

Université de Montréal

**Rôle de NF-kappaB dans la progression du cancer de la prostate :  
études clinicopathologiques et moléculaires**

par

Laurent Lessard

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Ph.D. en biologie moléculaire

Janvier, 2007

© Laurent Lessard, 2007





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
**Rôle de NF-kappaB dans la progression du cancer de la prostate :  
études clinicopathologiques et moléculaires**

présentée par :  
**Laurent Lessard**

à été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr Richard Bertrand**  
président-rapporteur

**Dre Anne-Marie Mes-Masson**  
directrice de recherche

**Dr Fred Saad**  
co-directeur de recherche

**Dre Isabelle Royal**  
membre du jury

**Dr Mario Chevrette**  
examineur externe

**Dr Jean-Claude Labbé**  
représentant du doyen de la FES



## RÉSUMÉ

L'adénocarcinome de la prostate est le cancer le plus fréquent et la troisième cause de mortalité liée au cancer chez les hommes nord-américains. Même si le cancer est généralement diagnostiqué à un stade précoce, il est encore difficile d'identifier les cancers à haut risque de progression. De plus, l'absence d'options thérapeutiques curatives pour les cancer avancés et hormono-réfractaires explique le niveau élevé de mortalité du cancer de la prostate. Le projet de doctorat s'est donc penché sur ces deux problèmes. En particulier, les travaux ont porté **1)** sur la validation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappaB) en tant que marqueur pronostique du cancer de la prostate et **2)** sur l'étude moléculaire de l'interaction entre NF-kappaB et la voie du récepteur aux androgènes afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance à la thérapie de privation d'androgènes (TPA).

NF- $\kappa$ B, lorsque présent dans le noyau cellulaire, contrôle l'expression de plusieurs gènes qui sont connus pour être impliqués dans l'oncogénèse. La première partie du projet de doctorat (chapitres II, III et IV) visait donc à caractériser la localisation intracellulaire de NF- $\kappa$ B dans les tissus cancéreux prostatiques et à déterminer si une localisation nucléaire pouvait aider à prédire l'évolution du cancer. L'approche expérimentale consistait en une analyse immunohistochimique de la sous-unité RelA (p65) de la famille NF- $\kappa$ B. Les résultats ont montré que RelA est détectée dans le noyau de cellules cancéreuses et que cette localisation nucléaire aide à mieux classifier les patients à risque de progression. De plus, en analyses multivariées, l'expression nucléaire de RelA est un marqueur indépendant de la rechute biochimique et de la présence de métastases ganglionnaires.

Au chapitre V, la détection nucléaire des sous-unités p50, RelB et/ou p52 suggère qu'en plus de RelA, d'autres membres de la famille NF- $\kappa$ B pourraient aspirer au statut de marqueurs pronostiques. En outre, la détection nucléaire des sous-unités RelB et p52 trahit un possible rôle de la voie NF- $\kappa$ B non classique dans le cancer de

la prostate qui avait jusqu'alors été attribué uniquement à la voie NF- $\kappa$ B classique et les sous-unités RelA et p50.

Enfin, le chapitre VI s'est intéressé aux mécanismes moléculaires impliqués dans le cancer avancé en s'attardant plus spécifiquement à l'interaction entre la voie NF- $\kappa$ B non classique et le récepteur aux androgènes. Les résultats montrent qu'une stimulation androgénique de cellules cancéreuses prostatiques exprimant le récepteur aux androgènes active la voie NF- $\kappa$ B non classique et provoque une accumulation nucléaire de la sous-unité p52. La présence de p52 au noyau pourrait contribuer à la répression de gènes normalement régulés par la voie NF- $\kappa$ B classique. D'un point de vue thérapeutique, la dé-répression de ces gènes lors d'une TPA combinée à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B classique pourrait favoriser la survie des cellules et expliquer le développement d'une résistance au traitement.

Globalement, ce projet de doctorat a contribué à l'émergence de NF- $\kappa$ B en tant que facteur étroitement impliqué dans la progression du cancer de la prostate. Les résultats de ces travaux, combinés aux études futures, pourraient mener à une meilleure gestion clinique et thérapeutique de la maladie.

### **Mots clés :**

Cancer de la prostate

Nuclear Factor-kappaB

RelA(p65)/p50/RelB/p52

Marqueur pronostique

Immunohistochimie

Récepteur aux androgènes

Thérapie de privation d'androgènes

## SUMMARY

Prostatic adenocarcinoma is the most frequent cancer and the third leading cause of cancer-related death in North-American men. Despite early diagnosis of most cancers, it is still difficult to identify subsets of tumors at high risk of progression. In addition, the absence of curative therapies for advanced and hormono-refractory tumors impedes a significant decrease in the mortality rate. These two important issues were the main focus of this doctoral thesis. More specifically, the project consisted in **1)** validating the NF- $\kappa$ B (Nuclear  $\kappa$ -Factor kappaB) transcription factor as a prostate cancer prognostic marker and **2)** studying the molecular interaction between NF- $\kappa$ B and the androgen receptor signaling pathway to better understand the mechanisms involved in the resistance to androgen deprivation therapy (ADT).

When localized to the cell nucleus, NF- $\kappa$ B controls the expression of many genes that are known to play a role in oncogenesis. The first part of this doctoral project (chapters II, III, and IV) thus aimed to characterize the subcellular localization of NF- $\kappa$ B in prostate cancer tissues and determine whether its nuclear localization could help predict prostate cancer outcome. The experimental approach consisted in the immunohistochemical detection of the NF- $\kappa$ B RelA (p65) subunit. The results show that RelA can be present in the nucleus of prostate cells and that this nuclear expression can help in classifying patients at risk of progression. Moreover, in multivariate analyses, the nuclear localization of RelA is an independent predictor of biochemical relapse and lymph node metastases.

In chapter V, the detection of nuclear p50, RelB, and/or p52 subunits suggests that in addition to RelA, other NF- $\kappa$ B family member may also become candidate prognostic markers. Furthermore, the nuclear localization of RelB and p52 suggests a possible role of the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in prostate cancer that was previously conferred only to the canonical NF- $\kappa$ B pathway and the RelA and p50 subunits.

Finally, chapter VI investigated the molecular mechanisms involved in advanced prostate cancer by focussing more specifically on the interaction between the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway and the androgen receptor. The results demonstrate that the androgenic stimulation of androgen receptor-expressing prostate cancer cells activates the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway and induces the nuclear accumulation of the p52 subunit. The nuclear translocation of p52 may participate in the repression of genes normally regulated by the canonical NF- $\kappa$ B pathway. From a therapeutic point of view, the de-repression of these genes during ADT, combined with the activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway, could promote cell survival and contribute to the development of a resistance to ADT.

Globally, this doctoral project contributed to the emergence of NF- $\kappa$ B as factor closely linked to prostate cancer progression. The results of these studies, combined with future discoveries, may lead to more efficient therapeutic management of prostate cancer.

**Keywords :**

Prostate Cancer

Nuclear Factor-kappaB

RelA(p65)/p50/RelB/p52

Prognostic marker

Immunohistochemistry

Androgen Receptor

Androgen Deprivation Therapy

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé	i
Mots clés	ii
Summary	iii
Keywords	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiv
Liste des sigles et des abréviations	xvi
Dédicace	xxii
Remerciements	xxiii
CHAPITRE I. INTRODUCTION	1
1.1 La prostate	1
1.1.1 Embryologie de la prostate	1
1.1.2 Anatomie de la prostate adulte	2
1.1.3 Types cellulaires	4
1.1.4 Fonctions de la prostate	4
1.1.5 Maladies non cancéreuses de la prostate	5
1.1.5.1 Prostatite	5
1.1.5.2 Hypertrophie bénigne de la prostate	7
1.2 Épidémiologie et facteurs de risque du cancer de la prostate	8
1.2.1 Épidémiologie	8
1.2.2 Facteurs de risque	9
1.2.2.1 L'âge	9
1.2.2.2 L'origine ethnique	9
1.2.2.3 L'histoire familiale et la susceptibilité génétique	10
1.2.2.4 L'alimentation	12

1.3	Histoire naturelle du cancer de la prostate	12
1.3.1	Le diagnostic	13
1.3.2	La stadification	15
1.3.3	Le grade histologique	17
1.3.4	Les marqueurs cliniques et les traitements	19
1.4	Pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate	22
1.4.1	Conditions pré-néoplasiques	22
1.4.2	Les lignées cellulaires du cancer de la prostate	24
1.4.3	Modèles murins du cancer de la prostate	25
1.4.4	Biologie moléculaire du cancer de la prostate	29
1.4.4.1	Altérations moléculaires dans le cancer de la prostate localisé	29
1.4.4.2	Altérations moléculaires dans le cancer de la prostate métastatique	31
1.4.4.3	Altérations moléculaires dans le cancer de la prostate hormono-réfractaire	33
1.5	Les grands problèmes de la gestion clinique du cancer de la prostate	36
1.5.1	L'insuffisance des marqueurs pronostiques cliniques	36
1.5.2	Mieux comprendre les effets du RA sur la signalisation intra-cellulaire	38
1.6	Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B	39
1.6.1	La famille NF- $\kappa$ B	39
1.6.2	La voie de signalisation classique	40
1.6.3	La voie de signalisation non classique	41
1.6.4	Modifications post-traductionnelles des sous-unités NF- $\kappa$ B	42
1.6.5	Gènes cibles et mécanismes de spécificité	45
1.6.6	Modèles murins	46
1.6.7	NF- $\kappa$ B et cancer	49

1.6.8	NF- $\kappa$ B et modèles murins de tumorigénèse	50
1.6.9	Inhibiteurs chimiques et naturels de NF- $\kappa$ B	52
1.7	Objectifs du projet de doctorat	53
1.7.1	Chapitres II, III et IV: expression de RelA dans le cancer de la prostate et validation de sa localisation nucléaire en tant que marqueur pronostique	53
1.7.2	Chapitre V: caractérisation de l'expression et de la localisation intra-cellulaire des sous-unités de la famille NF- $\kappa$ B dans le cancer de la prostate	54
1.7.3	Chapitre VI: Influence du RA sur la voie NF- $\kappa$ B non classique	54
CHAPITRE II	NF- $\kappa$ B Nuclear Localization and its Prognostic Significance in Prostate Cancer ( <i>BJU Int.</i> , vol. 91 : 417-420, 2003)	55
	Abstract	56
	Introduction	57
	Patients and Methods	58
	Results	59
	Discussion	60
	Acknowledgements	62
	References	63
	Tables	66
	Figure	68

CHAPITRE III	Nuclear Factor- $\kappa$ B Nuclear Localization is Predictive of Biochemical Recurrence in Patients with Positive Margin Prostate Cancer <i>(Clin Can Res, vol. 10, 8460-8464, 2004)</i>	69
Abstract		70
Introduction		71
Patients and Methods		72
Results		74
Discussion		75
Acknowledgements		77
References		78
Tables		82
Figures		84
CHAPITRE IV	Nuclear Localization of Nuclear Factor- $\kappa$ B p65 in Primary Prostate Tumors Is Highly Predictive of Pelvic Lymph Node Metastases <i>(Clin Can Res, vol. 12 : 5741-5745, 2006)</i>	86
Abstract		87
Introduction		88
Patients and Methods		90
Results		91
Discussion		93
Acknowledgements		96
References		97
Tables		101
Figure		103



CHAPITRE V	Nuclear Localisation of Nuclear Factor-kappaB Transcription Factors in Prostate Cancer : an Immunohistochemical Study <i>(Br J Cancer, vol. 93 : 1019-1023, 2005)</i>	104
Abstract		105
Introduction		106
Materials and Methods		108
Results		109
Discussion		110
Acknowledgements		114
References		115
Tables		118
Figures		120
CHAPITRE VI	NF- $\kappa$ B2 Processing and p52 Nuclear Accumulation after Androgenic Stimulation of LNCaP Prostate Cancer Cells <i>(Cell. Signal., sous presse, 2007)</i>	122
Abstract		123
Introduction		124
Materials and Methods		126
Results		128
Discussion		131
Conclusions		134
Acknowledgements		135
References		136
Figures		139

CHAPITRE VII	DISCUSSION	151
7.1	Chapitres II, III et IV	151
7.1.1	Résumé	151
7.1.2	Discussion et perspectives	153
7.2	Chapitre V	157
7.2.1	Résumé	157
7.2.2	Discussion et perspectives	158
7.3	Chapitre VI	161
7.3.1	Résumé	161
7.3.2	Discussion et perspectives	161
7.3.2.1	Activité des dimères NF- $\kappa$ B aux promoteurs endogènes	161
7.3.2.2	Mécanisme(s) d'induction de la voie NF- $\kappa$ B non classique par le RA	164
7.3.2.3	L'importance biologique des sous-unités non classiques RelB et p52	166
7.4	Contribution de NF- $\kappa$ B dans la pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate	169
7.5	Conclusion	172
CHAPITRE VIII	BIBLIOGRAPHIE	173
CHAPITRE IX	ANNEXES	196
9.1	Annexe I Expression of NF- $\kappa$ B in Prostate Cancer Lymph Node Metastasis ( <i>Prostate</i> , vol. 58 : 308-313, 2004)	196

9.2	Annexe II	NF- $\kappa$ B : un nouveau marqueur <i>kappable</i> de prédire l'évolution du cancer de la prostate ( <i>Bull. Cancer</i> , vol.93(9) : 891-899, 2006)	203
-----	-----------	--	-----

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I

Tableau 1.	Stadification du cancer de la prostate	16
Tableau 2.	Lignées cellulaires du cancer de la prostate	25
Tableau 3.	Modèles murins du cancer de la prostate	26
Tableau 4.	Activateurs des voies NF- $\kappa$ B	41
Tableau 5.	Gènes cibles de NF- $\kappa$ B	46
Tableau 6.	Modèles murins ciblant les sous-unités ou les voies NF- $\kappa$ B	47

### CHAPITRE II

Table 1.	Detection of nuclear NF- $\kappa$ B in prostate cancer tissues stratified by Gleason category	66
Table 2.	Clinical outcomes stratified by Gleason score and according to NF- $\kappa$ B nuclear staining	67

### CHAPITRE III

Table 1.	Clinical and pathological characteristics of 42 evaluable patients who were treated with RP	82
Table 2.	Univariate and multivariate Cox survival analyses addressing the association between NF- $\kappa$ B and biochemical prostate cancer recurrence (PSA >3 ng/ml and rising) after RP	83

### CHAPITRE IV

Table 1.	Clinical and pathological characteristics of 51 patients treated by radical prostatectomy	101
Table 2.	Univariate and multivariate models predicting lymph node metastasis at surgery	102

## CHAPITRE V

Table 1.	Nuclear localisation of NF- $\kappa$ B transcription factors in prostatic tissue cores	118
Table 2.	Nuclear localisation of NF- $\kappa$ B transcription factors in low to intermediate (2, 2/3, 3) and high (3/4, 4, 4/5, 5) Gleason grade cores	118
Table 3.	Correlation between NF- $\kappa$ B nuclear localisation and patient's Gleason scores	119

## CHAPITRE VII

Tableau 7.	Rôles de NF- $\kappa$ B dans le cancer de la prostate	167
------------	---	-----

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

Figure 1.	Anatomie de la prostate adulte	3
Figure 2.	Pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate	14
Figure 3.	Grades histologiques du cancer de la prostate	18
Figure 4.	Altération de la voie PI3K-Akt dans le cancer de la prostate	30
Figure 5.	Structure et mécanisme d'activation du récepteur aux androgènes	34
Figure 6.	Structure des sous-unités de la famille NF- $\kappa$ B et des inhibiteurs de la famille I $\kappa$ B	43
Figure 7.	Voies de signalisation NF- $\kappa$ B	44

### CHAPITRE II

Figure 1.	NF- $\kappa$ B immunostaining patterns in the prostate	68
-----------	--	----

### CHAPITRE III

Figure 1.	Immunohistochemical detection of NF- $\kappa$ B (p65 subunit) in prostate tissues.	84
Figure 2.	Kaplan-Meir curve of biochemical recurrence-free survival according to NF- $\kappa$ B status	85

### CHAPITRE IV

Figure 1.	Immunohistochemical detection of NF- $\kappa$ B p65 in prostate cancer tissues	103
-----------	--	-----

### CHAPITRE V

Figure 1.	Immunohistochemical detection of c-Rel, RelA, p50, RelB, and p52 in normal, PIN and cancerous prostate tissues	120
Figure 2.	Frequencies of NF- $\kappa$ B subunit combinations in the prostate cancer cores	121

## CHAPITRE VI

- Figure 1. NF- $\kappa$ B p100/p52 expression in prostate cancer cells in androgen-deprived conditions. 139
- Figure 2. NF- $\kappa$ B p52 production and nuclear accumulation in R1881-treated androgen-sensitive prostate cancer cells 141
- Figure 3. Differential modulation of NF- $\kappa$ B subunits by R1881 and TNF- $\alpha$  143
- Figure 4. Time-dependent modulation of NF- $\kappa$ B DNA-binding and variation in the nature of DNA-binding complexes during androgenic stimulation of LNCaP cells 145
- Figure 5. Androgen signalling-induced p52 interacts with RelA and p50. 147
- Figure 6. The accumulation of p52 is IKK- $\alpha$ -dependent 149

## CHAPITRE VII

- Figure 8. Modulation de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B lors de la progression du cancer la prostate vers une maladie hormono-réfractaire 162
- Figure 9. Croisement entre différents modèles murins afin d'analyser la contribution de NF- $\kappa$ B dans le cancer de la prostate primaire et métastatique 171

**LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS**

ADN	acide déoxyribonucléique
AI	androgéno-indépendant
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien
AIP	atrophie inflammatoire prostatique
Akt/PKB	thymoma viral proto-oncogene / protein kinase B
AMPS	antigène membranaire prostatique spécifique
AOM	azoxymethane
AP-1	activating protein-1
APS	antigène prostatique spécifique
ARA55	androgen receptor activator 55
ARA70	androgen receptor activator 70
ARN	acide ribonucléique
ATF2	activating transcription factor 2
ATFB1	activating transcription factor B1
BAD	Bcl-xL/Bcl-2-Associated Death Promoter
BAFF	B cell activation factor of the TNF family
Bcl-2	B cell lymphoma/leukemia-2
Bcl-3	B cell lymphoma/leukemia-3
Bcl-XL	B cell lymphoma/leukemia-X Long
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
BRCA1	breast cancer-1
BRCA2	breast cancer-2
CD30	cluster designation 30
CD40	cluster designation 40
CD44	cluster designation 44
CDK4	cylin-dependent kinase 4
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
c-FLIP	cellular fadd-like interleukin 1B converting enzyme-inhibitory protein



CHEK2	checkpoint kinase 2
ChiP	chromatin immunoprecipitation
c-IAP	cellular inhibitor of apoptosis
c-jun	cellular avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
CK2	casein kinase 2
CMV	cytomégalo­virus
c-myc	cellular avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
Co-IP	co-immunoprécipitation
Cox-2	cyclooxygenase-2
CREB-BP	cAMP response element binding protein-binding protein
CYP17	cytochrome p450 family 17
delta CT	délétion en région carboxy-terminale
DEN	diethylnitrosamine
DHMEQ	déhydroxyméthylepoxynomicine
DHT	dihydrotestostérone
DLA	domaine de liaison à l'ADN
DLL	domaine de liaison au ligand
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene
DSS	dextran-sulphate sodium salt
DTA	domaine de transactivation
EBV	epstein-barr virus
EGF	epithelial growth factor
EGFR	epithelial growth factor receptor
ELAC2	elaC homolog 2
ELAM-1	endothelial leukocyte adhesion molecule-1
EMSA	electromobility shift assay
ERG	early response gene
ERK	ectracellular-related kinase
ET-1	endothelin-1
ETV1	ETS translocation variant 1
EZH2	enhancer of zeste homolog 2

FGF	fibroblast growth factor
FGF10	fibroblast growth factor 10
FUT1	fucosyltransferase 1
GFP	green fluorescent protein
GSK3b	glycogen synthase kinase 3-beta
GSTP	gluthatione S-transferase P
GSTT	gluthatione S-transferase t
HAT	histone acetyl-transferase
HBP	hypertrophie bénigne de la prostate
HDAC1	histone deacetylase 1
Her-2	human epidermal growth factor receptor-2
Hox10a	homeobox 10a
HPC1	hereditary prostate cancer 1
Hsp90	heat-shock protein 90
HTLV-1	human T-cell leukemia virus 1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IGF-1	insulin growth factor-1
IGF-1R	insulin growth factor receptor-1
Igk	immunoglobulin kappa
IkB	inhibitor of NF-kB
IkB-SR	inhibitor of NF-kB-super repressor
IKK	IkB kinase
IKK-DN	IkB kinase-dominant negative
IL-1	interleukine-1
IL-6	interleukine-6
IL-6R	interleukin-6 receptor
IL-8	interleukine-8
IRF	interferon-regulating factor
JNK	c-jun N-terminal protein kinase
KAI-1	kangai-1
KGF	keratinocyte growth factor

Ki-67	antigène identifié à l'aide de l'anticorps monoclonal Ki-67
KLF-6	kruppel-like factor 6
KO	knock-out
LHRH	luteinizing hormone-releasing hormone
LMP-1	latent infection membrane protein-1
LPS	lipopolysaccharides
LTb1	lymphotoxin b1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mdr2	multi-drug resistance 2
MMP-9	métalloprotéinase-9
MSK 1/2	mitogen and stress-activated protein kinase 1/2
MSR1	macrophage scavenger receptor 1
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase
mTOR	mamalian target of rapamycin
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
N-CoR	nuclear-corepressor
NEMO	nf-kappaB essential modulator
NES	nuclear export signal
NIP	néoplasie intra-épithéliale prostatique
Nkx3.1	NK homeobox family 3 member 1
NLS	nuclear localization signal
PB	probasin
PDGF	platelet-derived growth factor
PI3K	phosphatidylinositol-3'-OH kinase
Pim-1	proviral integration site-1
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PR	prostatectomie radicale
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTHrP	parathyroid hormone-related protein
Q-PCR	quantitative polymerase chain reaction

RA	récepteur aux androgènes
RANK	receptor activator of nuclear factor kappaB
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappaB ligand
Rb	retinoblastoma
REa	récepteur à l'estrogène alpha
RHD	rel-homology domain
RNAi	RNA interference
RNase L	ribonucléase L
RSK1	ribosomal protein S6 kinase 1
RTx	radiothérapie
RVD	récepteur à la vitamine D
SA	surveillance active
SDPC	syndrome douloureux pelvien chronique
Ser	sérine
Shh	sonic hedgehog
SIRT1	sirtuin 1
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SOCS-1	suppressor of cytokine signalling-1
SRC-3	steroid receptor coactivator-3
SRD5A2	steroid 5-alpha-reductase 2
Stat3	signal transducer and activator of transcription 3
TBK1	traf-associated NF-kappaB activator-binding kinase 1
TD	temps de doublement
TEM	transition épithéliale-mésenchymale
TGF-a	tumor growth factor alpha
TGF-b	tumor growth factor beta
TLR4	toll-like receptor 4
TMA	tissue microarray
TMPRSS2	transmembrane protease serine 2
TNF-a	tumor necrosis factor alpha
TNF-R1	tumor necrosis factor receptor 1

TPA	thérapie de privation d'androgènes
TPAc	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TR	toucher rectal
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
WW	watchful waiting
XIAP	x-linked inhibitor of apoptosis

- À la douce mémoire de mes grands-mères

## REMERCIEMENTS

Ce projet de doctorat n'aurait jamais existé sans la présence de mes directeurs de recherche Dre Anne-Marie Mes-Masson et Dr Fred Saad. Je désire les remercier chaleureusement pour leur support, leur disponibilité, leur respect et leur confiance. Ils sont pour moi des exemples de persévérance, d'ingéniosité et d'équilibre entre la vie professionnelle et la vie familiale. Ces années passées ensemble auront aussi permis de bâtir une grande amitié qui m'est très chère.

