellison, L.F., and Wilkins, K. (2010). *Mise à jour sur la survie au cancer*, S. Canada, ed.

Epstein, J.I. (2010). An update of the Gleason grading system. *The Journal of urology* 183, 433-440.

Eskelinen, E.L. (2005). Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 2, 1468-1472.

Espinosa, L., Bigas, A., and Mulero, M.C. (2011). Alternative nuclear functions for NF-kappaB family members. *American journal of cancer research* *1*, 446-459.

Ferraro, E., and Cecconi, F. (2007). Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of biochemistry and biophysics* *462*, 210-219.

Foo, S.Y., and Nolan, G.P. (1999). NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends in genetics : TIG* *15*, 229-235.

Fournier, G., Valeri, A., Mangin, P., and Cussenot, O. (2004). [Prostate cancer: Diagnosis and staging]. *Annales d'urologie* *38*, 207-224.

Fradet, V., Lessard, L., Begin, L.R., Karakiewicz, P., Masson, A.M., and Saad, F. (2004). Nuclear factor-kappaB nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 8460-8464.

Fritz, R.D., and Radziwill, G. (2010). CNK1 promotes invasion of cancer cells through NF-kappaB-dependent signaling. *Molecular cancer research : MCR* *8*, 395-406.

Gannon, P.O., Lessard, L., Stevens, L.M., Forest, V., Begin, L.R., Minner, S., Tennstedt, P., Schlomm, T., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2013). Large-scale independent validation of the nuclear factor-kappa B p65 prognostic biomarker in prostate cancer. *European journal of cancer* *49*, 2441-2448.

Gannon, P.O., Poisson, A.O., Delvoye, N., Lapointe, R., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2009). Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *Journal of immunological methods* *348*, 9-17.

Garnick, M.B. <http://www.harvardprostateknowledge.org/hormone-therapy-for-prostate-cancer>, Hormone therapy for prostate cancer (Harvard medical school + Harvard health publications).

Gerondakis, S., Banerjee, A., Grigoriadis, G., Vasanthakumar, A., Gugasyan, R., Sidwell, T., and Grumont, R.J. (2012). NF-kappaB subunit specificity in hemopoiesis. *Immunological reviews* 246, 272-285.

Ghosh, G., Wang, V.Y., Huang, D.B., and Fusco, A. (2012). NF-kappaB regulation: lessons from structures. *Immunological reviews* 246, 36-58.

Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-6684.

Glass, G., Papin, J.A., and Mandell, J.W. (2009). SIMPLE: a sequential immunoperoxidase labeling and erasing method. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 57, 899-905.

Gordon, D.J., Resio, B., and Pellman, D. (2012). Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature reviews Genetics* 13, 189-203.

Grassi, P., Verzoni, E., Montone, R., Testa, I., Garanzini, E., Biondani, P., Pusceddu, S., Braud, F.d., and Procopio, G. (2013). Future Directions in Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer (mCRPC): Clinical Rationale and Use of New-Generation Hormonal Therapies *Journal of cancer therapy* 4, 698-703.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.

Guadamillas, M.C., Cerezo, A., and Del Pozo, M.A. (2011). Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of cell science* 124, 3189-3197.

Harik, L.R., and O'Toole, K.M. (2012). Nonneoplastic lesions of the prostate and bladder. *Archives of pathology & laboratory medicine* 136, 721-734.

Harris, W.P., Mostaghel, E.A., Nelson, P.S., and Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature clinical practice Urology* 6, 76-85.

Heinlein, C.A., and Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews* 25, 276-308.

Helzer, K.T., Barnes, H.E., Day, L., Harvey, J., Billings, P.R., and Forsyth, A. (2009). Circulating tumor cells are transcriptionally similar to the primary tumor in a murine prostate model. *Cancer research* 69, 7860-7866.

Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., and Strauss, M. (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and cellular biology* 19, 2690-2698.

Hippert, M.M., O'Toole, P.S., and Thorburn, A. (2006). Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer research* 66, 9349-9351.

Hoedemaeker, R.F., Vis, A.N., and Van Der Kwast, T.H. (2000). Staging prostate cancer. *Microscopy research and technique* 51, 423-429.

Hoesel, B., and Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer* 12, 86.

Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716.

Holley, A.K., Xu, Y., St Clair, D.K., and St Clair, W.H. (2010). RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201, 129-136.

Horbinski, C., Mojesky, C., and Kyprianou, N. (2010). Live free or die: tales of homeless (cells) in cancer. *The American journal of pathology* 177, 1044-1052.

Hotte, S.J., and Saad, F. (2010). Current management of castrate-resistant prostate cancer. *Current oncology* 17 Suppl 2, S72-79.

