

Université de Montréal

**Biomarqueurs pronostiques dans le cancer de la prostate:  
Mieux prédire pour mieux traiter**

par  
Marc Nicolas Bienz

Institut du cancer de Montréal, Centre de recherche du CHUM  
Département de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et post-doctorales  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Sciences biomédicales

Le 31 décembre 2015

© Marc Nicolas Bienz, 2015

## Résumé

Le cancer de la prostate (CP) est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué en Amérique du Nord et est au troisième rang en termes de létalité chez les hommes. Suite aux traitements de première ligne, 20 à 30% des patients diagnostiqués avec un cancer localisé auront une récurrence biochimique de la maladie. La déplétion androgénique mène fréquemment au développement du stade de résistance à la castration (RC). Ce dernier est associé avec une augmentation de la morbidité (métastases osseuses) et de la mortalité avec une survie moyenne inférieure à deux ans. L'évolution du CP est très hétérogène dans la population et il n'existe actuellement aucun biomarqueur pronostique permettant d'identifier les patients à risque de récurrence biochimique, de métastases osseuses et de développement d'une résistance à la castration.

De nombreuses études ont démontré que les cytokines inflammatoires IL-6 et IL-8 jouent un rôle dans la pathogénèse du CP, notamment dans le développement de la résistance à la castration. Par ailleurs, les niveaux sériques élevés de ces cytokines ont été associés à un mauvais pronostic. Précédemment, notre laboratoire a démontré *in vitro* que la protéine IKK $\epsilon$  entraîne une augmentation de la sécrétion de ces cytokines dans les cellules du CP et qu'elle est exprimée davantage dans les tissus de cancers plus avancés.

Le premier objectif du présent mémoire fut d'évaluer dans des tissus humains la corrélation d'IKK $\epsilon$ , IL-6 et IL-8 avec des paramètres cliniques. Nos résultats soulignent le potentiel d'IKK $\epsilon$  comme biomarqueur tissulaire pronostique de récurrence biochimique et de métastases osseuses. Nous n'avons trouvé aucune association entre IL-6/IL-8 et les paramètres cliniques inclus dans l'étude. Le second objectif de ce projet fut d'évaluer la coexpression de ces trois molécules dans

l'épithélium du CP. Nos résultats confirment les observations *in vitro* en mettant en évidence une forte association entre l'expression d'IKK $\epsilon$ , IL-6 et IL-8. Le troisième objectif fut d'évaluer la relation entre les niveaux sériques et tissulaires d'IL-6 et d'IL-8. Aucune relation significative n'a été établie, suggérant que les cytokines sériques ne sont pas uniquement d'origine prostatique.

En conclusion, mon projet de maîtrise aura permis de préciser le potentiel d'IKK $\epsilon$  comme biomarqueur tissulaire pronostique et de valider pour la première fois dans des tissus humains sa co-expression avec les cytokines IL-6 et IL-8, dont le rôle dans la pathogénèse de la maladie est bien établi. Une étude plus exhaustive des voies de signalisation d'IKK $\epsilon$  reste d'intérêt pour élucider notamment les mécanismes par lesquels IKK $\epsilon$  stimule la production de cytokines et par quels moyens cette protéine pourrait être impliquée dans le développement d'un état résistant à la castration.

**Mots-clés :** Cancer de la prostate, IKK $\epsilon$ , IL-6, IL-8, immunofluorescence, pronostic, métastases osseuses, récurrence biochimique

## **Abstract**

Prostate cancer (PC) is the most frequently diagnosed cancer in North America and is ranked third in terms of mortality. After first line treatments, 20-30% of patients with localized disease will develop biochemical recurrence. Androgen-deprivation therapy is often used as a second line treatment, but some patients unfortunately progress to the castrate-resistant state, for which no curative treatment exists, and which is associated with high morbidity (bone metastasis) and a mean survival of less than two years. PC has a heterogeneous evolution among patients and to date no prognostic markers exist to identify those with a higher risk of biochemical recurrence, bone metastasis or castrate-resistant disease.

Many studies have shown that the inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are implicated in PC progression and the development of castration-resistance. In addition, high serum levels of these markers are associated with a worse outcome. Previous work has shown that the kinase IKK $\epsilon$  is associated with higher levels of IL-6 and IL-8 *in vitro*, and that its expression is higher in tissue samples of more advanced disease.

The first objective was to assess the association between IKK $\epsilon$ , IL-6 and IL-8 tissular expression levels and clinical parameters. Our results suggest that IKK $\epsilon$  has prognostic properties in terms of biochemical recurrence and the development of bone metastasis. No association between IL-6/IL-8 and the clinical parameters was identified. The second objective was to evaluate the coexpression of these molecules within the PC epithelium. Our results confirm previous *in vitro* observations showing a strong correlation between IKK $\epsilon$ , IL-6 and IL-8 expression levels. The third objective was to compare within the same patients the expression levels of IL-6 and IL-8 in the serum and

PC tissue samples. No relation was identified suggesting that serum levels of these cytokines are not only of prostatic origin.

In conclusion, the research project presented highlights the potential of IKK $\epsilon$  as a prognostic biomarker in tissue samples and validated for the first time its correlation with IL-6 and IL-8, both well-established cytokines implicated in the pathogenesis of PC. Further studies can further investigate the IKK $\epsilon$  signaling pathways implicated in the stimulation of IL-6 and IL-8 production and by which mechanisms IKK $\epsilon$  could contribute to the transition into castration-resistance.

**Key-words:** Prostate cancer, IKK $\epsilon$ , IL-6, IL-8, immunofluorescence, prognostic, bone metastasis, biochemical recurrence

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>LA LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VII</b>
<b>LA LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS FRANÇAISES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ANGLAISES (ARTICLE)</b> .....	<b>IX</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>X</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. LA PROSTATE</b> .....	<b>1</b>
1.1 ANATOMIE MACROSCOPIQUE .....	1
1.2 ANATOMIE MICROSCOPIQUE .....	2
1.3 FONCTIONS DE LA PROSTATE .....	3
1.4 DÉVELOPPEMENT DE LA PROSTATE ET HORMONODEPENDENCE .....	4
<b>2 LE CANCER DE LA PROSTATE</b> .....	<b>5</b>
2.1 ÉPIDÉMIOLOGIE .....	5
2.2 LE DÉPISTAGE DU CP .....	6
2.3 LE DIAGNOSTIC DU CP .....	7
2.3.1 L'hyperplasie bénigne de la prostate .....	7
2.3.2 La néoplasie intraépithéliale de la prostate de haut-grade .....	7
2.3.3 L'adénocarcinome de la prostate .....	9
2.3.4 Les autres formes du cancer de la prostate .....	10
2.4 TRAITEMENTS DU CANCER DE LA PROSTATE LOCALISÉ .....	10
2.4.1 Le paradigme thérapeutique .....	10
2.4.2 La surveillance active .....	11
2.4.3 La prostatectomie radicale .....	11
2.4.4 La radiothérapie .....	12
2.4.5 La thérapie hormonale primaire .....	12
2.5 LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE .....	13
2.5.1 La récurrence biochimique .....	13
2.5.2 La résistance à la castration .....	13
2.5.3 Les modifications génétiques associées au développement du CPRC .....	14
2.5.4 Les traitements du CP avancé .....	15
<b>3 L'INFLAMMATION DANS LE CP</b> .....	<b>15</b>
3.1 LA VOIE DE SIGNALISATION NF- $\kappa$ B .....	16
3.1.1 Nuclear-Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) .....	16
3.1.2 NF- $\kappa$ B dans le cancer .....	16
3.1.3 La voie d'activation canonique de NF- $\kappa$ B .....	17
3.1.4 La voie d'activation alternative de NF- $\kappa$ B .....	17
3.1.5 IKK $\epsilon$ dans le CP .....	18

3.1.5.1	L'expression et la localisation .....	18
3.1.5.2	La régulation d'IKKε dans le CP .....	19
3.1.5.3	Le rôle d'IKKε dans le CP .....	19
3.2	L'INTERLEUKINE-6 (IL-6) .....	20
3.2.1	Sources d'IL-6 dans le CP .....	20
3.2.2	Le rôle RA-indépendant d'IL-6 dans le CP .....	21
3.2.3	Le rôle RA-dépendant d'IL-6 dans le CP .....	22
3.2.4	Le potentiel d'IL-6 comme biomarqueur pronostique sérique .....	22
3.3	L'INTERLEUKINE-8 (IL-8) .....	24
3.3.1	Sources d'IL-8 dans le CP .....	24
3.3.2	Le rôle RA-indépendant d'IL-8 dans le CP .....	25
3.3.3	Le rôle RA-dépendant d'IL-8 dans le CP .....	26
3.3.4	Le potentiel d'IL-8 comme biomarqueur pronostique sérique .....	26
<b>4</b>	<b>PROJET DE MÉMOIRE .....</b>	<b>27</b>
4.1	HYPOTHÈSES DE TRAVAIL .....	27
4.2	OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	28
<b>ARTICLE : ÉTUDE D'IKKE, IL-6 ET IL-8 DANS LE CANCER DE LA PROSTATE .....</b>		<b>29</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>		<b>53</b>
<b>1</b>	<b>RÔLE D'IKKE DANS LE CANCER DE LA PROSTATE .....</b>	<b>53</b>
<b>2</b>	<b>IL-6 ET IL-8 DANS LES TISSUS HUMAINS DE CANCER DE LA PROSTATE .....</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>L'IMMUNOFLUORESCENCE POUR L'ÉTUDE D'IKKE, IL-6 ET IL-8 TISSULAIRES .....</b>	<b>55</b>
3.1	AVANTAGES DE L'IMMUNOFLUORESCENCE POUR L'ÉTUDE DE MARQUEURS TISSULAIRES .....	55
3.2	CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES DES COMARQUAGES EN IMMUNOFLUORESCENCE .....	56
3.2.1	La validation des anticorps .....	56
3.2.2	Le choix des anticorps secondaires .....	57
3.2.3	La fluorescence non-spécifique des tissus .....	57
3.2.4	Considérations techniques liées à la quantification du signal fluorescent .....	58
<b>4</b>	<b>LES MICRO-ETALAGES DE TISSUS POUR L'ÉTUDE DE BIOMARQUEURS TISSULAIRES .....</b>	<b>59</b>
4.1	L'UTILISATION DE CORES TISSULAIRES .....	59
4.2	CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES DES MICRO-ETALAGES TISSULAIRES .....	59
4.2.1	La perte d'échantillons .....	60
4.2.2	La variation du signal entre les lames .....	60
<b>5</b>	<b>TRAVAUX FUTURS .....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>63</b>
<b>FIGURE SUPPLÉMENTAIRE .....</b>		<b>65</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>		<b>66</b>

## La liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Taux d'APS maximum (ng/mL) jugés normaux en fonction de l'âge et de la race.....	7
<b>Tableau 2</b> : Les différents stades et grades de l'adénocarcinome de la prostate.....	9
<b>Tableau 3</b> : Études cliniques avec l'anticorps monoclonal anti-IL-6 (CNTO348) dans le CP.....	22
<b>Tableau d'article 1</b> : Cohort characteristics.....	45
<b>Tableau d'article 2</b> : Correlation between the IL-6, IL-8, and IKK $\epsilon$ tumor tissue levels, and clinical parameters.....	46
<b>Tableau d'article 3</b> : Hazard ratios from the Cox proportional hazard model for biochemical recurrence and bone metastasis.....	47
<b>Tableau d'article 4</b> : Correlation of IL-6 and IL-8 serum levels to biochemical recurrence.....	48
<b>Tableau d'article 5</b> : Correlation between tissue and serum levels of IL-6 and IL-8.....	49

## La liste des figures

<b>Figure 1</b> : Anatomie du système reproducteur mâle et des voies urinaires.....	1
<b>Figure 2</b> : Principaux types cellulaires de la prostate.....	2
<b>Figure 3</b> : Statistiques sur le cancer au Canada, 2014.....	5
<b>Figure 4</b> : Coupe histologique de prostate.....	8
<b>Figure 5</b> : Les marges extra-prostatiques.....	12
<b>Figure 6</b> : Schématisation de la voie signalisation cellulaire d'IKK $\epsilon$ .....	29
<b>Figure 7</b> : Signalisation cellulaire d'IL-6 dans le CP.....	24
<b>Figure 8</b> : Hypothèses de travail.....	27
<b>Figure d'article 1</b> : IL-6, IL-8 and IKK $\epsilon$ immunofluorescence and correlation in human prostate cancer tissue.....	49
<b>Figure d'article 2</b> : Influence of IKK $\epsilon$ expression in tumor samples and patient survival.....	51
<b>Figure d'article 3</b> : Influence of cytokine serum levels and biochemical recurrence.....	52
<b>Figure supplémentaire 1</b> : Validation des anticorps primaires anti-IL-6 et anti-IL-8 par immunofluorescence à l'aide de tissus humains inclus en paraffine.....	65

## Liste des abréviations françaises

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
APS	Cytokératine
CK	Antigène prostatique spécifique
CP	Cancer de la prostate
CPHS	Cancer de la prostate hormono-sensible
CPRC	Cancer de la prostate résistant à la castration
DHT	Dihydrotestostérone
HBP	Hypertrophie bénigne de la prostate
HS	Hormono-sensible
IKK $\epsilon$	I $\kappa$ -B kinase-epsilon
IL	Interleukine
NF-kB	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramme
p	P-value
PR	Prostatectomie radicale
r	Coefficient de coefficient «r» de Pearson
RA	Récepteur aux androgènes
RC	Résistant à la castration
RT	Radiothérapie
TDA	Thérapie par déplétion androgénique
TR	Toucher rectal

## Liste des abréviations anglaises (article)

ADT	Androgen deprivation therapy
AR	Androgen receptor
AU/pixel	Arbitrary units per pixel
BCR	Biochemical recurrence
Benign adj.	Benign tissue adjacent to tumor cells
CI	Confidence interval
CR	Castration resistant
GS	Gleason score
HR	Hormone resistant
p	P-value
PC	Prostate cancer
PSA	Prostate-specific antigen
r	R Pearson correlation coefficient
TMA	Tissue micro-array

## Remerciements

C'est avec toute ma reconnaissance que je remercie mes directeurs de recherche, Dr. Fred Saad et Dre Anne-Marie Mes-Masson, pour m'avoir permis d'atteindre mes objectifs en mettant à ma disposition tant de ressources et de temps, et de réaliser cette maîtrise au cours de laquelle j'ai grandi et mûri. Je remercie également tous les membres du laboratoire qui ont partagé leurs connaissances et m'ont encouragé tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de mémoire Dr. Nicolas Noiseux et Dr. Éric Lécuyer pour le temps et les efforts qu'ils ont consentis à investir dans l'étape finale de ma maîtrise.

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*, les *Fonds de recherche du Québec en santé*, le *Canadian urologic oncology group (CUOG)*, la *Fondation Terry Fox*, la *Faculté des études supérieures et post-doctorales (FESP)*, la *Faculté de sciences biomédicales* et le *Département de médecine de l'Université de Montréal*, ainsi que le *Comité d'organisation du programme des stages d'été (COPSE)*.

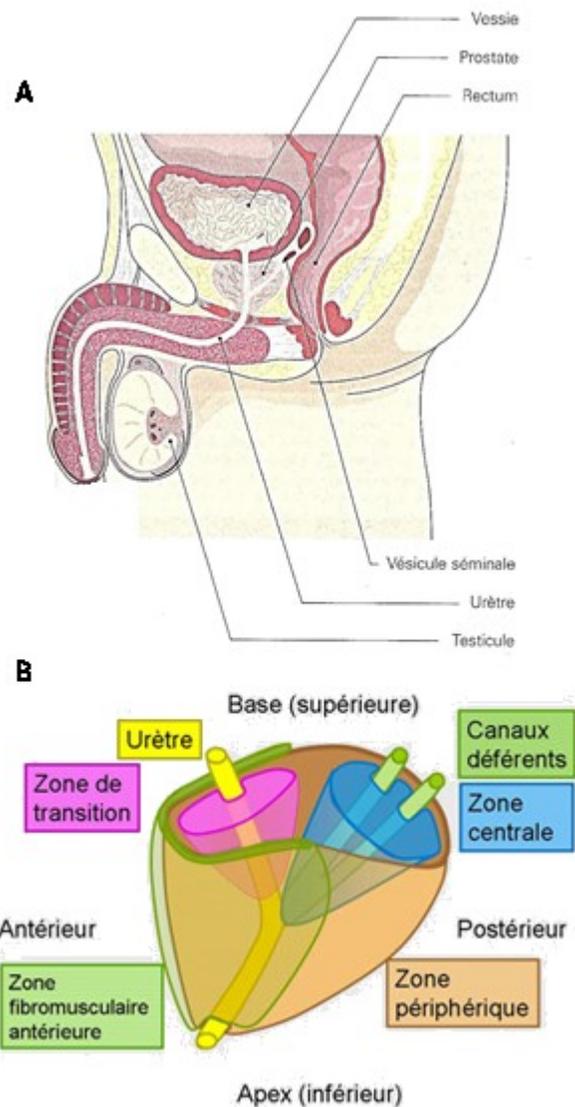
Enfin, je remercie toute ma famille et mes proches pour leurs encouragements tout au long de mon parcours universitaire.

## INTRODUCTION

### 1. LA PROSTATE

#### 1.1 ANATOMIE MACROSCOPIQUE

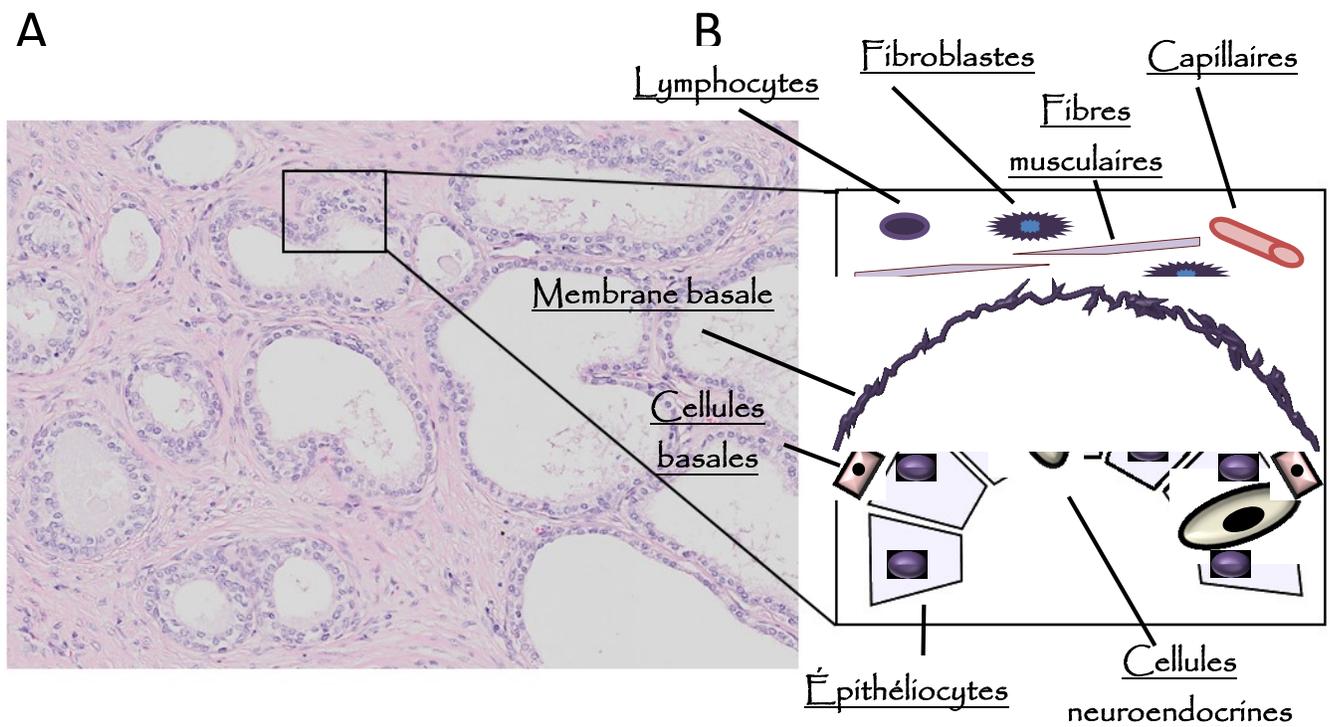
La prostate est un organe de l'appareil urogénital masculin, situé sous la vessie et traversé dans sa portion antérieure par l'urètre proximal. La base de la prostate se situe sous le plancher vésical, tandis que l'apex est prolongé par le sphincter urétral. La face postérieure de la prostate est surmontée par les vésicules séminales et est séparée du rectum par les bandes de muscle lisse du fascia de Denonvilliers (Figure 1A) [1, 2]. En postéro-latéral, des plexus neuro-vasculaires longent la glande, responsables notamment de la fonction érectile et de la continence [3].



**Figure 1. Anatomie du système reproducteur mâle et des voies urinaires.** A) Vue en latérale de la prostate et des repères anatomiques adjacents dont la vessie, le rectum, les vésicules séminales et l'urètre. Reproduit avec la permission du Dr. Fred Saad [1]. B) Localisation anatomique des quatre régions histologiques de la prostate en relation avec l'urètre et les canaux déférents [2].