Je veux souligner la contribution inestimable des mes collègues (actuels ou anciens) et amis du groupe prostate. Merci à Chantale Auger, Pascale Bellon-Gagnon, Nathalie Delvoye, Jean-Simon Diallo, Dre Mona Fahmy, Dr Hervé Koumakpayi, Philippe Gannon, Dre Cécile Le Page et Dr Benjamin Péant. Leur esprit de camaraderie, de collaboration et d'entraide a grandement influencé la progression du projet. Je veux aussi mentionner l'apport important des résidents et « *fellows* » en urologie (Dr Abdulhadi Adejmah, Dr Alain Duclos, Dr Vincent Fradet, Dr Hazem Ismail, Dr Jean-Baptiste Lattouf) ainsi que des collaborateurs (Dr Louis R. Bégin, Dr Martin E. Gleave, Dr Pierre I. Karakiewicz, Dr Louis Lamarre et Dre Christine Maugard) avec qui il fut fort agréable de travailler. Je remercie aussi le défunt chercheur et ami Dr Lee Wall dont les précieux conseils resteront à jamais gravés dans ma mémoire. Je m'en voudrais d'oublier les membres des groupes ovaire et polyome que j'ai cotoyés tout au long du doctorat et avec qui j'ai eu énormément de plaisir à apprendre, travailler et célébrer. Je veux de plus remercier Louise Champoux qui veille sans cesse au bien-être des membres du laboratoire de part son dévouement et sa générosité. Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres de mon comité de thèse, Dr Richard Bertrand et Dr Mario Chevrette, ainsi qu'aux étudiants et aux membres du personnel de l'Institut du cancer, du Centre de recherche du CHUM, des départements d'urologie, de pathologie et de chirurgie du CHUM ainsi que des Programmes de biologie moléculaire pour m'avoir fourni un environnement d'apprentissage enrichissant et stimulant empreint de convivialité et de bonne humeur.

Je n'aurais pas pu entreprendre et compléter ce doctorat sans le soutien financier de mes directeurs de recherche, de l'Institut du cancer, de Canderel, des Programmes de biologie moléculaire, du Centre de recherche du CHUM et des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC). Je leur en suis d'ailleurs très reconnaissant.

J'aimerais enfin remercier du fond du coeur toute ma famille et tous mes amis qui sont ma source d'inspiration et de motivation. Ma mère, mon père et ma soeur ont toujours cru en moi et n'ont jamais cessé de m'encourager. Un merci tout spécial à ma mère qui a minutieusement relu et corrigé la thèse. Et, bien entendu, merci à mon épouse Nancy pour sa présence continuelle à mes côtés, son écoute, ses conseils, son sourire et son amour pendant toutes ces années.



## CHAPITRE 1. INTRODUCTION

### 1.1 La prostate

Afin de mieux comprendre la biologie du cancer de la prostate, il est important de connaître la nature et la fonction d'une prostate saine. Le Petit Robert définit la prostate comme une *“glande de sécrétion externe et interne de l'appareil génital masculin, située autour de la partie initiale de l'urètre et en dessous de la vessie, et dont la sécrétion contribue à la formation du sperme”*. Les prochains paragraphes s'appliqueront à décortiquer cette définition en s'attardant au développement, à l'anatomie et à la physiologie de cette glande essentielle à la fertilité masculine.

#### 1.1.1 Embryologie de la prostate

Chez l'homme, la prostate primitive se développe à partir de la 12<sup>ième</sup> semaine suivant la fécondation [1]<sup>1</sup>. Elle est issue des cellules entoblastiques du sinus urogénital qui, stimulées par la dihydrotestostérone (DHT), donnent naissance à des bourgeons prostatiques. Dès la 13<sup>ième</sup> semaine, ces excroissances adoptent une forme glandulaire caractérisée par des structures tubulaires entourées d'épithélium pseudo-stratifié. La présence de granules apicales suggère que cet épithélium possède déjà une activité sécrétoire. Au cours de la 15<sup>ième</sup> semaine, les bourgeons envahissent le mésenchyme et englobent l'urètre ainsi que les canaux éjaculateurs pour former une prostate parfaitement différenciée. De la naissance jusqu'à la puberté, le poids de la prostate demeure stable à environ 5 grammes. À partir de la période pubère, son poids augmente d'approximativement 2 grammes par année pour atteindre 15-20 grammes à l'âge adulte.

L'utilisation de modèles murins a permis d'identifier une série de gènes clés impliqués dans le développement de la prostate [2]. Parmi ceux-ci, le gène

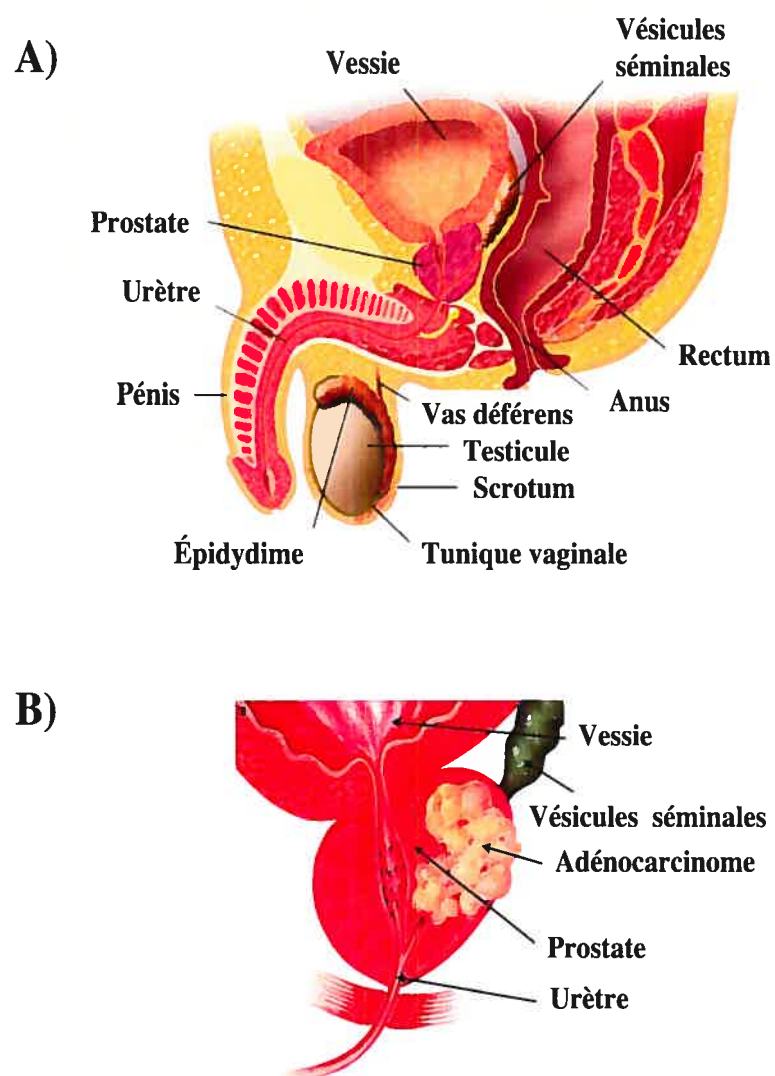
---

<sup>1</sup> Contrairement aux chapitres II à VI, les références bibliographiques de ce chapitre sont regroupées avec celles du chapitre VII et listées par ordre d'apparition dans la bibliographie (chapitre VIII).

androgéno-dépendant de type homéoboîte *Nkx3.1* est le premier marqueur prostatique détecté 48 heures avant l'émergence des bourgeons prostatiques [3]. La prostate des souris *Nkx3.1* *-/-* se développe quand même, mais sa croissance et sa différenciation sont sévèrement affectées [4]. La voie de signalisation sonic hedgehog (*Shh*) joue elle aussi un rôle dans la croissance prostatique [5]. Pour sa part, l'expression de *FGF10* est à la fois essentielle au développement et à la croissance de la prostate [6]. Le gène *Hox10a* est quant à lui impliqué dans la spécification des zones prostatiques[7], alors que *Fut1* joue un rôle dans le développement des conduits prostatiques[8].

### 1.1.2 Anatomie de la prostate adulte

La prostate d'un homme de 25-30 ans a la taille d'une noix de Grenoble. Elle est située en dessous de la vessie et ses deux lobes entourent la partie proximale de l'urètre ([9]; Figure 1A). Elle se trouve en avant du rectum, ce qui explique probablement l'origine latine du mot prostate, *prostatês*, qui signifie "qui se tient en avant". Les deux lobes de la glande sont constitués d'alvéoles tapissées de cellules épithéliales sécrétrices. L'acinus de ces alvéoles se déverse, à travers un embranchement de conduits, dans les canaux éjaculateurs puis dans l'urètre prostatique. Ces structures sont imbriquées à l'intérieur d'un stroma composé de tissu fibro-musculaire. Enfin, situées au-dessus de la prostate et en région postéro-inférieure de la vessie, les vésicules séminales sécrètent une grande partie du fluide composant le liquide séminal à l'intérieur de conduits menant aux canaux éjaculateurs. D'après les travaux de McNeal[10], la prostate se divise en trois zones histologiquement différentes. La zone transitionnelle représente 5% de la prostate, la zone centrale environ 25%, alors que la zone périphérique forme 70% de la glande. Les zones périphérique et transitionnelle partagent une architecture glandulaire similaire, tandis que les acini de la zone centrale sont morphologiquement distincts. Les adénocarcinomes prostatiques se développent préférentiellement dans la zone périphérique ([11], 60-70%; Figure 1B), alors que l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) apparaît le plus souvent dans la zone transitionnelle[12].



**Figure 1. Anatomie de la prostate adulte**

**A) Coupe sagittale de l'appareil génito-urinaire masculin**

**B) Adénocarcinome de la prostate se développant dans la zone périphérique**

### 1.1.3 Types cellulaires

L'épithélium prostatique est composé de 3 types cellulaires: les cellules luminales sécrétrices, les cellules basales et les cellules neuroendocriniennes [1]. Les cellules sécrétrices sont complètement différenciées alors que les cellules basales contiennent des cellules souches qui se régénèrent (non-engagées) ou se différencient en cellules sécrétrices[13]. Parsemées à l'intérieur du tissu épithélial, les cellules neuroendocriniennes sécrètent certains neuropeptides impliqués, entre autres, dans la prolifération cellulaire [14]. Le stroma qui entoure l'épithélium contient principalement des fibroblastes, des fibres musculaires et des vaisseaux sanguins. Les fibroblastes sécrètent une variété de facteurs de croissance dont KGF, FGF et TGF- $\beta$  qui interagissent avec l'épithélium prostatique[15, 16].

Les androgènes, dont la DHT, jouent un rôle crucial non seulement dans le développement mais aussi dans le maintien de l'épithélium prostatique. Bien que les cellules stromales et épithéliales expriment le récepteur aux androgènes (RA), l'action de la DHT sur ces 2 types cellulaires influence différemment l'épithélium prostatique [15]. D'une part, dans les cellules stromales, la DHT induit l'expression et la sécrétion de facteurs de croissance et de survie qui vont stimuler les cellules épithéliales. D'autre part, la DHT agit directement sur l'épithélium prostatique afin d'induire la différenciation cellulaire et l'expression de protéines destinées à la sécrétion. Seules les cellules souches non-engagées et les cellules neuroendocriniennes semblent être insensibles aux androgènes.

### 1.1.4 Fonctions de la prostate

La prostate est d'abord et avant tout une glande exocrine. Sa principale fonction est donc la sécrétion d'un fluide blanchâtre qui se joint au liquide séminal et qui optimise les conditions de fertilisation [1, 17, 18]. Les sécrétions prostatiques contiennent une variété de nutriments et d'enzymes incluant, entre autres, le zinc, le citrate, le cholestérol et l'antigène prostatique spécifique (APS). Bien que leur rôle ne soit pas

tout à fait clair, il semble que le zinc agirait comme facteur antibactérien, le citrate favoriserait le transport du sperme, alors que le cholestérol protégerait le sperme. Par ailleurs, l'APS, une protéase de type sérine, est clairement impliqué dans la liquéfaction du sperme.

La prostate peut être aussi considérée, jusqu'à un certain point, comme une glande endocrine. Par exemple, une petite partie de l'APS produit par les cellules sécrétrices s'infiltré à l'intérieur du stroma et pénètre dans les vaisseaux sanguins. Cependant, le rôle physiologique des enzymes prostatiques sécrétés dans le sang est inconnu.

Enfin, la prostate a un rôle mécanique puisqu'elle contrôle le flux urinaire. Les fibres musculaires présentes dans la prostate produisent une constriction ralentissant le flux urinaire. Par contre, cette fonction n'est pas indispensable puisque la majorité des patients prostatectomisés réussissent à uriner normalement [19].

### 1.1.5 Maladies non cancéreuses de la prostate

#### 1.1.5.1 Prostatite

La prostatite symptomatique est une inflammation de la prostate qui atteint de 2 à 10% des hommes et qui peut prendre plusieurs formes [20]. La prostatite aiguë, la moins courante mais la plus sévère, est causée par une infection bactérienne. Les bactéries provenant de la voie urinaire et du gros intestin s'infiltrerent dans la prostate et provoquent une réaction inflammatoire. Il arrive aussi que la prostatite aiguë résulte de la propagation d'une infection urinaire. Le second type, la prostatite chronique d'origine bactérienne, s'explique par la récurrence d'une prostatite aiguë, par un traumatisme des voies urinaires ou par des infections provenant d'autres régions du corps. Le dernier type, la prostatite chronique non-bactérienne ou syndrome douloureux pelvien chronique (SDPC), est la forme la plus fréquente mais la moins bien comprise. Les causes avancées par les experts incluent des agents infectieux indétectables en laboratoire, des travaux ou des loisirs sujets à des vibrations intenses

pouvant irriter la prostate, ainsi que des spasmes des muscles prostatiques ou des malformations de la voie urinaire augmentant la pression intra-prostatique.

Les symptômes associés aux prostatites d'origine bactérienne sont en général de la fièvre, des douleurs à la prostate, dans le bas du dos ou aux parties génitales, des difficultés urinaires et des éjaculations douloureuses. Le SDPC présente les mêmes symptômes excepté la fièvre. Le diagnostic d'une prostatite est cependant difficile à faire parce que les symptômes s'apparentent à d'autres types d'inflammation. Malgré tout, le médecin possède certains outils comme le toucher rectal et les tests en laboratoire. En effet, une prostate élargie et tendre au toucher peut être un signe d'une prostatite. De plus, la présence de bactéries et/ou d'un taux élevé de cellules blanches dans un échantillon d'urine peut mener au diagnostic d'une prostatite. Enfin, cette inflammation peut parfois être responsable d'une élévation de l'APS (section 1.3.1) et nécessiter une biopsie de la prostate pour confirmer la présence d'inflammation et s'assurer de l'absence de cancer.

Un traitement aux antibiotiques guérit habituellement la prostatite aiguë. La prostatite bactérienne chronique peut se résorber suite à un traitement prolongé aux antibiotiques, mais d'autres traitements aussi utilisés pour le SDPC sont parfois nécessaires. Ces derniers incluent des alpha-bloqueurs, des relaxants musculaires, ainsi que des anti-inflammatoires. Le patient peut aussi s'adonner à divers exercices soulageant les symptômes associés à l'irritation musculaire.

L'inflammation est de plus en plus soupçonnée de jouer un rôle dans le développement de plusieurs cancers, dont le cancer de la prostate [21]. Certaines études de cohortes suggèrent que la prise d'anti-oxidants et d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens diminue le risque de développer un cancer de la prostate. L'inflammation chronique endommagerait les glandes prostatiques qui deviendraient atrophiques, une condition maintenant reconnue sous le nom d'atrophie inflammatoire proliférative (AIP; [22]). Ces lésions pourraient précéder le

développement de la néoplasie intra-épithéliale prostatique (NIP) et du cancer de la prostate (voir section 1.4.1).

#### 1.1.5.2 Hypertrophie bénigne de la prostate

L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est la tumeur bénigne la plus fréquente chez l'homme, touchant plus de 80% des septuagénaires [23]. Dans les stades plus avancés, la prostate peut peser plus de 200 grammes. Il s'agit d'un désordre prolifératif dont les causes sont toujours inexplicables mais qui est clairement associé au vieillissement [24]. L'évolution clinique de l'HBP se divise en trois stades: un stade précoce asymptomatique et cliniquement indétectable, un stade asymptomatique mais décelable cliniquement, et un stade associé à des symptômes urinaires appelé prostatisme. Ces symptômes peuvent être de type obstructif (jet affaibli, goutte-à-goutte, trouble à initier la miction, mauvaise vidange) ou de type irritatif (mictions urgentes et fréquentes, nycturie).

L'HBP se développe presque exclusivement dans la zone transitionnelle de la prostate de manière multifocale en formant des nodules expansibles [25]. Ces nodules peuvent être causés par le bourgeonnement de nouveau tissu épithélial et/ou par la prolifération des cellules stromales et épithéliales. L'épithélium prostatique de l'HBP diffère de l'épithélium normal sur plusieurs facettes[26]. Les cellules sécrétrices s'aplatissent et modulent à la hausse ou à la baisse l'expression de certaines protéines comme la vimentine et l'antigène membranaire prostatique spécifique (AMPS). De leur côté, les cellules basales et neuroendocriniennes diminuent en nombre. Au niveau du stroma, les composantes fibroblastique et fibromusculaire augmentent. Tous ces changements sont associés à des altérations moléculaires dont une augmentation des enzymes et des récepteurs impliqués dans le métabolisme des androgènes (ex.: 5-alpha-réductase, RA) une sur-expression de facteurs de croissance (ex.: FGF, IGF, VEGF) et de cytokines (ex.: IL-1, IL-8), et une sur-activation des MAPK (ex.: ERK, p38).

Le soulagement des symptômes associés à l'HBP peut se faire à l'aide d'alpha-bloqueurs, par blocage des androgènes et, dans les cas les plus graves, par résection chirurgicale de la prostate [27, 28]. Les alpha-bloqueurs vont relaxer les muscles lisses de la prostate et diminuer la tension exercée sur la vessie et l'urètre. Le blocage des androgènes vise quant à lui à freiner le développement de l'HBP et à réduire le volume prostatique puisque les cellules stromales et épithéliales sont dépendantes des androgènes pour leur prolifération et leur survie. Le finastéride et le dutastéride, inhibiteurs de l'enzyme 5-alpha-réductase qui convertit la testostérone en DHT, sont utilisés pour traiter l'HBP. Ils permettent de diminuer le volume prostatique de 20% et d'alléger les symptômes de l'HBP. Ultimement, si les symptômes s'aggravent ou persistent et sont associés à une morbidité élevée, l'ablation de la prostate peut être envisagée. Dans le cas contraire où les symptômes sont légers ou peu inconfortables, la surveillance éclairée, ou "Watchful Waiting", est recommandée.