<http://www.europeanurology.com/platinum-slide-series/zoom/9893> (Elsiver Ltd).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032722/>. Prostate Cancer Treatment (PDQ®) (Pubmed Health: National Cancer Institute).

<http://www.webpathology.com/image.asp?case=26&n=5>. High quality pathology of benign and malignant neoplasm and related entities (Web Pathology).

Huang, S., Pettaway, C.A., Uehara, H., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (2001). Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 20, 4188-4197.

Humphrey, P.A. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17, 292-306.

Humphrey, P.A. (2012). Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology* 60, 59-74.

Ismail, H.A., Lessard, L., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2004). Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *The Prostate* 58, 308-313.

Jacque, E., Billot, K., Authier, H., Bordereaux, D., and Baud, V. (2013). RelB inhibits cell proliferation and tumor growth through p53 transcriptional activation. *Oncogene* 32, 2661-2669.

Jacque, E., Tchenio, T., Piton, G., Romeo, P.H., and Baud, V. (2005). RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14635-14640.

Josson, S., Xu, Y., Fang, F., Dhar, S.K., St Clair, D.K., and St Clair, W.H. (2006). RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells. *Oncogene* 25, 1554-1559.

Kabeysa, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* *19*, 5720-5728.

Karantanos, T., Corn, P.G., and Thompson, T.C. (2013). Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene*.

Kassen, A., Sutkowski, D.M., Ahn, H., Sensibar, J.A., Kozlowski, J.M., and Lee, C. (1996). Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. *The Prostate* *28*, 89-97.

Kattan, M.W. (2008). A nomogram for predicting 10-year life expectancy in men with prostate cancer after definitive therapy. *Nature clinical practice Urology* *5*, 138-139.

Kim, Y.N., Koo, K.H., Sung, J.Y., Yun, U.J., and Kim, H. (2012). Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *International journal of cell biology* *2012*, 306879.

Kleinmann, N., Zaorsky, N.G., Showalter, T.N., Gomella, L.G., Lallas, C.D., and Trabulsi, E.J. (2012). The effect of ethnicity and sexual preference on prostate-cancer-related quality of life. *Nature reviews Urology* *9*, 258-265.

Klotz, L. (2012). Active surveillance for favorable-risk prostate cancer: background, patient selection, triggers for intervention, and outcomes. *Current urology reports* *13*, 153-159.

Koumakpayi, I.H., Le Page, C., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2010). Hierarchical clustering of immunohistochemical analysis of the activated ErbB/PI3K/Akt/NF-kappaB signalling pathway and prognostic significance in prostate cancer. *British journal of cancer* *102*, 1163-1173.

Kroemer, G., Marino, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* *40*, 280-293.

Kuyu, H., Lee, W.R., Bare, R., Hall, M.C., and Torti, F.M. (1999). Recent advances in the treatment of prostate cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 10*, 891-898.

Labouba, I., Poisson, A., Lafontaine, J., Delvoye, N., O.Gannon, P., Page, C.L., Saad, F., and Mes-Masson, A.-M. (xxxx). The RelB alternative NF-kappaB subunit promotes autophagy in 22Rv1 prostate cancer cells in vitro and affects mouse xenograft tumor growth in vivo. submitted to *Cancer Cell International* xx.

Lafontaine, J., Rodier, F., Ouellet, V., and Mes-Masson, A.M. (2012). Necdin, a p53-target gene, is an inhibitor of p53-mediated growth arrest. *PloS one* 7, e31916.

Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a001651.

Le Page, C., Koumakpayi, I.H., Alam-Fahmy, M., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2006). Expression and localisation of Akt-1, Akt-2 and Akt-3 correlate with clinical outcome of prostate cancer patients. *British journal of cancer* 94, 1906-1912.

Le Page, C., Koumakpayi, I.H., Lessard, L., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2005). EGFR and Her-2 regulate the constitutive activation of NF-kappaB in PC-3 prostate cancer cells. *The Prostate* 65, 130-140.

Lee, D.W., Ramakrishnan, D., Valenta, J., Parney, I.F., Bayless, K.J., and Sitcheran, R. (2013). The NF-kappaB RelB protein is an oncogenic driver of mesenchymal glioma. *PloS one* 8, e57489.

Lessard, L., Begin, L.R., Gleave, M.E., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2005). Nuclear localisation of nuclear factor-kappaB transcription factors in prostate cancer: an immunohistochemical study. *British journal of cancer* 93, 1019-1023.

Lessard, L., Karakiewicz, P.I., Bellon-Gagnon, P., Alam-Fahmy, M., Ismail, H.A., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2006a). Nuclear localization of nuclear factor-kappaB p65 in

primary prostate tumors is highly predictive of pelvic lymph node metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 5741-5745.