## 1.2 ANATOMIE MICROSCOPIQUE

La prostate est subdivisée en quatre zones. La zone périphérique comporte 70% du tissu glandulaire prostatique et est principalement associée au cancer de la prostate (CP). La zone centrale entoure les conduits éjaculatoires et comporte 25% du tissu glandulaire prostatique. La zone de transition comporte 5% du tissu glandulaire prostatique et est principalement associée à l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP). Enfin, la zone de stroma fibromusculaire antérieure est composée de collagène, d'élastine et de muscle lisse et s'étend jusqu'à la jonction avec le sphincter urétral



**Figure 2. Principaux types cellulaires de la prostate.** A. Vue microscopique d'un échantillon de tissu glandulaire prostatique après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. B. Représentation schématique d'une section de glande prostatique. L'épithélium glandulaire est constitué d'une couche de cellules luminales (les cellules sécrétrices et neuroendocrines). Elles reposent sur une couche de cellules basales, entourées du stroma fibro-musculaire contenant des fibroblastes, des cellules immunitaires, des cellules musculaires lisses, ainsi que des capillaires sanguins. Par Marc Nicolas Bienz.

(Figure 1B) [4]. La prostate est revêtue d'une pseudocapsule fibromusculaire dont l'intégrité sur les spécimens pathologiques de prostatectomie est associée à un intérêt clinique important.

L'architecture prostatique est composée de glandes organisées entourées d'un stroma de soutien. Les glandes tubulo-alvéolaires de la prostate sont composées de **cellules épithéliales** cylindriques pseudostratifiées, entourées de **cellules basales** pluripotentes responsables de la régénération épithéliale. Des **cellules neuroendocrines** éparses au sein de l'épithélium jouent un rôle au niveau de la différenciation et de la croissance cellulaire [5]. La population cellulaire stromale quant à elle inclue les **fibroblastes** responsables de la production de matrice extracellulaire et de facteurs de croissance, les **cellules musculaires lisses** responsables de l'expulsion du contenu glandulaire lors de l'éjaculation, et des **cellules immunitaires** (macrophages, polymorphonucléaires et lymphocytes) assurant une défense contre les infections (Figure 2) [6].

### 1.3 FONCTIONS DE LA PROSTATE

La prostate est une glande exocrine qui se contracte grâce aux cellules musculaires lisses lors de l'éjaculation pour déverser son contenu dans l'urètre. Les sécrétions prostatiques, représentent 25 à 30% du volume éjaculatoire et auraient des fonctions antiseptiques de par la haute teneur en zinc, et de protection en raison de l'alcalinisation du pH spermatique contre le pH vaginal acide [7].

L'antigène spécifique de la prostate (APS) aussi connue sous le nom de *Human Kallikrein 3*, est une protéine produite exclusivement par les cellules sécrétrices de la prostate et dont le rôle physiologique est de cliver les seminogélines I et II afin de liquéfier le liquide séminal [8].

L'architecture histologique normale des glandes prostatiques empêche le passage de l'APS mature et de son précurseur, la pro-APS, dans la circulation sanguine.

#### **1.4 DÉVELOPPEMENT DE LA PROSTATE ET HORMONODEPENDENCE**

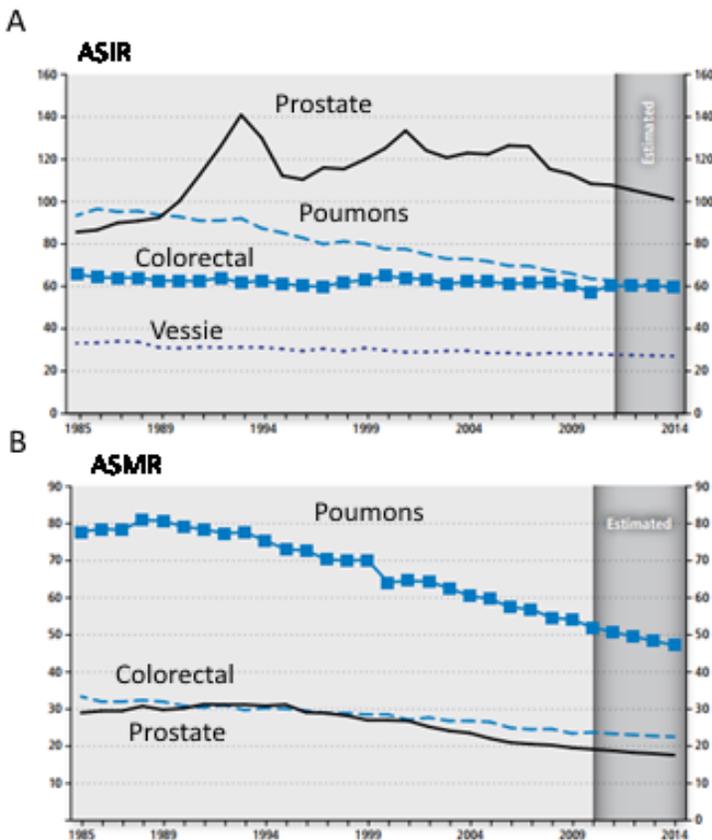
Durant l'embryogénèse mâle, le gène SRY, codé par le chromosome Y, permet au bulbe prostatique primordial de se développer sous l'influence d'androgènes fœtaux d'origine gonadique. Leur liaison aux récepteurs aux androgènes (RA) induit l'activation de voies de signalisation qui stimulent la prolifération des cellules épithéliales prostatiques.

Au-delà de son développement définitif, la prolifération de l'épithélium de la prostate demeure hormono-dépendant et nécessite l'activité du RA. Tandis que la testostérone est l'androgène le plus répandu, c'est la dihydrotestostérone (DHT), une forme clivée par la 5 $\alpha$ -réductase de la testostérone qui a plus d'affinité pour le RA.

Le RA est un facteur de transcription de type récepteur nucléaire. Sous sa forme inactive, le RA est complexé à des chaperonnes moléculaires dont la *heat-shock protein 90*. La liaison du récepteur avec l'androgène entraîne un changement de conformation, son homodimérisation et sa translocation nucléaire. L'homodimère RA, *via* son domaine de liaison à l'ADN, se fixe à des séquences spécifiques dites *androgen response elements* et exerce ainsi son rôle de facteur de transcription [9].

## 2 LE CANCER DE LA PROSTATE

### 2.1 ÉPIDÉMIOLOGIE



**Figure 3. Statistiques sur le cancer au Canada, 2014.** A. Taux d'incidence standardisés (ASIR) et B. taux de mortalité standardisés (ASMR) pour 100 000 hommes selon l'âge pour les cancers de la prostate, des poumons et colorectal au Canada de 1985 à 2014 [10].

Le cancer de la prostate (CP) est le cancer le plus diagnostiqué chez les hommes au Canada. En 2014, 23 600 hommes ont été diagnostiqués au pays, pour une incidence de 101 cas /100 000 (Figure 3) [10]. À titre comparatif, les cancers colorectal et du pouxon qui sont en deuxième et troisième rang en terme d'incidence chez les hommes ont tous deux été diagnostiqués chez respectivement 59 et 58 patients sur 100 000 durant la même année [10]. Ces taux se maintiennent en Europe pour le cancer de la prostate avec une incidence du CP de 96 cas/100 000

[11]. Dans les pays occidentaux, le développement d'outils diagnostiques perfectionnés et l'amélioration des recommandations de dépistage ont eu pour effet d'augmenter de façon marquée l'incidence du CP durant les années 1990. En effet, au Canada, une augmentation de 24 cas/100 000 a été observée depuis 1984. Cette tendance n'est toutefois pas maintenue dans les pays en

développement dans lesquels les taux peuvent être jusqu'à 25 fois moins élevés que ceux de l'occident [12]. De plus, le CP est au troisième rang en terme de mortalité liée au cancer chez les hommes au Canada (Figure 3) [13].

## 2.2 LE DÉPISTAGE DU CP

Le recours au toucher rectal et au dosage de l'APS de routine chez les hommes de 45 et plus n'a fait partie des recommandations de la *Société Américaine du Cancer (ACS)* qu'à partir de 1992 [14]. Le potentiel de l'APS comme biomarqueur diagnostique réside dans le fait que le CP a pour effet de démanteler la structure étanche des glandes au niveau des acini et de la membrane basale, et d'augmenter la vascularisation de la prostate ce qui conduit à une augmentation des niveaux sériques d'APS.

L'interprétation des niveaux d'APS est cependant complexe (Tableau 1). Outre le CP, l'HBP, la prostatite et le toucher rectal sont aussi associés à une augmentation des niveaux sériques d'APS tandis que certains CP ne sont pas associés à des concentrations anormales d'APS [8]. De plus, des CP très avancés dont la dédifférenciation cellulaire est telle que les cellules épithéliales produisent des niveaux faibles d'APS peuvent être, quant à eux, associés à une diminution tardive de l'APS sérique. Ainsi, certaines controverses persistent quant à l'interprétation de l'APS dans le dépistage du CP et plusieurs études sont en cours visant à évaluer le potentiel de la vélocité (augmentation de l'APS en un an) et de la densité (APS par gramme de prostate) de l'APS ainsi que du dosage de la pro-APS en clinique, un précurseur de la fraction libre de l'APS sérique.

**Tableau 1 : Taux d'APS maximums (ng/mL) jugés normaux en fonction de l'âge et de la race [1]**

Âge (années)	Caucases	Noirs	Asiatiques
40-49	2,5	2,0	2,0
50-59	3,5	4,0	3,0
60-69	4,5	4,5	4,0
70-80	6,5	5,5	5,0

## 2.3 LE DIAGNOSTIC DU CP

La biopsie transrectale de la prostate permet le diagnostic et l'identification du caractère des différentes pathologies bénignes et malignes de la prostate, dont notamment l'HBP, la néoplasie intraépithéliale de la prostate de haut-grade (NIP-HG) et l'adénocarcinome de la prostate.

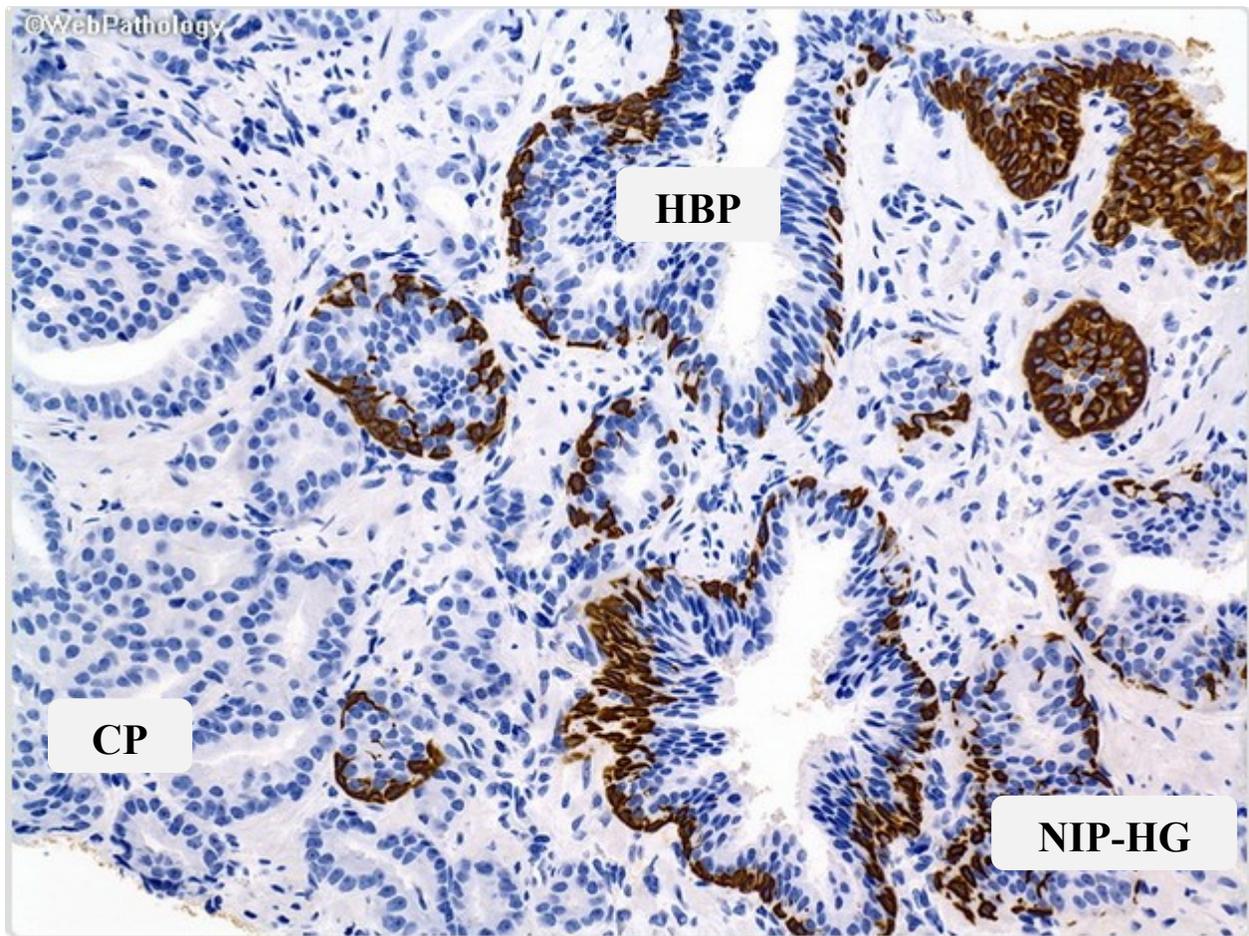
### 2.3.1 *L'hyperplasie bénigne de la prostate*

L'HBP est une pathologie bénigne qui consiste en une prolifération accrue des cellules épithéliales et des muscles lisses de la prostate (Figure 4). L'augmentation considérable du volume de la glande est à l'origine de symptômes du tractus urinaire bas, souvent observés chez les personnes âgées, tels que la baisse du débit urinaire, l'augmentation de la fréquence mictionnelle et la nycturie. En effet, 75% des hommes âgés de plus de 70 ans présentent une HBP [15].

### 2.3.2 *La néoplasie intraépithéliale de la prostate de haut-grade*

La NIP-HG est un précurseur bien établi du CP. Comme cela a été montré dans plusieurs autres cancers (de l'œsophage, de la peau et du sein), le CP se développe à partir d'une transformation néoplasique pré-maligne des cellules épithéliales des glandes bénignes. La NIP-HG présente des noyaux et des nucléoles élargis et des nucléoles proéminents à l'intérieur des canaux glandulaires

préexistants (Figure 4) [16]. Le passage au stade d'adénocarcinome se fait lorsque les cellules épithéliales néoplasiques traversent la couche de cellules basales. Cette distinction peut être mise en évidence par immunohistochimie par l'ajout de marqueurs épithéliaux tels les cytokératines [16].



**Figure 4. Coupe histologique de prostate.** Représentation des glandes de néoplasie intra-épithéliale de haut-grade (NIP-HG), de l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) et du cancer de la prostate (CP). Le marquage immunohistochimique de cytokératine identifie en brun les cellules de la couche basale intacte en HBP, fragmentée dans le NIP-HG et absente en périphérie des foyers d'adénocarcinomes de la prostate (*adapté par Marc Nicolas Bienz*).

(<http://www.webpathology.com/image.asp?case=26&n=5>)

### 2.3.3 L'adénocarcinome de la prostate

La caractérisation du CP implique la détermination du stade et du grade de la tumeur. Le stade tumoral désigne la taille et l'étendue de la tumeur par rapport à la prostate. Le stade tumoral clinique (cT) est établi au moment de la biopsie. Le stade tumoral pathologique est établi lors de l'examen du spécimen chirurgical de la prostatectomie radicale (Tableau 2).

#### **Tableau 2. Les différents stades et grades de l'adénocarcinome de la prostate**

##### **Les stades (selon le système TNM)**

T (taille de la tumeur dans la prostate)

T0 : aucune indication d'une tumeur dans la prostate

T1 : la prostate semble normale et la tumeur a été découverte à la suite d'un taux d'APS élevé

T2 : la tumeur est palpable et confinée à la prostate

T3 : la tumeur déborde de la prostate (la Capsule - l'enveloppe de la prostate – et/ou les vésicules séminales sont touchées)

T4 : la tumeur a atteint des tissus voisins (col de la vessie, sphincter externe, rectum, etc)

N (degré d'atteinte des ganglions pelviens)

N0 : il n'y a pas de trace de tumeur dans les ganglions

N+ : un ou plusieurs ganglions sont atteints

M (présence ou absence d'autres métastases)

M0 : il n'y a aucune métastase au-delà des ganglions

M1 : il y a des métastases dans les os ou dans d'autres endroits éloignés

##### **Les grades (selon l'échelle de Gleason)**

Grade 1 : le tissu ressemble encore beaucoup à un tissu sain (c'est le grade le moins agressif)

Grade 2 : le tissu est un peu différent d'un tissu normal

Grade 3 : le tissu est modérément différent d'un tissu normal

Grade 4 : le tissu a un aspect plutôt irrégulier et une forme différente de la normale

Grade 5 : le tissu est très différent d'un tissu normal (c'est le grade le plus élevé)

Reproduit avec la permission du Dr. Fred Saad de: *Fred Saad, Michael McCormack. Le Cancer De La Prostate, 3<sup>e</sup> Édition. Comprendre la maladie et ses traitements. Edited by Annika Parence Éditeur, Montréal, 2012 [1].*

Le grade tumoral est établi par le score de Gleason, qui évalue l'architecture tumorale et le niveau de dédifférenciation cellulaire sur une échelle de 1 (bien différencié) à 5 (peu différencié) [17]. Le score de Gleason est présenté sous la forme d'une addition des deux grades les plus prévalents dans le tissu tumoral (ex. 3+3, 3+4, 4+3) ou de la somme des deux scores, allant de 1 à 10 (Tableau 2).

Le CP étant un cancer le plus souvent multifocal, des scores de Gleason différents dans des foyers tumoraux différents vont fréquemment être observés. De par sa corrélation avec le stade tumoral et la récurrence biochimique et clinique des patients, le score de Gleason est un facteur pronostique très important dans la prise en charge du CP [18].

#### *2.3.4 Les autres formes du cancer de la prostate*

La vaste majorité (90-95%) des cancers d'origine prostatique sont des adénocarcinomes acinaires. Les autres CP décrits incluent le carcinome sarcomatoïde, le carcinome urothélial, les carcinomes squameux et adénoquameux, le carcinome à cellules basales et les tumeurs neuroendocrines de la prostate [19]. Ces variants ont été décrits dans la littérature, mais ne seront pas discutés davantage dans ce travail.

## **2.4 TRAITEMENTS DU CANCER DE LA PROSTATE LOCALISÉ**

### *2.4.1 Le paradigme thérapeutique*

Le CP est une maladie d'évolution hétérogène et une proportion importante de patients décède avec le CP et non pas en raison du CP. Un phénomène de sur-traitement des patients a lieu, en raison du défi de discriminer les patients à risque de progression agressive et de formation de métastases de ceux qui demeureront asymptomatiques. Étant donné les effets secondaires associés aux différentes thérapies, plusieurs nomogrammes, se basant sur des paramètres essentiellement cliniques et sur l'espérance de vie, sont utilisés pour le suivi des patients atteints du CP et pour le choix de traitement. L'inclusion, dans ces consensus de prise en charge, de biomarqueurs pronostiques est désormais nécessaire afin d'en augmenter l'acuité et ainsi discriminer plus tôt les patients à risque

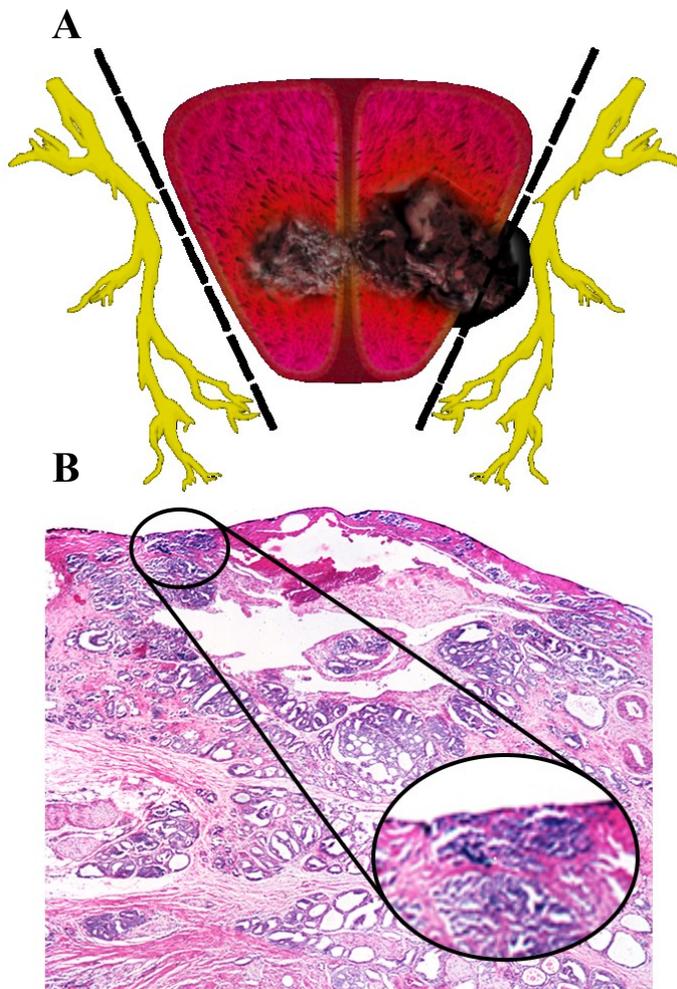
de progression intermédiaire et rapide, de ceux dont le CP est indolent et pouvant donc avoir une prise en charge non-curative.