L'HBP et le cancer de la prostate (voir section 1.2) sont tous les deux associés au vieillissement et sont androgéno-dépendants [29]. Cependant, la pathogénèse moléculaire de l'HBP diffère de celle du cancer de la prostate. L'HBP n'est pas un précurseur du cancer de la prostate et sa présence n'en est pas non plus un facteur de risque. Par ailleurs, l'élucidation des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'HBP peut favoriser la compréhension de mécanismes impliqués dans le cancer de la prostate et vice versa. Par exemple, l'interaction stroma-épithélium décrite pour l'HBP existe aussi dans le cancer de la prostate, et les facteurs impliqués sont similaires [30].

## **1.2 Épidémiologie et facteurs de risque du cancer de la prostate**

### **1.2.1 Épidémiologie**

L'adénocarcinome de la prostate est le cancer le plus fréquent et la troisième cause de mortalité liée au cancer chez les hommes canadiens [31]. En 2006, le cancer frappera un Canadien sur 7, soit au-delà de 20 000 personnes. Parmi celles-ci, environ 1



personne sur 5 mourra des suites de la maladie. L'incidence du cancer de la prostate varie d'une région du monde à l'autre, étant plus fréquent chez les nord-américains et les scandinaves, et moins fréquent en Chine et dans d'autres pays d'Asie. Le taux de mortalité est aussi variable, étant plus élevé dans les Caraïbes et en Scandinavie, et moins élevé en Chine, au Japon, et dans les pays de l'ex-URSS [32]. Ces différences peuvent surtout s'expliquer par les habitudes de vie, la présence de facteurs génétiques et épigénétiques de susceptibilité, par l'accessibilité et la qualité des soins, ou par la combinaison de tous ces facteurs.

### 1.2.2 Facteurs de risque

L'étiologie du cancer de la prostate n'est pas connue. Toutefois, il existe un certain nombre de facteurs de risque dont les principaux sont l'âge, l'origine ethnique, l'histoire familiale et les habitudes alimentaires.

#### 1.2.2.1 L'âge

Le cancer de la prostate est clairement associé au vieillissement. En Amérique du Nord, plus de 70% des hommes diagnostiqués sont âgés de plus de 65 ans et rares sont ceux âgés de moins de 50 ans [32]. Au Canada, la probabilité de développer un cancer de la prostate dans les 10 prochaines années passe de 0.1% chez les individus de 40-49 ans à 5.6% pour les 60-69 ans et à 6.9% pour les 70-79 ans [33]. Par ailleurs, les résultats d'autopsies révèlent une probabilité encore plus élevée de développer un cancer indétectable cliniquement. Une étude de 1990 à montré que 20% des hommes entre 50 et 60 ans et 50% de ceux entre 70 et 80 ans présentaient un cancer détectable histologiquement[34].

#### 1.2.2.2 L'origine ethnique

Les Afro-Américains ont l'incidence et le taux de mortalité du cancer de la prostate les plus élevés au monde et sont suivis par les Caucasiens, les Hispaniques et les

Asiatiques [32]. Ces variations semblent être principalement attribuables à des facteurs génétiques et alimentaires.

### 1.2.2.3 L'histoire familiale et la susceptibilité génétique

Seulement 5-10% des tumeurs prostatiques ont une base héréditaire [35]. Cependant, le risque de développer un cancer de la prostate double chez les hommes dont le père ou le frère est atteint, et s'accroît encore plus si de proches parents sont affectés [36]. Même si le cancer héréditaire apparaît en moyenne 6 à 7 ans plus tôt, son évolution clinique ne diffère pas d'un cancer sporadique [35]. De plus, il est impossible de différencier moléculairement les deux types de cancers puisqu'aucun gène hautement pénétrant spécifique au cancer héréditaire n'a été identifié [37]. Une des hypothèses avancées pour expliquer cette situation s'inspire de la théorie des traits complexes. Ainsi, plusieurs gènes ayant, à eux seuls, une pénétrance faible ou modérée, agiraient de concert pour causer le cancer de la prostate héréditaire [37]. Alternativement, une mutation pourrait n'avoir un effet qu'en combinaison avec certains facteurs environnementaux. Dans les deux cas, les études de liaison génétique deviennent alors extrêmement ardues et lorsqu'un gène est finalement identifié, sa présence est rarement confirmée dans d'autres familles.

Ainsi, plusieurs régions chromosomiques ont été associées au cancer de la prostate héréditaire, mais les résultats sont souvent controversés. Ces régions contiennent des gènes candidats comme *RNAseL* (1q), *MSR1* (8p), *ELAC2* (17p), *NBS1* (5p) et *CHEK2* (22q). Le locus chromosomique dans lequel se trouve le gène *RNAseL*, appelé HPC1 ("*hereditary prostate cancer 1*"), a été le premier locus montrant une liaison génétique avec le cancer de la prostate héréditaire [38], mais ce n'est que tout récemment que le gène *RNAseL* a été identifié [39]. Ce gène code pour une ribonucléase ayant des propriétés anti-virales et pro-apoptotiques. Le gène *MSR1*, quant à lui, code pour un récepteur de type éboueur ("*scavenger*") exprimé par les macrophages. Les protéines RNaseL et MSR1 faisant toutes deux partie d'un mécanisme de défense face aux infections, leur absence ou leur défaillance pourrait

promouvoir une inflammation chronique favorisant le développement du cancer. [37]. Certains génotypes du gène *ELAC2* ont aussi été associés au cancer héréditaire [40] et pourraient potentiellement interférer avec l'arrêt de la croissance cellulaire induit par le TGF- $\beta$  [41]. De leur côté, les gènes *NBS1* et *CHEK2* sont impliqués dans le contrôle de l'intégrité du cycle cellulaire et certains mutants sont associés à une légère augmentation du risque de développer un cancer de la prostate [42, 43]. Enfin, il semble que les gènes *MSR1*, *NBS1* et *CHEK2* soient non seulement mutés dans certains cancers héréditaires mais aussi dans une proportion significative de cancers sporadiques [42-44].

La susceptibilité génétique au cancer de la prostate peut aussi se traduire par des polymorphismes influençant le risque d'être atteint de la maladie. Par exemple, la région N-terminale du RA contient des répétitions trinuécléotidiques polymorphiques CAG et GGN codant respectivement pour des répétitions de glutamine et de glycine. La longueur de ces répétitions varie d'une personne à l'autre, les plus courtes ayant été associées à un risque plus élevé de cancer dans certaines études [45, 46]. À ce propos, les Afro-Américains ont la plus faible prévalence de répétitions, ce qui pourrait peut-être expliquer l'incidence élevée du cancer dans cette population [47]. D'un point de vue fonctionnel, de courtes répétitions augmenteraient l'efficacité transactivatrice du RA [48]. De manière similaire, certaines variations alléliques dans la région 3' du gène du récepteur à la vitamine D (RVD) atténueraient sa fonction et favoriseraient le développement tumoral [49]. Un autre polymorphisme bien connu est celui du gène de l'enzyme 5-alpha-réductase *SRD5A2* [50]. Les allèles codant pour des formes plus actives de l'enzyme seraient responsables d'une augmentation du risque de développer le cancer. Physiologiquement, la capacité accrue de l'enzyme *SRD5A2* à convertir la testostérone en DHT amènerait une surabondance de DHT qui débalancerait l'équilibre cellulaire prostatique. D'autres polymorphismes ayant un impact plus ou moins important sur le risque du cancer de la prostate se retrouvent dans les gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *TLR4*, *CYP17*, *GSTT*, *GSTP*, *MTHFR* et *CDKN1B (p27)* [37, 51].

#### 1.2.2.4 L'alimentation

Les habitudes alimentaires sont considérées comme un facteur de risque dans une panoplie de cancers, dont le cancer de la prostate [52]. Il est évident que les résultats d'études rétrospectives et prospectives sont parfois contradictoires ou difficiles à interpréter étant donné la coexistence d'autres habitudes de vie comme la cigarette ou l'exercice. Malgré ces difficultés, certains aliments réussissent tout de même à se démarquer dans plusieurs études indépendantes et à influencer à la baisse ou à la hausse le risque de développer un cancer de la prostate. Ainsi, une alimentation riche en lycopène (tomates), vitamine E, vitamine D, sélénium (ail), sulforaphane et indole-3-carbinol (légumes crucifères), isoflavones (soja), polyphénols (vin rouge, thé vert), ou en acide gras omega-3 (poisson) semble avoir un effet préventif. Au contraire, une consommation accrue d'acides gras saturés, de viande rouge, d'amines hétérocycliques (viandes grillées) ou de calcium (produits laitiers) augmente généralement le risque de développer le cancer. Les cibles intra-cellulaires de ces substances ne sont pas très bien connues ou multiples, mais la plupart des agents protecteurs auraient des propriétés anti-oxidantes et/ou anti-prolifératives. De leur côté, les agents néfastes moduleraient le métabolisme hormonal et augmenteraient le stress oxydant.

Les facteurs de risque du cancer de la prostate sont souvent interreliés. Par exemple, l'origine ethnique cache certaines susceptibilités génétiques comme chez les Afro-Américains. Il en va de même pour l'alimentation des Asiatiques qui consomment une quantité astronomique d'aliments protecteurs dont le soja et le thé vert. Bref, l'ensemble de ces facteurs influence de près ou de loin l'histoire naturelle du cancer.

### 1.3 Histoire naturelle du cancer de la prostate

L'adénocarcinome de la prostate est généralement diagnostiqué à un stade précoce grâce au dépistage mesurant le niveau sanguin de l'APS [53]. À ce stade, le cancer est localisé à l'intérieur de la capsule prostatique et peut être traité par prostatectomie

radicale ou radiothérapie. Pour ces patients, le taux de survie après 10 ans tourne autour de 85-90%. Cependant, pour une proportion d'individus, le cancer récidive après une période de rémission. Cette récidive, appelée rechute biochimique, correspond à une réapparition de l'APS sanguin, trahissant la présence de cellules tumorales (Figure 2). Puisque ces cellules dépendent des androgènes pour survivre, les patients subissent alors une thérapie anti-androgénique afin d'induire une mort cellulaire, ce qui se traduit par une baisse substantielle de l'APS sanguin. Malheureusement, cette hormono-thérapie demeure essentiellement palliative car le cancer progresse dans une proportion significative des cas vers un stade métastatique et hormono-réfractaire [54]. À ce niveau, les options thérapeutiques curatives sont inexistantes, ce qui explique le haut taux de mortalité du cancer de la prostate. Les prochains paragraphes décriront en détails l'histoire naturelle du cancer de la prostate afin de mieux comprendre les grands enjeux auxquels font face la médecine et la recherche uro-oncologique d'aujourd'hui.

### 1.3.1 Le diagnostic

Le cancer de la prostate localisé à l'intérieur de la capsule prostatique est généralement asymptomatique puisque la majorité des tumeurs se développe dans la zone périphérique derrière l'urètre [55]. Seul les cancers localement avancés ou métastatiques peuvent causer des symptômes allant de problèmes urinaires à des douleurs osseuses ou de l'anémie. Heureusement, l'utilisation du toucher rectal (TR) et la mesure du niveau sanguin de l'APS permettent de suspecter la présence d'une tumeur qui est, la plupart du temps, à un stade asymptomatique. La zone périphérique de la prostate se trouvant en avant du rectum, le TR permet de palper la prostate et d'identifier une excroissance tumorale. Suite à un TR anormal, une biopsie de la prostate est fortement recommandée même si le niveau d'APS est normal parce qu'environ 25% des hommes dans cette situation sont réellement atteints d'un cancer. Par contre, le TR détecte des cancers à un stade plus avancé que l'APS. Ainsi, à l'époque où le TR était la seule méthode de détection, 75% des hommes diagnostiqués mouraient du cancer. Au milieu des années 1980, la découverte de

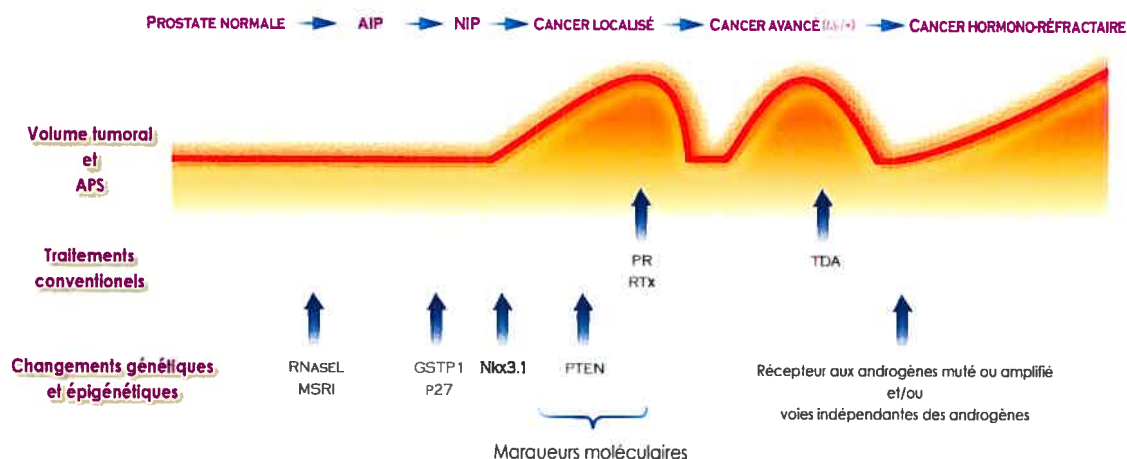


Figure 2. Pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate (inspiré de [56])

Le développement du cancer de la prostate est précédé de 2 stades précurseurs appelés atrophie inflammatoire proliférative (AIP) et néoplasie intra-épithéliale prostatique (NIP). L'AIP se situe principalement dans la zone périphérique de la prostate où la NIP et le cancer se développent. Elle serait le résultat d'une accumulation de dommages oxydants due à une inflammation récurrente ou chronique. Les gènes RnaseL et MSR-1, dont certaines mutations sont associées à un risque élevé de développer un cancer de la prostate, sont impliqués dans le processus inflammatoire et une atténuation de leur fonction pourraient promouvoir le développement de l'AIP. Par la suite, d'autres changements incluant l'hyperméthylation du gène GSTP1 et la sous-expression de l'inhibiteur de cycline p27 favorisait l'apparition de NIP. La NIP est officiellement reconnue comme le stade pré-invasif du cancer de la prostate et sa présence dans les biopsies prostatiques est un marqueur hautement prédictif de cancer. Il s'agit d'une prolifération anormale de cellules épithéliales à l'intérieur des acini prostatiques. D'un point de vue diagnostique, l'AIP et la NIP sont indétectables cliniquement et n'élèvent pas le niveau sanguin de l'APS. Seul le cancer de la prostate module l'APS à la hausse. L'adénocarcinome de la prostate est caractérisé par une panoplie de changements moléculaires dont une absence fréquente des gènes Nkx3.1 et PTEN. Le cancer localisé à l'intérieur de la prostate peut être efficacement traité par prostatectomie radicale (PR) ou radiothérapie (RTx), ce qui fait baisser le taux sanguin de l'APS. C'est à ce niveau que plusieurs marqueurs moléculaires sont à l'étude afin de prédire une rechute biochimique (hausse de l'APS) et le développement de cancer avancé avec ou sans évidence de métastases (M+/-). Lors d'une rechute, le patient subi une thérapie de déplétion des androgènes (TDA) qui a pour but de tuer les cellules cancéreuses prostatiques dépendantes des androgènes pour leur survie. Après une période de rémission où le niveau d'APS régresse, le cancer ré-apparaît sous une forme indépendante des androgènes et généralement métastatique. Cette résistance est due à des mutations ou à l'amplification du récepteur aux androgènes (RA) et/ou à l'activation de voies indépendantes des androgènes. À ce niveau, il n'existe pas de traitement curatif. La chimiothérapie peut, dans certains cas, aider à contrôler la croissance du volume tumoral sur une courte période, mais le cancer reprend rapidement le dessus.

l'APS a révolutionné la médecine uro-oncologique. Normalement, une faible concentration (0-4 ng/ml) de cette protéase sécrétée par les cellules épithéliales de la prostate (voir section 1.1.4) se retrouve dans la circulation sanguine. Cependant, lorsqu'une tumeur se développe, l'augmentation de la masse tumorale combinée à l'effondrement de l'architecture glandulaire provoquent une diffusion accrue de l'APS à l'intérieur du tissu prostatique et des vaisseaux sanguins environnants. Par conséquent, un taux d'APS sanguin supérieur à 4 ng/ml laisse présager la présence d'une tumeur prostatique et justifie la pratique d'une biopsie. D'ailleurs, la probabilité de diagnostiquer un cancer par biopsie est de 1 sur 8 pour un taux d'APS inférieur à 4 ng/ml, 1 sur 3 pour un APS entre 4 et 10 ng/ml, et au moins 1 sur 2 pour un niveau d'APS supérieur à 10 ng/ml. De plus, contrairement au TR, l'APS permet de détecter des tumeurs à un stade plus précoce (voir section 1.2.3.3). Le dépistage du cancer à l'aide de l'APS est aussi responsable de l'augmentation importante du nombre de patients diagnostiqués à la fin des années 1980. Actuellement, la combinaison du TR et de l'APS est la méthode la plus efficace pour détecter un maximum de tumeurs.

### 1.3.2 La stadification

La stadification du cancer de la prostate utilise le système de classification TNM (T pour tumeur, N pour ganglions régionaux et M pour métastases à distance; Tableau 1; [55]). Une tumeur de stade T1 est, par définition, non-palpable et indétectable par imagerie. Alors que les tumeurs classées dans les sous-groupes T1a et T1b sont découvertes par hasard lors d'une résection trans-urétrale (ex.: pour le traitement de l'HBP), les tumeurs de stade T1c sont identifiées suite à une biopsie effectuée en raison d'une élévation de l'APS sanguin. Les tumeurs localisées à la prostate mais palpables par TR sont au stade T2. La masse peut envahir la moitié d'un lobe prostatique (T2a), plus de la moitié d'un lobe (T2b), ou les deux lobes (T2c). Les stades considérés comme localement avancés sont les stades T3 et T4. Au stade T3, le cancer s'étend au-delà de la capsule prostatique dans un (T3a) ou deux lobes (T3b),

TNM	Description
T1	Tumeur non-palpable, invisible par imagerie
T1a	Tumeur trouvée fortuitement lors d'une résection trans-urétrale; <5% du tissu réséqué
T1b	Tumeur trouvée fortuitement lors d'une résection trans-urétrale; >5% du tissu réséqué
T1c	Tumeur identifiée sur biopsie effectuée à cause d'une élévation de l'APS
T2	Tumeur palpable confinée à la prostate
T2a	Tumeur présente sur la moitié d'un lobe ou moins
T2b	Tumeur présente sur plus de la moitié d'un lobe, mais pas deux lobes
T2c	Tumeur présente sur les 2 lobes
T3	Tumeur palpable s'étendant à la capsule prostatique et/ou les vésicules
T3a	Extension extracapsulaire unilatérale
T3b	Extension extracapsulaire bilatérale
T3c	Invasion des vésicules séminales
T4	Tumeur fixée ou envahissant des structures adjacentes autres que les vésicules séminales
T4a	Tumeur envahissant le col de la vessie et/ou le sphincter externe et/ou le
T4b	Tumeur envahissant les muscles releveurs et/ou fixée au mur pelvien
N1	Métastase dans un ganglion pelvien ( $\leq 2$ cm)
N2	Métastase dans un ganglion pelvien ( $\geq 2$ cm mais $\leq 5$ cm) ou plusieurs ganglions pelviens $\leq 5$ cm
N3	Métastase dans un ganglion pelvien ( $> 5$ cm)
M1	Métastases à distance
M1a	Ganglions non-régionaux
M1b	Métastases osseuses
M1c	Métastases à d'autres sites

**Tableau 1. Stadification du cancer de la prostate d'après [55]**



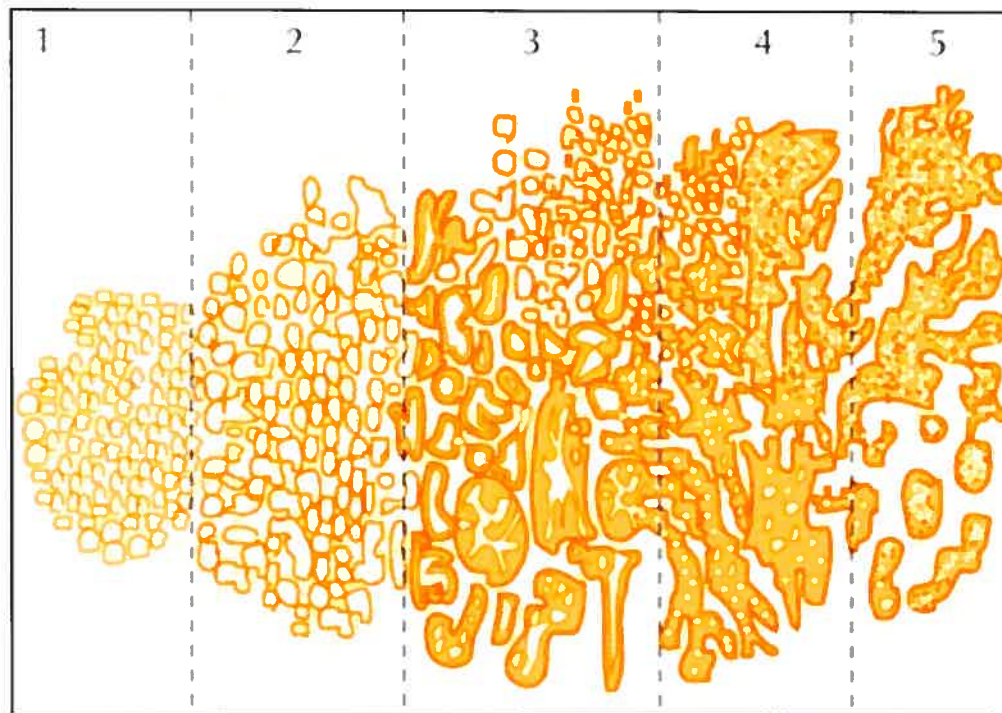
et peut aussi atteindre les vésicules séminales (T3c). Enfin, une tumeur de stade T4 envahit des structures autres que les vésicules séminales comme le col de la vessie et le rectum. Pour leur part, les lettres N et M représentent respectivement une atteinte métastatique aux ganglions pelviens et la présence de métastases à distance (M), le plus souvent atteignant les os. Un cancer métastatique est automatiquement qualifié de cancer avancé même si la tumeur primaire est de stade T1 ou T2.