Lessard, L., Mes-Masson, A.M., Lamarre, L., Wall, L., Lattouf, J.B., and Saad, F. (2003). NF-kappa B nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. *BJU international* 91, 417-420.

Lessard, L., Mes-Masson, A.M., and Saad, F. (2006b). [NFkappaB : a new marker kappable of predicting prostate cancer outcome]. *Bulletin du cancer* 93, 891-899.

Lessard, L., Saad, F., Le Page, C., Diallo, J.S., Peant, B., Delvoye, N., and Mes-Masson, A.M. (2007). NF-kappaB2 processing and p52 nuclear accumulation after androgenic stimulation of LNCaP prostate cancer cells. *Cellular signalling* 19, 1093-1100.

Levy, I.G., Iscoe, N.A., and Klotz, L.H. (1998). Prostate cancer: 1. The descriptive epidemiology in Canada. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 159, 509-513.

Li, X., and Stark, G.R. (2002). NFkappaB-dependent signaling pathways. *Experimental hematology* 30, 285-296.

Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., and Hawiger, J. (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *The Journal of biological chemistry* 270, 14255-14258.

Liu, F., Xia, Y., Parker, A.S., and Verma, I.M. (2012a). IKK biology. *Immunological reviews* 246, 239-253.

Liu, Y., Hegde, P., Zhang, F., Hampton, G., and Jia, S. (2012b). Prostate cancer - a biomarker perspective. *Frontiers in endocrinology* 3, 72.

Lonergan, P.E., and Tindall, D.J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis* 10, 20.

Long, R.M., Morrissey, C., Fitzpatrick, J.M., and Watson, R.W. (2005). Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clinical science* 108, 1-11.

MacKenzie, L., McCall, P., Hatzieremia, S., Catlow, J., Adams, C., McArdle, P., Seywright, M., Tanahill, C., Paul, A., Underwood, M., *et al.* (2012). Nuclear factor kappaB predicts poor outcome in patients with hormone-naive prostate cancer with high nuclear androgen receptor. *Human pathology* 43, 1491-1500.

Madan, R.A., Gulley, J.L., and Kantoff, P.W. (2013). Demystifying immunotherapy in prostate cancer: understanding current and future treatment strategies. *Cancer journal* 19, 50-58.

Madu, C.O., and Lu, Y. (2010). Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Journal of Cancer* 1, 150-177.

Makarov, S.S. (2001). NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis research* 3, 200-206.

Mancino, A., and Lawrence, T. (2010). Nuclear factor-kappaB and tumor-associated macrophages. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 784-789.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.

Marienfeld, R., May, M.J., Berberich, I., Serfling, E., Ghosh, S., and Neumann, M. (2003). RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *The Journal of biological chemistry* 278, 19852-19860.

Marino, G., Madeo, F., and Kroemer, G. (2011). Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Current opinion in cell biology* 23, 198-206.

Maygarden, S.J., and Pruthi, R. (2005). Gleason grading and volume estimation in prostate needle biopsy specimens: evolving issues. *American journal of clinical pathology 123 Suppl*, S58-66.

McCall, P., Bennett, L., Ahmad, I., Mackenzie, L.M., Forbes, I.W., Leung, H.Y., Sansom, O.J., Orange, C., Seywright, M., Underwood, M.A., *et al.* (2012). NFkappaB signalling is upregulated in a subset of castrate-resistant prostate cancer patients and correlates with disease progression. *British journal of cancer 107*, 1554-1563.

McNeal, J.E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate 2*, 35-49.

Mineva, N.D., Wang, X., Yang, S., Ying, H., Xiao, Z.X., Holick, M.F., and Sonenshein, G.E. (2009). Inhibition of RelB by 1,25-dihydroxyvitamin D3 promotes sensitivity of breast cancer cells to radiation. *Journal of cellular physiology 220*, 593-599.

Montironi, R., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., and Cheng, L. (2011a). The Gleason grading system: where are we now? *Diagnostic histopathology 17*, 419-427.

Montironi, R., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., and Cheng, L. (2011b). Prostatic intraepithelial neoplasia: its morphological and molecular diagnosis and clinical significance. *BJU international 108*, 1394-1401.

Moore, F., Buonocore, S., Aksoy, E., Ouled-Haddou, N., Goriely, S., Lazarova, E., Paulart, F., Heirman, C., Vaeremans, E., Thielemans, K., *et al.* (2007). An alternative pathway of NF-kappaB activation results in maturation and T cell priming activity of dendritic cells overexpressing a mutated IkappaBalpha. *Journal of immunology 178*, 1301-1311.

Morais, C., Gobe, G., Johnson, D.W., and Healy, H. (2011). The emerging role of nuclear factor kappa B in renal cell carcinoma. *The international journal of biochemistry & cell biology 43*, 1537-1549.