#### 2.4.2 La surveillance active

Étant donné la nature hétérogène de l'évolution du CP, le concept de surveillance active est une option conservatrice émergente permettant d'offrir aux patients le choix d'attendre avant de se faire opérer ou traiter par radiothérapie jusqu'à l'apparition de symptômes ou de signes de progression. La surveillance active peut être envisagée dans les CP de bas risque, afin de préserver le patient des effets secondaires des différentes modalités thérapeutiques. Dans ces cas où un traitement curatif immédiat n'est pas nécessaire, un suivi rapproché est organisé.

#### 2.4.3 La prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale (PR) est une intervention chirurgicale durant laquelle la prostate, les tissus environnants sont entièrement retirés dans le but de n'épargner aucun tissu tumoral (Figure 5A). Vu la proximité des nerfs impliqués dans la fonction érectile et de la continence, le choix du degré d'épargne des nerfs péri-prostatiques est relatif à la localisation et à l'étendue de la maladie. Le spécimen opératoire est analysé en pathologie, afin de déterminer la présence ou non de marges chirurgicales positives, c'est à dire, la présence ou non de cellules tumorales au niveau des marges de résection (Figure 5B). Des marges chirurgicales positives sont associées à un plus mauvais pronostic [1].



**Figure 5. L'extension extra-prostatique A) Schématisation d'un cancer de la prostate bilatéral avec extension extraprostatique et marge chirurgicale positive. L'illustration met en perspective la proximité des nerfs périprostatiques représentés en jaune avec la paroi prostatique et la ligne chirurgicale pointillée (Par Marc Nicolas Bienz et Alexandre Michaud). B. Échantillon de tissu d'un spécimen prostatique avec marges chirurgicales positives (voir région avec grossissement). La coloration tissulaire à l'hématoxyline et à l'éosine met en évidence le tissu conjonctif en rose et les cellules épithéliales/tumorales en mauve.**  
(© Dr. Mathieu Latour)

#### 2.4.4 La radiothérapie

La radiothérapie (RT) est basée sur le principe de radiosensibilité des cellules tumorales. Des doses de radiations ionisantes sont administrées de manière extracorporelle ou interne, par l'insertion chirurgicale d'implants radioactifs temporaires ou permanents (brachythérapie), afin d'éliminer les cellules ciblées ou, du moins, limiter la progression de la maladie. La radiothérapie peut être utilisée en monothérapie ou en thérapie adjuvante à la prostatectomie radicale dans le but de limiter les risques de récurrence due à la présence potentielle de maladie résiduelle [1].

#### 2.4.5 La thérapie hormonale primaire

Huggins et Hodges ont été les premiers à démontrer en 1941 que l'orchectomie bilatérale permettait la régression du CP

dans son état initial hormono-sensible. En effet, la réduction des niveaux circulants d'androgènes permet de limiter l'activation du RA et des voies de signalisation cellulaires pro-prolifératives et anti-apoptotiques associées. À partir des années 1980, l'utilisation d'un agoniste de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires de longue durée (LHRH), ou d'un antagoniste de la LHRH, est devenue le traitement de référence de déplétion androgénique (TDA).

## **2.5 LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE**

### *2.5.1 La récurrence biochimique*

Suite à la baisse initialement observée des taux d'APS après un traitement par PR ou RT, chez certains patients des cellules tumorales résiduelles continuent à croître, résultant en une ré-augmentation progressive de l'APS sérique. La récurrence biochimique est définie par une APS post-opératoire  $\geq 0.2$  ng/mL sur deux analyses consécutives [20], ou d'un APS qui dépasse le nadir + 2 ng/mL. La vitesse d'augmentation est fonction de la progression du CP et prédit le risque métastatique ou le décès.

### *2.5.2 La résistance à la castration*

L'appellation « état résistant à la castration » est employée lorsqu'une progression de la maladie est constatée malgré des niveaux réduits d'androgène sérique ( $\leq 50$  ng/dl) [21]. Environ 25% des patients progressent vers l'état de résistance à la castration. Cet état est associé à l'apparition de métastases, principalement osseuses et à mauvais pronostic, menant au décès. Plus de la moitié des patients décèdent dans les deux années suivant la progression vers l'état de résistance à la castration avec métastases.

Deux hypothèses existent quant au développement d'un cancer résistant à la castration (CPRC) : 1/ la présence chez certains patients d'une sous-population de cellules résistantes au TDA, qui, par sélection clonale durant le TDA, devient la population cellulaire prédominante; 2/ l'acquisition, durant le TDA, de mutations somatiques dans les cellules tumorales, leur conférant une résistance au traitement [22].

### *2.5.3 Les modifications génétiques associées au développement du CPRC*

Des mutations du RA ou d'autres gènes intervenant dans les voies de signalisation régulées par le RA pourraient être responsables de l'apparition de l'état résistant à la castration. Chez les caucasiens, moins de 2% des patients avec un CP hormonosensible (CP-HS) présentent des mutations du RA tandis que celles-ci sont détectées très fréquemment dans le CPRC et pourraient apparaître durant la période initiale de déplétion androgénique [22]. Plus de 660 mutations du gène RA ont été identifiées à ce jour. 49% des mutations répertoriées sont localisées dans le domaine liant le ligand (LBD), 37% dans le domaine N-terminal (NTD), assurant l'activité du récepteur et 7% dans le domaine liant l'ADN (DBD) [9]. Des mutations du RA de type gain de fonction peuvent mener à une hypersensibilité aux faibles doses d'androgènes ou à l'activation ligand-indépendante du RA [22]. Des mutations dans des gènes codant pour des corépresseurs et des coactivateurs de RA peuvent également être la cause de la résistance à la castration via la dérégulation de l'expression du RA. Enfin, la cellule tumorale pourrait acquérir la capacité de produire des androgènes ou d'autres molécules (i.e. IL-6) lui confiant la capacité d'activer ses propres voies de signalisation régulées par le RA [22].

#### 2.5.4 Les traitements du CP avancé

Une seconde ligne de traitement hormonale a été récemment approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA) suite à des études cliniques de phase III démontrant le potentiel de nouvelles thérapies pour améliorer la survie de patients présentant un CPRC. L'enzalutamide, un inhibiteur compétitif du RA, a été associé à une augmentation de la survie de 4.8 mois chez les patients post-chimiothérapie (HR = 0.65 p 0.001) [23]. Similairement, l'acétate d'abiraterone, un inhibiteur de CYP17 qui est l'enzyme responsable de l'ajout d'un groupe hydroxyl à la progestérone dans la synthèse de la testostérone, a été associé à une augmentation de la survie de 3.9 mois (HR = 0.66 p 0.001) lorsque pris en combinaison avec du prednisone (vs prise de prednisone seule) [23].

### 3 L'INFLAMMATION DANS LE CP

En 1863, Rudolf Virchow fut le premier à décrire le rôle de l'inflammation dans le cancer, grâce à ses observations sur la présence de leucocytes dans des tissus néoplasiques [24]. Depuis, de nombreux travaux ont permis de confirmer ses hypothèses et de comprendre les voies de signalisation complexes qui associent l'inflammation et la tumorigénèse. La relation entre le virus du papillome humain et le cancer du col utérin, *Helicobacter pylori* et le cancer gastrique et la maladie de Crohn et le cancer colorectal en sont quelques exemples [25]. Jusqu'à 20% des cancers sont associés avec un phénomène d'inflammation et/ou d'infection chronique [26]. Un point commun entre toutes ces pathologies est l'implication des cytokines produites par les cellules cancéreuses. Ces cytokines telles que *Tumor Necrosis Factor* (TNF), interleukine (IL)-1 et IL-6 influenceraient la survie et la croissance cellulaire, l'apparition et/ou le maintien de mutations, la différenciation et les interactions entre les cellules et leur environnement [24].

### 3.1 LA VOIE DE SIGNALISATION NF-kB

#### 3.1.1 Nuclear-Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB)

La protéine NF-kB est un facteur de transcription important dans la signalisation inflammatoire cellulaire. C'est un dimère constitué d'une combinaison de protéines de la famille NF-kB dont RelA, RelB, C-Rel et p50. Sa fonction physiologique dans le maintien de la fonction immune a été bien démontrée [27]. Les cibles de transcription impliquées incluent les gènes des cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 et IFN- $\gamma$ ), des molécules d'adhésion cellulaire (VCAM-1, ICAM-1), des récepteurs de surface et des facteurs de transcription [28].

#### 3.1.2 NF-kB dans le cancer

Il a été démontré que NF-kB joue un rôle clef dans la stimulation de la tumorigénèse via le maintien d'un état inflammatoire chronique [29]. L'expression de NF-kB dans plusieurs cancers est fréquemment altérée notamment suite à des mutations ponctuelles et des amplifications géniques [30, 31]. NF-kB est constitutivement actif dans le cancer colorectal, en lien avec son rôle dans la physiologie du système digestif, mais aussi dans le cancer du sein [32, 33]. Dans le cancer de la prostate, l'activation constitutive de NF-kB serait impliquée dans la progression du CP et dans la survie cellulaire suite au TDA [34-36]. En effet, notre laboratoire a démontré que la localisation nucléaire de NF-kB dans les tumeurs primaires de CP était associée à un mauvais pronostic et à la présence de métastases ganglionnaires [37-39]. De plus, les lignées cellulaires de CP exprimant faiblement le RA (PC-3, DU145) expriment constitutivement NF-kB, tandis que les lignées cellulaires répondant aux androgènes et ayant des niveaux détectables du RA (LNCaP) exprimaient faiblement NF-kB [36]. Les gènes régulés par NF-kB et qui permettraient d'induire la tumorigénèse

incluent les cytokines pro-inflammatoires et d'immunorégulation, d'angiogénèse (VEGF, IL-8, uPA et MMP9), des gènes anti-apoptotiques et de prolifération cellulaire (c-myc, cyclin D1) [40].

### 3.1.3 La voie d'activation canonique de NF- $\kappa$ B

Étant donné le nombre de processus cellulaires influencés par le facteur NF- $\kappa$ B, ce dernier est soumis à une régulation rigoureuse, essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire. Ce facteur de transcription est présent dans la majorité des cellules, maintenu dans le cytoplasme, sous sa forme inactive, par les protéines inhibitrices I $\kappa$ B (*inhibitor of  $\kappa$ B*). L'activation dite canonique de NF- $\kappa$ B a lieu suite à un stimulus microbien, viral ou par des cytokines proinflammatoires telles que *Tumor Necrosis Factor* (TNF) et *Interleukine-1* (IL-1), ce qui a pour effet d'activer les kinases IKK (*I $\kappa$ B kinase*). Les IKK dégradent de façon ubiquitine-dépendante I $\kappa$ B ce qui active NF- $\kappa$ B qui transloque dans le noyau [41]. Les IKK sont une famille de 5 protéines. Les IKK- $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  interviennent dans la voie canonique d'activation de NF- $\kappa$ B. IKK $\epsilon$  et TBK1 régulent l'activation de la voie alternative (voir paragraphe suivant). En ce qui concerne le cancer de la prostate, Gasparian et al. ont démontré que l'activation aberrante des IKK- $\alpha$  et IKK- $\beta$  mène à une activation constitutive de NF- $\kappa$ B et de sa voie de signalisation de survie dans des cellules de CP résistantes à la castration [36].

### 3.1.4 La voie d'activation alternative de NF- $\kappa$ B

Il existe une voie d'activation non-canonique de NF- $\kappa$ B, sous la régulation d'autres stimuli tels que des lymphotoxines, CDE40L et la *B-cell Activating Factor Belonging to the Tumor Necrosis Factor Family* (BAFF). Les molécules impliquées dans la phosphorylation des I $\kappa$ B sont *Tank Binding Kinase 1* (TBK1) et I-kappa-B-Kinase epsilon (IKK $\epsilon$ ) [42]. Ces deux enzymes présentent

une structure et une fonction différente des homologues IKK- $\alpha$  et IKK- $\beta$  et seraient impliquées dans la réponse immunitaire innée anti-virale par l'intermédiaire de la voie de signalisation de l'*Interferon Regulatory Factor 3* (IRF-3) et IRF-7 [43].

Le rôle d'IKK $\epsilon$  dans l'inflammation a été démontré par exemple dans l'arthrite rhumatoïde et l'inflammation du poumon [44]. Son association avec la tumorigénèse a aussi été documentée, notamment dans le cancer du sein; il est estimé qu'environ 30% des tumeurs primaires du sein expriment fortement cette protéine. En effet, en 2007 Boehm et al. ont été les premiers à démontrer le potentiel oncogénique d'IKK $\epsilon$  dans le cancer du sein, permettant d'expliquer le mécanisme responsable de l'activation de NF-kB dans cette maladie [45]. Le potentiel oncogénique d'IKK $\epsilon$  via la phosphorylation de substrats menant à l'activation d'NF-kB impliquerait la survie cellulaire, la prolifération et la transformation cellulaire [44].

### 3.1.5 IKK $\epsilon$ dans le CP

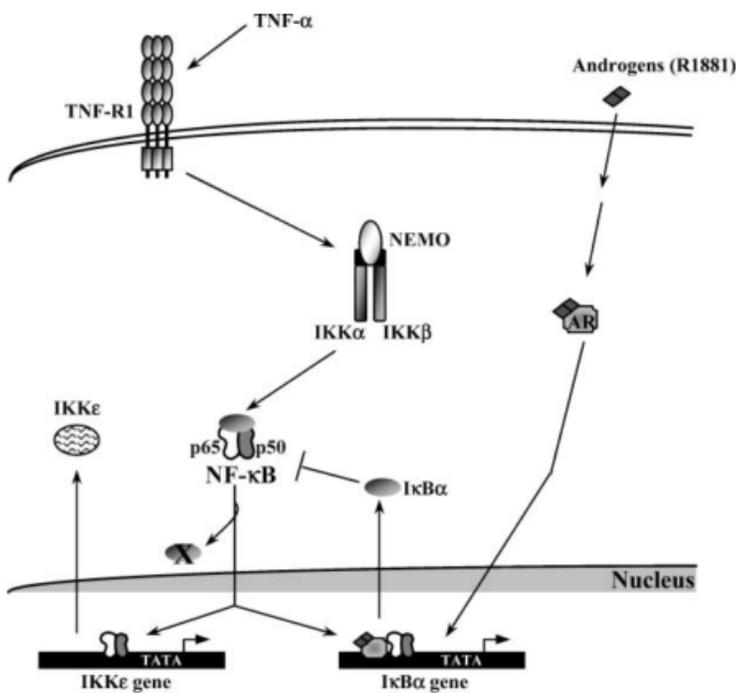
#### 3.1.5.1 *L'expression et la localisation*

Notre laboratoire a mis en évidence l'expression constitutive d'IKK $\epsilon$  dans les lignées cellulaires du CP résistantes à la castration (PC3, DU145) contrairement aux lignées hormono-sensibles (22Rv1, LNCP) [46]. Ces dernières observations ont été validées dans des tissus humains par la quantification de niveaux d'expression d'IKK $\epsilon$  cytosolique supérieurs dans les cellules de CPRC par rapport au CP-HS; les tissus sains, adjacents aux tumeurs et les PIN ayant des niveaux significativement plus faibles d'IKK $\epsilon$  cytosolique. Ces résultats suggèrent un rôle d'IKK $\epsilon$  dans la progression vers le gain de résistance à la castration. Ces observations sont en accord avec le fait que les tumeurs HS ayant progressé au stade RC avaient toutes des niveaux d'IKK $\epsilon$  cytosoliques

plus élevées. Cette hypothèse a aussi été appuyée par des évidences cliniques démontrant une relation entre les niveaux d'IKKε cytosolique et l'apparition de métastases [47].

### 3.1.5.2 La régulation d'IKKε dans le CP

Plusieurs études ont mis en évidence la régulation de l'expression d'IKKε dans des lignées cellulaires du CP. Cette régulation est complexe et dépendante du statut hormonosensible ou



**Figure 6. Schématisation de la voie de signalisation cellulaire d'IKKε.** La stimulation du récepteur TNF-1 (TNF-R1) via TNF-α induit la phosphorylation d'IκBα. La dégradation d'IκBα par le protéasome libère le complexe NF-κB p65/p50 qui transloque ainsi au noyau pour induire l'expression de gènes tels IKKε et IκBα. Les androgènes ont pour effet d'activer le récepteur aux androgènes (AR) et sa translocation au noyau afin de stimuler la synthèse d'IκBα. IκBα étant un inhibiteur du complexe NF-Kb permet de réguler à la baisse les niveaux d'expression d'IKKε [46].

résistant des cellules. En effet, il a été démontré que dans la lignée HS LNCP, l'expression d'IKKε est stimulée par l'activation de NF-κB et réprimée par l'activation du RA. Cette dernière a pour effet de maintenir une quantité élevée du dérégulateur de NF-κB IκB-α, empêchant ainsi l'activation de NF-κB et la stimulation d'IKKε (Figure 6) [46, 48, 49].

### 3.1.5.3 Le rôle d'IKKε dans le CP

Dans le but d'élucider la voie de signalisation d'IKKε et son implication dans les mécanismes inflammatoires du CP, Péant *et al.* ont étudié la relation entre l'expression d'IKKε et la production de

cytokines inflammatoires en 2009 [50]. Dans les lignées de CP-HS LNCP et 22Rv1 il a été démontré que la surexpression d'IKK $\epsilon$  stimule la production et de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8. Dans la lignée cellulaire CPRC PC3 et DU145, dans lesquelles l'expression d'IKK $\epsilon$  est constitutive, l'inhibition de celle-ci par shARN diminue drastiquement la quantité produite d'IL-6 [50]. La stimulation par IKK $\epsilon$  de l'expression de ces cytokines pourrait contribuer à la tumorigénèse en stimulant la croissance tumorale [51] et/ou en créant un état inflammatoire chronique favorable au processus tumoral [52].

## **3.2 L'INTERLEUKINE-6 (IL-6)**

### *3.2.1 Sources d'IL-6 dans le CP*

IL-6 est une cytokine inflammatoire pléiotropique importante sécrétée par les cellules infiltrantes lymphocytaires et nonlymphocytaires du système immunitaire dans la prostate, mais aussi par les cellules du cancer de la prostate elles-mêmes [53]. Il a été démontré que les infiltrats inflammatoires du CP sont constitués de façon prédominante par des lymphocytes CD4 principalement du sous-type Th17 et des lymphocytes-T régulateurs (Treg), dont la différenciation est sous le contrôle d'IL-6. Plus récemment, des *Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)* ont été impliqués dans la pathogénèse du CP, une sous-population de cellules myéloïdes dont le recrutement est régulé par IL-6. En parallèle, des niveaux élevés d'IL-6 ont été mesurés dans les cellules tumorales des coupes histologiques du CP [54] et dans les milieux de culture des lignées cellulaires du CP [50].

### 3.2.2 Le rôle RA-indépendant d'IL-6 dans le CP

Le rôle d'IL-6 dans l'inflammation, la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire est bien documenté [51]. Cette cytokine inflammatoire se lie à son récepteur (IL-6R) composé d'une sous-unité  $\alpha$  de reconnaissance du ligand (gp-80) et d'une sous-unité  $\beta$  de transduction du signal (gp 130). La liaison d'IL-6 à l'IL-6R permet une dimérisation de la sous-unité  $\beta$  et l'activation subséquente de trois voies de signalisation. La voie des kinases Janus active la transcription de gènes cibles via STAT-3 incluant des facteurs de croissance, *hypoxia-inducible factor (HIF)*, des métalloprotéinases et le *vascular endothelial growth factor (VEGF)*. La voie de signalisation ERK1/2-MAPK implique l'oncogène RAS et la voie de signalisation PI3-K mène à la translocation au noyau d'Akt qui régule une variété d'activités biologiques dont des processus anti-apoptotiques et pro-prolifératifs. [55]. L'effet d'IL-6 serait paracrine et autocrine et jouerait donc un rôle au niveau de la prolifération cellulaire, mais aussi de l'apoptose et de l'angiogénèse [26, 56].

Des études ont par ailleurs démontré une association entre l'exposition à l'IL-6 et le développement de métastases [57]. Les mécanismes pouvant être impliqués incluent la stimulation IL-6 dépendante des métalloprotéinases (MMP-9) par la voie PI3-K et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. Il a été démontré qu'IL-6 serait impliquée dans la pathogénèse des métastases osseuses suite au CP notamment au niveau de la différenciation ostéoblastique et qu'IL-6 produit par les ostéoblastes stimulerait la prolifération tumorale locale formant ainsi une boucle pro-proliférative [26, 58].

### 3.2.3 Le rôle RA-dépendant d'IL-6 dans le CP

Plusieurs études ont démontré qu'IL-6 active, en absence de stéroïdes, le RA et que son activation résulte en l'augmentation de la production de protéines prostatiques telles que l'APS [55] (Révisé par Paule et al. [59]) [60]. Cette voie d'activation ligand-indépendante du RA pourrait jouer un rôle important dans la progression de la maladie en l'absence d'androgènes et serait l'un des mécanismes proposés pour expliquer la progression du CP vers un état RC lors du TDA. Pour cette raison, un inhibiteur monoclonal d'IL-6 (CNTO328/siltuximab) a été testé dans des modèles murins avec des xénogreffes LnCaP hormono-sensibles. Les souris traitées avaient un plus petit volume tumoral, des niveaux sériques de l'APS plus faibles et une survie prolongée [61]. Cependant, les essais cliniques de phase I et II qui ont suivi ont produit des résultats sous-optimaux (Tableau 3) [26].