Il existe deux niveaux de stadification tumorale: le stade clinique et le stade pathologique. Le stade clinique est déterminé à l'aide du TR et des techniques d'imagerie. Le stade pathologique, quant à lui, correspond au stade post-chirurgie lorsqu'un patient est traité par chirurgie (voir section 1.2.3.6). Ce stade est plus utile pour prédire l'évolution subséquente du cancer parce qu'il représente de façon plus juste l'étendue de la maladie. En effet, il permet d'évaluer histologiquement le volume tumoral réel, la présence de marges chirurgicales positives, l'envahissement extraprostatique et l'atteinte des vésicules séminales et des ganglions pelviens.

### 1.3.3 Le grade histologique

Les tumeurs prostatiques sont aussi caractérisées par leur degré de différenciation histologique qui corrèle positivement avec leur agressivité. Une tumeur bien différenciée possède une architecture tissulaire se rapprochant des glandes normales alors qu'une tumeur pauvrement différenciée perd toute ressemblance avec le patron glandulaire normal. En 1966, Donald F. Gleason a établi un système de gradation se basant strictement sur cette architecture tumorale sans tenir compte des aspects cytologiques comme l'index mitotique ou la morphologie nucléaire [57]. Ce système reconnaît 5 patrons architecturaux, ou grades histologiques, pouvant être adoptés par les tumeurs prostatiques (Figure 3). Ainsi, une tumeur de grade 1 est bien différenciée alors qu'une tumeur de grade 5 est pauvrement différenciée. Gleason a toutefois remarqué que les tumeurs étaient, pour la plupart, composées de grades contigus et que l'agressivité des tumeurs corrélait avec la somme des grades primaire et secondaire. Le score de Gleason s'obtient donc en additionnant les deux

patrons les plus fréquents, ce qui résulte en des valeurs de 2 à 10. Classiquement, ce système permettait de classer les tumeurs en trois groupes soit les tumeurs bien (Gleason 2-4), modérément (Gleason 5-7) et pauvrement (Gleason 8-10) différenciées. Cependant, des études récentes suggèrent que les tumeurs de Gleason 7 formeraient un groupe distinct parce qu'elle se comportent de façon moins prévisible que les Gleason 5 et 6 [58]. Avant l'arrivée du test d'APS, la majorité des tumeurs diagnostiquées étaient de stade et de grade plus élevés qu'aujourd'hui[55].



**Figure 3. Grades histologiques du cancer de la prostate (adapté de [www.images.md](http://www.images.md)) .  
Les chiffres (1 à 5) représentent les grades de Gleason**

### 1.3.4 Les marqueurs cliniques et les traitements

Actuellement, le niveau sanguin d'APS, le stade clinique et le score de Gleason sur biopsie d'un cancer sont les trois marqueurs cliniques utilisés pour prédire le stade pathologique et, par conséquent, choisir l'approche thérapeutique appropriée [59]. À cet effet, il existe quelques systèmes d'évaluation du risque basés sur ces marqueurs. Celui du Memorial Sloan-Kettering utilise 3 facteurs de risque: un APS > 10 ng/ml, un stade clinique > T2b et un score de Gleason > 6. La présence de ces trois facteurs est associée à un haut risque d'avoir une tumeur localement avancée (T3-T4). De leur côté, Partin et al. ont mis au point en 1997 une table permettant de déterminer si une tumeur est à un stade pathologique localisé ou avancé [60]. Cet algorithme tient compte des valeurs prédictives de ces trois marqueurs pour en arriver à une estimation probabilistique du stade pathologique.

Une fois le stade pathologique estimé, le clinicien et le patient décident de l'option thérapeutique à sélectionner en fonction de l'âge et de la santé du patient. Au niveau d'un cancer localisé (T1-T2), ils peuvent choisir entre l'attente attentive (Watchful Waiting (WW)), la surveillance active (SA), la prostatectomie radicale (PR) ou la radiothérapie (RTx) [59]. Le WW est envisageable pour les patients âgés et/ou malades dont l'espérance de vie est inférieure au risque de mourir du cancer de la prostate [61]. Dans le cas peu probable d'une progression vers un cancer avancé, ces patients reçoivent une thérapie palliative comme la thérapie de privation des androgènes (TPA, voir plus bas). Pour sa part, la SA est plus agressive que le WW et s'adresse aux patients à faible risque de progression (APS < 10 ng/ml, stade T1c ou T2a et score de Gleason  $\leq$  6) [59, 61]. Cette surveillance utilise le temps de doublement (TD) de l'APS comme indicateur de croissance tumorale et parfois implique une re-biopsie pour déterminer si le grade devient plus agressif. Lorsqu'il y a évidence de changement d'agressivité, les patients deviennent candidats à une intervention plus radicale comme la chirurgie ou la radiation. Par ailleurs, il est important de noter que la SA est en cours d'évaluation dans des études randomisées.

Au contraire, la prostatectomie radicale (PR) et la radiothérapie (RTx) sont des options efficaces reconnues pour traiter le cancer de la prostate localisé (T1-T2). Dans les deux cas, le risque de rechute biochimique après 5 ans est faible et le taux de survie après 10-15 ans est élevé [62, 63]. Le choix d'une approche aux dépens d'une autre repose surtout sur l'expertise disponible et la perception du patient face aux effets secondaires. La PR consiste en une ablation totale de la prostate et des vésicules séminales. La RTx, quant à elle, cible la prostate, les vésicules séminales et parfois les ganglions pelviens (radiothérapie externe). Elle peut être donnée à partir d'un faisceau externe ou par brachythérapie qui consiste en l'insertion de minuscules billes radioactives dans le tissu prostatique. D'un point de vue pathologique, la PR est plus avantageuse que la RTx parce qu'elle donne l'image exacte du stade et du grade histologique de la tumeur et permet une évaluation plus exacte du pronostic. D'autres thérapies ont aussi été développées pour soigner un cancer localisé dont la cryothérapie et, plus récemment, la thérapie photodynamique et la thérapie à ultrasons [59]. Ces approches semblent donner des résultats intéressants mais tardent à être adoptées par les centres hospitaliers à cause du manque d'expertise et/ou du manque de données cliniques sur les bienfaits à long terme.

La prise en charge thérapeutique est différente lorsqu'un cancer localement avancé (T3-T4) est suspecté. D'abord, la PR est rarement employée parce qu'elle ne permet pas d'éliminer le tissu cancéreux extra-prostatique. La RTx en combinaison avec la TPA est actuellement le traitement standard pour les cancers localement avancés [64]. Ceci est basé sur des études prospectives et randomisées qui ont démontré un avantage de survie par rapport à la RTx seule. Dans le cas où un cancer localement avancé ou avancé (N+) est diagnostiqué après la PR, la TPA et/ou la RTx sont aussi les deux options de thérapies adjuvantes offertes aux patients [59].

Le traitement d'un cancer localisé (T1-T2) par PR ou RTx échoue dans environ 35% des cas [65]. Ceci se traduit par une augmentation de l'APS sanguin, dite rechute biochimique, trahissant la réapparition de cellules cancéreuses prostatiques. Il peut s'agir d'une récurrence locale ou d'une récurrence systémique laissant présager la

présence de métastases à distance. Dans cette situation, le principal traitement est la TPA [66]. Cette approche implique l'utilisation d'un analogue de la LHRH avec ou sans anti-androgène (ex.: Casodex) afin d'inhiber la prolifération et la survie des cellules prostatiques. L'anti-androgène se lie directement au RA alors que l'analogue de la LHRH bloque la sécrétion de LHRH et, subséquemment, la production de testostérone et de DHT. La baisse de prolifération et la mort des cellules cancéreuses dépendantes des androgènes provoquent une baisse de l'APS qui peut persister plusieurs mois. Étant donné les nombreux effets secondaires comme les bouffées de chaleur, la dysfonction érectile et la perte de masse osseuse, la TPA peut être administrée de façon intermittente en suivant les oscillations du niveau d'APS. En présence de cancer métastatique, malgré une réponse initiale favorable, les patients vont généralement développer dans les 14 à 20 mois un cancer réfractaire à la TPA communément appelé cancer hormono-réfractaire [66]. Ceci s'explique par la sélection de cellules cancéreuses androgéno-indépendantes capable de proliférer et de survivre dans des conditions qui sont normalement contraignantes.

Le traitement du cancer de la prostate hormono-réfractaire est strictement palliatif et vise à ralentir le développement de complications liées aux métastases osseuses [67]. Des agents comme l'aminoglutéthimide et le kétoconazole éliminent la testostérone résiduelle produite par les glandes surrénales qui pourrait favoriser la survie des cellules cancéreuses. La RTx ou l'injection intraveineuse de molécules radioactives comme le strontium ou le samarium permet de soulager la douleur intense causée par les métastases. Les biphosphanates, dont fait partie l'acide zolédronique, sont aussi efficaces pour contrôler la douleur mais sont d'abord reconnus pour diminuer le risque de complications osseuses (fractures) lié aux métastases et à la perte de densité osseuse. Seul le docetaxel, un agent chimiothérapeutique ciblant les microtubules, prolonge de manière significative la survie des patients [68]. Cet agent est devenu le traitement standard administré aux patients aux prises avec un cancer de la prostate hormono-réfractaire métastatique. D'autres essais cliniques sont en cours afin de mesurer l'efficacité du docetaxel en combinaison avec de nouveaux agents

thérapeutiques ciblant, entre autres, des récepteurs de facteurs de croissance et le processus angiogénique.

## 1.4 Pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate

### 1.4.1 Conditions pré-néoplasiques

Le processus de transformation d'un tissu prostatique normal à un tissu cancéreux serait entrecoupé de deux stades précurseurs. Au départ, l'accumulation de dommages oxydants causés par une inflammation récurrente ou chronique provoquerait l'apparition d'une "atrophie inflammatoire proliférative" (AIP) des glandes prostatiques [21, 69]. Ces lésions sont qualifiées d'inflammatoires parce qu'elles sont presque toujours accompagnées d'infiltrations de lymphocytes et de macrophages. L'atrophie proliférative s'expliquerait par une perte cellulaire causée par le stress oxydant accompagnant l'inflammation combinée à une régénération active pour combler cette perte. Même s'il n'existe pas de preuve irréfutable liant l'inflammation au cancer de la prostate, certaines caractéristiques de l'AIP vont dans ce sens. D'abord, l'AIP se développerait majoritairement dans la zone périphérique de la prostate où se développent aussi les adénocarcinomes [11]. De plus, le patron d'expression de marqueurs de prolifération et d'apoptose ressemble à celui du cancer. Par exemple, l'AIP et l'adénocarcinome expriment des niveaux élevés de Ki-67 et de Bcl-2 comparativement au tissu normal adjacent, et un faible niveau de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 [70]. Les lésions atrophiques expriment aussi une quantité accrue de l'enzyme COX-2 [71]. Ce dernier est la cible des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) qui sont reconnus pour abaisser le risque de développer un cancer de la prostate. D'un point de vue génétique, on retrouve dans l'AIP des pertes et des gains dans le chromosome 8 [72], des mutations dans le gène p53 [73], et dans quelques cas une hyperméthylation du promoteur du gène *GSTP1* [74] qui sont des événements aussi détectés dans le cancer de la prostate. Par ailleurs, l'établissement de l'AIP en tant que précurseur du cancer de la prostate expliquerait la présence de nombreux facteurs de risques du cancer qui ont un lien dans le processus

inflammatoire (voir section 1.2.2.3). Entre autres, des mutations ou des polymorphismes dans les gènes *RnaseL*, *MSR-1* et *GSTP1* pourraient influencer le développement du cancer en favorisant l'apparition d'AIP. De la même façon, une alimentation faible en molécules anti-oxydantes amplifierait les effets néfastes de l'inflammation et la formation d'AIP. Enfin, même si aucune étude n'a jusqu'à présent montré que la présence d'AIP avait une quelconque valeur prédictive par rapport au cancer de la prostate, Putzi et De Marzo ont observé qu'environ 40% des lésions atrophiques étaient fusionnées à de la néoplasie intra-épithéliale prostatique (NIP) qui, elle, est un marqueur pronostique hautement prédictif [75]. Cependant, ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres groupes [76].

La NIP se caractérise par une prolifération anormale des cellules épithéliales à l'intérieur des acini prostatiques accompagnée d'une rupture progressive de la couche de cellules basales, sans toutefois envahir le stroma [77]. Elle se divise en deux grades distincts, soit la NIP de bas grade et la NIP de haut grade. Seul la NIP de haut grade est rapportée lors d'une évaluation pathologique car la NIP de bas grade ne semble pas avoir un comportement différent de celui des glandes normales. La NIP est considérée comme le précurseur de l'adénocarcinome prostatique à cause de son incidence, sa valeur pronostique, ses altérations moléculaires et son omniprésence dans les modèles animaux du cancer de la prostate [77]. Tout d'abord, la NIP se développe aussi dans la zone périphérique de la prostate et son incidence augmente avec l'âge [78]. D'ailleurs, il semble qu'elle précède d'environ 10 ans l'apparition du cancer et, comme ce dernier, elle est plus fréquente chez les Afro-Américains que chez les Caucasiens [79]. La NIP de haut grade est souvent retrouvée à proximité de tissus cancéreux et, lorsqu'elle est diagnostiquée sur des biopsies non cancéreuses, le risque de découvrir un cancer dans les biopsies subséquentes augmente substantiellement [80]. Moléculairement, la NIP présente des altérations similaires à l'AIP et/ou au cancer. Le promoteur du gène de *GSTP1* est hyperméthylé dans environ 70% des cas [74]. Il y a de fréquentes pertes ou amplifications d'allèles des chromosomes 8 et 10 [81, 82], une sous-expression de p27 [83] et une disparition des marqueurs de différenciation sécrétoire [84]. Plusieurs protéines sont aussi sur-

exprimées par rapport aux glandes normales dont Bcl-2 [85], Her-2 [86] et Ki-67 [87], alors que p53 est mutée dans un certain nombre de cas [88]. Qui plus est, l'expression de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, bFGF) et la haute densité des microvaisseaux sanguins entourant la NIP s'apparentent au cancer [89]. Finalement, la présence de NIP dans les modèles murins du cancer de la prostate (voir section 1.4.3) renforce la théorie d'une progression de la NIP vers l'adénocarcinome.

L'AIP et la NIP sont strictement détectées histologiquement et sont indécélables cliniquement parce qu'elles ne modifient pas significativement le volume de la prostate et ne sont pas associées à une élévation de l'APS sanguin (Figure 2;[77]), en opposition à l'adénocarcinome prostatique.

#### 1.4.2 Les lignées cellulaires du cancer de la prostate

Les mécanismes moléculaires soupçonnés d'être impliqués dans la progression du cancer de la prostate ont, pour la grande majorité, été identifiés à l'aide de lignées cellulaires (Tableau 2; [90-92]). Les 3 lignées humaines les plus utilisées sont la LNCaP, la PC-3, et la DU145 qui ont toutes été dérivées de métastases soit aux ganglions (LNCaP), à la colonne vertébrale (PC-3) ou au cerveau (DU145). Contrairement aux tumeurs métastatiques, il est extrêmement difficile de générer des cultures cellulaires primaires provenant directement de la tumeur d'origine ou d'un tissu normal. Les lignées existantes ont plutôt été obtenues indirectement à la suite d'une série de xénogreffes chez la souris (ex.: LAPC-4, 22Rv1) ou de transfections de gènes immortalisants comme la télomérase (RC-58T/hTERT) et HPV-18 (RWPE-1).

Les cellules PC-3 et DU145 sont androgéno-indépendantes et s'apparentent donc au cancer de la prostate hormono-réfractaire. Les cellules LNCaP, au contraire, sont androgéno-sensibles et sont généralement utilisées pour étudier les mécanismes associés au cancer androgéno-dépendant et/ou pour caractériser les événements moléculaires jouant un rôle dans la progression vers un cancer hormono-réfractaire. À cet effet, plusieurs sous-lignées androgéno-indépendantes de LNCaP ont été



obtenues suite à des xénogreffes successives sur des souris castrées [91]. Il existe aussi des lignées androgéno-indépendantes mais qui répondent tout de même à une stimulation androgénique. Par exemple, les cellules 22rv1, elles aussi dérivées de xénogreffes de cellules CWR22R dans des souris castrées, prolifèrent et survivent aisément en l'absence d'androgènes. Par contre, contrairement aux cellules PC-3 et DU145, elles sont sensibles à la DHT.

Lignées cellulaires	Origine	Formation de tumeurs <i>in vivo</i>	Expression du RA	Sensibilité à l'androgène
LNCaP	Métastase ganglionnaire	Oui	+	AD
PC-3	Métastase osseuse	Oui	-	AI
DU145	Métastase au cerveau	Oui	-	AI
LAPC-4	Xénogreffe de tumeur primaire	Oui	+	AD
22rv1	Xénogreffe de tumeur primaire dans souris castrées	Oui	+	AI/AS
RC-58T/hTERT	Culture primaire de cellules tumorales immortalisées avec la télomérase	Non	-	AI
RC-58T/hTERT SA#4	Culture primaire de cellules tumorales immortalisées avec la télomérase: sous-clone isolé d'une culture en agar mou	Oui	+	AI/AS
RWPE-1	Cellules de prostate normale immortalisées avec HPV-18	Non	+	AI/AS

**Tableau 2. Lignées cellulaires du cancer de la prostate. AD: androgéno-dépendante; AI: androgéno-indépendante; AS: androgéno-sensible [90-92]**

### 1.4.3 Modèles murins du cancer de la prostate

Plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées ont aussi été créés afin d'élucider la pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate (Tableau 3; [93]). Il s'agit de souris transgéniques, "knockout" (KO), ou multigéniques. Certains modèles tentent de reproduire les altérations moléculaires identifiées dans les cellules et/ou tumeurs prostatiques humaines, alors que d'autres visent d'abord à transformer le tissu prostatique pour ensuite caractériser les changements moléculaires sous-jacents. Malheureusement, les modèles ne reflètent, pour la majorité, que partiellement la pathogénèse du cancer. En effet, la plupart des souris présentent des lésions pré-

Modèle	NIP de haut grade	Adénocarcinome invasif	Métastases
<i>Transgénèse avec promoteur probasin (PB)</i>			
PB-mAR	Oui	Non	Non
PB-EcoRI	Oui	Oui	Non
PB-RAS His273	Oui	Non	Non
PB-Large-T/small-t (TRAMP)	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
PB-Large-T/small-t (rat)	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
PB-MPAKT	Oui	Non	Non
Lo-Myc	Oui	Oui	Non
Hi-Myc	Oui	Oui	Non
ARR2PB-FGF8b	Oui	Non	Non
ARR2PB-SKP2	Oui	Non	Non
Modèle Lady 12T-7f	Oui	Oui	Non
Modèle Lady 12T-10	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
ARR2PB-TgAPT121	Oui	Oui	Oui
PB-Neu	Oui	Oui	Non
<i>Transgénèse avec d'autres promoteurs</i>			
BK5-IGF1	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
C3(1)-Polyoma virus middle T	Oui	Oui	Non
C3(1)-SV40 Large-T/small-t	Oui	Oui	Non
Cryptdin 2-SV40 Large-T/small-t	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
Fetal gamma globin-SV40 Large-T/small-t	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
gp91-phox-SV40 Large-T/small-t	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
PSP94-SV40 Large-T/small-t	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
<i>Ablations génétiques</i>			
PB-Cre4 x RXRalpha f/f	Oui	Non	Non
PB-Cre4 x PTEN loxp/loxp	Oui	Oui	Oui
MMTV-Cre4 x PTEN loxp/loxp	Oui	Oui	Non
<i>Modèles bigéniques</i>			
Lady 12T-7 x ARR2PB-hepsin	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
PTEN+/- x p27 -/-	Oui	Oui	Non
PTEN +/- x Nkx3.1 -/-	Oui	Oui	Non
PTEN +/- x TRAMP	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
TRAMP x FGF2-/-	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
Lady 12T-7 x MT-DNIIR (TGF-bR DN)	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)
Lady 12T-10 x MT-DNIIR (TGF-bR DN)	Oui	Oui	Oui (Neuroendocriniennes)

**Tableau 3. Modèles murins du cancer de la prostate.** Les modèles énumérés dans le tableau développent, pour la plupart, des adénocarcinomes invasifs. Une liste exhaustive de tous les modèles murins est disponible en [93].

néoplasiques ressemblant à la NIP de bas grade et/ou de haut grade, mais seul un nombre limité développe subséquemment des tumeurs invasives et métastatiques. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer ces résultats. D'abord, l'environnement prostatique murin pourrait ne pas être permissif à la transformation tumorale puisque les souris vieillissantes ne développent pas de cancer sporadique de la prostate. En second lieu, la progression tumorale nécessiterait une série de changements génétiques et épigénétiques encore inconnus ou qui ne sont pas présents dans les modèles ciblant un seul gène. Enfin, de manière plus spécifique, le choix du promoteur contrôlant l'expression d'un transgène affecterait aussi le phénotype des souris transgéniques. Un des promoteurs les plus utilisés pour obtenir une expression spécifique à la prostate est celui du gène *probasin* du rat (PB; [94]) ainsi que ses dérivés (Lo-PB, Hi-PB) pouvant générer différents niveaux d'expression.