- Munshi, A., Kurland, J.F., Nishikawa, T., Chiao, P.J., Andreeff, M., and Meyn, R.E. (2004). Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB radiosensitizes human melanoma cells. *Molecular cancer therapeutics* 3, 985-992.
- Murrow, L., and Debnath, J. (2013). Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annual review of pathology* 8, 105-137.
- Nagle, R.B., Brawer, M.K., Kittelson, J., and Clark, V. (1991). Phenotypic relationships of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostatic carcinoma. *The American journal of pathology* 138, 119-128.
- Newton, K., and Dixit, V.M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Nishina, T., Yamaguchi, N., Gohda, J., Semba, K., and Inoue, J. (2009). NIK is involved in constitutive activation of the alternative NF-kappaB pathway and proliferation of pancreatic cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 388, 96-101.
- Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A.P., and Kretz-Remy, C. (2009). Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy* 5, 766-783.
- Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a000034.
- Parrondo, R., de las Pozas, A., Reiner, T., Rai, P., and Perez-Stable, C. (2010). NF-kappaB activation enhances cell death by antimetabolic drugs in human prostate cancer cells. *Molecular cancer* 9, 182.
- Partin, A.W., Kattan, M.W., Subong, E.N., Walsh, P.C., Wojno, K.J., Oesterling, J.E., Scardino, P.T., and Pearson, J.D. (1997). Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-

institutional update. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 277, 1445-1451.

Patel, A.R., and Stephenson, A.J. (2011). Radiation therapy for prostate cancer after prostatectomy: adjuvant or salvage? *Nature reviews Urology* 8, 385-392.

Peant, B., Diallo, J.S., Lessard, L., Delvoye, N., Le Page, C., Saad, F., and Mes-Masson, A.M. (2007). Regulation of IkappaB kinase epsilon expression by the androgen receptor and the nuclear factor-kappaB transcription factor in prostate cancer. *Molecular cancer research : MCR* 5, 87-94.

Perkins, N.D. (2012). The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nature reviews Cancer* 12, 121-132.

Perkins, N.D., and Gilmore, T.D. (2006). Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell death and differentiation* 13, 759-772.

Pienta, K.J., and Esper, P.S. (1993). Risk factors for prostate cancer. *Annals of internal medicine* 118, 793-803.

Pirici, D., Mogoanta, L., Kumar-Singh, S., Pirici, I., Margaritescu, C., Simionescu, C., and Stanescu, R. (2009). Antibody elution method for multiple immunohistochemistry on primary antibodies raised in the same species and of the same subtype. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 57, 567-575.

Pomerantz, M., and Kantoff, P. (2007). Advances in the treatment of prostate cancer. *Annu Rev Med* 58, 205-220.

Powell, I.J. (2011). The precise role of ethnicity and family history on aggressive prostate cancer: a review analysis. *Archivos espanoles de urologia* 64, 711-719.

Prasad, S., Ravindran, J., and Aggarwal, B.B. (2010). NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Molecular and cellular biochemistry* 336, 25-37.

Ramos-Vara, J.A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology* 42, 405-426.

Rodier, F., Coppe, J.P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A., Munoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology* 11, 973-979.

Roehrborn, C.G. (2008). Pathology of benign prostatic hyperplasia. *International journal of impotence research* 20 *Suppl* 3, S11-18.

Rosenthal, S.A., and Sandler, H.M. (2010). Treatment strategies for high-risk locally advanced prostate cancer. *Nature reviews Urology* 7, 31-38.

Ross, J.S., Kallakury, B.V., Sheehan, C.E., Fisher, H.A., Kaufman, R.P., Jr., Kaur, P., Gray, K., and Stringer, B. (2004). Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 2466-2472.

Ruijter, E., van de Kaa, C., Miller, G., Ruiters, D., Debruyne, F., and Schalken, J. (1999). Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocrine reviews* 20, 22-45.

Saad, and McCormack, eds. (2008). *Comprendre le cancer de la prostate*, Les Editions Santé edn.

Sakamoto, K., Maeda, S., Hikiba, Y., Nakagawa, H., Hayakawa, Y., Shibata, W., Yanai, A., Ogura, K., and Omata, M. (2009). Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 2248-2258.

Sartor, A.O., Hricak, H., Wheeler, T.M., Coleman, J., Penson, D.F., Carroll, P.R., Rubin, M.A., and Scardino, P.T. (2008). Evaluating localized prostate cancer and identifying candidates for focal therapy. *Urology* 72, S12-24.

Saunders, ed. (1998a). *Campbell's Urology*.

Saunders, ed. (1998b). *Campbell's Urology*, 7th edn.

Saunders, ed. (1998c). *Campbell's Urology*, 7th edn.