**Tableau 3. Études cliniques avec l'anticorps monoclonal anti-IL-6 (CNTO328) dans le CP [26]**

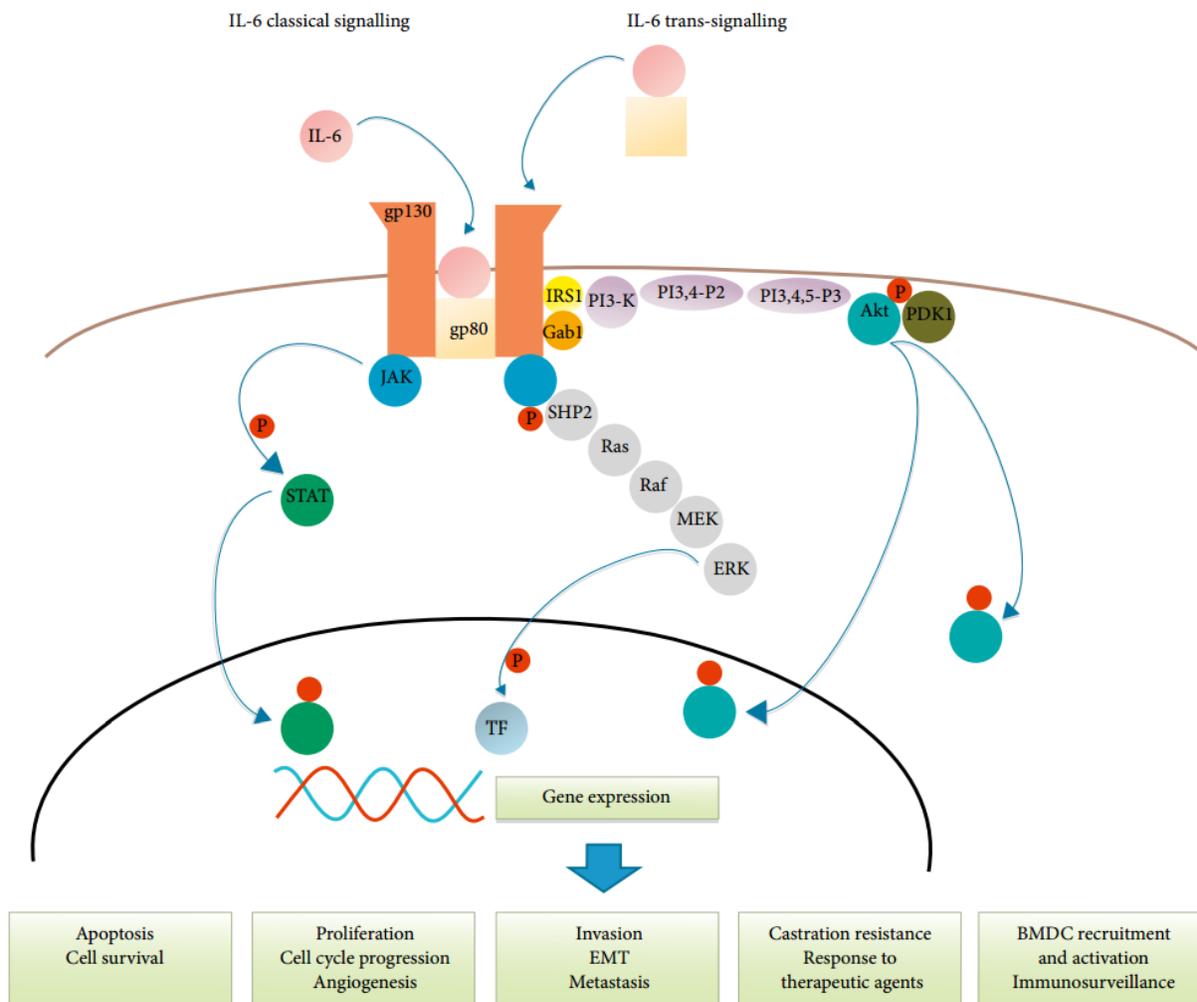
Référence	Type d'étude	Population	# patients (n)	Résultats
Karkera <i>et al.</i> [62]	Phase 1	Patients en attente de prostatectomie radicale	20	Pas d'effets adverses
Dorff <i>et al.</i> [63]	Phase 2	Patients avec CRPC pré-chimiothérapie.	53	-réponse de l'APS de 3.8% -23% de CP stable -survie médiane 11.6 mois avec un suivi médian de 14.8 mois
Fizazi <i>et al.</i> [64]	Phase 2	Patients CRPC pré-chimiothérapie. En combinaison avec mitoxantrone et de la prednisone	97	Pas d'amélioration de la survie sans progression.
clinicaltrials.gov; identifiant de l'étude NCT00401765	Phase 1	Patients CRPC naïfs à la chimiothérapie. En combinaison avec du docetaxel	40	NA

### 3.2.4 Le potentiel d'IL-6 comme biomarqueur pronostique sérique

Des études se sont intéressées à l'analyse des niveaux sériques de cette cytokine chez les patients atteints du CP. En effet, Drachenberg *et al.* ont montré que les niveaux sériques d'IL-6 chez les

patients avec CP-HR avancé (médiane 1.97 pg/mL [0.0-64.5]) étaient significativement plus élevés ( $p < 0.05$ ) que chez les contrôles (0.0 pg/mL [0.0-4.5]), les patients avec prostatite chronique (0.0 pg/mL [0.0-61.1]), HPB (0.0 pg/mL [0.0-44.5]), CP localisé (0.0 pg/mL [0.0-22.4]) et récurrent (0.0 pg/mL [0.0-5.4]) [65]. Une étude de Shariat *et al.* montre que les niveaux sériques d'IL-6 sont significativement plus élevés chez les patients présentant des métastases osseuses ( $47.41 \pm 21.32$  pg/mL) par rapport à ceux présentant des métastases aux ganglions lymphatiques ( $2.52 \pm 1.62$  pg/mL,  $p < 0.001$ ), ceux présentant des évidences cliniques de CP localisé au moment de la prostatectomie radicale ( $2.07 \pm 0.97$  pg/mL,  $p = 0.043$ ) et des contrôles en santé ( $1.91 \pm 0.61$ ,  $p = 0.039$ ). Par ailleurs, des niveaux d'IL-6  $\geq 1.99$  pg/mL constituerait un marqueur prédictif négatif de progression biochimique ( $p = 0.0093$ ) [66]. Similairement, Nakashima *et al.* ont démontré que des niveaux d'IL-6 sérique  $\geq 7$  pg/mL était un facteur pronostique négatif indépendant de survie ( $p < 0.05$ ) [67]. De tels résultats ont confirmé l'importance d'IL-6 comme potentiel biomarqueur pronostique du CP qui pourrait devenir un outil important en clinique.

En résumé, la cytokine inflammatoire IL-6 joue un rôle important dans la pathologie du CP via de nombreuses voies de signalisation (Figure 7). Des études récentes ont d'ailleurs mis en lumière sa régulation via le facteur de transcription IKK $\epsilon$  [50]. De plus, des niveaux sériques élevés d'IL-6 ont été associés à un plus mauvais pronostic, d'où son intérêt comme biomarqueur du CP. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée au lien entre les niveaux sériques et tissulaires de cette cytokine, à savoir l'origine prostatique ou non des niveaux sériques d'IL-6.



**Figure 7. Signalisation cellulaire d'IL-6 dans le CP.** Schématisation de la voie de signalisation d'IL-6 dans le cancer de la prostate tel que représenté par Nguyen *et al.* impliquant les trois voies de signalisation d'IL-6 JAK-STAT, ERK1/2-MAPK et P13-K [26].

### 3.3 L'INTERLEUKINE-8 (IL-8)

#### 3.3.1 Sources d'IL-8 dans le CP

IL-8 a été initialement identifiée comme une cytokine de chimiotactisme des neutrophiles sécrétée par les monocytes. Des modèles de mélanocytes ont montré qu'IL-8 était aussi sécrétée par les cellules tumorales. Cela a été validé pour un nombre important de tumeurs humaines [68]. Plusieurs

stimuli tels que les lipopolysaccharides, IL-1 et TNF peuvent induire la production d'IL-8 dont l'expression constitutive a été rapportée dans le cancer du sein, du colon, de la prostate et du pancréas [68, 69].

### 3.3.2 Le rôle RA-indépendant d'IL-8 dans le CP

Le rôle d'IL-8 comme facteur angiogénique est bien documenté, entre autre de par la stimulation de la sécrétion de *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* et *Basic Fibroblast Growth Factor* [69, 70]. Dans des modèles de CP *in vivo*, la quantité d'IL-8 a été corrélée à un potentiel pro-métastatique et pro-angiogénique en partie par l'induction de MMP-9 [71]. Aalinkeel *et al.* ont démontré l'association entre l'expression de facteurs angiogéniques et le potentiel métastatique de cellules du CP. Dans cette étude, IL-8 est significativement plus exprimée dans les cellules de lignées fortement métastatiques (PC3 et DU-145), contrairement à la lignée de faible potentiel métastatique (LNCP) [72]. Par ailleurs, Araki *et al.* ont démontré que les lignées cellulaires transfectées pour sécréter davantage d'IL8, démontrent une motilité, un caractère invasif, et une production de MMP-9 et de facteurs de croissance, 3 à 5 fois plus importante que les lignées cellulaires contrôle. De plus, les xenogreffes obtenues avec la lignée à plus faible potentiel métastatique (LNCP) transfectée pour sécréter IL-8, démontrent une croissance tumorale plus importante et des anomalies de la vascularisation comparées aux tumeurs de LNCP parentales.[69].

Dans des tissus de prostatectomie radicale, Uehara *et al.* ont corrélé l'expression d'IL-8 à un stade pathologique et à un score de Gleason plus avancés [73] et Murphy *et al.* ont démontré que l'expression cytoplasmique d'IL-8 et de ces deux récepteurs (CXCR1 et CXCR2) corrèlent avec la progression du stade du CP [74].

### 3.3.3 Le rôle RA-dépendant d'IL-8 dans le CP

Plusieurs travaux ont également exploré le rôle d'IL-8 dans la voie de signalisation du RA. Des résultats obtenus par Kanda *et al.* dans un modèle de mélanome métastatique suggèrent que la production d'IL-8 est inhibée par la 17 $\beta$ -estradiol, la progestérone et la DHT, l'androgène prédominant dans l'activation du RA dans la prostate. Ainsi, la suppression des androgènes aurait pour effet de stimuler la transcription d'IL-8 [69, 75]. De plus, Seaton *et al.* ont démontré que la stimulation de lignées de CP-HS (22Rv-1 et LNCaP) par de l'IL-8 exogène mène à une plus importante expression de la protéine RA et de son ARNm. Ceci a pour effet de réduire l'effet de l'antagoniste du RA, le bicalutamide, sur la viabilité des cellules [76]. En parallèle, Araki *et al.* ont décrit le rôle d'IL-8 et l'effet sur la résistance à la castration en démontrant que l'ajout d'IL-8 dans le milieu de culture de cellules hormonosensibles (LNCaP et LAPC-4) réduit leur sensibilité aux anti-androgènes et diminue le besoin d'androgène pour leur croissance [77].

### 3.3.4 Le potentiel d'IL-8 comme biomarqueur pronostique sérique

La pertinence des résultats décrits ci-dessus dans le contexte du CP et de la progression du cancer vers un stade RC est appuyée par des données qui montrent que les niveaux sériques d'IL-8 sont plus élevés chez les patients atteints d'un CP avancé, à des stades ne répondant plus aux TDA [78-80]. Tel que démontré récemment par Sharma *et al.*, chez les patients ayant un CP métastatique et débutant un TDA, les niveaux d'IL-8 sériques sont associés à une apparition significativement plus rapide d'un état résistant à la castration et à une survie plus courte [81].

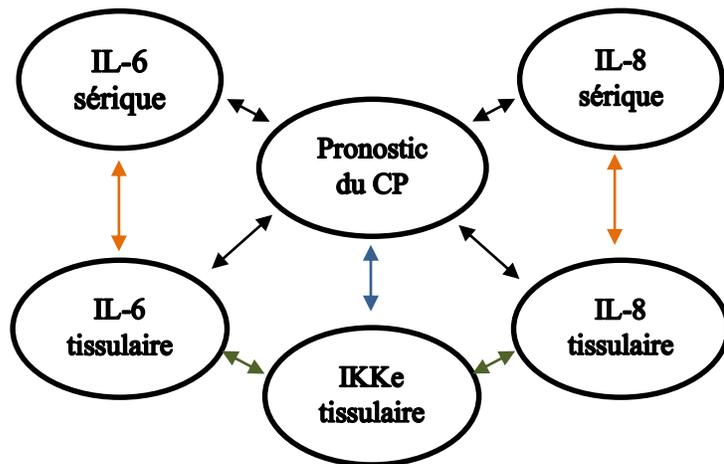
Les travaux réalisés sur IL-8 dans le CP ont mené à une meilleure compréhension de son rôle dans la pathogénèse de la maladie, dans la progression vers un stade RC, et du potentiel du dosage de ses niveaux sériques comme outil pronostique. Cependant, tout comme pour IL-6, l'association entre les niveaux sériques et tissulaires d'IL8 n'a jamais été établie.

#### 4 PROJET DE MÉMOIRE

##### 4.1 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

La problématique que pose la progression du CP nous a conduits, au laboratoire, à nous intéresser à la voie de signalisation d'IKKε et aux cytokines IL-6 et IL-8, à titre de biomarqueurs. Péant *et al.* ont mis en évidence le rôle oncogénique d'IKKε dans le CP, et le lien entre l'expression d'IKKε et la sécrétion des cytokines proinflammatoires IL-6 et IL-8 [46, 47, 50]. La présente étude s'inscrit dans la continuité des travaux de Péant *et al.* qui nous ont conduits à émettre les hypothèses

suivantes : 1) *les tissus exprimant plus fortement IKKε sécrèteraient d'avantage d'IL-6 et d'IL-8* et 2) *IKKε serait un biomarqueur pronostique tissulaire du CP.*



De plus, les travaux effectués sur les niveaux tissulaires d'IL-6 et d'IL-8 ont mis en évidence leur présence dans les tissus de CP et leur rôle dans

**Figure 8. Hypothèses de travail.** Les relations étudiées sont illustrées par des flèches de couleur en fonction de l'hypothèse de travail : vert (hypothèse 1), bleu (hypothèse 2), orange (hypothèse 3). Les flèches noires représentent des liens déjà décrits par la littérature.

la tumorigénèse, tandis que l'étude des niveaux sériques de ces cytokines suggère un potentiel pronostique. Ces observations nous mènent donc à émettre l'hypothèse suivante : 3) *les niveaux sériques d'IL-6 et d'IL-8 corréleront avec les niveaux tissulaires prostatiques.*

## **4.2 OBJECTIFS DE RECHERCHE**

Nous avons procédé à une étude par immunofluorescence qui, contrairement à l'immunohistochimie traditionnelle, permet le marquage de plusieurs protéines sur le même échantillon de tissu. Il devient alors possible d'effectuer des analyses de codistribution des différents marqueurs tissulaires dont IKK $\epsilon$ , IL-6 et IL-8. Ainsi, trois principaux objectifs ont été définis afin d'évaluer la validité des hypothèses précédemment énoncées.

Le premier objectif vise à corréler, au sein des échantillons de spécimens chirurgicaux de la même cohorte, les niveaux d'expression tissulaires d'IKK $\epsilon$  et d'IL-6/IL-8 dans l'épithélium tumoral.

Le deuxième objectif cherche à déterminer le potentiel d'IKK $\epsilon$  comme biomarqueur pronostique, en corrélant les mesures des niveaux épithéliaux d'IKK $\epsilon$  aux paramètres oncologiques de récurrence de la maladie.

Le troisième objectif consiste à corréler, au sein d'une cohorte de patients atteints de CP et opérés par prostatectomie radicale, les niveaux sériques d'IL-6 et d'IL-8 dans les séra préopératoires aux niveaux tissulaires tumoraux de ces cytokines dans l'échantillon de la prostatectomie.

**ARTICLE** : Étude d'IKKε, IL-6 et IL-8 dans le cancer de la prostate

*(version originale, en préparation pour soumission)*

**IKKε EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH POOR OUTCOME AND HIGH TUMORAL LEVELS OF IL-6 AND IL-8 IN PROSTATE CANCER**

Marc Bienz<sup>1,3</sup>, Guergana Tchakarska<sup>1</sup>, Benjamin Péant<sup>1</sup>, Dominique Trudel<sup>1,2,3</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,3</sup>, and Fred Saad<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)/Institut du cancer de Montréal, Montréal, Canada; <sup>2</sup>Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Département d'anatomo-pathologie; <sup>3</sup>Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada; <sup>4</sup>Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Département d'urologie

**Author implication:**

MNB performed the experiments, the statistical analysis, and is the main author of the manuscript. GT helped with immunocytofluorescence experiments and in reviewing the manuscript. BP was implicated in the design of the study and in reviewing the manuscript. DT reviewed all pathology specimens to ensure correct tissue classification and tumor grading. AMMM and FS were responsible of the study design and did the final manuscript reviewing.

Abstract word count : 332 words

Manuscript word count : 4199 words

**Small title:** IKKε, IL-6 and IL-8 expression in prostate cancer

**Key words:** Prostate cancer, IKKε, IL-6, IL-8, immunofluorescence, prognostic, bone metastasis, biochemical recurrence

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

Prostate cancer (PC) is highly heterogeneous in its course and there is a lack of prognostic biomarkers to identify patients with a higher risk of aggressive disease. Serum levels of IL-6 and IL-8 have shown to be promising predictors of biochemical recurrence (BCR). These cytokines are also secreted by PC cells and implicated in prostatic carcinogenesis. A previous study reported that higher levels of Ik-B kinase-epsilon (IKK $\epsilon$ ) was associated with higher production of both cytokines *in vitro* and that its expression was higher in more advanced disease. In the present study, we evaluate the expression of IKK $\epsilon$ , IL-6 and IL-8 in PC tissue samples and their potential as prognostic biomarkers. As a secondary endpoint, we evaluated the relation between tissue and serum levels of IL-6 and IL-8.

### METHODS

Immunofluorescent co-staining of IKK $\epsilon$ , IL-6 and IL-8 was performed on large-scale PC tissue microarrays (TMA), composed of samples of various tumor grades (n=216). Signal quantification was performed using the Visiomorph<sup>TM</sup> image analysis platform. Cytokine levels in preoperative serum samples were quantified by ELISA assay. Clinical and pathological parameters were gathered including preoperative PSA, tumor grade and stage, biochemical recurrence, bone metastasis and evidence of castration-resistant PC.

### RESULTS

For the first time, we show that IKK $\epsilon$  expression levels correlate significantly with IL-6 and IL-8 levels in both tumor and benign tissue adjacent to tumor (p<0.001). IKK $\epsilon$  was also associated to

tumor grade and stage ( $r>0.2$ ,  $p<0.05$ ), a shorter disease-free survival ( $p=0.007$ ) and a shorter bone metastasis-free survival ( $p=0.048$ ). Serum levels of IL-6 and IL-8 did not correlate with tumor levels of these cytokines. However, IL-6 serum levels in patients with low grade PC (Gleason score  $\leq 3+3$ ) was associated with a shorter disease-free survival.

## CONCLUSIONS

We report clear evidence of IKK $\epsilon$  as a potential tissue biomarker in PC. Also, using tissue samples we validate *in vitro* observations on the epithelial coexpression of IKK $\epsilon$ , IL-6 and IL-8. Our results suggest that high serum levels of these cytokines in localized disease are not of prostatic origin.

## INTRODUCTION

While prostate cancer (PC) is the leading cause of cancer in men in North America [82], 80% of newly diagnosed cases are localized to the prostate, and can usually be treated with radical prostatectomy or radiation therapy. However, 20-30% of those patients will experience biochemical recurrence (BCR) which often requires androgen-deprivation therapy (ADT) to slow cancer progression, with or without local salvage treatment [83]. Within 2-3 years of hormonal therapy, the disease may progress to castrate-resistant prostate cancer (CRPC), a state that is associated with a high propensity for metastasis and a poor prognosis. The mean survival of metastatic CRPC is 16-18 months [84]. As PC is highly variable in its course, the clinical challenge resides in identifying those patients with a more aggressive disease and adapting primary and secondary treatments to improve clinical outcome and avoid the onset of BCR. A better understanding of PC progression and the finding of efficacious prognostic biomarkers for future management of the disease are paramount. Serum levels of inflammatory cytokines, such as IL-6

and IL-8, have shown promising results as predictors of BCR [66, 67] and CRPC respectively [81]. Interestingly, in prostatic tumor cells IL-6 is a major regulator of PC progression that promotes cell proliferation and survival, angiogenesis, bone metastasis development, and can also activate the androgen receptor (AR) in a ligand-independent manner [26, 56, 58]. IL-8 has been shown to stimulate chemoresistance, tumor growth, and angiogenesis [69]. IL-8 also promotes androgen-independence of the tumor by increasing AR expression and promoting the ligand-independent activation of the AR [69, 76].

The transcription factor, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), is an important regulator of pro-inflammatory genes, including IL-6 and IL-8 [85]. Among the members of the I $\kappa$ B kinase (IKK) family of proteins, known as regulators of NF- $\kappa$ B, IKK $\epsilon$  has stood out for its role in carcinogenesis for different cancers [44]. Interestingly, IKK $\epsilon$  overexpression in hormone sensitive (HS) PC cell lines was shown to increase the secretion of IL-6 and IL-8 cytokines, whereas IKK $\epsilon$  knock-down in a CRPC cell line resulted in decreased IL-6 levels [50]. In addition, IKK $\epsilon$  is constitutively expressed in CRPC cell lines, and is also highly expressed in CRPC primary tumors, compared to HS PC and non-malignant tissues [46, 47]. Altogether, these data suggest a role for IKK $\epsilon$  in PC progression by establishing a chronic inflammatory state thought to promote cancer development [86].