Parmi les quelques modèles transgéniques développant des adénocarcinomes prostatiques, ceux qui expriment les antigènes grand-T et petit-T du virus SV40 sont les plus agressifs [93]. Les tumeurs des souris TRAMP [95], Cryptdin 2-SV40 [96], Fetal gamma globin-SV40 [97], gp91-phox-SV40 [98] et PSP94-SV40 [99] progressent toutes vers un stade métastatique à l'intérieur de 12 mois. Le modèle Lady, qui ne possède que l'antigène grand-T, a un phénotype plus variable [100]. La lignée Lady 12T-7f développe rapidement des tumeurs invasives sans évidence de métastases, alors que la lignée Lady 12T-10 progresse plus lentement mais présente des métastases à distance. Tous ces modèles sont associés à une différenciation neuroendocrinienne de la tumeur primaire et des métastases. Dans les tumeurs humaines, cette différenciation n'est observée que focalement mais pourrait jouer un rôle dans la progression de la maladie. Par ailleurs, suite à une castration, les modèles exprimant grand-T et petit-T se comportent de façon similaire aux tumeurs humaines [93]. Ainsi, après une période de régression, les tumeurs recommencent à croître de manière androgéno-indépendante comme dans le cancer hormono-réfractaire. Ces modèles représentent donc des outils importants pour mieux comprendre le cancer de la prostate et tester de nouvelles thérapies. Cependant, le défi actuel est de vérifier si

les changements moléculaires induits par grand-T et petit-T se retrouvent dans les tumeurs humaines.

Un certain nombre de modèles murins ciblant spécifiquement des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur atteignent aussi le stade du carcinome invasif. [93] Les souris transgéniques BK5-IGF1 [101], Lo-myc et Hi-myc [102], PB-Neu (Her-2 activé; [103]), TgAPT<sub>121</sub> (antigène grand-T muté liant Rb, p107 et p130 mais incapable de lier p53; [104]) et PB-AR-E231G (RA muté dans une région liant des co-facteurs; [105]) font partie de ce groupe, ainsi que les souris avec un KO prostate-spécifique pour le gène PTEN (PB-Cre4 x PTEN<sup>loxp/loxp</sup>; [106]). Les tumeurs des souris BK5-IGF1 présentent un phénotype semblable à celui des souris exprimant les antigènes grand-T et petit-T étant donné la différenciation neuroendocrinienne prononcée et le développement de métastases. Au contraire, les adénocarcinomes des souris Lo-/Hi-myc, PB-Neu et TgAPT<sub>121</sub> sont à prédominance épithéliale mais restent localisés à la prostate. Jusqu'à présent, les 2 modèles qui se rapprochent le plus du cancer humain sont les souris PB-AR-E231G et PB-Cre4 x PTEN<sup>loxp/loxp</sup>. Dans les deux cas, les tumeurs sont d'origine épithéliale et progressent vers un stade métastatique. De plus, en absence d'androgène, les tumeurs PTEN<sup>-/-</sup> ne régressent que partiellement suggérant une capacité à survivre de manière androgéno-indépendante. Enfin, le croisement de souris hétérozygotes (+/-) pour PTEN avec d'autres modèles qui, à eux seuls, ne développent que de la NIP de bas grade, permet d'évaluer la contribution de ces gènes dans la progression de la maladie. Par exemple, les souris bigéniques combinant la perte d'un allèle de PTEN avec la perte de 2 allèles de p27<sup>KIP</sup> ou NKx3.1 développent des adénocarcinomes invasifs alors qu'individuellement, les souris PTEN<sup>+/-</sup>, p27<sup>KIP</sup><sup>-/-</sup>, et NKx3.1<sup>-/-</sup> ne montrent que de légères altérations morphologiques pré-néoplasiques [107-110]. Ces résultats appuient la théorie selon laquelle plusieurs mutations seraient nécessaires pour développer un carcinome invasif.

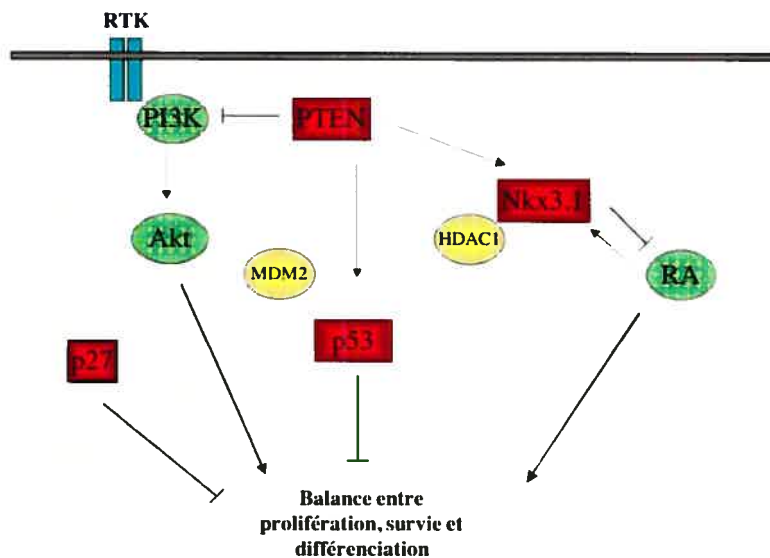
#### 1.4.4 Biologie moléculaire du cancer de la prostate

Les recherches effectuées sur les tissus humains, les lignées cellulaires et les modèles murins ont permis de faire ressortir certains événements moléculaires impliqués dans le développement et la progression du cancer de la prostate. Il est toutefois difficile d'assigner la plupart de ces modifications génétiques et épigénétiques à une étape précise du processus de transformation parce qu'elles varient souvent d'un cancer à l'autre.

##### 1.4.4.1 Altérations moléculaires dans le cancer de la prostate localisé

Les altérations les plus fréquentes et les mieux comprises impliquent le gène homéoboîte NKx3.1, l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>KIP</sup> et la phosphatase PTEN. Le gène NKx3.1, impliqué dans le développement de la prostate [4], se situe dans la région chromosomale 8p qui est souvent associée à une perte d'hétérozygotie dans la NIP et le cancer de la prostate [111]. Ce facteur homéoboîte aurait de multiples rôles dont la stabilisation de p53 et la répression de l'activité transcriptionnelle du RA [112]. Son absence pourrait donc promouvoir la survie et la prolifération cellulaire. Pour sa part, la diminution de l'expression de p27<sup>KIP</sup> favoriserait l'entrée en phase S du cycle cellulaire médiée par le complexe cycline E/CDK2 [113]. En amont de NKx3.1 et p27<sup>KIP</sup> se trouve PTEN, une phosphatase reconnue pour son rôle majeur dans l'inhibition de la voie de signalisation PI3K-Akt [114]. La perte d'hétérozygotie de la région 10q qui contient le gène de PTEN est détectée dans 30% des cancers localisés [115] et dans 63% des cancers métastatiques [116]. En présence de signaux émanant d'un récepteur de type tyrosine kinase, l'haploinsuffisance ou l'absence de PTEN provoquent une hyperactivation de la voie PI3K-Akt, la dégradation de p27<sup>KIP</sup> suite à sa phosphorylation par Akt, une baisse des niveaux de NKx3.1 par l'inhibition de sa transcription, une déstabilisation de p53 due à l'interaction avec MDM2 et HDAC1, ainsi qu'une augmentation de l'activité du RA (Figure 4; [112]). Les phénotypes observés dans les modèles murins étudiant la perte de PTEN et/ou

A)



B)

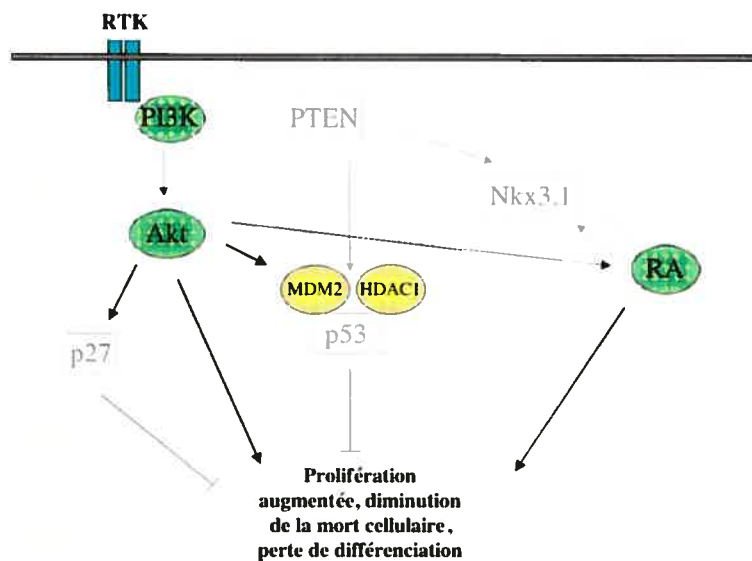


Figure 4. Altération de la voie PI3K-Akt dans le cancer de la prostate (modifié de [112])

A) Dans les cellules normales, la présence des suppresseurs de tumeur (en rouge) permet de contre-balancer les effets pro-prolifératif et anti-apoptotique de la voie PI3K-Akt

B) Dans les cellules tumorales, la perte d'un ou plusieurs suppresseurs de tumeurs favorise la prolifération et la survie médiée par la voie PI3K-Akt.

RTK: Récepteur(s) tyrosine kinase (ex.: récepteurs de la famille EGF)

NKx3.1 et p27<sup>KIP</sup> (section 1.4.3) supportent le rôle principal de PTEN et la complicité de NKx3.1 et p27<sup>KIP</sup> dans le contrôle de l'homéostasie prostatique.

D'autres altérations présentes dans le cancer de la prostate localisé incluent, entre autres, l'inactivation par hyperméthylation du gène glutathione-S-tranfèrase (GSTP1; jusqu'à 90% des tumeurs analysées; [117]), l'amplification de la région chromosomique 8q (c-Myc; [118]), les pertes d'hétérozygotie en régions 13q (Rb; [119]), 16q [118] et 10p (KLF-6; [120]), et la sur-expression de l'interleukine-6 (IL-6) et Her-2 [37]. L'impact de ces modifications sur la pathogénèse est toutefois moins bien compris que celui de l'axe PI3K-Akt-NKx3.1-p27<sup>KIP</sup> étant donné le manque d'étude fonctionnelle (ex.: GSTP1, KLF-6), la faible fréquence (ex.: Rb, Her-2) et l'hétérogénéité apparente des altérations. Malgré tout, la récente découverte d'une fusion chromosomique des oncogènes ERG ou ETV1 avec le gène androgéno-dépendant TMPRSS2 dans > 80% des tumeurs primaires analysées en ferait les premiers oncogènes dominants du cancer de la prostate [121]. L'absence de sur-expression de ERG et ETV1 dans la NIP suggère que ces translocations seraient impliquées dans les premiers stades du cancer localisé.

#### 1.4.4.2 Altérations moléculaires dans le cancer de la prostate métastatique

Le processus métastatique commence à l'intérieur même de la tumeur primaire. À ce niveau, les interactions entre les cellules stromales et épithéliales semblent jouer un rôle crucial [122]. L'expression de facteurs solubles comme bFGF, EGF, VEGF, TGF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  ainsi que leurs récepteurs par les deux types cellulaires stimulerait l'angiogénèse et/ou la transition épithéliale-mésenchymale (TEM). La TEM procure aux cellules tumorales un potentiel métastatique accru en augmentant leur motilité et leur capacité d'invasion et de migration [123]. Ceci se traduit, entre autres, par la perte de la protéine d'adhésion intercellulaire E-cadhérine et par la production élevée de métalloprotéinases qui dégradent la matrice extra-cellulaire [122]. L'expression d'autres molécules d'adhésion impliquées dans les interactions cellule-cellule, comme KAI-1 et CD44, est aussi diminuée dans les cancers métastatiques [37]. Le

suppresseur de tumeur p53, dont certaines mutations sont parfois détectées dans l'AIP, la NIP et le cancer localisé, influencerait principalement le potentiel métastatique des cellules cancéreuses [124]. En effet, la fréquence des mutations de p53 est plus faible que dans les autres cancers, mais lorsqu'elles sont présentes, elles sont fortement liées à la rechute biochimique et au développement de métastases [125, 126].

Les métastases du cancer de la prostate peuvent atteindre les ganglions pelviens entourant la prostate (N+) et/ou se propager à distance (M+) en se logeant dans les os, les poumons et le cerveau. En périphérie, les métastases osseuses sont les plus fréquentes et sont la principale cause de morbidité et de mortalité de la maladie car les traitements ne sont que palliatifs (section 1.3.4). Les événements moléculaires prenant part à ce processus ont été identifiés à l'aide de lignées cellulaires et de modèles murins [127]. Ces derniers sont surtout des modèles d'injection sous-cutanée, intra-prostatique, intraveineuse, ou intra-osseuse de cellules PC-3, LNCaP et leurs dérivés. Les souris génétiquement modifiées sont moins utilisées car la majorité des modèles métastatiques (section 1.4.3) développent peu ou pas de métastases osseuses. Cliniquement, les métastases osseuses du cancer de la prostate sont de type ostéoblastique car elles induisent la prolifération des ostéoblastes impliqués dans la formation de l'os [128]. Dans les modèles murins, certaines lignées cellulaires semblent aussi avoir des caractéristiques ostéoblastiques, alors que d'autres sont plutôt ostéolytiques parce qu'elles stimulent la prolifération des ostéoclastes responsables de la résorption osseuse. Malgré ces différences, certaines caractéristiques semblent être communes à toutes les cellules prostatiques capables de former des métastases osseuses. À prime abord, elles font preuve d'ostéo-mimétisme [122]. Ainsi, plusieurs protéines normalement exprimées par les cellules osseuses dont l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéoprotégérine, la PTHrP, RANK et RANKL sont aussi détectées dans les cellules prostatiques et favoriseraient leur implantation dans le micro-environnement osseux [129]. Les cellules métastatiques sont aussi stimulées par de nombreux facteurs de croissance présents dans la matrice osseuse comme le TGF- $\beta$ , l'IGF-1&2, le FGF, le PDGF, le BMP, et l'ET-1 [129]. L'ostéo-

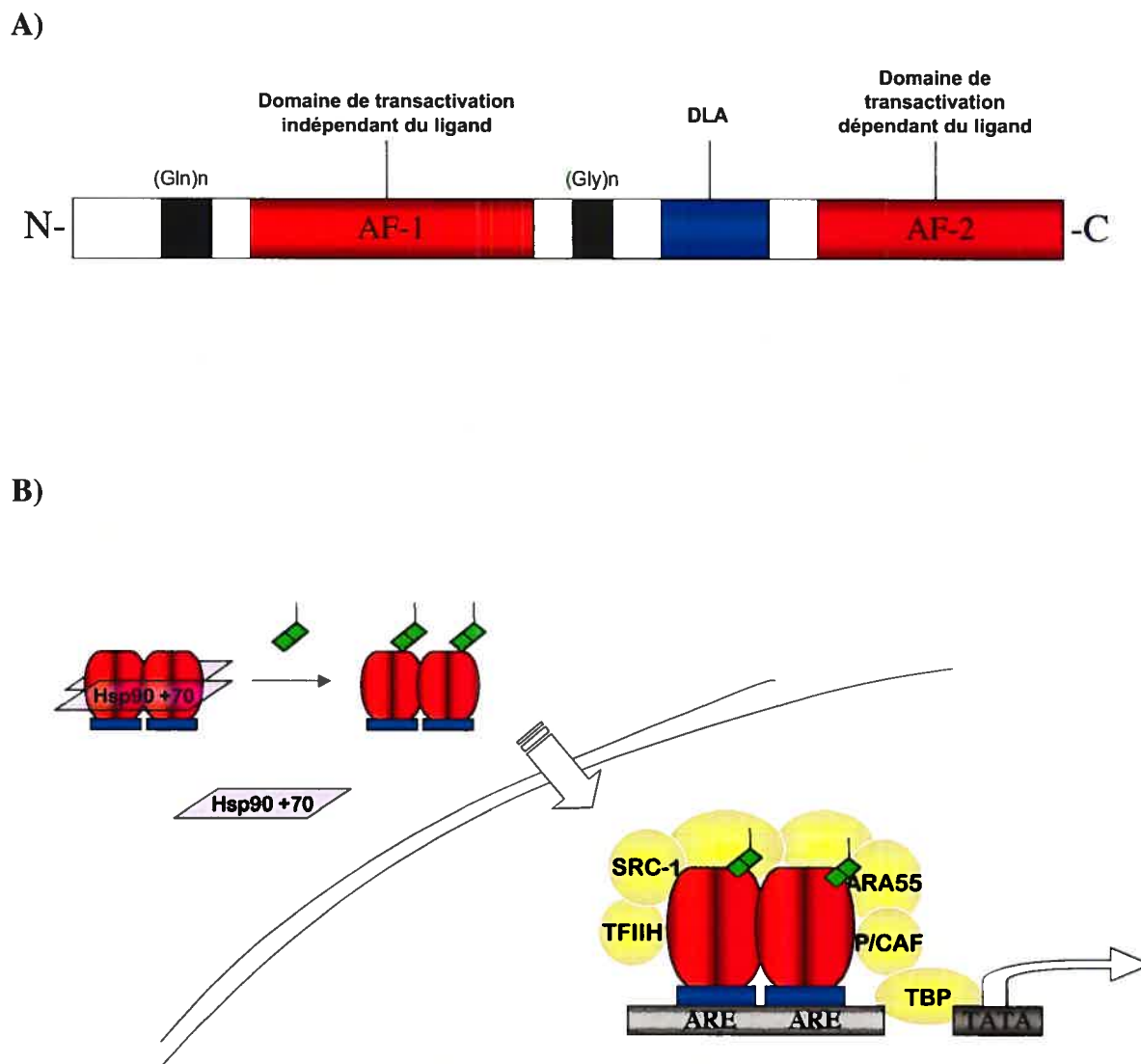


mimétisme des cellules cancéreuses et la complexité des interactions entre les métastases et l'environnement osseux rendent difficile le développement de médicaments efficaces ciblant spécifiquement les métastases. La TPA reste encore aujourd'hui l'approche thérapeutique qui retarde l'apparition de métastases et qui prolonge le plus la survie des patients atteints de cancers avancés [67].

#### 1.4.4.3 Altérations moléculaires dans le cancer de la prostate hormono-réfractaire

L'activité du RA est si essentielle à la prolifération et à la survie des cellules prostatiques que même les cellules cancéreuses conservent leur dépendance aux androgènes [15, 130]. La TPA prend avantage de cette propriété et permet une régression temporaire de la masse tumorale (section 1.3.4). En contrepartie, la TPA exerce aussi une sélection positive auprès de cellules cancéreuses ne dépendant pas de l'apport normal d'androgènes. Ces cellules remplacent progressivement la population androgéno-dépendante initiale donnant ainsi naissance au cancer de la prostate hormono-réfractaire. Les mécanismes moléculaires déployés par les cellules pour résister à la privation d'androgène ont été observés en majeure partie dans les tissus humains et dans les lignées cellulaires. Les lignées androgéno-dépendantes peuvent être cultivées dans un milieu privé d'androgènes ou injectées dans des souris castrées afin de dériver des lignées androgéno-indépendantes et en étudier les altérations moléculaires sous-jacentes [91, 92]. Ces changements se divisent en deux catégories distinctes qui ne sont pas mutuellement exclusives: les altérations ciblant directement le RA et les voies contournant le RA [54].

Le RA est membre de la famille des récepteurs hormonaux nucléaires qui agissent comme facteurs de transcription (Figure 5; [131]). Le récepteur est une protéine d'environ 110 kd composée de plusieurs domaines: un domaine de liaison à l'ADN (DLA), une région charnière ("*hinge region*"), un domaine de liaison au ligand (DLL) et deux régions influençant l'activité transcriptionnelle du RA appelées AF-1 et AF-2. Le domaine AF-1 fonctionne indépendamment du ligand alors que la région AF-2, constituée du DLL, en est dépendante. En absence de ligand, le RA est séquestré



**Figure 5. Structure (A) et mécanisme d'activation (B) du récepteur aux androgènes**

Dans sa forme inactive, le RA se retrouve principalement au cytoplasme et interagit avec d'autres facteurs dont les chaperones moléculaires Hsp70 et Hsp90. Lorsqu'une molécule androgénique (ex.: R1881 ou 5-DHT; boîtes vertes) lie le DLA (région AF-2), le RA change de conformation, se défait des chaperones et transloque au noyau. Le RA "actif" lie des séquences d'ADN appelées ARE ("androgen response element") situées en amont de la boîte TATA qui est reconnue par l'ARN polymérase de type II. Le RA recrute aussi un grand nombre de co-régulateurs (ex.: SRC-1, ARA55, TFIID, P/CAF) qui favorise l'ouverture de la chromatine et l'interaction avec la machinerie basale de transcription.

dans le cytoplasme par les protéines de type “*heat-shock*” Hsp-70 et Hsp-90 qui stabilisent le RA et le protègent contre la dégradation. Lorsque la DHT lie le DLL, le RA change de conformation et se dissocie de Hsp-70 et Hsp-90 pour former un homodimère. Au même moment, le RA est phosphorylé par la protéine kinase C (PKC) sur plusieurs sérines le rendant “visible” pour la machinerie d’importation nucléaire. Une fois arrivé au noyau, le RA interagit avec divers co-régulateurs et lie l’ADN sur des séquences spécifiques, appelées éléments de réponse spécifiques aux androgènes, situées dans les régions promotrices de gènes cibles.