Schneider, G., Saur, D., Siveke, J.T., Fritsch, R., Greten, F.R., and Schmid, R.M. (2006). IKKalpha controls p52/RelB at the *skp2* gene promoter to regulate G1- to S-phase progression. *The EMBO journal* 25, 3801-3812.

Sethi, G., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Experimental biology and medicine* 233, 21-31.

Shariat, S.F., Karakiewicz, P.I., Suardi, N., and Kattan, M.W. (2008). Comparison of nomograms with other methods for predicting outcomes in prostate cancer: a critical analysis of the literature. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 4400-4407.

Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development* 24, 1967-2000.

Shostak, K., and Chariot, A. (2011). NF-kappaB, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast cancer research : BCR* 13, 214.

Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 62, 10-29.

Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians* 63, 11-30.

Skjoth, I.H., and Issinger, O.G. (2006). Profiling of signaling molecules in four different human prostate carcinoma cell lines before and after induction of apoptosis. *International journal of oncology* 28, 217-229.

Smale, S.T. (2012). Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-kappaB family of transcription factors. *Immunological reviews* 246, 193-204.

Soysa, N.S., Alles, N., Weih, D., Lovas, A., Mian, A.H., Shimokawa, H., Yasuda, H., Weih, F., Jimi, E., Ohya, K., *et al.* (2010). The pivotal role of the alternative NF-kappaB pathway in maintenance of basal bone homeostasis and osteoclastogenesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25, 809-818.

Sramkoski, R.M., Pretlow, T.G., 2nd, Giaconia, J.M., Pretlow, T.P., Schwartz, S., Sy, M.S., Marengo, S.R., Rhim, J.S., Zhang, D., and Jacobberger, J.W. (1999). A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 35, 403-409.

Stephenson, R.A., Dinney, C.P., Gohji, K., Ordonez, N.G., Killion, J.J., and Fidler, I.J. (1992). Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* 84, 951-957.

Sun, S.C. (2011). Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell research* 21, 71-85.

Sun, S.C. (2012). The noncanonical NF-kappaB pathway. *Immunological reviews* 246, 125-140.

Sun, Z., and Andersson, R. (2002). NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* 18, 99-106.

Tabruyn, S.P., and Griffioen, A.W. (2007). A new role for NF-kappaB in angiogenesis inhibition. *Cell death and differentiation* 14, 1393-1397.

Taddei, M.L., Giannoni, E., Fiaschi, T., and Chiarugi, P. (2012). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of pathology* 226, 380-393.

Thiessen, E.U. (1974). Concerning a familial association between breast cancer and both prostatic and uterine malignancies. *Cancer* 34, 1102-1107.

Vallabhapurapu, S.D., Pagolu, K.R., and Vallabhapurapu, S. (2013). Regulation of the Alternative NF-kb Pathway and Its Role in Cancer. *J Cancer Sci Ther* 5.

Van der Kwast, T.H., and Roobol, M.J. (2013). Defining the threshold for significant versus insignificant prostate cancer. *Nature reviews Urology* 10, 473-482.

Venderbos, L.D., and Roobol, M.J. (2011). PSA-based prostate cancer screening: the role of active surveillance and informed and shared decision making. *Asian journal of andrology* 13, 219-224.

Viegas, M.S., Martins, T.C., Seco, F., and do Carmo, A. (2007). An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *European journal of histochemistry : EJH* 51, 59-66.

Wang, X., Belguise, K., Kersual, N., Kirsch, K.H., Mineva, N.D., Galtier, F., Chalbos, D., and Sonenshein, G.E. (2007). Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nature cell biology* 9, 470-478.

Weih, F., and Caamano, J. (2003). Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunological reviews* 195, 91-105.

Wharry, C.E., Haines, K.M., Carroll, R.G., and May, M.J. (2009). Constitutive non-canonical NFkappaB signaling in pancreatic cancer cells. *Cancer biology & therapy* 8, 1567-1576.

Wilson, K.M., Giovannucci, E.L., and Mucci, L.A. (2012). Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer. *Asian journal of andrology* 14, 365-374.

Witte, J.S. (2009). Prostate cancer genomics: towards a new understanding. *Nature reviews Genetics* 10, 77-82.

Wong, C.P., Bray, T.M., and Ho, E. (2009). Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages. *Cancer letters* 276, 38-46.

Xiao, G. (2007). Autophagy and NF-kappaB: fight for fate. *Cytokine & growth factor reviews* 18, 233-243.

Xiao, G., Rabson, A.B., Young, W., Qing, G., and Qu, Z. (2006). Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine & growth factor reviews* 17, 281-293.

Xu, Y., Fang, F., St Clair, D.K., Sompol, P., Josson, S., and St Clair, W.H. (2008). SN52, a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, blocks nuclear import of RelB:p52 dimer and sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation. *Molecular cancer therapeutics* 7, 2367-2376.