Here we report evidence supporting the current literature on the relationship between IKK $\epsilon$  expression, and IL-6 and IL-8 levels in PC tumor cells. This is the first investigation of the coexpression of these molecules in human prostatic tissue. Moreover, we demonstrate that high IKK $\epsilon$  expression in tumors is associated with poor oncological outcome and has high potential as a prognostic tissue biomarker in PC. While production of IL-6 and IL-8 by tumor cells is well documented and both cytoplasmic and serum levels of these cytokines have clinical significance,

we did not identify any evidence to show that serum levels of IL-6 and IL-8 originated from the PC epithelium.

## **MATERIAL AND METHODS**

### Cell culture

PC-3 human cell lines derived from CRPC metastasis were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-1435, Manassas, VA). Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 100 µg/ml gentamicin, 0.5 µg/ml amphotericin B and 10% fetal bovine serum (FBS) (all from Wisent, Inc., St-Bruno, Quebec, Canada). Cells were seeded onto 10 mm glass cover slips in a 12-well plate for 24 h prior to transfection.

### siRNA transfection and immunofluorescence

PC-3 cells were transfected with siRNAs targeting IL-6 and IL-8 mRNA. All transfection reagents and siRNAs were purchased from Dharmacon GE (Lafayette, CO, USA) and used according to the manufacturer's recommendations. For each target, four siRNAs were tested (ON-TARGETplus Human IL-6 and IL-8 smart pools). Cells were transfected with 50 nM of each siRNA and cytokine expression was assessed at 72 h. For a negative control, we used the non-human targeting siRNA (si scramble) ON-TARGETplus Non-targeting Pool #2 at the same concentration as the targeting siRNA. Cells were transfected with DharmaFECT 2 Transfection Reagent.

For immunofluorescence, cells were probed with anti-IL-6 (MAB2061) and anti-IL-8 (MAB208) antibodies purchased from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA). Cells were first formalin-fixed, permeabilized by 0.1% Triton X100 in phosphate buffered saline (PBS), and blocked in 1%

bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h. Cells were then incubated overnight with primary antibody followed by a 1 h incubation with the suitable secondary antibody. Cells were mounted onto glass slides using ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies Inc., Burlington, ON) for nuclear counterstaining. Pictures were taken using a Zeiss Observer Z1 microscope at 40x magnification.

#### Patient cohort and tissue-microarray (TMA) design

Our cohort was composed of patients who underwent open radical prostatectomy for PC. Tissue cores were derived from either tumoral tissue or benign tissue adjacent to tumor (benign adj.) collected from final surgical prostatic specimens, and were available for analysis on six paraffin-embedded TMA blocks. Tissue sections of 0.4 mm thickness were cut with a Leica 2125 RM microtome (Leica Biosystems, Concord, ON, CA) and mounted onto slides. Hematoxylin/eosin stained TMA sections were validated by an uropathologist for assessment of tumoral tissue. For all patients, two cores of tumor and/or two of benign adj. tissue were arrayed on two (A and B) separate TMA blocks for a total of six test-TMAs: 1A, 1B, 2A, 2B, 3A and 3B. During processing, some cores were lost or considered of poorer quality and were excluded from the analysis. A total of 1080 cores passed the quality check. Patients who did not have two cores of either tumor or benign adj. tissue were excluded from the cohort. Our final cohort was composed of 216 patients with available serum samples, and among which 166 had adequate tumor samples and 181 had adequate benign adj. samples. Cohort characteristics are summarized in table 1.

#### Immunofluorescence multi-staining of TMAs

The TMA was stained using anti-IL-6 (MAB2061), anti-IL-8 (MAB208) and anti-IKK $\epsilon$  (Prosci 2329, ProSci Incorporated, Poway, CA, USA) antibodies. An additional epithelial mask,

highlighting epithelial features within the tissue, was defined by prostate epithelium-specific proteins using anti-PSA (SC-7638, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-Cytokeratin-18 (SC-6259, Santa Cruz Biotechnology) and anti-Cytokeratin-19 (A53-B/A2.26, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) antibodies. Multi-staining was performed on twelve slides: the six test-TMAs and their associated duplicates, which were used as negative controls without primary antibodies to adjust for non-specific tissue staining. Slides were processed through the automated BenchMark XT platform (Ventana Medical Systems, Inc., Roche, Tucson, AZ, USA) and incubated with the primary antibodies at the desired concentration or with PBS (for control slides). Slides were then incubated for 60 min with fluorescent secondary antibodies. Subsequent stainings were performed after an overnight incubation with mouse-on-mouse blocking reagent (Vector Laboratories, Inc. CA, USA) to avoid cross-staining. Cover slips (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, UK) were mounted with ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI for nuclear counterstaining.

Slides were scanned using the Olympus XM10 camera (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Using the image analysis software Visiomorph (Visiopharm, Hoersholm, Denmark), discrimination of the stroma *versus* epithelium was achieved by recognition of the wavelength signal ( $\pm 540-570$  nm) associated with the epithelial mask. Quantification of the epithelial expression intensity of IL-6, IL-8 and IKK $\epsilon$  was digitally performed and measured as Arbitrary Units/Pixel (AU/pixel). Some cores with inadequate (incomplete, missing, or containing artifacts) IKK $\epsilon$  staining were excluded from the IKK $\epsilon$  analysis, which resulted in sampling from 101 patients for this subgroup.

## ELISA

IL-6 and IL-8 serum levels were measured according to manufacturer's conditions using Quantikine ELISA kits from R&D Systems.

## Statistical analysis

The IBM SPSS Statistics package (IBM Corporation, Version 21, Armonk, New York) was used for analysis. All tests were two-tailed with a *p*-value cutoff of 0.05 to determine statistical significance. Pearson correlations were used to correlate intracellular levels of IL-6, IL-8 and IKK $\epsilon$  and to evaluate the association between serum cytokine levels, clinical parameters and tissue levels of IL-6, IL-8, and IKK $\epsilon$ . A univariate binomial logistic regression model was used to assess risk of BCR, defined as an increase in PSA of > 0.2 ng/mL after surgery. The Kaplan-Meier method was used to estimate disease-free survival distributions. Disease-free survival was calculated from the time of diagnosis to the date of the first BCR. The Cox proportional hazard model was used for univariate and multivariate survival analyses.

## **RESULTS**

### *Validation of antibody specificity for IL-6 and IL-8*

We validated the specificity of our anti-IL-6 and anti-IL-8 antibodies by immunocytochemistry. This first involved inhibiting the cellular synthesis of either cytokines by transfecting the PC-3 cell line with siRNAs that targeted IL-6 and IL-8. Results showed that the signal detected by the anti-IL-6 and anti-IL-8 antibodies was significantly reduced in cells that were transfected with the corresponding siRNA, compared to the negative control (siRNA scramble) (Figure 1A). These results validated the specificity of both antibodies, demonstrating that the signal reflected the

expected amounts of these cytokines in cells. The specificity of the anti-IKK $\epsilon$  antibody was previously validated by Péant *et al.* [47].

#### *IL-6, IL-8 and IKK $\epsilon$ coexpression in human prostatic epithelium*

In order to better characterize the link between IKK $\epsilon$  and IL-6 or IL-8 levels in prostatic tissue, we investigated the cellular expression of these proteins in tumor and benign adj. tissues from our patient cohort (Table 1). The TMA was stained with antibodies against IL-6, IL-8, IKK $\epsilon$ , and a cocktail of prostate epithelium-specific proteins (cytokeratin18, cytokeratin 19 and PSA) (Figure 1B). After subtraction of the stromal staining, expression levels in tumoral and benign adj. epithelia were respectively  $1376.24 \pm 139.39$  AU/pixel and  $1384.34 \pm 150.37$  AU/pixel for IL-6 ( $p=0.792$ ),  $1129.92 \pm 137.20$  AU/pixel and  $1088.95 \pm 136.48$  AU/pixel for IL-8 ( $p=0.001$ ), and  $5625.57 \pm 789.10$  AU/pixel and  $5510.90 \pm 766.98$  AU/pixel for IKK $\epsilon$  ( $p=0.153$ ). Epithelial levels of IL-6 and IKK $\epsilon$  were similar between tumoral and benign adj. cores. However, IL-8 tumoral levels were statistically higher than levels in benign adj. tissue. Next we plotted the expression levels of IL-6 vs IKK $\epsilon$  and IL-8 vs IKK $\epsilon$  in tumoral and benign adj. cores. IL-6 or IL-8 paired with IKK $\epsilon$  expression levels correlated strongly and significantly with a Pearson r correlation ranging from 0.731 to 0.782 in both tumoral and benign adj. tissues (Figure 1C). In addition, IL-6 and IL-8 expression correlated significantly with each other in both tumor and benign adj. cores ( $r = 0.689$ ,  $p < 0.001$ , and  $r = 0.668$ ,  $p < 0.001$  respectively; data not shown).

#### *Evaluation of IL-6, IL-8 and IKK $\epsilon$ expression in tumors as predictors of disease progression*

Tumoral levels of IL-6, IL-8 and IKK $\epsilon$  were correlated to specific oncological and pathological parameters (Table 2). Benign adj. cores were not included in this analysis because we focused on

the biomarker potential of cellular targets that were specific to tumor cells. In tumor cells, IL-6 levels did not associate with any of the tested outcomes. However, IL-8 levels correlated significantly with tumor invasion of the seminal vesicle ( $r = 0.189, p = 0.014$ ). Moreover, IKK $\epsilon$  expression was significantly associated with a higher Gleason score ( $r = 0.206, p = 0.041$ ), extraprostatic extension ( $r = 0.212, p = 0.035$ ), tumor invasion of the seminal vesicles ( $r = 0.292, p = 0.004$ ), BCR ( $r = 0.203, p = 0.041$ ) and tumor stage ( $r = 0.210, p = 0.035$ ).

We determined 6500 AU/pixel as the optimal IKK $\epsilon$  cutoff level to distinguish patients with significantly longer disease-free survival (Figure 2A). Association between tumoral IKK $\epsilon$  levels and BCR remained statistically significant when incorporated in a univariate Cox proportional hazard model with a hazard ratio of 1.001 [95% CI 1.000-1.001,  $p = 0.016$ ] (Table 3). However, IKK $\epsilon$  was not an independent predictor of BCR when incorporated with other known predictors such as positive surgical margins, Gleason score, and preoperative PSA (Table 3). IKK $\epsilon$  in tumor cores also showed a trend in association with bone metastasis development. The Kaplan-Meier survival curve showed that patients with tumor IKK $\epsilon$  expression levels  $\geq 5300$  AU/pixel developed bone metastasis in a significantly shorter time (Figure 2B). More importantly, none of the patients with IKK $\epsilon$  expression levels below 5300 AU/pixel had bone metastasis during their follow-up. However, in our multivariate Cox proportional hazard model, IKK $\epsilon$  was not identified as an independent predictor of bone metastasis (Table 3).

#### *Correlation of serum levels of IL-6 and IL-8 with corresponding tissue expression levels and oncological outcomes*

Since IL-6 and IL-8 serum levels are reported as predictors of BCR [66, 67, 80], we examined our cohort to validate this observation. IL-6 and IL-8 serum levels were determined by ELISA assay.

Median serum levels for IL-6 and IL-8 were 0.71 [interquartile range 0.00-4.23] pg/mL and 8.12 [interquartile range 3.49-17.07] pg/mL respectively. For IL-6 serum levels  $\geq 7$  pg/mL, there was no significant correlation with BCR (Figure 3A), CRPC, bone metastasis development, or with PC survival (Table 4). However, when stratifying the cohort by Gleason score, a significant correlation between IL-6 serum levels and BCR was observed in patients with low-grade tumors (Gleason score  $\leq 3+3$ ) (Table 4). Disease-free survival of patients with Gleason scores of  $\leq 3+3$  and IL-6 serum levels  $\geq 7$  pg/mL was significantly reduced (Figure 3B). In this subgroup, IL-6 levels also correlated with bone metastasis. However, this result did not yield strong statistical evidence because only one patient with GS  $\leq 3+3$  had bone metastasis. Regarding IL-8 serum levels, it did not correlate with any of the oncological parameters tested (Table 4 and Figure 3C). Similar results were found when stratifying the cohort according to Gleason score (Figure 3D).

Finally, we compared IL-6 and IL-8 expression levels between serum and tissue. IL-6 expression levels in tumoral and benign adj. cores did not correlate with the patient's corresponding IL-6 serum levels, producing Pearson  $r$  coefficients of 0.127 ( $p = 0.102$ ) and 0.023 ( $p = 0.759$ ) respectively (Table 5). Similarly, tumor and benign adj. expression levels of IL-8 did not correlate with the corresponding serum levels, with Pearson  $r$  coefficients of 0.104 ( $p = 0.182$ ) and 0.031 ( $p = 0.683$ ) respectively nor with IKK $\epsilon$  levels (Table 5).

## DISCUSSION

In this study, we report evidence of IKK $\epsilon$  as a potential tissue biomarker in PC. Using prostatic specimens taken at the time of radical prostatectomy, we first show that higher IKK $\epsilon$  expression levels in tumor cells ( $\geq 6500$  AU/pixel) reflects a more advanced grade and stage of the tumor. IKK $\epsilon$  epithelial levels positively correlated with the Gleason score, pathological stage, and more specifically to extraprostatic extension and seminal vesicle invasion (Table 3). In regards to tumor progression, we report for the first time, evidence showing that high IKK $\epsilon$  expression is associated with significantly shorter disease-free survival. In addition, we obtained similar results to those obtained by Péant *et al.* which show that IKK $\epsilon$  tumor expression correlates with the appearance of bone metastasis [47]. Péant *et al.* also reported correlation between IKK $\epsilon$  levels and the onset of BCR and CRPC, which was not observed in our study. These differences could reflect cohort differences and the low rates of CRPC in our study [47]. The strong link between IKK $\epsilon$  expression and tumor progression is also supported by the literature for other primary cancers. In particular, IKK $\epsilon$  was described as a promising marker of poor prognosis in ovarian cancer as it was associated with shorter survival (HR: 1.813, 95%CI 1.043-3.151,  $p = 0.029$ ) [87], tumor invasion, metastasis, and resistance to chemotherapy [88]. In non-small cell lung carcinoma, IKK $\epsilon$  was also described as a negative predictor of overall survival (HR: 3.34, 95%CI 1.07-10.40,  $p = 0.038$ ) [89], and was associated with impaired chemosensitivity [90]. In breast cancer, IKK $\epsilon$  has been described as an oncogene that stimulates tumor growth through the well-documented NF-kB pathway [45, 91]. Other studies have shown that IKK $\epsilon$  may contribute to carcinogenesis via pathways independent from NF-kB signaling, which is considered one of the classical targets of IKK $\epsilon$  [41, 50, 89]. Together, these reports demonstrate IKK $\epsilon$ 's potential as a novel cellular target and a marker of disease progression in PC.

One suggested mechanism by which IKK $\epsilon$  may stimulate carcinogenesis in PC is through the promotion of an inflammatory, tumor-supporting microenvironment in the prostate. Péant *et al.* were the first to show that IKK $\epsilon$  over-expression stimulated IL-6 and IL-8 secretion by PC cells *in vitro* [50]. Interestingly, both cytokines are well-documented tumor growth promoting factors in PC [26, 69] that have been implicated in PC progression, acting through the AR signaling pathway to promote progression to a CRPC state [56, 59, 76]. In the present study, we report the first evidence for IKK $\epsilon$ , IL-6 and IL-8 coexpression in human prostatic tissue. Our observations are in line with the *in vitro* results presented by Péant *et al.* [50] and demonstrate that this coexpression is not only notable in PC cells, but also in benign cells adjacent to tumor. These results support the hypothesis that cells in proximity to the tumor may contribute to a pro-inflammatory microenvironment [52]. This is additionally supported by the fact that IKK $\epsilon$  expression levels in benign adj. cells were not significantly lower compared to PC cells. This observation however differs from Péant *et al.* which showed a significantly higher expression of IKK $\epsilon$  in HS PC cells compared to benign adj. cells and even greater expression in CRPC cells [47]. This discrepancy may be the result of cohort variations at the time of surgery and the selection process of benign adj. cores. Nevertheless, our combined results highlight a clear association between IKK $\epsilon$ , IL-6 and IL-8 in PC. Further investigation of the peri-tumoral stroma could also improve our understanding of inflammation in the tumoral microenvironment.

While the role of IL-6 and IL-8 in PC has been well demonstrated through many *in vitro* and *in vivo* models, few studies have investigated the association of IL-6 and IL-8 in human PC tissue samples with disease outcome. Among the few radical prostatectomy models, Ishiguro *et al.* showed that positive IL-6 staining by immunohistochemistry was associated with a higher

proportion of Gleason scores  $\geq 8$  and BCR [92]. Similarly, Uehara *et al.* showed that IL-8 expression was associated with more advanced tumor staging and a higher Gleason score [73], whereas Murphy *et al.* correlated cytoplasmic IL-8 and its two receptors (CXCR1 and CXCR2) to PC staging [74]. We did not find a significant association between IL-6 levels in PC cells and the pathological parameters and oncological outcomes tested. Similar results were obtained by Engelhardt *et al.* who showed no association between IL-6 levels and tumor grade, stage and PSA [93], and Ishiguro *et al.* who also did not find a significant association with staging [92]. IL-8 only correlated with seminal vesicle invasion in our study. Exclusion of the stroma in our cohort could explain the absence of correlation between tissue levels of both cytokines and the clinical outcomes tested. While data from *in vitro* and *in vivo* models consistently associate IL-6 and IL-8 production in tumor cells with a poor outcome, their expression in human surgical specimens does not have a clear association with the clinical outcome. This could be explained by insufficient data in the literature, or by differences between tumor cells *in vitro* and tumor cells within a tissue specimen. Tissue expression levels of clinical specimens may not exclusively nor accurately represent cytokine production by tumor cells alone. Nevertheless, the relevance of IL-6 and IL-8 expression in tumor samples has been demonstrated for other cancers. IL-6 was strongly associated with survival and the degree of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer [94]. Also, IL-6 positive staining in bladder cancer samples was associated with a higher clinical stage, a higher recurrence rate after treatment and a reduced survival rate [95]. In colorectal cancer samples, IL-8 was associated with advanced stage and metastasis to lymph nodes and the liver [96].

Serum levels of IL-6 and IL-8 have been thoroughly studied for many cancers. In the serum of patients with laryngeal squamous cell cancer, IL-6 and IL-8 were overexpressed, and IL-6 was associated with lymph node metastasis, tumor stage, and shorter overall and progression-free

survival [97]. In addition, both cytokines were associated with significantly shorter survival in lung cancer [98]. IL-6 and IL-8 serum levels in PC patients have also been studied for their potential as prognostic biomarkers. Nakashima *et al.* showed that an IL-6 serum level  $\geq 7$  pg/mL was associated with shorter survival [67]. When we used the same threshold for our cohort, IL-6 serum levels was associated with a significantly shorter disease-free survival in patients with a Gleason score of  $\leq 3+3$  (Figure 3D). The distinction for only this subgroup is unclear. One could hypothesize that a higher inflammatory profile in early disease (Gleason score  $\leq 3+3$ ) may be associated with shorter disease-free survival. Alternatively, IL-8 serum levels are not associated with the outcomes tested (Table 4). Previous work has shown a link between higher IL-8 serum levels and a more advanced disease [78-80]. Moreover, Sharma *et al.* showed that higher IL-8 serum levels were associated with a significantly shorter time to CRPC and reduced survival in patients with bone metastasis starting on ADT [81]. These discrepancies with our results may be due to cohort differences in which the study population of these reports had more advanced disease with either CRPC or bone metastasis, whereas serum samples in our cohort were taken from hormone-naïve patients, prior to surgery [81]. In addition, the low rate of CRPC in our cohort limited both our capacity to detect significance for this clinical outcome and subgroup statistical analysis.

Many studies support the potential of IL-6 and IL-8 as serum biomarkers of PC progression [66, 67, 80]. Since these cytokines are also produced by PC cells, we hypothesized that their serum levels would correlate with corresponding levels measured in tissue samples. Validating this hypothesis would suggest that cytokines produced by the prostatic tumor may leak into the blood stream, similar to PSA in advanced disease. However, we found no association between IL-6 and IL-8 levels in tumor cells and levels in patient's serum (Table 5). Correspondingly, serum levels

of these cytokines did not correlate with tumor levels of IKK $\epsilon$ , which stimulates the cellular production of IL-6 and IL-8, when overexpressed [50]. Together, these results suggest that while IL-6 and IL-8 serum levels do not correlate with the extent of inflammation in the prostate, they may instead reflect the systemic inflammatory reaction stimulated by immune cells reacting to cancer. Results from Tazaki *et al.* show that PC is associated with increased serum levels of many cytokines including IL-6 and IL-8 [80]. Further research is necessary to investigate beyond the epithelial levels of these cytokines. Analyzing the prostatic stroma may result in new findings since IL-6 and IL-8 play paracrine roles and are also implicated in positive feedback loops with infiltrating immune cells of the stroma [52, 99].

## **CONCLUSION**

In conclusion, we report a strong link between IKK $\epsilon$  expression levels in prostatic carcinoma and the corresponding IL-6 and IL-8 tissue expression levels. These results validate previous observations highlighting the importance of IKK $\epsilon$  in IL-6 and IL-8 signaling pathways and subsequent initiation and maintenance of an inflammatory tumor supporting microenvironment [50, 52]. In addition, we observed that high tumoral IKK $\epsilon$  levels coincide with a higher tumor stage and grade, and are associated with a poor oncological prognosis that includes biochemical recurrence and bone metastasis. Such results suggest that IKK $\epsilon$  could act as a good tissue biomarker and be an interesting therapeutic target. Finally, we do not show an association between tissular and serum levels of IL-6 and IL-8. In this study we were able to validate previously demonstrated associations between IL-6 serum levels and biochemical recurrence. However, further analysis on the stromal expression levels of these cytokines is necessary to improve our understanding on whether IL-6 and IL-8 serum levels may reflect the overall activation of the systemic inflammatory machinery.