La plupart des cancers hormono-réfractaires expriment un RA fonctionnel qui est gardé actif malgré l’absence de DHT [131]. Pour ce faire, le RA peut être muté, amplifié, stimulé par une phosphorylation accrue ou activé suite à la modulation de co-activateurs et de co-répresseurs. Selon les études, la fréquence de mutations somatiques du RA dans le cancer hormono-réfractaire peut atteindre jusqu’à 50% des tissus analysés [54]. Les mutations ciblent généralement le DLL et procurent une hypersensibilité à la DHT ou une perte de spécificité permettant la liaison d’autres hormones et même d’anti-androgènes qui inhibent normalement l’activité du récepteur [130]. À cet effet, une des mutations les plus connues est la substitution T877A présente dans la lignée LNCaP qui permet une activation du RA par l’anti-androgène hydroxyflutamide [132]. L’amplification du gène du RA est détectée dans 20% à 25% des tumeurs hormono-résistantes et résulte généralement en l’augmentation de l’expression de la protéine [54, 133]. Un niveau d’expression élevé du RA sensibiliserait les cellules cancéreuses à la faible concentration de DHT toujours présente lors d’une TPA. De son côté, la phosphorylation constitutive du RA par les protéines kinases MAPK, Akt et PKC pourrait non seulement augmenter sa stabilisation et sa sensibilité à la DHT, mais aussi influencer positivement sa capacité de transactivation en attirant des co-facteurs [134]. À ce propos, la sur-expression de co-activateurs comme ARA55, ARA70, p300, Stat3 et  $\beta$ -caténine et/ou la diminution de co-répresseurs tel N-CoR et SMRT peuvent influencer l’activité transcriptionnelle du RA. D’ailleurs, le développement de tumeurs invasives et métastatiques dans le récent modèle PB-AR-E231Get les souris PTEN<sup>-/-</sup> (section

1.4.3) souligne l'importance des co-facteurs du RA dans la progression du cancer de la prostate. Dans le premier cas, la mutation du RA cible une région impliquée dans l'interaction avec des co-régulateurs [105]. De son côté, l'absence de PTEN favorise l'activation d'Akt qui, en plus de cibler directement le RA, inactive la kinase GSK3 $\beta$  qui régule négativement la  $\beta$ -caténine [135].

Les voies de signalisation ciblant le RA peuvent aussi le contourner afin d'activer d'autres facteurs de transcription [54, 134]. D'ailleurs, un bon nombre de ces voies ont été mises au jour dans les lignées androgéno-indépendantes PC-3 et DU145 qui n'expriment pas le RA. Par exemple, la cascade des MAP kinases peut moduler l'activité de c-Myc et AP-1 qui contrôlent la croissance cellulaire. Pour sa part, la voie PI3K-Akt influence la survie en inhibant la fonction pro-apoptotique de BAD et stimule la prolifération en activant le complexe cycline D1/CDK4 via la voie de mTOR. En amont de ces cascades se retrouvent différents récepteurs incluant EGFR, Her-2, IGF-1R et IL-6R dont l'activité est augmentée dans les lignées cancéreuses androgéno-indépendantes. L'activation de ces récepteurs peut se faire de manière autocrine ou possiblement par l'entremise de cellules stromales et/ou neuroendocriniennes sécrétant des facteurs de croissance. À cet effet, une différenciation neuroendocrinienne accrue est associée au développement du cancer hormono-réfractaire [136, 137]. Enfin, la sur-expression de protéines anti-apoptotiques et tout particulièrement Bcl-2 favoriserait la survie des cellules en absence d'androgène [138].

## **1.5 Les grands problèmes de la gestion clinique du cancer de la prostate**

### **1.5.1 L'insuffisance des marqueurs pronostiques cliniques**

La description de l'histoire naturelle du cancer de la prostate (section 1.3) fait ressortir une lacune majeure dans la prise en charge de la maladie, soit le manque de considération pour les événements moléculaires impliqués dans le développement et la progression du cancer (section 1.4). En particulier, l'évaluation du pronostic se fait

exclusivement à l'aide d'un nombre restreint de marqueurs cliniques ayant une valeur prédictive limitée.

Le score de Gleason est le marqueur clinique le plus puissant pour prédire l'évolution d'un cancer localisé [139, 140]. En d'autres termes, en analyses statistiques multivariées, il est le facteur clinique qui influence le plus le risque de rechute biochimique et la survie. Un score de Gleason  $\leq 4$  est habituellement lié à un faible risque de progression, alors qu'un score  $\geq 8$  est synonyme de haut risque. La situation se corse toutefois pour les tumeurs modérément différenciées de Gleason 5-6 et de Gleason 7. Bien que les tumeurs de Gleason 7 soient associées à un moins bon pronostic que celles de Gleason 5-6, il reste qu'une proportion significative de Gleason 5-6 va progresser alors qu'un nombre significatif de Gleason 7 va demeurer en état de latence. Or, les tumeurs modérément différenciées sont les plus souvent diagnostiquées [141]. Cette situation fait en sorte qu'une fraction des patients traités préventivement ne nécessiterait en fait aucune intervention, tandis qu'une autre fraction serait privée d'un traitement plus agressif qui pourrait retarder ou empêcher une récurrence. Il y a donc un besoin urgent d'autres marqueurs permettant de mieux classer les cancers à faible et à haut risque de progression.

Les marqueurs moléculaires (aussi appelés bio-marqueurs) pourraient combler ce besoin. De plus, ils peuvent être considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles, ce qui n'est pas le cas avec les marqueurs cliniques actuels comme l'APS, le grade histologique et le stade pathologique. Ces molécules sont détectées dans le sérum, l'urine et le liquide séminal, mais majoritairement dans le tissu cancéreux prostatique par immunohistochimie. Plusieurs marqueurs comme GSTP1, p27, c-Myc, E-cadhérine, VEGF, IL-6, p53 et Bcl-2 sont impliqués dans la pathogénèse moléculaire du cancer tandis que d'autres, dont le rôle dans la progression du cancer était inconnu, ont été découverts grâce à des analyses génomiques ou protéomiques [142]. Ceux-ci incluent, entre autres, l'Hepsine, Pim-1 et EZH2. Cependant, même s'il démontre une valeur pronostique, un bio-marqueur doit avoir une valeur ajoutée par rapport aux marqueurs classiques. D'un point de

vue statistique, cela signifie qu'il demeure un facteur indépendant de prédiction lorsqu'il est comparé, en analyse multivariée, aux marqueurs cliniques. Cette caractéristique est la principale raison pour laquelle peu de marqueurs moléculaires sont utilisés en clinique [143]. En effet, les études arrivent souvent à des conclusions contradictoires, minant ainsi la validité du marqueur. Toutefois, la complexité et l'hétérogénéité de la pathogénèse moléculaire du cancer peuvent expliquer ces résultats variables et justifient la recherche de nouveaux marqueurs afin de raffiner les modèles de prédiction et d'offrir des modalités de traitement de plus en plus individualisées.

### 1.5.2 Mieux comprendre les effets du RA sur la signalisation intra-cellulaire

La progression du cancer de la prostate vers un stade hormono-réfractaire semble être grandement influencée par le RA (section 1.4.4.3). Celui-ci s'adapte aux conditions hypo-androgéniques et continue de promouvoir la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. Dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, la plupart des études s'attardent aux mécanismes modulant l'activité du RA dans un contexte de privation d'androgène. Par ailleurs, rares sont celles qui tentent d'élucider l'impact du RA dans la régulation de la signalisation intra-cellulaire. Dans cette optique, il semble que le RA ait un rôle différentiel en fonction de son mode d'activation, c'est-à-dire ligand-dépendant ou ligand-indépendant. Par exemple, certaines études montrent que la voie PI3K-Akt, responsable de l'activation du RA dans les cellules androgéno-indépendantes, est réprimée dans les cellules androgéno-dépendantes en présence de DHT [144, 145]. De façon similaire, les androgènes suppriment l'expression de Bcl-2 qui est fréquemment sur-exprimé dans le cancer hormono-réfractaire [146]. Cette répression exercée par le RA, ressemblant étrangement à une caractéristique de suppresseur de tumeur, s'estomperait lors d'une TPA et permettrait à certaines cellules de survivre malgré l'absence d'androgène. Une connaissance plus approfondie des cibles et du mécanisme d'action du RA en présence d'androgènes pourrait mener au développement de nouvelles thérapies imitant l'effet répresseur du RA. Administrés en combinaison avec la TPA, ces

traitements auraient potentiellement un impact significatif sur la progression de la maladie.

## 1.6 Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B

L'année 2006 marque le 20<sup>e</sup> anniversaire de la découverte du facteur de transcription "*Nuclear-Factor kappaB*" (NF- $\kappa$ B; [147]). Comme son nom l'indique, il a d'abord été identifié dans les cellules B en tant que facteur liant avec grande affinité un "*enhancer*" transcriptionnel du gène de la chaîne légère de l'immunoglobuline  $\kappa$  (Ig $\kappa$ ). Au cours des années subséquentes, il est devenu évident que NF- $\kappa$ B n'était ni spécifique aux cellules B, ni un régulateur important de la transcription du gène Ig $\kappa$  [148]. Il est maintenant reconnu comme un facteur ubiquitaire contrôlant l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans divers processus cellulaires. La sur-activation de NF- $\kappa$ B pourrait même être impliquée dans la pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate.

### 1.6.1 La famille NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est en fait une famille de 5 sous-unités caractérisées par un domaine d'homologie Rel (RHD pour *Rel-homology domain*) servant à la dimérisation et à la liaison à l'ADN (revu dans [148, 149]). Cette famille peut-être divisée en 2 classes par leur région en carboxy-terminale (Figure 6). La première classe inclut RelA (p65), RelB et c-Rel qui possèdent un domaine de transactivation (DTA). La deuxième classe, quant à elle, est représentée par NF- $\kappa$ B1 (p50 et son précurseur p105) et NF- $\kappa$ B2 (p52 et p100). Le domaine carboxy-terminal des précurseurs p105 et p100 contient des répétitions de type ankyrine qui doivent être dégradées pour générer les sous-unités actives p50 et p52. Toutes ces sous-unités fonctionnent en tant qu'homo- et hétérodimères. Les dimères contenant une sous-unité de classe 1 (RelA, RelB, c-Rel) agissent généralement comme activateurs de transcription grâce à leur DTA qui attire des histones acétyl-transférases (HAT). De leur côté, les dimères formés strictement de p50 et/ou p52 (p50-p50, p50-p52, p52-p52) ne contiennent pas

de DTA et fonctionnent comme répresseurs de transcription. Ils peuvent cependant interagir avec le co-facteur Bcl-3 de la famille I $\kappa$ B (voir plus bas) qui, dépendamment du stimulus et/ou du gène cible, contribue à la répression transcriptionnelle ou comble l'absence de DTA en agissant comme co-activateur.

Dans la plupart des cellules normales, les dimères contenant RelA ou c-Rel sont gardés inactifs par les inhibiteurs de la famille I $\kappa$ B ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ). Tout comme p105 et p100, les protéines I $\kappa$ B possèdent des répétitions de type ankyrine qui interagissent avec les domaines RHD des dimères NF- $\kappa$ B. Le complexe RelA-p50/I $\kappa$ B- $\alpha$ , le plus fréquent, est en constant va-et-vient entre le cytosol et le noyau. Cependant, il est localisé par défaut au cytoplasme parce que les signaux d'exportation nucléaire (NES pour "*Nuclear Export Signal*") dominent sur les signaux de localisation nucléaire (NLS pour "*Nuclear Localization Signal*"): le NLS de RelA est masqué par I $\kappa$ B- $\alpha$  alors que celui de p50, qui demeure accessible, ne fait pas le poids devant les NES de RelA et I $\kappa$ B- $\alpha$  [150]. Cette exclusion nucléaire nette semble donc un moyen efficace d'inhiber l'activité de RelA-p50. Par contre, des données récentes suggèrent que le rôle principal des protéines I $\kappa$ B serait d'empêcher la liaison de RelA-p50 à l'ADN plutôt que de promouvoir son exportation au cytosol. Ainsi, dans un triple KO pour I $\kappa$ B- $\alpha$ , - $\beta$ , et - $\epsilon$ , le dimère RelA-p50 reste quand même localisé par défaut au cytoplasme alors que contrairement aux cellules de type sauvage, la faible fraction nucléaire de RelA-p50 lie fortement l'ADN et transactive l'expression de nombreux gènes [151].

### 1.6.2 La voie de signalisation classique

L'activation des dimères de classe 1 comme RelA-p50 requiert la dégradation des I $\kappa$ B médiée par la voie NF- $\kappa$ B classique. Cette voie a d'abord été caractérisée dans les cellules lymphoïdes où elle est reconnue pour son rôle crucial dans la régulation de l'inflammation, le contrôle de la prolifération et l'apoptose [148]. Elle peut être activée par des cytokines, des endotoxines, des agents infectieux et des agents de stress génotoxique et métabolique (Tableau 4). Une des cytokines activatrices les



plus connue est le TNF- $\alpha$  qui, en se liant au récepteur TNF-R1, initie une cascade de phosphorylation convergeant vers le complexe trimérique IKK composé des kinases IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , et IKK- $\gamma$ /NEMO (Figure 7). Ce complexe, par l'entremise de IKK- $\beta$ , phosphoryle l'inhibiteur I $\kappa$ B sur deux sérines (Ser-32,36 pour I $\kappa$ B- $\alpha$ ) qui agissent comme site d'encrage pour l'ubiquitine ligase  $\beta$ -TRCP. L'ubiquitinylation qui en résulte mène à la dégradation de I $\kappa$ B par le protéasome 26S. Libéré de son inhibiteur, le dimère RelA-p50 peut aisément lier des sites  $\kappa$ B présents dans le promoteur et les régions "enhancer" de gènes cibles (voir section 1.6.5).

Activateurs de NF- $\kappa$ B	Exemples
Virus, bactéries, champignons	HTLV-1, <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Streptomyces californicus</i>
Produits dérivés de virus, bactéries et champignons	Tax, Tat, Entérotoxine, LPS
Cytokines inflammatoires	IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TWEAK
Stress physique et physiologique	Cassures doubles-brins, Hypoxie, Sénescence, Asthme
Stress oxydant	Peroxyde, Glutathione
Ligands et leurs récepteurs	BAFF, TRAIL, CD30, CD40
Médiateurs apoptotiques	PARP, FAS
Mitogènes, facteurs de croissance	HGF, EGF, PDGF, TGF- $\alpha$ , BMP-2
Agents chimiques et thérapeutiques	Cisplatine, Doxorubicine, Etoposide, Paclitaxel

**Tableau 4. Activateurs des voies NF- $\kappa$ B ([www.nf-kb.org](http://www.nf-kb.org))**

### 1.6.3 La voie de signalisation non classique

Plus récemment, un autre voie d'activation ciblant principalement le dimère RelB-p52 a été mise à jour (Figure 7; [152]). Dans cette voie non classique, la kinase IKK- $\alpha$  phosphoryle le précurseur p100, qui est ensuite ubiquitinylé et partiellement dégradé par le protéasome pour générer la sous-unité p52. Le dimère RelB-p52 se déplace alors dans le noyau où il induit lui aussi l'expression de plusieurs gènes.

Jusqu'à présent, la plupart des activateurs de la voie non classique ont d'abord été identifiés comme activateurs de la voie classique. Ceux-ci incluent les récepteurs de la super-famille TNF (TNF-R1 [153], CD40 [154], BAFF [155], CD30 [156], LTβ1 [157, 158]), TLR4 ("*Toll-like receptor 4*";[158]) et quelques protéines virales (HTLV-1 Tax [159], EBV LMP-1 [160]). D'un point de vue cinétique, l'activation de la voie classique est extrêmement rapide, de l'ordre de quelques secondes, alors que l'induction de RelB-p52 débute après quelques heures de stimulation. Ce mode de fonctionnement permettrait, entre autres, d'activer certains gènes de façon soutenue [153]. En effet, l'activité du dimère RelA-p50 est rapidement réprimée parce qu'il induit l'expression de son propre inhibiteur, IκB-α. Le dimère RelB-p52 pourrait alors remplacer RelA-p50 au niveau de certains promoteurs et, puisqu'IκB-α n'interagit pas avec RelB-p52, l'activation de gènes pourrait s'étendre sur une plus longue période.

#### 1.6.4 Modifications post-traductionnelles des sous-unités NF-κB

L'activité transcriptionnelle de RelA-p50 est aussi influencée par les modifications post-traductionnelles de RelA. Plusieurs kinases de type sérine/thréonine phosphorylent RelA accentuant ainsi son potentiel de transactivation [161]. La phosphorylation des résidus Ser276 (PKA, MSK1/2), Ser311 (PKCζ), Ser529 (CK2) et/ou Ser536 (IKK-α, IKK-β, Akt, RSK1, TBK1, IKKε) facilite le recrutement de co-activateurs, l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle de base et la stabilité de RelA. Quelques sites de phosphorylation ont aussi été identifiés dans RelB, c-Rel et p50 mais l'effet de ces sites sur la fonction des sous-unités reste à caractériser. D'autres modifications post-traductionnelles de RelA incluent l'acétylation et l'ubiquitinylation [162]. Par exemple, suite à une stimulation au TNF-α, les HAT p300 et CREB-BP acétylent les lysines 218, 221, et 310 de RelA afin de potentialiser son activité transcriptionnelle. Pour terminer l'activation, RelA est déacétylée par HDAC1 et SIRT1 alors que SOCS-1, une ubiquitine ligase, s'occupe de son ubiquitinylation et de sa dégradation par le protéasome.