Xu, Y., Fang, F., St Clair, D.K., and St Clair, W.H. (2012). Inverse relationship between PSA and IL-8 in prostate cancer: an insight into a NF-kappaB-mediated mechanism. *PloS one* 7, e32905.

Xu, Y., Fang, F., Sun, Y., St Clair, D.K., and St Clair, W.H. (2010). RelB-dependent differential radiosensitization effect of STI571 on prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 9, 803-812.

Xu, Y., Josson, S., Fang, F., Oberley, T.D., St Clair, D.K., Wan, X.S., Sun, Y., Bakthavatchalu, V., Muthuswamy, A., and St Clair, W.H. (2009). RelB enhances prostate cancer growth: implications for the role of the nuclear factor-kappaB alternative pathway in tumorigenicity. *Cancer research* 69, 3267-3271.

Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (2004). IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends in biochemical sciences* 29, 72-79.

Yemelyanov, A., Gasparian, A., Lindholm, P., Dang, L., Pierce, J.W., Kisseljov, F., Karseladze, A., and Budunova, I. (2006). Effects of IKK inhibitor PS1145 on NF-kappaB

function, proliferation, apoptosis and invasion activity in prostate carcinoma cells. *Oncogene* 25, 387-398.

Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., and Haber, D.A. (2011). Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *The Journal of cell biology* 192, 373-382.

Zhong, X., and Rescorla, F.J. (2012). Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. *Cellular signalling* 24, 393-4

Annexe

Résultats supplémentaires

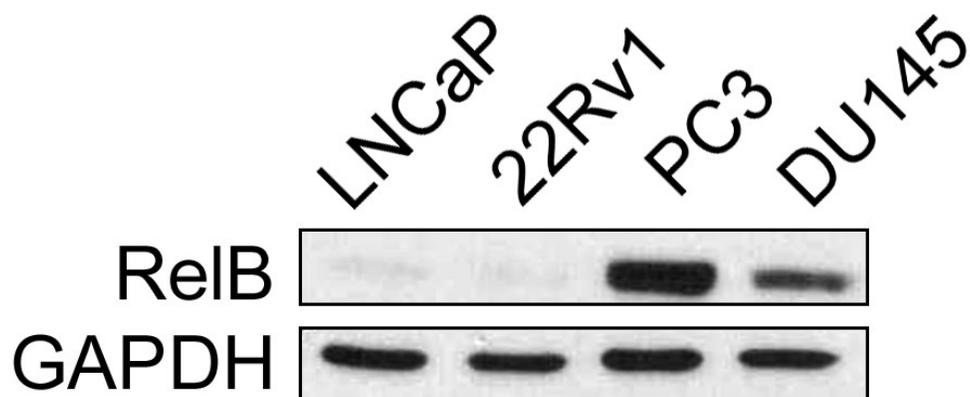


Figure S1 : RelB au sein de lignées cancéreuses prostatiques. Analyses du profil d'expression de RelB par immunobuvardage de type Western à partir d'extraits protéiques totaux de cellules LNCaP, 22Rv1, PC3 et DU145. La GAPDH fait office de contrôle de chargement.

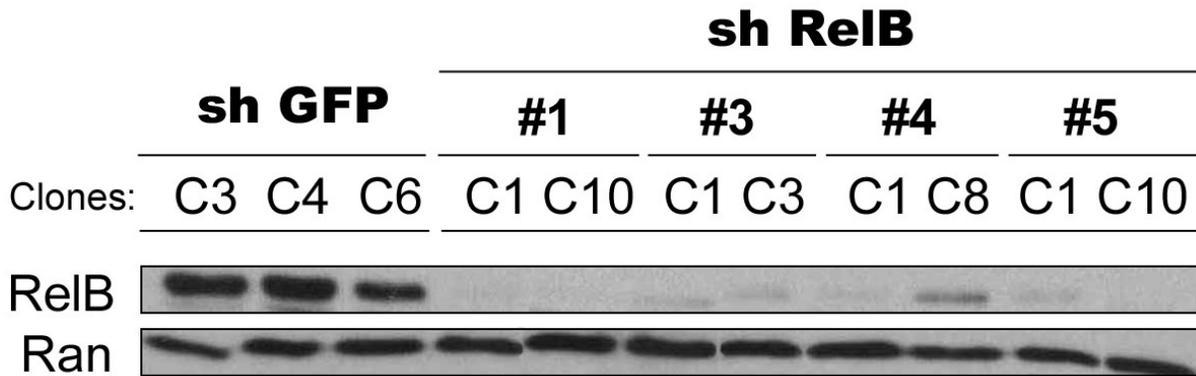


Figure S2 : Répression de RelB dans les cellules DU145. Analyses de l'expression de RelB au sein de populations clonales DU145 dérivées suite à la transduction lentivirale de différents ARNsh RelB et GFP. Trois clones sh GFP expriment RelB à l'instar de la population sauvage DU145. L'expression de RelB est efficacement réprimée au sein des huit clones sh RelB dérivés, à raison de deux par séquences ARNsh. Ran est utilisé comme contrôle de chargement.