## TABLES

**Table 1. Cohort characteristics**

Parameter	Cohort	
<b>Cohort characteristics</b>		
Total number of patients	216 (100)	
With available serum samples	216 (100)	
With available tumoral tissue samples	166 (77)	
With available Benign adj. tissue samples	181 (84)	
Age at diagnosis (years)	62.4 ± 5.5	
Preoperative PSA (ng/mL)	7.09 [5.17-10.68]	
Post-operative follow-up time (months)	103.91 ± 50.03	
<b>Oncological and pathological outcome</b>		
BCR	86 (40)	
Interval RP - BCR (months)	31.6 ± 34.3	
CRPC evidence	17 (8)	
Bone metastasis	19 (9)	
Interval RP - first bone metastasis (months)	59.4 ± 47.9	
Prostate cancer related death	10 (5)	
Interval RP – prostate cancer related death (months)	57.7 ± 27.4	
Specimen Gleason Score	<3+3	55 (26)
	3+4	115 (54)
	4+3	18 (9)
	≥4+4	24 (11)
Pathological stage	pT2	157 (73)
	pT3	59 (27)
Seminal vesicle invasion	26 (12)	
Lymph node invasion	8 (6)	
Extraprostatic extension	59 (27)	
Positive surgical margins	77 (37)	
Data presented as n (%), mean ± SD, or median [Q1-Q3]. Benign adj. Benign tissue adjacent to tumor cells. PSA Prostate-specific antigen. BCR Biochemical recurrence. CRPC Castrate-resistant prostate cancer. RP Radical prostatectomy.		

**Table 2. Correlation between the IL-6, IL-8, and IKK $\epsilon$  tumoral levels, and oncological parameters.**

	Markers	Preop PSA	GS	pStage	EPE	LNI	SVI	BCR	CRPC evidence	BM	PC survival
<b>Tumoral cores</b>	<b>IL-6 (n=166)</b>	r=-0.010	r=-0.010	r=0.080	r=0.077	r=0.006	r=0.119	r=0.039	r=0.051	r=0.078	r=-0.018
		p=0.897	p=0.898	p=0.304	p=0.326	p=0.947	p=0.127	p=0.615	p=0.513	p=0.318	p=0.813
	<b>IL-8 (n=166)</b>	r=0.019	r=0.047	r=0.068	r=0.066	r=0.006	r=0.189	r=0.048	r=-0.029	r=-0.001	r=0.053
		p=0.810	p=0.553	p=0.383	p=0.401	p=0.954	p=0.014	p=0.538	p=0.715	p=0.987	p=0.499
	<b>IKK<math>\epsilon</math> (n=101)</b>	r=0.085	r=0.206	r=0.210	r=0.212	r=0.102	r=0.292	r=0.203	r=0.144	r=0.178	r=0.140
		p=0.400	p=0.041	p=0.035	p=0.035	p=0.414	p=0.003	p=0.041	p=0.154	p=0.074	p=0.162
Preop PSA Preoperative prostate-specific antigen. GS Gleason-Score. pStage Pathological Tumor stage. EPE Extraprostatic extension. LNI Lymph node invasion. SVI Seminal vesicle invasion. BCR Biochemical recurrence. CRPC Castrate-resistant prostate cancer. BM Bone metastasis. PC Prostate cancer. See Material and Methods for specifications regarding the group sizes.											

**Table 3. Hazard ratios from the Cox proportional hazard model for biochemical recurrence and bone metastasis**

Covariate	Biochemical recurrence						Bone metastasis					
	Univariate			Multivariate			Univariate			Multivariate		
	Coefficient (bi)	HR [exp(bi)] 95%CI	P-Value	Coefficient (bi)	HR [exp(bi)] 95%CI	P-Value	Coefficient (bi)	HR [exp(bi)] 95%CI	P-Value	Coefficient (bi)	HR [exp(bi)] 95%CI	P-Value
<b>Tumoral IKKε</b>	0.001	1.001 [1.000-1.001]	0.016	0.000	1.000 [1.000-1.001]	0.266	0.001	1.001 [1.000-1.002]	0.094	0.000	1.000 [0.999-1.002]	0.534
<b>PSM</b>	1.103	3.015 [1.804-5.037]	<0.001	0.968	2.633 [1.248-5.556]	0.011	0.169	1.184 [0.386-3.628]	0.767	0.048	1.049 [0.203-5.417]	0.954
<b>GS</b>			<0.001			0.012			0.001			0.606
<b>≤ 3+3</b>	(0.00)	(1.00)		(0.00)	(1.00)		(0.00)	(1.00)		(0.00)	(1.00)	
<b>3+4</b>	1.023	2.783 [1.227-6.310]		0.784	2.191 [0.615-7.803]		-0.064	0.938 [0.085-10.351]		-12.010	0.000 [0.000-]	
<b>4+3</b>	1.206	3.341 [1.060-10.531]		1.028	2.794 [0.588-13.287]		1.443	4.234 [0.264-68.026]		0.63	1.878 [0.106-33.388]	
<b>≥ 4+4</b>	2.353	10.513 [4.315-25.621]		1.944	6.984 [1.703-28.646]		2.753	15.694 [1.969-125.092]		1.529	4.613 [0.416-51.161]	
<b>Preop PSA</b>	0.051	1.052 [1.021-1.085]	0.001	0.059	1.061 [1.018-1.106]	0.005	0.067	1.069 [1.009-1.134]	0.025	0.108	1.114 [1.001-1.241]	0.048

PSM Positive surgical margins. GS Gleason-Score. PSA Prostate-specific antigen. CRPC Castrate-resistant prostate cancer. SVI Seminal vesicle invasion. LNI Lymph node invasion. EPE Extraprostatic extension.

**Table 4. Correlation of IL-6 and IL-8 serum levels to biochemical recurrence**

Serum	Substratification		BCR	CRPC	BM	PC survival
<b>IL-6 cutoff ≥7 pg/mL</b>	<b>Total (n=216)</b>	<b>Gleason Score</b>	r=0.042, p=0.536	r=-0.040, p=0.563	r=0.037, p<0.593	r=0.020, p=0.773
	<b>Gleason score</b>	≤3+3 (n=55)	r=0.301, p=0.025	-	r=0.289, p=0.033	-
		3+4 (n=114)	r=-0.013, p=0.890	r=0.074, p=0.437	r=0.074, p=0.431	r=-0.042, p=0.658
		4+3 (n=17)	r=-0.040, p=0.876	r=-0.169, p=0.517	r=-0.189, p=0.453	r=-0.086, p=0.735
		≥4+4 (n=24)	r=-0.100, p=0.642	r=-0.151, p=0.481	r=0.076, p=0.726	r=0.205, p=0.337
<b>IL-8 cutoff ≥8 pg/mL</b>	<b>Total (n=216)</b>	<b>Gleason Score</b>	r=-0.014, p=0.832	r=-0.026, p=0.832	r=-0.028, p=0.676	r=-0.009, p=898
	<b>Gleason score</b>	≤3+3 (n=55)	<b>r=0.047, p=0.723</b>	-	<b>r=-0.119, p=0.372</b>	-
		3+4 (n=114)	r=-0.104, p=0.261	r=-0.063, p=0.495	r=-0.064, p=0.486	r=0.086, p=352
		4+3 (n=17)	r=0.304, p=0.180	r=-0.031, p=0.898	r=0.038, p=0.869	r=0.141, p=0.541
		≥4+4 (n=24)	r=-0.302, p=0.151	r=-0.029, p=0.895	r=-0.029, p=0.895	r=-0.170, p=0.426

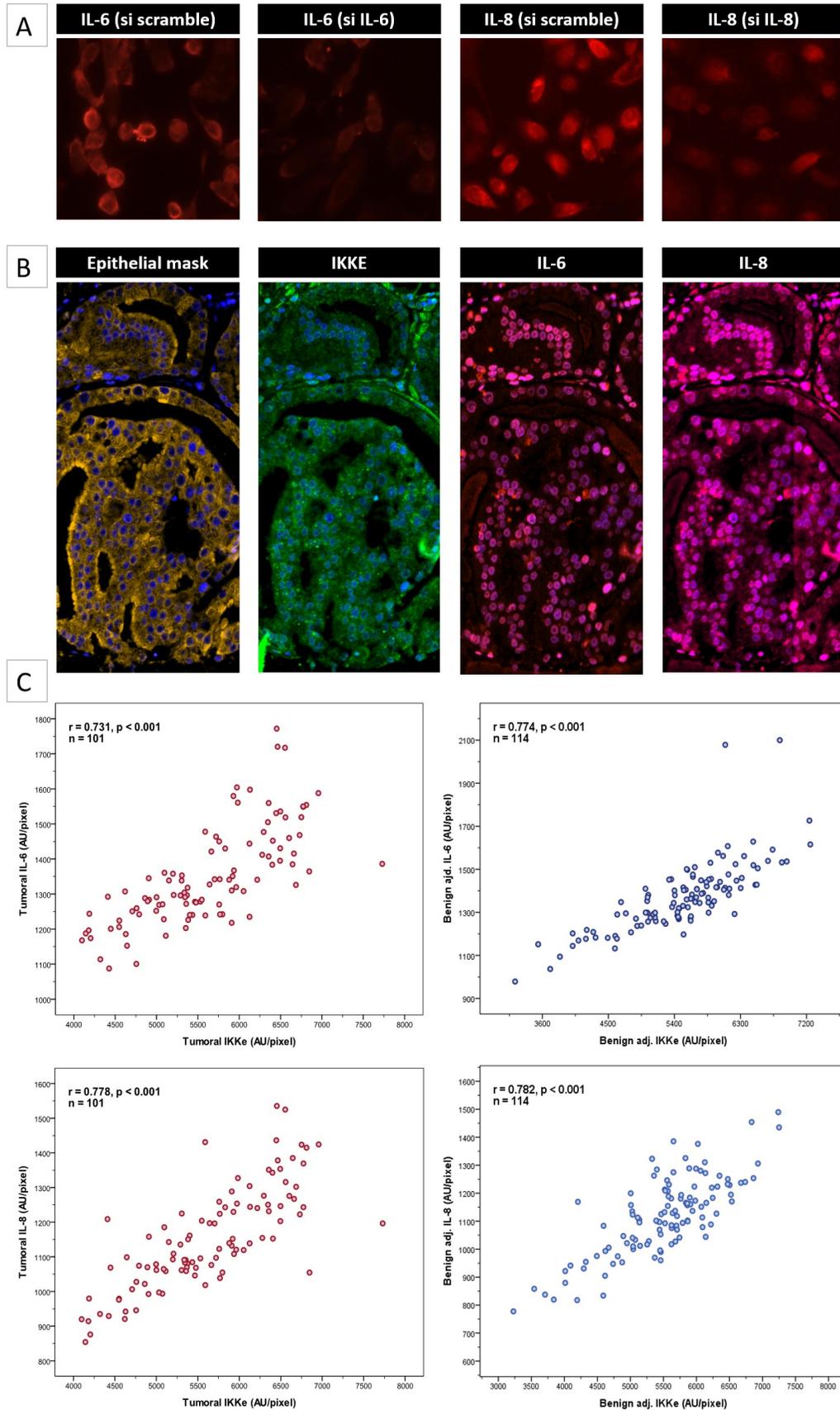
BCR Biochemical recurrence. CRPC Castrate-resistant prostate cancer. BM Bone metastasis. PC Prostate cancer. - no event in the subgroup.

**Table 5. Correlation between tissue and serum levels of IL-6 and IL-8**

		Serum IL-6	Serum IL-8
<b>Tumoral (n=166)</b>	<b>IL-6</b>	r=-0.127	-
		p=0.102	-
	<b>IL-8</b>	-	r=-0.104
		-	p=0.182
	<b>IKKε</b>	r=-0.112	r=-0.066
		p=0.264	p=0.514
<b>Benign adj. (n=181)</b>	<b>IL-6</b>	r=-0.023	-
		p=0.759	-
	<b>IL-8</b>	-	r=-0.031
		-	p=0.683
	<b>IKKε</b>	r=-0.055	r=-0.003
		p=0.559	p=0.971

Benign adj. Benign tissue adjacent to tumor cells

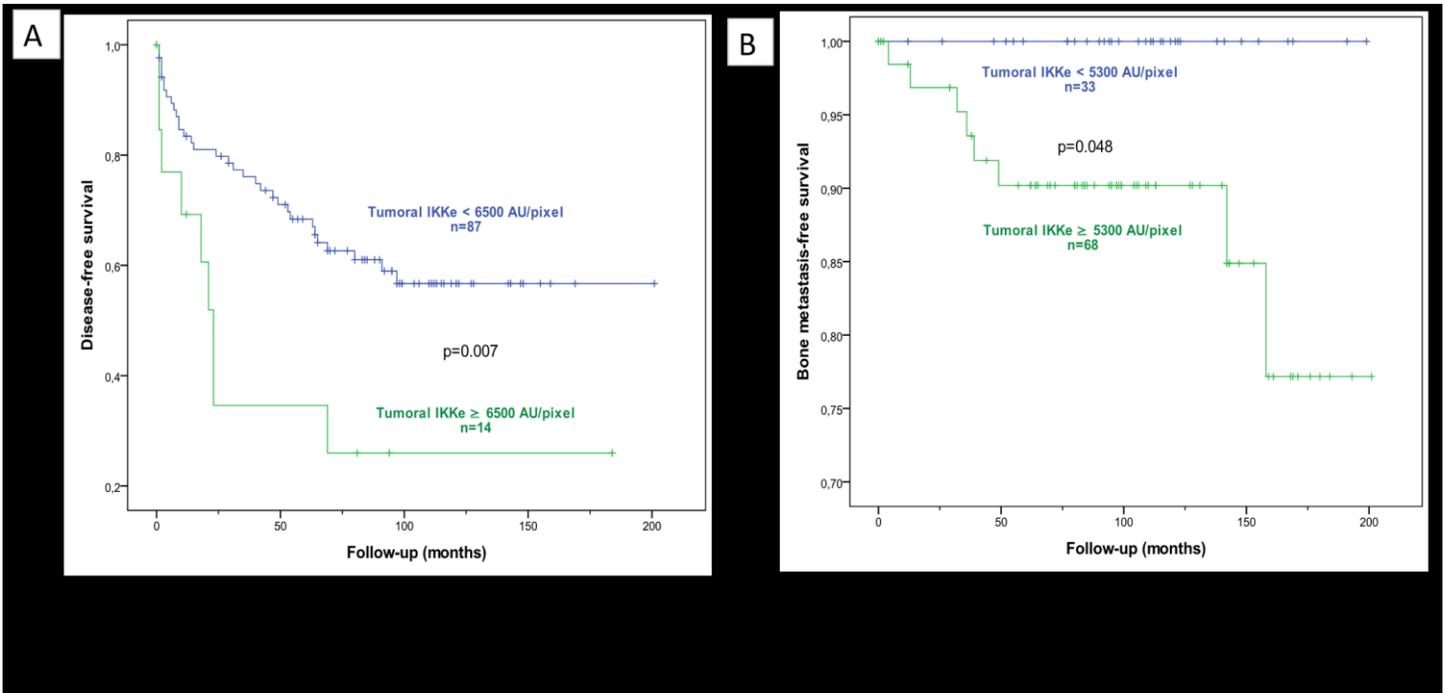
# FIGURES



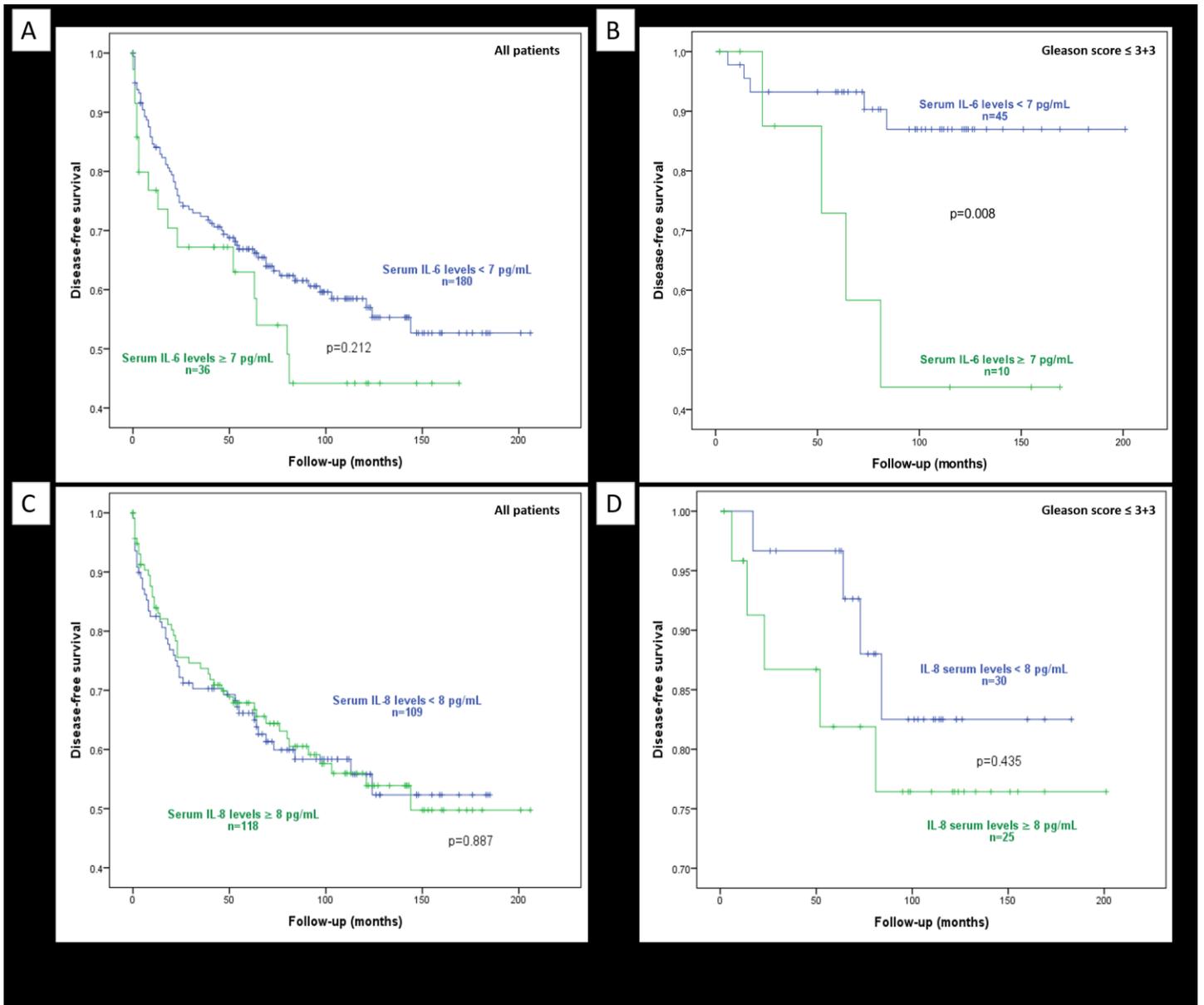
**Figure 1. IL-6, IL-8 and IKKe immunofluorescence and correlation in human prostate cancer tissue** **A.** Validation of IL-6 and IL-8 antibodies specificity for immunofluorescent staining. IL-6 and IL-8 expression were targeted *in vitro* in PC-3 cells with siRNA. Cells were probed with anti-IL-6 and IL-8 antibodies 72 hours after transfection with 50 nM of either siRNA scramble (control), siRNA IL6 or siRNA IL-8. **B.** Representative images of a prostate cancer sample co-stained with the epithelial mask (cytokeratin-18, cytokeratin-19, PSA), IKKe, IL-6 and IL-8 antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). **C.** Correlation between IKKe expression and IL-6 or IL-8 expression in tissue. In tumor (red) and benign adj. (blue) cores, IKKe correlated significantly with both IL-6 (top) and IL-8 (bottom).  $r$  = Pearson correlation coefficient;  $n$  = number of patients with available tissue sample used in analysis; AU/pixel represents Arbitrary units per pixel.

**Figure 1. IL-6, IL-8 and IKK $\epsilon$  immunofluorescence and correlation in human prostate cancer tissue**

**A.** Validation of IL-6 and IL-8 antibodies specificity for immunofluorescent staining. IL-6 and IL-8 expression were targeted *in vitro* in PC-3 cells with siRNA. Cells were probed with anti-IL-6 and IL-8 antibodies 72 hours after transfection with 50 nM of either siRNA scramble (control), siRNA IL6 or siRNA IL-8. **B.** Representative images of a prostate cancer sample co-stained with the epithelial mask (cytokeratin-18, cytokeratin-19, PSA), IKK $\epsilon$ , IL-6 and IL-8 antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). **C.** Correlation between IKK $\epsilon$  expression and IL-6 or IL-8 expression in tissue. In tumor (red) and benign adj. (blue) cores, IKK $\epsilon$  correlated significantly with both IL-6 (top) and IL-8 (bottom).  $r$  = Pearson correlation coefficient;  $n$  = number of patients with available tissue sample used in analysis; AU/pixel represents Arbitrary units per pixel.



**Figure 2. Influence of IKKε expression in tumor samples on patient survival.** **A.** Disease-free survival (DFS) of patients with IKKε tumoral expression levels < 6500 AU/pixel (blue) and ≥ 6500 AU/pixel (green). **B.** Bone metastasis-free survival of patients with IKKε tumoral expression levels < 5300 AU/pixel (blue) and ≥ 5300 AU/pixel (green). None of the patients with IKKε levels < 5300 AU/pixel had metastasis during follow-up. See Material and Methods, section *Immunofluorescence multi-staining of TMAs* for specifications regarding the group size of IKKε analysis (total  $n = 101$ ). AU/pixel represents Arbitrary units per pixel.