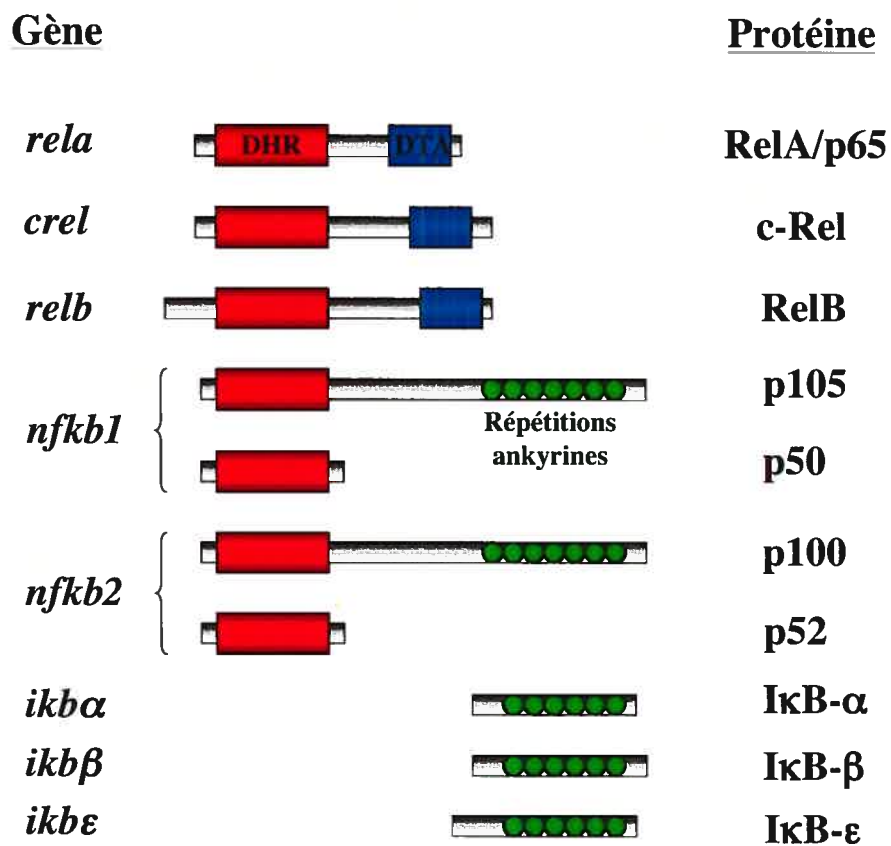
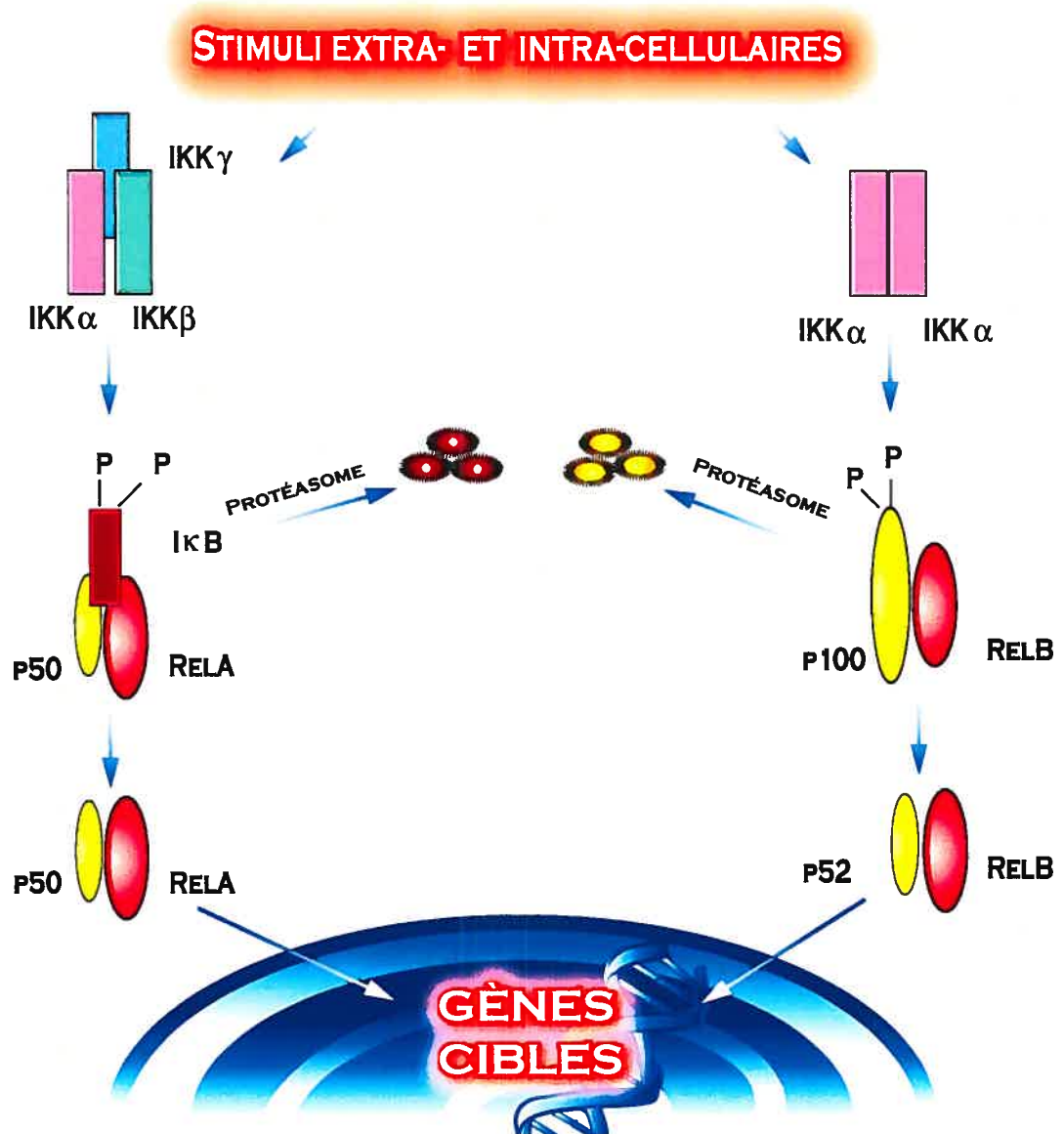


Figure 6. Structure des sous-unités de la famille NF- $\kappa$ B et des inhibiteurs de la famille I $\kappa$ B (adapté de [148])

DHR : Domaine d'homologie Rel  
DTA : Domaine de transactivation



**Figure 7. Voies de signalisation NF- $\kappa$ B**

Dans la voie NF- $\kappa$ B classique (gauche), la phosphorylation IKK- $\beta$ -dépendante de I $\kappa$ B- $\alpha$  provoque sa dégradation par le protéasome, ce qui permet du même coup au dimère RelA-p50 de transloquer au noyau. Dans la voie NF- $\kappa$ B non classique (droite), la phosphorylation IKK- $\alpha$ -dépendante de p100 provoque sa dégradation partielle par le protéasome et la génération de la sous-unité p52 qui se déplace au noyau en compagnie de RelB.

### 1.6.5 Gènes cibles et mécanismes de spécificité

Des sites  $\kappa$ B ayant la séquence consensus GGGRNNYYCC (N = n'importe quel nucléotide, R = purine, Y = pyrimidine) ont été détectés dans le promoteur de plus d'une centaine de gènes dont l'expression corrèle avec l'activation de NF- $\kappa$ B [163]. Ces gènes sont impliqués dans le processus inflammatoire, la réponse immunitaire innée, l'apoptose, le cycle cellulaire, l'angiogénèse et le remodelage tissulaire (Tableau 5; [148]). La spécificité des gènes exprimés est largement attribuable au type cellulaire et au type de stimulus activant NF- $\kappa$ B. À cet effet, différents stimuli activent les voies NF- $\kappa$ B avec des cinétiques variables et utilisent des mécanismes spécifiques d'autorégulation. Par exemple, l'activité du complexe IKK est inhibée par une rétroaction négative lors d'une stimulation au TNF- $\alpha$ , alors qu'elle est amplifiée par une rétroaction positive en présence de LPS [164]. De plus, un même stimuli peut activer des voies parallèles à NF- $\kappa$ B et cibler des facteurs de transcription coopérant avec NF- $\kappa$ B au niveau des promoteurs. C'est le cas du gène IFN- $\beta$  qui est seulement induit lorsque les facteurs NF- $\kappa$ B, ATF2/c-Jun et IRF sont présents simultanément [165]. La phosphorylation des sous-unités NF- $\kappa$ B par diverses kinases (section 1.6.4) module aussi la spécificité des gènes ciblés en favorisant le recrutement de co-facteurs. Enfin, les dimères NF- $\kappa$ B peuvent se lier avec différentes affinités sur les mêmes sites  $\kappa$ B ou lier des séquences spécifiques. Le nombre de sites  $\kappa$ B (unique vs 2 sites en tandem à l'intérieur de la région promotrice) et leur séquence nucléotidique peuvent même influencer la conformation des dimères et l'interaction avec des co-facteurs [163].

Processus	Exemples
Cytokines / Chémokines	IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TRAIL, IFN- $\gamma$ , IP-10, Lymphotoxine $\beta$
Immunorécepteurs	CD137, CD154, TLR2, TLR9, b2 microglobuline, CMH classe I (H2-Kb)
Molécules d'adhésion	ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1, P-sélectine
Gènes de réponse au stress	Cox-2, Mn SOD, iNOS, Phospholipase 2A
Récepteurs membranaires	Her-2, Mdr1, Neuropeptide Y-récepteur Y1
Régulateurs de l'apoptose	Bcl-2, Bcl-XL, c-FLIP, x-IAP, c-IAP, CD95, FasL, Bax, TRAF1, TRAF2
Facteurs de croissance	BMP-2, GM-CSF, IGF-BP2, NGF, VEGF C
Facteurs de transcription	Bcl-3, c-myc, c-rel, nfkb2, IkBa, IkBe, RelB, p53, IRF-1,2,4,7
Autres	GSTP1, MMP-9, TERT, Cathepsine B

**Tableau 5. Gènes cibles de NF- $\kappa$ B ([www.nf-kb.org](http://www.nf-kb.org))**

### 1.6.6 Modèles murins

Le phénotype des souris KO pour une ou plusieurs sous-unités NF- $\kappa$ B a révélé leur rôle critique dans le développement du foie embryonnaire et du système immunitaire (Tableau 6). Les souris RelA-/- meurent au jour 14.5 post-conception (E14.5) suite à une apoptose massive des cellules hépatiques [166]. La survie des doubles mutants RelA-/- TNFR1-/- ou RelA-/- TNF $\alpha$ -/- a montré par la suite que, dans le foie fœtal, RelA protège contre l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  [167, 168]. Au contraire, l'ablation unique de RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 ou NF- $\kappa$ B2 n'affecte pas le développement hépatique et n'est généralement pas mortelle sauf pour une proportion de souris RelB-/- (< 50%) qui développent de l'inflammation systémique probablement liée à la présence de cellules T auto-réactives [169, 170]. D'ailleurs, tous ces modèles présentent, à divers degrés, des problèmes de différenciation du système immunitaire associés à une apoptose accrue et/ou une prolifération déficiente des cellules B et T. En outre, le croisement des différents KO amplifie souvent la sévérité du phénotype, ce qui trahit une redondance dans la fonction de certaines sous-unités. Par exemple, alors que les simples mutants NF- $\kappa$ B1 et NF- $\kappa$ B2 ont une fonction immunitaire quelque peu atténuée, les doubles mutants présentent de sévères anomalies osseuses et un blocage dans la maturation des cellules B [148].

Modèle	Mortalité	Description
<i>Ablation(s) génétique(s)</i>		
rela -/-	E14.5	Apoptose massive des cellules du foie fœtal
tnfr -/-rela -/-	Non	Sauvetage des souris rela -/-; Défauts de prolifération des cellules B et T
tnf -/-rela -/-	Non	Sauvetage des souris rela -/-; Défauts de prolifération des cellules B et T
nfkB1 -/-	Non	Défauts de prolifération des cellules T
nfkB2 -/-	Non	Problèmes de maturation des cellules B, défauts dans l'architecture de la rate
relB -/-	0-50% à 3 mois	Inflammation de plusieurs organes, défauts dans l'architecture de la rate, des ganglions lymphatiques et dans le développement des glandes mammaires
c-rel -/-	Non	Défauts de prolifération des cellules B
rela -/-nfkB1 -/-	E12.5	Apoptose massive des cellules du foie fœtal
rela -/-crel -/-	E13.5	Apoptose massive des cellules du foie fœtal
c-rel -/-nfkB1 -/-	Non	Défauts de prolifération des cellules B plus sévères que les simples KO, problème de maturation des cellules dendritiques
nfkB1 -/-nfkB2 -/-	Après le sevrage	Pas de dents, problèmes de prolifération des cellules B et T, défaut dans la différenciation ostéoclastique
nfkB1 -/-relB -/-	80% à 3 mois	Inflammation de plusieurs organes, phénotype plus sévère que les simples mutants
ikB-a -/-	7-10 jours	Inflammation de plusieurs organes
ikBε -/-	Non	Phénotype normal mise à part une réduction des cellules T CD44-CD25+
ikKa -/-	Après la naissance	Absence de pattes et d'oreilles, anomalies au niveau du squelette
ikKb -/-	E12.5-E14.5	Apoptose massive des cellules du foie fœtal
<i>Région carboxy-terminale tronquée</i>		
nfkB1 CT/CT	Non	Phénotype plus sévère que les souris nfkB1 -/-, défauts d'architecture de la rate et des ganglions, susceptibilité accrue à certains pathogènes
nfkB2 CT/CT	Non	Hyperplasie gastrique, hyperkératose cardiaque, cellules T hyper-réactives
c-rel CT/CT	Non	Rate et ganglions élargis, expansion lymphocytaire accrue
<i>Modèles transgéniques</i>		
rela (conditionnel)	Non	Expression de rela dans les thymocytes: pas de phénotype dû à l'augmentation parallèle de ikB-a
ikBM (conditionnel)	Non	Expression du super-répresseur IkB-a dans une multitude de tissus dont les cellules T, cellules B, le cœur, le foie, les muscles, la peau, le pancréas afin d'étudier le rôle de NF-κB dans diverses maladies
ikK-DN (conditionnel)	Non	Expression d'un dominant négatif de la kinase IKK-b dans les cellules T, les cellules B et les neurones afin d'étudier le rôle de NF-κB dans diverses maladies
ikK2CA (conditionnel)	Non	Expression d'un mutant constitutivement actif de la kinase IKK-b dans les cellules T, le foie, les muscles et les neurones afin d'étudier le rôle de NF-κB dans diverses maladies
<i>Modèles tumoraux</i>		
v-rel (conditionnel)		Expression de v-rel dans les thymocytes: les souris développent des leucémies
AOM-DSS ikBM (entérocytes)		Diminution de 80% du nombre de tumeurs due à une augmentation de l'apoptose des entérocytes
AOM-DSS ikKb -/- (cellules myéloïdes)		Diminution de 50% du nombre de tumeurs et diminution de la taille des tumeurs due à une baisse de prolifération des entérocytes
Mdr2 -/- IkBM (hépatocytes)		Diminution du nombre de tumeurs due à une augmentation de l'apoptose des hépatocytes
DMBA-TPA ikBM (kératinocytes)		Augmentation du nombre de tumeurs due à la perte de l'activité répressive de NF-κB sur la voie JNK
DEN ikKb -/- (hépatocytes)		Augmentation du nombre de tumeurs due à une augmentation de la prolifération compensatoire des hépatocytes
DEN ikKb -/- (cellules myéloïdes)		Diminution du nombre de tumeurs due à une baisse de prolifération des hépatocytes
DMBA ikBM (cellules mammaires)		Développement de tumeurs avec une activité élevée de la voie non classique (RelB-p52)

**Tableau 6. Modèles murins ciblant les sous-unités ou les voies NF-κB (d'après [148, 170-172])**

Puisque l'ablation de NF- $\kappa$ B1 ou NF- $\kappa$ B2 élimine non seulement les précurseurs p105 et p100 mais aussi les sous-unités p50 et p52, les souris NF- $\kappa$ B1<sup>ΔCT/ΔCT</sup> et NF- $\kappa$ B2<sup>ΔCT/ΔCT</sup> ont été créées afin de caractériser le rôle spécifique de p105 et p100 *in vivo* [173, 174]. Ces souris expriment uniquement les sous-unités p50 ou p52 car les allèles *nfkb1* ou *nfkb2* ont été tronqués en région carboxy-terminale. Le phénotype qui en résulte est de loin plus grave que celui des souris NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> ou NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> et semble relié à la sur-activation de dimères composés des sous-unités p50 ou p52. Bien que le système immunitaire soit encore affecté dans les deux cas, les souris NF- $\kappa$ B2<sup>ΔCT/ΔCT</sup> présentent en plus une hyperprolifération des cellules épithéliales gastriques.

Les voies de signalisation NF- $\kappa$ B ont aussi été ciblées dans les modèles d'ablation génétique (Tableau 6). Ainsi, l'absence de I $\kappa$ B- $\alpha$  augmente l'activité transcriptionnelle du dimère RelA-p50 dans les thymocytes et les splénocytes et provoque une inflammation systémique mortelle 7 à 10 jours après la naissance [175]. L'irradiation individuelle des kinases IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  et IKK- $\gamma$  est également létale mais pour des raisons différentes: les souris IKK- $\alpha$  <sup>-/-</sup> ont des atteintes morphogénétiques graves [176] tandis que les souris IKK- $\beta$  <sup>-/-</sup> et IKK- $\gamma$  <sup>-/-</sup> exhibent une apoptose hépatique massive semblable aux souris RelA <sup>-/-</sup> [177, 178]. Étant donné la mortalité précoce de ces modèles et/ou la complexité des phénotypes, plusieurs modèles transgéniques conditionnels ont été développés. Ils consistent généralement en la sur-expression de dominants négatifs ou de mutants constitutivement actifs affectant l'activité de la voie NF- $\kappa$ B classique dans un type cellulaire spécifique. Les transgènes les plus couramment utilisés sont le mutant non dégradable de I $\kappa$ B- $\alpha$  (I $\kappa$ B-SR; I $\kappa$ B-“*Super-Repressor*”), le dominant négatif de IKK- $\beta$  (IKK-DN) ou son mutant constitutivement actif (IKK2CA) [171]. Il existe aussi des KO conditionnels de I $\kappa$ B- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , IKK- $\alpha$  et IKK- $\gamma$  générés à l'aide du système de recombinaison Cre/loxP. Ces modèles se sont avérés des outils indispensables pour identifier les fonctions de NF- $\kappa$ B dans les différents types cellulaires (Tableau 6). Ils sont d'ailleurs très utiles pour analyser le rôle de NF- $\kappa$ B dans la tumorigénèse (section 1.6.8).



### 1.6.7 NF- $\kappa$ B et cancer

Un des premiers indices liant NF- $\kappa$ B au cancer est venu de la découverte de l'oncogène rétroviral v-Rel, homologue viral de la sous-unité c-Rel, qui induit la formation de tumeurs lymphoïdes chez le poulet [179]. Par la suite, les effets oncogéniques d'autres protéines virales ont été montrés comme étant dépendants, du moins en partie, de leur capacité à activer les voies NF- $\kappa$ B. C'est le cas de la protéine Tax du virus humain T-lymphotrope de type 1 (HTLV-1) [159] et de la protéine LMP-1 du virus d'Epstein-Barr (EBV) [180]. Plusieurs altérations chromosomiques impliquant les gènes *c-rel* et *nf- $\kappa$ b2* ont aussi été détectées dans des lymphomes à cellules B et T [181]. En ce qui a trait aux tumeurs solides, une localisation nucléaire aberrante des sous-unités NF- $\kappa$ B a été observée dans divers cancers dont ceux du pancréas [182], du sein [183], de l'endomètre [184], du rein [185], de la tête et du cou [186], ainsi que dans le mélanome [187].

Étant donné la nature des gènes modulés par NF- $\kappa$ B, il n'est pas étonnant d'observer une sur-activation des sous-unités NF- $\kappa$ B dans plusieurs tumeurs [188, 189]. En effet, NF- $\kappa$ B joue un rôle dans la plupart des processus cellulaires essentiels à l'émergence et à la progression des cancers tels que décrits par Hanahan et Weinberg [190]. De nombreuses cytokines induites par NF- $\kappa$ B dont IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  agissent comme facteurs de croissance autocrins dans les lymphomes, myélomes et gliomes. Le récepteur HER-2, sur-exprimé dans plusieurs tumeurs solides, initie une cascade de signalisation menant à l'activation de NF- $\kappa$ B. Afin d'éviter le déclenchement de l'apoptose, les cellules cancéreuses sur-expriment des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL, c-IAP, XIAP, et c-FLIP dont le gène est sous le contrôle de NF- $\kappa$ B. De même, NF- $\kappa$ B peut moduler l'expression de la télomérase dont l'expression soutenue procure un potentiel de réplication illimité. L'invasion des cellules tumorales à travers la matrice extra-cellulaire est aussi dans son champ d'action puisque NF- $\kappa$ B stimule l'expression de MMP-9 et de uPA. En outre, NF- $\kappa$ B contribue à l'angiogénèse car il transactive, entre autres, les gènes des facteurs angiogéniques IL-8 et VEGF. Enfin, NF- $\kappa$ B contribue au processus

métastatique en régulant l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1. L'introduction de I $\kappa$ B-SR, l'inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B classique, dans un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses diminue l'expression des protéines anti-apoptotiques, pro-invasives, pro-angiogéniques et pro-métastatiques. Cette inhibition sensibilise donc les cellules à l'apoptose induite par divers agents chimiothérapeutiques et atténue leur potentiel métastatique.

#### 1.6.8 NF- $\kappa$ B et modèles murins de tumorigénèse

L'implication concrète de NF- $\kappa$ B dans le développement et la progression tumorale n'a toutefois été confirmée que tout récemment dans des modèles murins de carcinogénèse (Tableau 6). La stratégie consiste à inhiber l'activité de la voie NF- $\kappa$ B classique dans un type cellulaire spécifique à l'aide de I $\kappa$ B-SR ou d'un KO conditionnel de IKK- $\beta$ . Ces modèles se concentrent tout particulièrement sur les cancers liés à l'inflammation puisque NF- $\kappa$ B joue un rôle central dans le processus inflammatoire (voir section 1.6.2). Dans les souris KO pour la "multidrug resistance protein 2" (Mdr2 $^{-/-}$ ) développant spontanément des tumeurs suite à une inflammation hépatique, l'expression de I $\kappa$ B-SR dans les hépatocytes induit l'apoptose et empêche le développement de tumeurs [191]. De même, dans un modèle de cancer colorectal induit par le carcinogène azoxyméthane (AOM) et l'agent pro-inflammatoire dextran-sulphate (DSS), l'ablation de IKK- $\beta$  dans les entérocytes diminue le nombre de tumeurs de 80%, sans toutefois modifier la taille des tumeurs résiduelles [192]. L'analyse de l'état tissulaire suite à l'exposition au AOM-DSS a montré une augmentation significative de l'apoptose dans les entérocytes IKK- $\beta$   $^{-/-}$  pré-néoplasiques. Ces observations suggèrent donc que la voie NF- $\kappa$ B classique dans les hépatocytes et les entérocytes contribue aux étapes précoces de la tumorigénèse en protégeant les cellules pré-néoplasiques contre l'apoptose. Par ailleurs, dans ce même modèle, l'absence de IKK- $\beta$  dans les cellules myéloïdes (macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles) diminue le nombre de tumeurs colorectales de seulement 50%, mais affecte à la baisse la taille des tumeurs. Dans ce cas, il semble que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B classique dans les cellules myéloïdes promeut

l'expression de facteurs de croissance, dont l'IL-6, qui favorisent la prolifération et la progression des cellules tumorales. L'ensemble de ces découvertes permet d'affirmer que NF- $\kappa$ B est un important promoteur de la tumorigénèse reliée à l'inflammation et qu'il exerce différents rôles en fonction du type cellulaire.