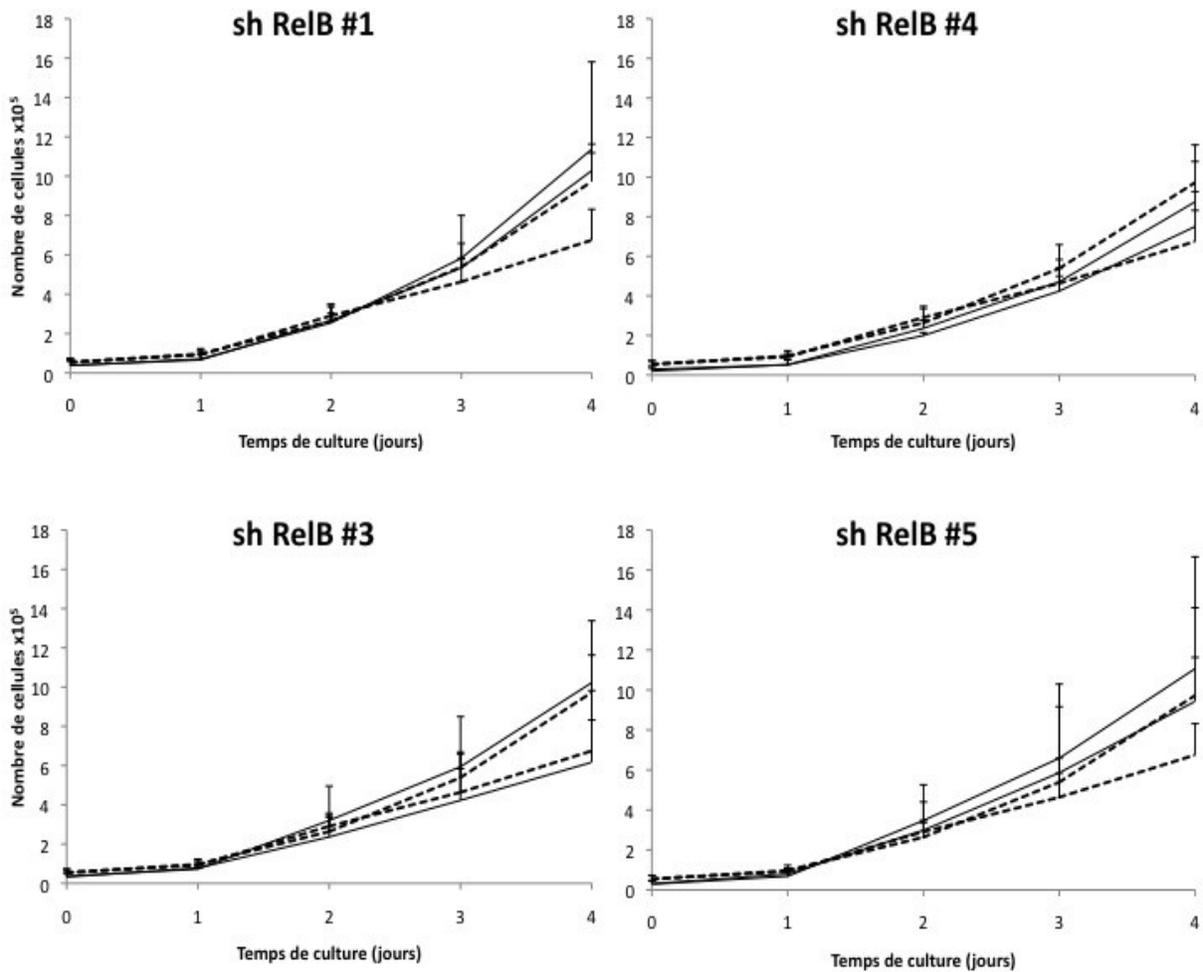


Figure S3 : Effet de la répression de RelB sur la prolifération des cellules DU145. 24h après la mise en culture de 50,000 cellules DU145 en plaque de six puits (sh RelB et GFP), ces dernières sont comptées, en dupliquat, pendant quatre jours consécutifs à l'aide d'un compteur de cellules. Pour chacun des clones DU145 sh RelB, la quantité de cellules comptées est reportée graphiquement en fonction du temps. Les mêmes clones contrôles sh GFP (C3 et C4 représentés en pointillés) sont illustrés sur chacun des graphes pour en faciliter la comparaison avec les différents clones DU145 sh RelB (deux par sh RelB représentées en trait plein). Les expériences ont été réalisées en triplicat. Les valeurs de p, toutes supérieures à 0,05, indiquent qu'il n'existe pas de différence significative dans le taux de prolifération des cellules contrôles sh GFP versus les DU145 sh RelB où l'expression de RelB est réprimée.