**Figure 3. Influence of cytokine serum levels on biochemical recurrence. A.** Disease-free survival of all patients with IL-6 serum levels < 7 pg/mL and ≥ 7 pg/mL. **B.** Disease-free survival (DFS) of patients with a Gleason score ≤ 3+3 and with IL-6 serum levels < 7 pg/mL and ≥ 7 pg/mL. **C.** Disease-free survival of all patients with IL-8 serum levels < 8 pg/mL and ≥ 8 pg/mL. **D.** Disease-free survival of patients with a Gleason score ≤ 3+3 and with IL-8 serum levels < 8 pg/mL and ≥ 8 pg/mL. AU/pixel represents Arbitrary units per pixel.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

### 1 RÔLE D'IKK $\epsilon$ DANS LE CANCER DE LA PROSTATE

Le rôle d'IKK $\epsilon$  dans la carcinogénèse est bien établi dans la littérature pour plusieurs tumeurs malignes [44]. Cependant, son rôle dans le cancer de la prostate est moins documenté. Les résultats obtenus dans la présente étude combinés à ceux obtenus précédemment par Péant *et al.* nous permettent de mieux définir le rôle, le fonctionnement, et le potentiel d'IKK $\epsilon$  dans le cancer de la prostate [46, 47, 50].

Nous avons démontré que les niveaux d'IKK $\epsilon$  dans des tissus tumoraux prostatiques corrèlent avec les niveaux correspondants d'IL-6 et d'IL-8. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus par Péant *et al.* qui mettaient en évidence que la production et la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 est dépendante de l'expression d'IKK $\epsilon$  *in vitro* [50]. Nous avons également mis en évidence le potentiel d'IKK $\epsilon$  comme biomarqueur tissulaire. Les niveaux d'IKK $\epsilon$  corrèlent avec le grade et le stade tumoraux et sont prédictifs de la récurrence biochimique et de l'apparition de métastases osseuses. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse qu'IKK $\epsilon$  via la stimulation de l'expression/sécrétion des cytokines, telles qu'IL-6 et IL-8, crée un microenvironnement qui promeut la tumorigénèse prostatique. Concernant la progression de la maladie, dans notre étude, nous n'avons pas observé de corrélation entre les niveaux d'IKK $\epsilon$  et le développement de l'état RC. Ces données sont en contradiction avec des études *in vitro* qui ont démontré qu'IKK $\epsilon$  est surexprimé de façon constitutive dans des lignées cellulaires RC (PC3 et DU145) et que son expression est régulée par le niveau d'activité des récepteurs aux androgènes dans des cellules HS (22Rv1, LNCaP) [46]. De plus, Péant *et al.* ont démontré, dans des tissus humains, que les niveaux d'IKK $\epsilon$  dans des

échantillons de tumeurs RC étaient plus élevés que dans les tumeurs HS. Dans cette étude la quantité d'IKK $\epsilon$  dans les tumeurs corrélait avec l'apparition de l'état RC. Cependant, 100% (62/62) des patients RC avaient aussi des métastases osseuses; il est donc difficile de distinguer l'association spécifique de chacun des paramètres avec les niveaux d'IKK $\epsilon$  [47]. Dans notre cohorte 82% (14/17) des patients RC étaient atteints de métastases osseuses et 74% (14/19) des patients avec métastases ont développé un état RC. Ceci dit, investiguer exclusivement les patients RC sans métastase était impossible dans notre cohorte vu le faible nombre de cas (n=3). En résumé, l'ensemble de nos résultats concernant IKK $\epsilon$  révèle l'intérêt d'étudier cette protéine dans le contexte du cancer de la prostate, et d'élucider son potentiel comme biomarqueur pronostique et son rôle dans la pathogénèse de la maladie.

## 2 IL-6 ET IL-8 DANS LES TISSUS HUMAINS DE CANCER DE LA PROSTATE

Concernant les cytokines inflammatoires IL-6 et IL-8, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre leurs niveaux d'expression tissulaire et les paramètres oncologiques. Ceci pourrait s'expliquer en partie par le fait que les niveaux de cytokines intracellulaires mesurés par immunofluorescence pourraient ne pas refléter suffisamment les niveaux de production des cytokines par les cellules tumorales de la prostate. En effet, la majorité de ces molécules est sécrétée dans l'environnement péri-tumoral et ne pourrait donc pas être détectée par cette approche expérimentale limitée à l'analyse des cellules épithéliales.

Bien que la littérature sur l'étude d'IL-6 et d'IL-8 dans des tissus humains est restreinte, nous nous attendions cependant à observer un lien entre les niveaux mesurés dans les tumeurs et le pronostic des patients, étant donné le rôle bien défini d'IL-6 et d'IL-8 dans la pathogénèse du CP selon

plusieurs études *in vitro* [51, 69, 70]. Parmi les études réalisées, Ishiguro *et al.* ont démontré un lien entre les niveaux tumoraux d'IL-6, un score de Gleason élevé et la récurrence biochimique [92]. Uehara *et al.* ont décrit l'association entre les niveaux d'IL-8, le grade et le stade de la tumeur [73]. Il est cependant important de noter que ces deux études ont été réalisées sur des cohortes de petite taille (n=43 and n=31 respectivement) et les méthodes de marquage et de quantification étaient différentes de la nôtre. Ishiguro *et al.* ont eu recours à l'IHC quantifié par la méthode observateur-dépendante traditionnelle. Uehara *et al.* ont analysé l'ARNm d'IL-8 par hybridation *in situ* et fluorescence et n'ont analysé que certaines cellules sélectionnées dans le front d'invasion de la tumeur. Ces différences dans la méthodologie, la taille et la composition des cohortes pourraient expliquer la discordance avec nos résultats.

### 3 L'IMMUNOFLUORESCENCE POUR L'ETUDE D'IKKE, IL-6 ET IL-8 TISSULAIRES

#### **3.1 Avantages de l'immunofluorescence pour l'étude de marqueurs tissulaires**

Dans le cadre de notre étude, l'immunofluorescence offrait des avantages considérables par rapport à l'immunohistochimie conventionnelle. En premier lieu, alors que l'immunohistochimie colore les sites de marquage par une réaction de peroxydation ne permettant pas de multi-marquages, l'immunofluorescence permet d'utiliser une diversité d'anticorps couplés à des fluorochromes différents afin de réaliser des comarquages simultanés de différents antigènes cibles. Ainsi, les niveaux d'expression d'IKK $\epsilon$ , IL-6 et IL-8 ont pu être corrélés au sein du même tissu mais surtout sur une même coupe de ce tissu. Par ailleurs, l'immunofluorescence nous a permis de marquer un ensemble de protéines spécifiques à l'épithélium (APS, cytokératine-18, cytokératine-19). Ceci nous a assuré une couverture optimale et uniforme de la surface épithéliale afin de la distinguer des régions stromales lors de l'analyse. En deuxième lieu, la quantification des signaux en

immunohistochimie conventionnelle se fait fréquemment par approximation visuelle par plusieurs observateurs. Cette méthode, dite en double aveugle, est subjective et longue. Les signaux des comarquages émis par immunofluorescence peuvent être indépendamment numérisés et quantifiés de façon semi-automatisée en unités aléatoires par pixel (AU/pixel) à l'aide du logiciel informatique Visiomorph. Ceci permet une quantification plus standardisée et plus reproductible des signaux obtenus. Ainsi, l'utilisation de comarquages par immunofluorescence nous a permis d'explorer de nouvelles pistes qu'il était impossible de suivre par immunohistochimie conventionnelle lors des études antérieures sur tissus humains de CP.

## **3.2 Considérations techniques des comarquages en immunofluorescence**

### *3.2.1 La validation des anticorps*

Afin d'assurer une détection optimale des protéines d'intérêt, nous avons validé la spécificité des anticorps primaires utilisés. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules de la lignée cellulaire PC3, qui expriment des quantités élevées d'IL-6 et d'IL-8 [50], avec des siARN anti-IL-6 et anti-IL-8 ou un siARN contrôle ne ciblant pas de séquence humaine (si scramble). Par la méthode d'immunocytochimie, nous avons observé une expression plus faible d'IL-6 et d'IL-8 dans les lignées transfectées avec les siARN ciblant l'ARNm de ces molécules (c.f Figure 1 du manuscrit). Par la suite, nous avons testé l'efficacité de nos anticorps sur des cores inclus dans de la paraffine en utilisant des coupes de ganglions humains riches en cytokines, ainsi que des zones inflammatoires de prostates préalablement identifiées sur des coupes de tissu colorées à l'hématoxyline/éosine. Tel qu'attendu, un fort signal d'IL-6 et d'IL-8 intracellulaire a été observé dans les tissus et les zones inflammatoires (Figure S1 de l'Annexe). Nous avons obtenu suffisamment d'éléments permettant de prouver que les anticorps choisis pour cette étude sont

spécifiques à leurs cibles respectives IL-6 et IL-8 et qu'ils sont détectables, par immunofluorescence, sur coupe de paraffine.

### 3.2.2 Le choix des anticorps secondaires

Plusieurs de nos anticorps primaires utilisés pour les comarquages sont produits en souris (IL-6, IL-8, cytokératin-18 et cytokératine-19). Pour réaliser nos comarquages, un anticorps anti-souris non-fluorescent a été ajouté après chaque incubation avec un anticorps secondaire fluorescent afin de saturer les sites de liaison libres des anticorps primaires d'origine murine et limiter ainsi le marquage non-spécifique lors des hybridations subséquentes avec d'autres anticorps de souris.

Chaque fluorochrome est indépendamment stimulé par une longueur d'onde spécifique du spectre lumineux. Par conséquent, le choix des anticorps secondaires en fonction de leur seuil de stimulation dans le contexte d'un comarquage est important afin d'éviter que plusieurs marquages n'émettent des signaux dans le même spectre d'intensité et se contaminent les uns les autres lors de la numérisation des images. Dans le cadre de notre étude, un total de cinq marquages a été utilisé afin de distinguer le signal émis par IKK $\epsilon$ , IL-6, IL-8, les noyaux (DAPI) et le masque épithélial. Nos anticorps secondaires ont donc été choisis de façon à ce que les spectres d'excitation et d'émission des différents fluorochromes ne se chevauchent pas.

### 3.2.3 La fluorescence non-spécifique des tissus

La technique d'immunofluorescence est aussi limitée par la fluorescence non-spécifique des tissus. Cette dernière peut provenir d'un signal de fond dû à la présence d'anticorps secondaires incorporés à la microarchitecture des tissus et ayant résistés aux étapes de lavages. Un second phénomène

courant ayant longtemps limité l'utilisation de l'immunofluorescence est l'autofluorescence, qui se manifeste par un signal naturel d'intensité variable dont les longueurs d'ondes ont été décrites aux alentours de 400-560 nm [100]. Ce phénomène est imputable à la lipofuscine intracellulaire, au collagène et à l'élastine. Il est amplifié par le paraffinage qui génère des produits fluorescents et fixe la lipofuscine tissulaire. Des tissus frais, congelés, fixés à l'éthanol, sont donc à favoriser, mais non disponibles dans le contexte de notre étude. Pour pallier ce problème, parmi les protocoles mis au point pour limiter l'autofluorescence en présence de paraffine, nous avons opté pour l'utilisation de noir de Soudan qui permet une atténuation de l'autofluorescence principalement pour la longueur d'onde de 488 nm [101]. Cet effet du noir de Soudan est particulièrement intéressant dans le cadre de notre étude, car le masque épithélial que nous avons utilisé émet un signal de l'ordre de 570 nm superposable à la limite supérieure du spectre d'émission de l'autofluorescence qui n'est pas estompée par le noir de Soudan. Cependant, c'est le tissu stromal prostatique, riche en collagène et en élastine, qui émet davantage d'autofluorescence, mais l'intensité du signal du masque épithélial est tel qu'il permet d'être facilement distinguée du signal émis par le stroma.

#### *3.2.4 Considérations techniques liées à la quantification du signal fluorescent*

Le logiciel Visiomorph permet de quantifier, de façon standardisée, l'intensité du signal des fluorochromes d'intérêt au sein de la zone définie par le masque épithélial. Il est donc primordial que l'identification de la zone épithéliale soit juste et n'inclue ni de lumière ganglionnaire ni de stroma. Comme l'intensité du signal du masque épithélial et la dispersion de l'épithélium au sein du tissu sont variables, une vérification minutieuse de la délimitation de la zone épithéliale a été réalisée pour chaque core étudié.

## 4 LES MICRO-ETALAGES DE TISSUS POUR L'ETUDE DE BIOMARQUEURS TISSULAIRES

### 4.1 **L'utilisation de cores tissulaires**

Étant donné la pertinence et l'importance des résultats concernant IKK $\epsilon$ , IL-6 et IL-8, obtenus *in vitro* et récemment publiés par notre laboratoire [50], il était nécessaire de valider ces observations dans un modèle de tissus humains afin de les corrélérer au parcours clinique des patients. Cependant, certaines contraintes sont associées avec l'utilisation de tissus prostatique. Tout d'abord, contrairement à l'uniformité tissulaire présente au sein d'une xénogreffe créée grâce à une lignée cellulaire, chaque core de tissu présent sur les TMAs ne reflète pas nécessairement le phénotype de la tumeur du patient, en particulier du point de vue de son grade et de son caractère inflammatoire. Afin de limiter l'impact de ce biais imposé par l'utilisation de petits échantillons tumoraux, nous n'avons inclus dans l'étude que les patients pour qui deux échantillons d'un même type de tissu (tumoral et/ou bénin adjacent à une tumeur) étaient disponibles et avons fait la moyenne des niveaux d'expression des protéines d'intérêt des deux échantillons.

### 4.2 **Considérations techniques des micro-étalages tissulaires**

Le micro-étalage tissulaire est le moyen le plus efficace pour exposer un ensemble important d'échantillons de tissus de patients aux mêmes conditions expérimentales et permettre une analyse standardisée des signaux fluorescents. Il permet aussi de conserver ces échantillons et d'utiliser de très petits volumes d'échantillon lors de chaque expérience. Cependant, certaines difficultés techniques sont inhérentes à l'utilisation de ces micro-étalages tissulaires.

#### 4.2.1 La perte d'échantillons

La technique de comarquage sur micro-étalage tissulaire est un processus long qui mène invariablement à la perte d'un certain nombre de cores de tissus (cores décollés, pliés, déchirés ou chevauchant partiellement un autre core). De plus, la qualité de chaque marquage a été vérifiée pour chaque échantillon. Dans certains cas, le marquage était faussé par la présence d'artéfacts émettant un signal fort notamment dû à la présence d'agrégats d'anticorps secondaires ayant résistés aux étapes de lavage. Plus rarement, des cores ont dû être exclus, car ils contenaient des zones non-marquées dues à une mauvaise distribution des anticorps primaires par le système de marquage Ventana. Ce type d'artefact se manifeste par l'arrêt du marquage dans une zone aux contours clairement délimités impliquant autant l'épithélium que le stroma. À l'inverse, les régions réellement peu marquées dues à l'absence d'expression de la protéine se présentent plutôt par un marquage faible qui respecte les contours de l'architecture épithéliale. Les cores présentant des anomalies de marquage ont été éliminés de l'analyse. Bien que peu fréquentes, ces pertes d'échantillons ont un impact sur la taille de la cohorte disponible pour l'analyse, étant donné que chaque patient qui n'a pas soit deux cores tumorales soit deux échantillons bénins adjacents à une tumeur est exclu de l'étude. Parmi les 216 patients de l'étude, 166 avaient deux cores de tissus tumorales et 181 avaient des tissus bénins adjacents à une tumeur de qualité suffisante pour satisfaire les critères d'analyse.

#### 4.2.2 La variation du signal entre les lames

Nos échantillons étaient distribués sur trois paires de lames, chaque paire contenant des dupliques de tissu tumoral et bénin adjacent à une tumeur des patients. Un des avantages de distribuer les cores d'échantillons sur différentes lames est de limiter l'effet de photoblanchiment. Ce phénomène

se définit par la perte graduelle et irréversible de la capacité d'un fluorochrome à émettre son signal et est le résultat de sa dégradation lors d'une exposition prolongée à la lumière. En pratique, ce phénomène pouvait nuire à la validité du signal capté lors de la numérisation, par une perte inégale de l'intensité de la fluorescence sur l'ensemble du micro-étalage tissulaire. Des précautions supplémentaires ont été prises en subdivisant chaque lame en plusieurs sections numérisées séparément. Cependant, une certaine variabilité de l'intensité du signal fluorescent persiste d'une lame à l'autre malgré leur exposition aux mêmes conditions expérimentales. Afin de limiter l'impact de ce biais expérimental, une moyenne a été calculée entre les doublons tumoraux et bénins adjacents à une tumeur des paires de lames. Peu de différences significatives ont été notées entre les lames pour l'intensité du signal d'IL-6 et d'IL-8. En revanche, nous avons observé une différence considérable dans les niveaux d'expression d'IKK $\epsilon$  pour la troisième paire de lames. Nous avons décidé de ne pas normaliser ces 2 lames à l'aide de leur médiane et plutôt de les exclure des analyses concernant IKK $\epsilon$ , car la différence dans l'intensité du signal était trop importante. C'est la raison pour laquelle les niveaux d'expression d'IKK $\epsilon$  dans le tissu tumoral ont été mesurés pour 100 patients au lieu de 166.

## 5 TRAVAUX FUTURS

En 2009 Péant *et al.* ont montré l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 après surexpression d'IKK $\epsilon$  dans des lignées cellulaires HS et la diminution de la quantité d'IL-6 après inhibition de l'expression d'IKK $\epsilon$  dans des lignées cellulaires RC [50]. Des travaux récents de notre laboratoire ont mis en évidence l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 en fonction du niveau d'expression d'IKK $\epsilon$  dans un modèle murin de xénotransplante (Péant *et al.* soumis). Enfin, dans la présente étude, nous avons montré la corrélation dans des tissus tumoraux humains entre les

niveaux d'IKK $\epsilon$  et les cytokines IL-6 et IL-8. L'ensemble de ces travaux montre clairement l'existence d'une régulation entre IKK $\epsilon$  et l'expression/sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8. La suite de ce projet visera à déterminer la ou les voies de signalisation gouvernant cette régulation.

IKK $\epsilon$  fait partie de la voie de signalisation NF-kB. Il a été montré que le facteur de transcription NF-kB est capable d'induire la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8 [102]. Alors que la modulation de l'expression d'IKK $\epsilon$  dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate n'a pas d'effet sur l'activation de NF-kB [50], nous ne savons pas actuellement si l'augmentation des niveaux d'IL-6 et d'IL-8 est due en partie à l'activation de la voie NF-kB. En faveur de cet argument, il a été rapporté que l'inhibition de l'expression d'IKK $\epsilon$  ne supprime pas complètement la présence d'IL-6 dans des fibroblastes murins [103]. Par ailleurs, tout comme IKK $\epsilon$ , NF-kB est constitutivement activée dans des cellules de cancer de la prostate RC, ayant perdu l'activité du récepteur aux androgènes [33]. Ainsi, l'augmentation des niveaux d'IL-6 et d'IL-8 pourrait être à la fois NF-kB indépendante/IKK $\epsilon$  dépendante aux stades plus précoces de la maladie et NF-kB dépendante et IKK $\epsilon$  dépendante au stade RC.

D'autres facteurs de transcription ont été décrits dans l'activation de l'expression de IL-6, comme par exemple AP-1 [104], CREB [105] et C/EBP- $\beta$  [106]. Il est intéressant de noter que ces mêmes facteurs de transcription sont capables de réguler également l'expression d'IL-8 [107]. Des travaux récents de notre équipe ont démontré que IKK $\epsilon$  était capable d'activer C/EBP- $\beta$  (Péant *et al.*, soumis).

Par ailleurs, actuellement il n'est pas compris par quel mécanisme IKK $\epsilon$  peut être impliqué dans le développement de l'état RC. *In vitro*, il a été montré que IKK $\epsilon$  est constitutivement exprimé et

nucléaire dans les cellules RC et cytoplasmique et inductible dans les cellules HS [50]. Il serait intéressant d'étudier les partenaires protéiques d'IKKε spécifiquement dans le noyau de la cellule RC et d'évaluer leur lien, direct ou non (i.e. production des cytokines), avec la progression de la maladie et l'acquisition de l'état RC.

Dans la présente étude, nous avons concentré notre analyse uniquement sur le compartiment épithélial du tissu tumoral. Il serait important d'effectuer les mêmes expériences sur l'expression stromale d'IKKε, d'IL-6 et d'IL-8, dans les fibroblastes et les cellules inflammatoires infiltrantes de la prostate. La corrélation éventuelle entre l'expression stromale de ces protéines et certains paramètres oncologiques serait en faveur de l'hypothèse qu'un microenvironnement inflammatoire autant épithélial que stromal favorise la pathogénèse du CP. Des anticorps monoclonaux anti-IL-6 ont déjà fait l'objet d'études cliniques. Bien que peu concluantes, celles-ci reflètent néanmoins l'importance des voies de signalisation pro-inflammatoires et leur intérêt clinique dans la recherche de nouvelles modalités de traitement [64].