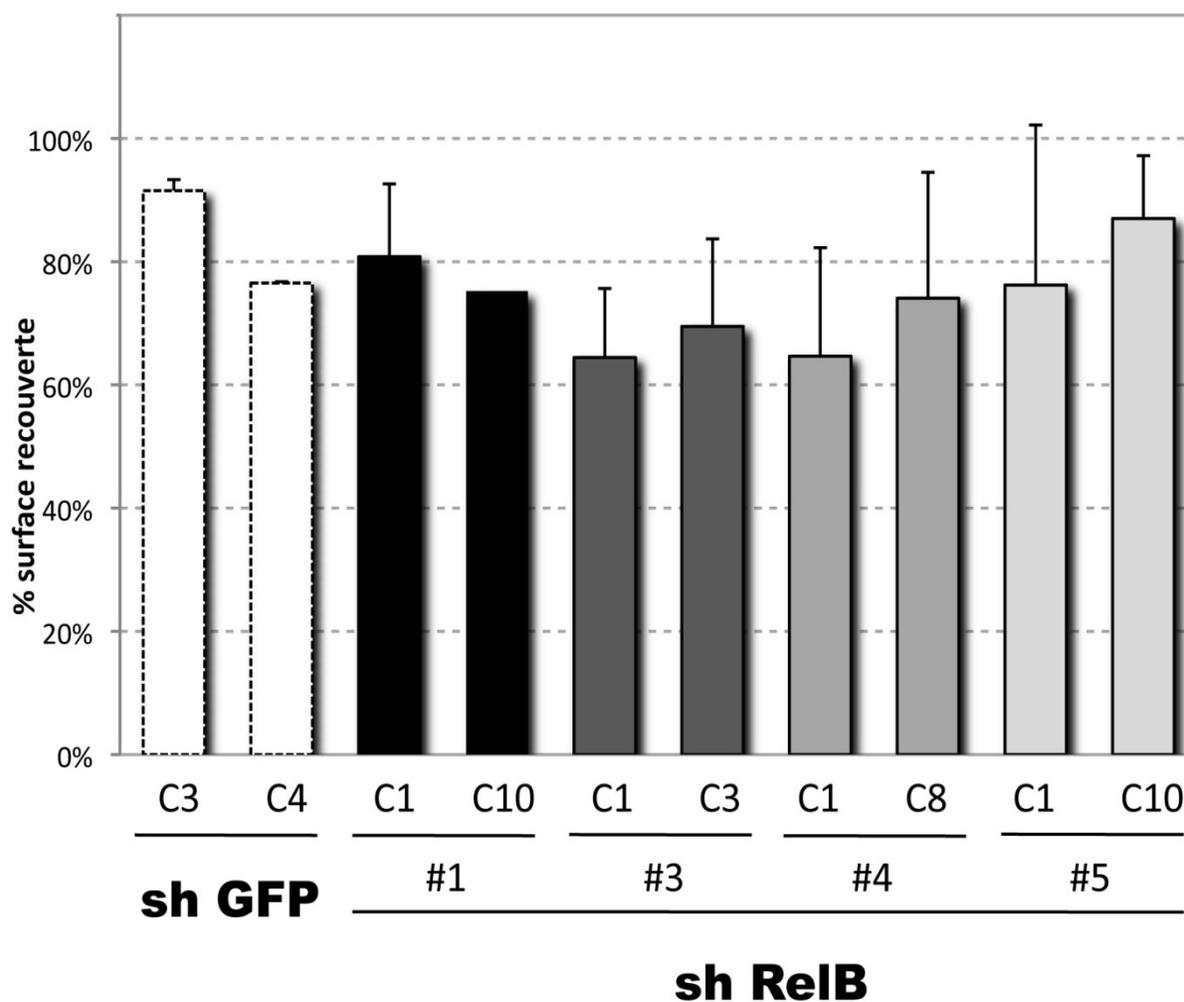


Figure S4 : Test de migration par blessure («Scratch assay»). Les cellules DU145 sh RelB et GFP sont mises en culture dans plaques de 6 puits (500 000 cellules/puit) jusqu'à confluence. Des blessures sont infligées au tapis cellulaire (3 blessures/puit) à l'aide d'un embout (jaune) à pipette de 200 μ L (P200) au temps t_0 tandis que les cellules sont remises en culture. Le recouvrement des blessures est évalué 42h après. Le pourcentage de recouvrement des blessures par les cellules est reporté graphiquement.