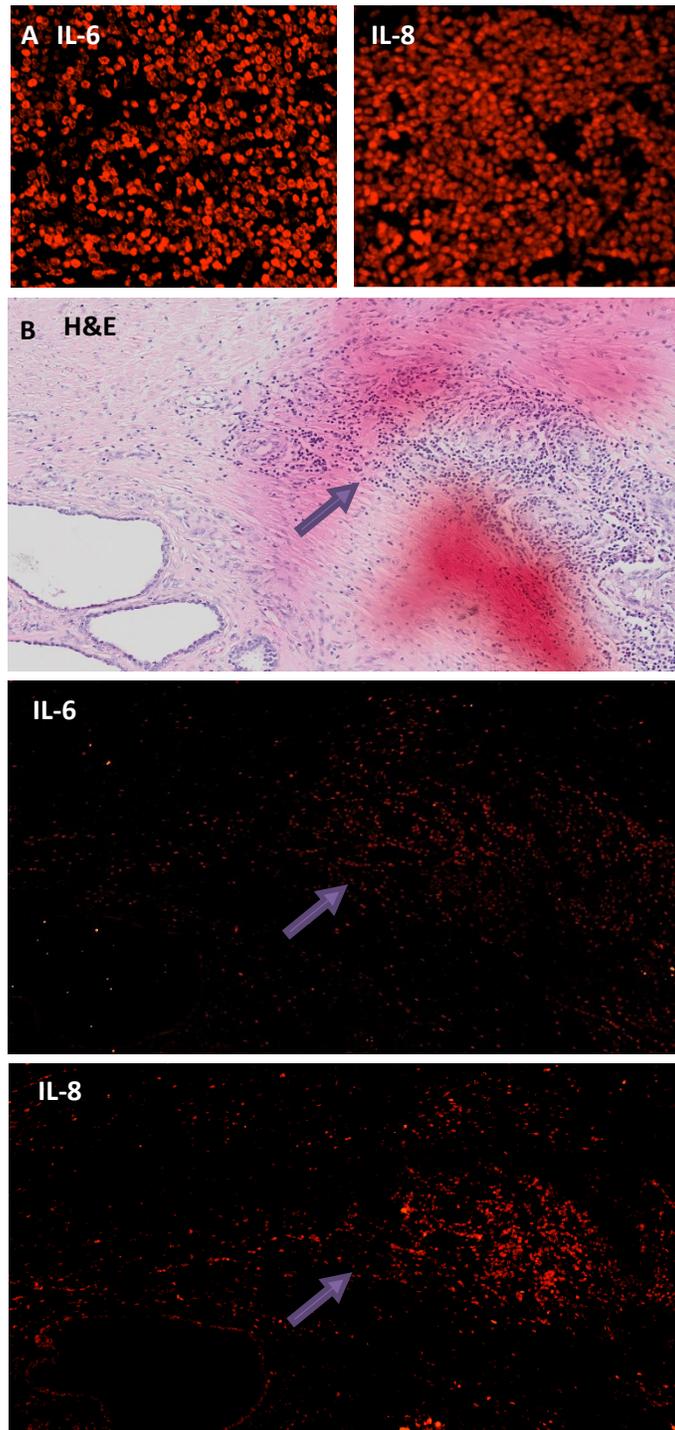
## **CONCLUSION**

L'implication d'IKKε dans la tumorigénèse du cancer de la prostate a été récemment explorée par un petit nombre d'études émergentes. Ces travaux suggèrent que IKKε joue un rôle pivot dans la cascade inflammatoire de NF-κB, stimule la production et la sécrétion de cytokines pro-tumorales et participe à l'évolution de la maladie vers des stades plus avancés, agressifs et réfractaires aux traitements.

Ce projet de maîtrise aura permis de transposer des observations et des hypothèses provenant de modèles *in vitro* à un modèle humain. Nous avons tout d'abord démontré la coexpression d'IKK $\epsilon$ , IL-6 et IL-8 au sein de l'épithélium tumoral. Nous avons aussi démontré qu'IKK $\epsilon$  détenait un potentiel en tant que biomarqueur tissulaire au niveau du stade et du grade tumoral, ainsi qu'un potentiel pronostique par rapport à la récurrence biochimique et l'apparition de métastases osseuses. Enfin, nous n'avons pas établi de lien entre les niveaux tissulaires et sériques d'IL-6 et d'IL-8, suggérant que les niveaux sériques mesurés seraient le reflet d'un état inflammatoire systémique plutôt qu'une expression élevée de ces cytokines au sein de la tumeur.

À terme, mieux définir le rôle d'IKK $\epsilon$  dans le cancer de la prostate favoriserait l'investigation de son potentiel comme biomarqueur tissulaire et comme outil pronostique en pathologie. Par ailleurs, une meilleure caractérisation des voies de signalisation dépendantes d'IKK $\epsilon$  permettrait d'envisager IKK $\epsilon$  comme cible thérapeutique potentielle après validation dans de larges cohortes indépendantes.

**FIGURE SUPPLÉMENTAIRE**



**Figure supplémentaire 1: Validation des anticorps primaires anti-IL-6 et anti-IL-8 par immunofluorescence à l'aide de tissus humains inclus en paraffine. A) Niveaux d'expression d'IL-6 (gauche) et d'IL-8 (droite) au sein de tissu glandulaire inflammatoire. B) Mise en évidence d'une région inflammatoire (flèche jaune) dans un tissu prostatique par marquage hématoxine-éosine (H&E) (haut) et niveaux d'expression correspondant d'IL-6 (milieu) et d'IL-8 (bas) sur des coupes subséquentes de ce tissu.**

## RÉFÉRENCES

1. Saad F, McCormack M. Le cancer de la prostate, 3e édition. Éditeur AP, editor. Montreal2012.
2. Description de la prostate et systématisation: Université de Bordeaux. Available from: [http://www.lamenligne.u-bordeaux2.fr/outils\\_pedago/examen\\_macroscopique/prostate/01/p\\_1a.htm](http://www.lamenligne.u-bordeaux2.fr/outils_pedago/examen_macroscopique/prostate/01/p_1a.htm).
3. Park YH, Jeong CW, Lee SE. A comprehensive review of neuroanatomy of the prostate. *Prostate international*. 2013;1(4):139-45.
4. Saunders e. *Campbell's Urology*, 1998a.
5. Saunders e. *Campbell's Urology*, 1998c. 7th ed.
6. Kassen A, Sutkowski DM, Ahn H, Sensibar JA, Kozlowski JM, Lee C. Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. *The Prostate*. 1996;28(2):89-97.
7. Saunders e. *Campbell's Urology*, 1998b  
7th ed.
8. Hori S, Blanchet J-S, McLoughlin J. From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer. *BJU international*. 2013;112(6):717-28.
9. Koochekpour S. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2010;12(5):639-57.
10. Canadian Cancer statistics 2014. Government of Canada. Toronto2014.
11. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2013;49(6):1374-403.
12. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
13. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(5):1341-7.
14. Chronological History of ACS Recommendations for the Early Detection of Cancer in People Without Cancer Symptoms American Cancer Society2014 [updated 02/28/2014]. Available from: <http://www.cancer.org/healthy/findcancerearly/cancerscreeningguidelines/chronological-history-of-ac-s-recommendations>.
15. Priest R, Garzotto M, Kaufman J. Benign prostatic hyperplasia: a brief overview of pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Techniques in vascular and interventional radiology*. 2012;15(4):261-4.
16. Brawer MK. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview. *REVIEWS IN UROLOGY*. 2005;7(SUPPL. 3).
17. Jennifer R. Stark SP, Meir J. Stampfer, Jennifer A. Sinnott, Stephen Finn, Anna S. Eisenstein, Jing Ma,, Michelangelo Fiorentino TK, Massimo Loda, Edward L. Giovannucci, Mark A. Rubin,, Mucci aLA. Gleason Score and Lethal Prostate Cancer: Does 3 + 4 = 4 + 3? *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. 2009;27(21).
18. Brimo F, Montironi R, Egevad L, Erbersdobler A, Lin DW, Nelson JB, et al. Contemporary grading for prostate cancer: implications for patient care. *European urology*. 2013;63(5):892-901.
19. Humphrey PA. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*. 2012;60(1):59-74.

20. Cookson MS, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, D'Amico AV, Dmochowski RR, et al. Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer: the American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel report and recommendations for a standard in the reporting of surgical outcomes. *The Journal of urology*. 2007;177(2):540-5.
21. Taplin ME. Secondary hormone therapy for castration-resistant prostate cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2013;27(5):371-2.
22. Shen MM, Abate-Shen C. Pten inactivation and the emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer research*. 2007;67(14):6535-8.
23. Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, Henry DH, Brown JE, Yardley DA, et al. Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2012;48(16):3082-92.
24. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
25. Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *Journal of clinical immunology*. 2013;33 Suppl 1:S79-84.
26. Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin-6. *BJU international*. 2013.
27. Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF-kappaB control of T cell development. *Nature immunology*. 2014;15(1):15-25.
28. Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut*. 1998;43(6):856-60.
29. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*. 1999;18(49):6938-47.
30. Seo SI, Song SY, Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, et al. Immunohistochemical analysis of NF-kappaB signaling proteins IKKepsilon, p50/p105, p52/p100 and RelA in prostate cancers. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2009;117(8):623-8.
31. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 2006;25(51):6831-43.
32. Zubair A, Frieri M. Role of nuclear factor-kB in breast and colorectal cancer. *Current allergy and asthma reports*. 2013;13(1):44-9.
33. Le Page C, Koumakpayi IH, Lessard L, Mes-Masson AM, Saad F. EGFR and Her-2 regulate the constitutive activation of NF-kappaB in PC-3 prostate cancer cells. *The Prostate*. 2005;65(2):130-40.
34. Shukla S, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Marengo SR, Resnick MI, et al. Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia (New York, NY)*. 2004;6(4):390-400.
35. Chen CD, Sawyers CL. NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(8):2862-70.
36. Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 1):141-51.

37. Lessard L, Mes-Masson AM, Lamarre L, Wall L, Lattouf JB, Saad F. NF-kappa B nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. *BJU international*. 2003;91(4):417-20.
38. Lessard L, Karakiewicz PI, Bellon-Gagnon P, Alam-Fahmy M, Ismail HA, Mes-Masson AM, et al. 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*. 2006;12(19):5741-5.
39. Fradet V, Lessard L, Begin LR, Karakiewicz P, Masson AM, Saad F. 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*. 2004;10(24):8460-4.
40. Suh J, Rabson AB. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *Journal of cellular biochemistry*. 2004;91(1):100-17.
41. Bergmann A. IKK epsilon signaling: not just NF-kappaB. *Current biology : CB*. 2006;16(15):R588-90.
42. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology*. 2003;4(5):491-6.
43. Adli M, Baldwin AS. IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(37):26976-84.
44. Verhelst K, Verstrepen L, Carpentier I, Beyaert R. IkappaB kinase epsilon (IKKepsilon): a therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(7):873-80.
45. Boehm JS, Zhao JJ, Yao J, Kim SY, Firestein R, Dunn IF, et al. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell*. 2007;129(6):1065-79.
46. Peant B, Diallo JS, Lessard L, Delvoeye N, Le Page C, Saad F, et al. Regulation of IkappaB kinase epsilon expression by the androgen receptor and the nuclear factor-kappaB transcription factor in prostate cancer. *Molecular cancer research : MCR*. 2007;5(1):87-94.
47. Peant B, Forest V, Trudeau V, Latour M, Mes-Masson AM, Saad F. IkappaB-Kinase-epsilon (IKKepsilon/IKKi/IkappaBKepsilon) expression and localization in prostate cancer tissues. *The Prostate*. 2011;71(10):1131-8.
48. Keller ET, Chang C, Ershler WB. Inhibition of NFkappaB activity through maintenance of IkappaBalpha levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(42):26267-75.
49. Altuwaijri S, Lin HK, Chuang KH, Lin WJ, Yeh S, Hanchett LA, et al. Interruption of nuclear factor kappaB signaling by the androgen receptor facilitates 12-O-tetradecanoylphorbolacetate-induced apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer LNCaP cells. *Cancer research*. 2003;63(21):7106-12.
50. Peant B, Diallo JS, Dufour F, Le Page C, Delvoeye N, Saad F, et al. Over-expression of IkappaB-kinase-epsilon (IKKepsilon/IKKi) induces secretion of inflammatory cytokines in prostate cancer cell lines. *The Prostate*. 2009;69(7):706-18.
51. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *Journal of cellular biochemistry*. 2005;95(3):497-505.
52. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1175-83.
53. Giri D, Ozen M, Ittmann M. Interleukin-6 Is an Autocrine Growth Factor in Human Prostate Cancer. *The American journal of pathology*. 2001;159(6):2159-65.

54. Hobisch A, Rogatsch H, Hittmair A, Fuchs D, Bartsch G, Jr., Klocker H, et al. Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *The Journal of pathology*. 2000;191(3):239-44.
55. Hobisch A, Eder IE, Putz T, Horninger W, Bartsch G, Klocker H, et al. Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer research*. 1998;58(20):4640-5.
56. Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta IT, Bektic J, Steiner H, Dietrich H, et al. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor. *Endocrine-related cancer*. 2009;16(1):155-69.
57. Shariat SF, Chromecki TF, Hoefler J, Barbieri CE, Scherr DS, Karakiewicz PI, et al. Soluble gp130 regulates prostate cancer invasion and progression in an interleukin-6 dependent and independent manner. *The Journal of urology*. 2011;186(5):2107-14.
58. Lu Y, Zhang J, Dai J, Dehne LA, Mizokami A, Yao Z, et al. Osteoblasts induce prostate cancer proliferation and PSA expression through interleukin-6-mediated activation of the androgen receptor. *Clinical & experimental metastasis*. 2004;21(5):399-408.
59. Paule B, Terry S, Kheuang L, Soyeux P, Vacherot F, de la Taille A. The NF-kappaB/IL-6 pathway in metastatic androgen-independent prostate cancer: new therapeutic approaches? *World journal of urology*. 2007;25(5):477-89.
60. Lee SO, Lou W, Hou M, de Miguel F, Gerber L, Gao AC. Interleukin-6 promotes androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(1):370-6.
61. Wallner L, Dai J, Escara-Wilke J, Zhang J, Yao Z, Lu Y, et al. Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchietomized mice. *Cancer research*. 2006;66(6):3087-95.
62. Karkera J, Steiner H, Li W, Skradski V, Moser PL, Riethdorf S, et al. The anti-interleukin-6 antibody siltuximab down-regulates genes implicated in tumorigenesis in prostate cancer patients from a phase I study. *The Prostate*. 2011;71(13):1455-65.
63. Dorff TB, Goldman B, Pinski JK, Mack PC, Lara PN, Jr., Van Veldhuizen PJ, Jr., et al. Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNTO328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(11):3028-34.
64. Fizazi K, De Bono JS, Flechon A, Heidenreich A, Voog E, Davis NB, et al. Randomised phase II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-IL-6 monoclonal antibody, in combination with mitoxantrone/prednisone versus mitoxantrone/prednisone alone in metastatic castration-resistant prostate cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2012;48(1):85-93.
65. Drachenberg DE, Elgamal AA, Rowbotham R, Peterson M, Murphy GP. Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*. 1999;41(2):127-33.
66. Shariat SF, Andrews B, Kattan MW, Kim J, Wheeler TM, Slawin KM. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. *Urology*. 2001;58(6):1008-15.
67. Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H, et al. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(7):2702-6.

68. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001;12(4):375-91.
69. Araki S, Omori Y, Lyn D, Singh RK, Meinbach DM, Sandman Y, et al. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. *Cancer research*. 2007;67(14):6854-62.
70. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science (New York, NY)*. 1987;235(4787):442-7.
71. Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(5):2104-19.
72. Aalinkeel R, Nair MP, Sufrin G, Mahajan SD, Chadha KC, Chawda RP, et al. Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer research*. 2004;64(15):5311-21.
73. Uehara H, Troncoso P, Johnston D, Bucana CD, Dinney C, Dong Z, et al. Expression of interleukin-8 gene in radical prostatectomy specimens is associated with advanced pathologic stage. *The Prostate*. 2005;64(1):40-9.
74. Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, et al. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(11):4117-27.
75. Kanda N, Watanabe S. 17beta-estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;117(2):274-83.
76. Seaton A, Scullin P, Maxwell PJ, Wilson C, Pettigrew J, Gallagher R, et al. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. *Carcinogenesis*. 2008;29(6):1148-56.
77. Bishr M, Saad F. Preventing bone complications in prostate cancer. *Current opinion in supportive and palliative care*. 2012;6(3):299-303.
78. Lehrer S, Diamond EJ, Mamkine B, Stone NN, Stock RG. Serum interleukin-8 is elevated in men with prostate cancer and bone metastases. *Technology in cancer research & treatment*. 2004;3(5):411.
79. Pfitzenmaier J, Vessella R, Higano CS, Noteboom JL, Wallace D, Jr., Corey E. Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer*. 2003;97(5):1211-6.
80. Tazaki E, Shimizu N, Tanaka R, Yoshizumi M, Kamma H, Imoto S, et al. Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine*. 2011;2(5):887-91.
81. Sharma J, Gray KP, Harshman LC, Evan C, Nakabayashi M, Fichorova R, et al. Elevated IL-8, TNF-alpha, and MCP-1 in men with metastatic prostate cancer starting androgen-deprivation therapy (ADT) are associated with shorter time to castration-resistance and overall survival. *The Prostate*. 2014;74(8):820-8.
82. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
83. Punnen S, Cooperberg MR, D'Amico AV, Karakiewicz PI, Moul JW, Scher HI, et al. Management of biochemical recurrence after primary treatment of prostate cancer: a systematic review of the literature. *European urology*. 2013;64(6):905-15.

84. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene*. 2013;32(49):5501-11.
85. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine*. 1997;336(15):1066-71.
86. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Molecular cancer research : MCR*. 2006;4(4):221-33.
87. Guo JP, Shu SK, He L, Lee YC, Kruk PA, Grenman S, et al. Deregulation of IKBKE is associated with tumor progression, poor prognosis, and cisplatin resistance in ovarian cancer. *The American journal of pathology*. 2009;175(1):324-33.
88. Hsu S, Kim M, Hernandez L, Grajales V, Noonan A, Anver M, et al. IKK-epsilon coordinates invasion and metastasis of ovarian cancer. *Cancer research*. 2012;72(21):5494-504.
89. Hildebrandt MA, Tan W, Tamboli P, Huang M, Ye Y, Lin J, et al. Kinome expression profiling identifies IKBKE as a predictor of overall survival in clear cell renal cell carcinoma patients. *Carcinogenesis*. 2012;33(4):799-803.
90. Guo J, Kim D, Gao J, Kurtyka C, Chen H, Yu C, et al. IKBKE is induced by STAT3 and tobacco carcinogen and determines chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2013;32(2):151-9.
91. Agami R. All roads lead to IKKepsilon. *Cell*. 2007;129(6):1043-5.
92. Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kagawa E, Sasaki T, Sano JY, et al. Coexpression of aPKClambda/iota and IL-6 in prostate cancer tissue correlates with biochemical recurrence. *Cancer Sci*. 2011;102(8):1576-81.
93. Engelhardt PF, Seklehner S, Brustmann H, Lusuardi L, Riedl CR. Immunohistochemical expression of interleukin-2 receptor and interleukin-6 in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: association with asymptomatic inflammatory prostatitis NIH category IV. *Scandinavian journal of urology*. 2015;49(2):120-6.
94. Pei BX, Sun BS, Zhang ZF, Wang AL, Ren P. Interstitial tumor-associated macrophages combined with tumor-derived colony-stimulating factor-1 and interleukin-6, a novel prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2014;148(4):1208-16 e2.
95. Chen MF, Lin PY, Wu CF, Chen WC, Wu CT. IL-6 expression regulates tumorigenicity and correlates with prognosis in bladder cancer. *PloS one*. 2013;8(4):e61901.
96. Xia W, Chen W, Zhang Z, Wu D, Wu P, Chen Z, et al. Prognostic value, clinicopathologic features and diagnostic accuracy of interleukin-8 in colorectal cancer: a meta-analysis. *PloS one*. 2015;10(4):e0123484.
97. Hao W, Zhu Y, Zhou H. Prognostic value of interleukin-6 and interleukin-8 in laryngeal squamous cell cancer. *Med Oncol*. 2013;30(1):333.
98. Ryan BM, Pine SR, Chaturvedi AK, Caporaso N, Harris CC. A combined prognostic serum interleukin-8 and interleukin-6 classifier for stage 1 lung cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *J Thorac Oncol*. 2014;9(10):1494-503.
99. Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU international*. 2014;113(6):986-92.
100. Sun Y, Yu H, Zheng D, Cao Q, Wang Y, Harris D, et al. Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(10):1335-42.
101. Viegas MS, Martins TC, Seco F, do Carmo A. 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. 2007;51(1):59-66.

102. Wang W, Ye L, Ye L, Li B, Gao B, Zeng Y, et al. Up-regulation of IL-6 and TNF-alpha induced by SARS-coronavirus spike protein in murine macrophages via NF-kappaB pathway. *Virus research*. 2007;128(1-2):1-8.

103. Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, et al. The roles of two I kappa B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med*. 2004;199(12):1641-50.

104. Asschert JG, De Vries EG, De Jong S, Withoff S, Vellenga E. Differential regulation of IL-6 promoter activity in a human ovarian-tumor cell line transfected with various p53 mutants: involvement of AP-1. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1999;81(2):236-42.

105. Dendorfer U, Oettgen P, Libermann TA. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(7):4443-54.

106. Xiao W, Hodge DR, Wang L, Yang X, Zhang X, Farrar WL. Co-operative functions between nuclear factors NFkappaB and CCAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBP-beta) regulate the IL-6 promoter in autocrine human prostate cancer cells. *The Prostate*. 2004;61(4):354-70.

107. Freund A, Jolivel V, Durand S, Kersual N, Chalbos D, Chavey C, et al. Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells. *Oncogene*. 2004;23(36):6105-14.