Cependant, les résultats d'autres études montrent que, dans certains cas, NF- $\kappa$ B s'oppose au développement de tumeurs. Dans le modèle murin de carcinogénèse de la peau utilisant les agents chimiques DMBA et TPAc comme initiateur et promoteur de tumeurs, l'expression de I $\kappa$ B-SR dans les kératinocytes augmente le nombre de tumeurs formées [193]. Cet effet est aussi observé dans des kératinocytes transformés par l'oncogène Ras, ne limitant donc pas le rôle protecteur de NF- $\kappa$ B aux tumeurs associées à l'inflammation [194]. L'ablation de IKK- $\beta$  dans les hépatocytes augmente aussi le nombre de tumeurs dans un modèle de carcinome hépatocellulaire provoqué par l'administration du pro-carcinogène DEN [195]. Dans les kératinocytes et les hépatocytes, l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B classique activerait la kinase JNK. Dans les kératinocytes, JNK exercerait son effet via le facteur de transcription AP-1 en induisant l'expression de gènes impliqués dans le développement de tumeurs [196]. Dans les hépatocytes, au contraire, l'activation JNK serait pro-apoptotique mais au lieu de prévenir la formation de tumeurs, cette mort cellulaire stimulerait fortement une prolifération compensatoire des hépatocytes favorisant ainsi le développement de tumeurs [195]. Toutefois, ce mécanisme est peut-être spécifique à la lignée murine ou au stimulus carcinogénique utilisé puisqu'il ne s'observe pas dans les souris Mdr2 $^{-/-}$  même si l'inhibition de NF- $\kappa$ B induit aussi l'apoptose des hépatocytes [191]. Par contre, comme pour le modèle de cancer colorectal, l'ablation de IKK- $\beta$  dans les cellules myéloïdes résulte en une diminution de la prolifération tumorale suite à l'exposition au DEN démontrant ainsi que l'activité de NF- $\kappa$ B dans les cellules inflammatoires favorise la progression tumorale [195].

En résumé, la voie NF- $\kappa$ B classique peut promouvoir ou s'opposer à la tumorigénèse dépendamment du tissu et du type cellulaire impliqués. De plus, ces modèles renforcent la théorie selon laquelle NF- $\kappa$ B serait le lien manquant entre

l'inflammation et le cancer. Auparavant, cette théorie se basait presque exclusivement sur des études épidémiologiques montrant une corrélation entre l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou naturels de NF- $\kappa$ B (voir section 1.6.9) et l'incidence de cancers où l'inflammation chronique jouerait un rôle important [172]. Ceux-ci incluent, entre autres, les cancers du colon, du poumon, de l'estomac, de l'oesophage et possiblement le cancer de la prostate (voir section 1.3.1).

#### 1.6.9 Inhibiteurs chimiques et naturels de NF- $\kappa$ B

L'implication de NF- $\kappa$ B dans la tumorigénèse stimule la recherche de composés chimiques ou naturels pouvant inhiber la voie NF- $\kappa$ B classique (revu par [197]). L'administration de ces inhibiteurs devra néanmoins être accompagnée d'une connaissance approfondie de la fonction de NF- $\kappa$ B étant donné son rôle protecteur dans certaines tumeurs (voir section 1.6.8). Actuellement, le développement d'inhibiteurs de NF- $\kappa$ B vise plutôt à contrecarrer la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie conventionnelle. En effet, plusieurs agents anti-cancéreux dont la doxorubicine, l'étoposide, le taxol, la cisplatine et la vinblastine stimulent l'activation de NF- $\kappa$ B qui, en retour, protège les cellules contre la cytotoxicité de ces agents. D'ailleurs, l'expression de I $\kappa$ B-SR dans des cellules chimiorésistantes re-sensibilise celles-ci aux agents cytotoxiques. La plupart des inhibiteurs chimiques de NF- $\kappa$ B ciblent les kinases IKK (BAY 11-7082, BAY 11-7085, PS-1145, CHS 828) ou le protéasome (bortézomibe, MG-132) afin de bloquer la phosphorylation et/ou la dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  et, conséquemment, l'activation du dimère RelA-p50. Certains anti-inflammatoires ciblent aussi directement la voie NF- $\kappa$ B. La dexaméthasone agit en induisant l'expression de I $\kappa$ B- $\alpha$  et en favorisant l'interaction directe entre le récepteur aux glucocorticoïdes et NF- $\kappa$ B. L'acide salicylique et le sulindac, deux AINS, inhibent l'activité des kinases IKK *in vitro* et *in vivo*. D'autres inhibiteurs synthétiques de NF- $\kappa$ B sont dérivés de composés naturels retrouvés chez les plantes ou les bactéries. Parmi eux, le flavoporiol et la DHMEQ (ou déhydroxyméthylepoxynomicine pour les amateurs de Scrabble!) sont des composés prometteurs. Enfin, plusieurs agents naturels présents dans les aliments dont la

consommation est associée à une faible incidence de cancer ont une activité anti-NF- $\kappa$ B intrinsèque. La génistéine (soya), le resveratrol (vin rouge), le curcumin, l' pigallacath quine-3-gallate (thé vert) et le lycopène (sauce tomate) font partie des composés les plus efficaces.

## 1.7 Objectifs du projet de doctorat

Le rôle émergeant de NF- $\kappa$ B dans la tumorig nese soulève automatiquement le questionnement suivant: NF- $\kappa$ B pourrait-il être impliqué dans le cancer de la prostate? Pourrait-il aider à résoudre les grands problèmes cliniques actuels, soit le manque de marqueurs moléculaires et le besoin de mieux comprendre les changements moléculaires menant au cancer hormono-réfractaire? Mon projet de doctorat, initié en mai 2000, se concentre sur ces questions importantes.

### 1.7.1 Chapitres II, III et IV: expression de RelA dans le cancer de la prostate et validation de sa localisation nucléaire en tant que marqueur pronostique

  l'époque, seul le niveau d'activation de NF- $\kappa$ B classique dans les lignées PC-3, DU145 et LNCaP était connu. Dans ces cellules, NF- $\kappa$ B protégeait contre l'apoptose et augmentait le potentiel invasif des cellules. Par contre, aucune donnée n'existait quant au statut de NF- $\kappa$ B à l'intérieur même d'une tumeur prostatique. Afin d'évaluer l'activité de NF- $\kappa$ B dans les tissus cancéreux prostatiques, nous avons d'abord caractérisé l'expression et la localisation intra-cellulaire de la sous-unité classique RelA par immunohistochimie (Chapitre II). En considérant la localisation nucléaire de RelA comme un signe d'activité, nous avons ensuite tenté de valider la coloration nucléaire de RelA en tant que marqueur pronostique du cancer de la prostate. Dans un premier temps, nous avons vérifié s'il pouvait complémenter le grade histologique afin de mieux classer les patients à haut et à faible risque de progression (Chapitre II). Nous avons ensuite testé dans des études multivariées si RelA pouvait agir comme marqueur indépendant de la rechute biochimique (Chapitre III) et de la présence de métastases ganglionnaires (Chapitre IV).

### 1.7.2 Chapitre V: caractérisation de l'expression et de la localisation intra-cellulaire des sous-unités de la famille NF- $\kappa$ B dans le cancer de la prostate

Les résultats des chapitres II, III et IV établissent RelA en tant que marqueur pronostique du cancer de la prostate. Par contre, les autres membres de la famille NF- $\kappa$ B ne sont pas pris en compte et pourraient éventuellement devenir eux aussi des marqueurs pronostiques. L'objectif du chapitre V était donc de caractériser l'expression et la localisation intra-cellulaires, jusqu'alors inconnues, de toutes les sous-unités NF- $\kappa$ B dans un même groupe de tissus prostatiques.

### 1.7.3 Chapitre VI: Influence du RA sur la voie NF- $\kappa$ B non classique

Dans les premières années du projet de doctorat, plusieurs études ont révélé un lien entre la voie NF- $\kappa$ B classique et le degré de dépendance aux androgènes des lignées cancéreuses prostatiques. D'une part, les cellules androgéno-indépendantes PC-3 et DU145 ont une activité basale de NF- $\kappa$ B beaucoup plus élevée que les cellules androgéno-sensibles LNCaP et 22Rv1 [198, 199]. De plus, les sous-lignées androgéno-indépendantes dérivées des cellules LNCaP ont elles aussi une activité NF- $\kappa$ B supérieure aux cellules d'origine [200]. La sur-activation de NF- $\kappa$ B serait donc associée au phénotype androgéno-indépendant et favoriserait la progression de la maladie. D'autre part, dans les cellules androgéno-dépendantes, le RA agirait comme répresseur de la voie NF- $\kappa$ B classique soit en compétitionnant pour des co-facteurs ou des sites de liaison à l'ADN, soit en augmentant les niveaux de I $\kappa$ B- $\alpha$  [201-204]. Une meilleure connaissance de ce mécanisme pourrait avoir des répercussions majeures du point de vue thérapeutique car la dé-répression de NF- $\kappa$ B lors d'une TPA pourrait permettre à certaines cellules de survivre malgré l'absence de stimulation androgénique. À cet effet, l'objectif du chapitre VI était de déterminer si la voie NF- $\kappa$ B non classique pouvait elle aussi être modulée par la voie du RA. À l'exception des résultats du chapitre V montrant une localisation nucléaire des sous-unités RelB et p52 dans les tissus cancéreux prostatiques, aucune étude ne s'était penchée sur la question.

## CHAPITRE II.

### **NF-kappaB Nuclear Localization and its Prognostic Significance in Prostate Cancer**

**\*Laurent Lessard<sup>a</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>a</sup>, Louis Lamarre<sup>c</sup>, Lee Wall<sup>a</sup>,  
Jean-Baptiste Lattouf<sup>b</sup>, Fred Saad<sup>a,b,\*</sup>**

<sup>a</sup>*Centre de recherche CHUM, Hôpital Notre Dame and Institut du cancer de  
Montréal, 2099 Alexandre-de-Sève, Montréal, Québec, Canada, H2L 2W5.*

<sup>b</sup>*Département d'urologie, CHUM, Hôpital Notre-Dame, 1560 rue Sherbrooke Est,  
Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1*

<sup>c</sup>*Département de pathologie, CHUM, Hôpital Notre-Dame, 1560 rue Sherbrooke Est,  
Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1*

Article publié dans:

**BJU Int., vol. 91: 417-420, 2003**

**Keywords:** Prostatic Neoplasm, NF-kappaB, Prognostic Marker,  
Immunohistochemistry, Gleason Grade

*\*L. Lessard est responsable d'environ 90% de la réalisation des travaux de recherche  
et de la rédaction de cet article. L. Lamarre, pathologiste, a révisé les lames  
histologiques et J.-B. Lattouf a sélectionné les patients inclus dans l'étude. L. Wall, A.-  
M. Mes-Masson et F. Saad ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To detect NF- $\kappa$ B (p65) subcellular localization in human prostate cancer tissues of different histological grades, and to test whether NF- $\kappa$ B localization alone, or combined with the histological grade, can predict patient outcome.

**PATIENTS AND METHODS:** All prostate cancer tissues were obtained from radical prostatectomy specimens; the histological grade was determined using the Gleason grading system. Clinical outcomes were defined as good (5-year disease free survival with undetectable levels of prostate specific antigen) or poor (progression to bone metastases). NF- $\kappa$ B subcellular localization was visualized by immunohistochemistry with an anti-p65 antibody.

**RESULTS:** The NF- $\kappa$ B subcellular localization was initially assessed in 45 specimens; in these samples a nuclear localization of NF- $\kappa$ B was specific to cancer tissues, but did not correlate with the Gleason score ( $p=0.089$ ). NF- $\kappa$ B was then assessed as a prognostic marker to complement Gleason score in predicting cancer progression. Tumor tissues from 30 men with known clinical outcome were included; 10 of 17 patients who had a poor outcome were positive for NF- $\kappa$ B nuclear staining, whereas only two of 13 with a good outcome were positive ( $p=0.026$ ). When NF- $\kappa$ B subcellular localization and Gleason score were combined, two risk categories of progression were defined. Eleven of 13 specimens from those with a good outcome were in the low risk category (Gleason 2-4 or Gleason 5-7 with negative nuclear NF- $\kappa$ B) and 12 of 17 in the poor outcome group were in the high-risk category (Gleason 8-10 or Gleason 5-7 with positive nuclear NF- $\kappa$ B;  $p=0.004$ ).

**CONCLUSION:** NF- $\kappa$ B is detectable in the nucleus in prostate cancer tissues and positivity can be used to help predict patient outcome. Multivariate analyses using other clinical and molecular variables are underway and will validate the usefulness of NF- $\kappa$ B as a prognostic factor.



## INTRODUCTION

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death in North American men. It is difficult to predict whether a clinically localized prostate cancer will remain latent or progress to an aggressive or metastatic disease. Indeed, molecular events associated with carcinogenesis and tumor progression in prostate cancer remain unclear. There is a need for molecular markers that could help to predict the aggressiveness of prostate cancers. The degree of histological differentiation (Gleason grade) is the best marker known to date, but the prognosis is difficult to establish in cases of moderately differentiated tissues (Gleason scores 5 to 7), which represent more than two thirds [1, 2] of diagnosed cancers.

The most studied form of the NF- $\kappa$ B transcription factor is a heterodimer formed by the p50 and RelA (p65) proteins [3-6]. It is expressed in most cells but kept inactive and maintained in the cytoplasm by interaction with its inhibitor I $\kappa$ B- $\alpha$ . Normally, activation of NF- $\kappa$ B requires signals that lead to the phosphorylation, ubiquitination and proteasome-dependent degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . NF- $\kappa$ B then translocates to the nucleus and activates the expression of various genes involved in cell growth, differentiation, inflammatory responses and the regulation of apoptosis.

There is growing evidence that NF- $\kappa$ B is implicated in oncogenesis[7, 8]. The initial evidence comes from the retroviral-encoded gene v-Rel which causes aggressive tumors in chickens. Other transforming viral proteins such as HTLV-1 Tax activate NF- $\kappa$ B. The detection of activated NF- $\kappa$ B in pancreatic adenocarcinoma was the first study to report a constitutive activation of NF- $\kappa$ B in a human carcinoma [9]. Aberrant nuclear localization of NF- $\kappa$ B has also been observed in human breast cancer specimens [10] and further analysis has shown that NF- $\kappa$ B activation occurs early in mammary cell carcinogenesis [11]. In addition, NF- $\kappa$ B has been shown to prevent cell death by apoptosis in many cell types (including the human PC-3 and DU145 cells lines) after chemotherapy, radiotherapy or TNF- $\alpha$  treatment [12, 13]. Constitutive activation of NF- $\kappa$ B has been detected in androgen-independent prostate cancer xenografts and cell lines [14-16] as well as in prostate cancer tissues [15,17].

While a role for NF- $\kappa$ B in prostate cancer is under study, the prognostic significance of NF- $\kappa$ B nuclear localization in human prostate cancer tissues is still unknown. Herein

we assessed the subcellular localization of NF- $\kappa$ B (p65 subunit) in prostate cancer tissues by immunohistochemical staining. We compared nuclear localization with both the Gleason score and patient outcome; Using these results, new risk categories were generated which combine the Gleason score and NF- $\kappa$ B localization status.

## **PATIENTS AND METHODS**

In an initial study, tissue specimens from 45 patients with prostate adenocarcinoma were assessed; tumor specimens were obtained after radical prostatectomy between January 1993 and July 1998 (age of patients 47-71 years).

In a second study, tissue specimens from 30 patients with known outcomes of prostate adenocarcinoma were selected; 17 and 13 specimens were included in "poor" and "good" outcome groups, respectively; a poor outcome was defined as recurrence after radical prostatectomy and progression to bone metastases (positive bone scan), whereas a good outcome was defined as no evidence of cancer recurrence (undetectable PSA) for at least 5 years after prostatectomy. Tumor specimens from the second group were obtained between 1993 and 1995, and tissues from the first between 1990 and 2000; the age of patients was 50-73 years. In both studies, patients had no neo-adjuvant treatment before surgery, and histological grade was evaluated according to Gleason grading system [18], and pathological stages were either T2 or T3.

Specimens were fixed with formalin and embedded in paraffin wax, sectioned, and stained by an immunoperoxidase method. Tissue sections were immunostained for NF- $\kappa$ B transcription factor by the biotin-streptavidin-peroxidase method using the NF- $\kappa$ B p65 (F-6) monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) which recognises amino-terminal sequences of the p65 subunit. Tissue sections were deparaffinized and treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to eliminate endogenous peroxidase activity, then incubated for 10 min at 95°C in citrate buffer (pH 6.0) for antigen unmasking. The sections were blocked with a protein-blocking serum-free reagent (Dako Diagnostics Canada Inc.) and incubated with the NF- $\kappa$ B p65 (F-6) antibody for 60 min at room temperature. The optimal concentration of primary antibody (1  $\mu$ g/ml) was determined by serial dilutions. Tissue sections were then incubated with secondary biotinylated antibody (Dako Diagnostics Canada Inc.) for 20 min followed by incubation with the streptavidin-peroxidase complex (Dako Diagnostics Canada Inc.) for 20 min at room temperature. Reaction products were developed using diaminobenzidine containing

0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a substrate for peroxidase. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Substitution of the primary antibody with PBS served as the negative control. NF- $\kappa$ B staining was observed by light microscopy and localized within the cell cytoplasm and/or nucleus. Nuclear localization of NF- $\kappa$ B was categorized as positive or negative, as well as an overall proportion of tumor surface which stained positively. All slides were independently analyzed while unaware of origin. Statistical analysis was performed using the chi-square test, and Fisher's exact test for small sample size.

## RESULTS

In the first study all 45 tumors had cytoplasmic staining and 18 also had positive nuclear staining (Figure 1). NF- $\kappa$ B (p65) was detected in the cytoplasm of normal and tumor cells, but was only nuclear in cancer cells. In normal glands surrounding the tumors, basal cells had a higher intensity of staining than luminal cells.

Tumors were analyzed according to Gleason grade and were sub-divided into three groups; nine tumors were well (Gleason scores 2-4), 24 moderately (Gleason scores 5-7), and 12 poorly differentiated (Gleason scores 8-10). The relationship between nuclear activation and Gleason score is presented in Table 1 (upper section). Although NF- $\kappa$ B (p65) nuclear staining was detected mainly in moderately and poorly differentiated tissues, nuclear localization and Gleason score were not linked ( $p=0.089$ ). Overall, NF- $\kappa$ B was nuclear in prostate cancer and appears to be an independent marker from the Gleason score.

In the second study, all specimens showed some degree of immunostaining. Table 2 shows the relationship between the Gleason scores and patient outcome; the tissues were sub-divided into three Gleason groups. As expected, there was a significant association ( $p=0.05$ ) between prognosis and increasing histological grade. However, it is hard to predict outcome in men with moderately differentiated tumour (Gleason 5-7). Table 2 shows that more than half the cancers in both the good and poor outcome groups had a Gleason score of 5-7. The use of an additional prognostic marker would be useful to predict patient outcome.

Table 2 also shows the percentage NF- $\kappa$ B nuclear staining in tumours stratified for patient outcome. Using negative and positive NF- $\kappa$ B nuclear staining only did not help

to predict patient outcome ( $p=0.413$ ), but when classifying nuclear NF- $\kappa$ B immunostaining into groups of 0-10% and >10% tumour staining, the nuclear localization was associated with outcome ( $p=0.026$ ).

Table 1 also shows the relationship between Gleason score and nuclear NF- $\kappa$ B positivity for the second study; as with the initial analysis both markers were independent ( $p=0.262$ ). The Gleason score and NF- $\kappa$ B nuclear localization are independent markers, yet both correlate with patient outcome. Thus tumour samples were reclassified into two categories of low risk and high risk for cancer progression (Table 2). The low risk category includes all Gleason 2-4, and 5-7 tumours with <10% nuclear staining, and the high risk category all Gleason scores 8-10, and 5-7 tumours with >10% nuclear staining; with this stratification of the specimens the prediction improved ( $P=0.004$ ; Table 2).

## DISCUSSION

Although prostate cancer can be detected at an early stage and treated effectively, it is still difficult to predict which cancers are at high risk of progression. There is a need for molecular markers that can help predict patient outcome. The Gleason grading system is the best prognostic marker known to date, but its predictive value is lower in moderately differentiated tissues, which can represent more than two thirds of diagnosed cancers (reviewed in [1, 2]). The activation of NF- $\kappa$ B has been shown to promote cancer cell survival under death-inducing conditions [19, 20]. Moreover, its inhibition prevented tumour angiogenesis, invasion and metastasis of PC-3 xenografts in nude mice [21, 22]. Constitutive activation of NF- $\kappa$ B has been shown to be an early event in breast carcinogenesis [11]. Interestingly, the tumor suppressor PTEN inhibits NF- $\kappa$ B activation [23] and has been implicated in prostate cancer [24]. In addition, the IL-6 gene, a target of NF- $\kappa$ B [25], is overexpressed in localized prostate cancer and is thought to promote prostate cancer cell growth [26-28]. Although the role of NF- $\kappa$ B in prostate cancer cells and tissues was investigated in several previous studies, none has reported the use of NF- $\kappa$ B subcellular localization as a prognostic marker.

In the initial study the expression of NF- $\kappa$ B was detected in cancer cells and in basal cells of normal glands, which represent less differentiated cells which can proliferate, but NF- $\kappa$ B in the nucleus was specific to cancer cells. In basal cells of normal glands, NF-

$\kappa$ B may be tightly regulated and activated only under specific conditions, whereas in cancer cells the regulation of NF- $\kappa$ B may be altered. The analysis of NF- $\kappa$ B regulating pathways and molecules is in progress to detect mutations that promote constitutive activation of NF- $\kappa$ B in prostate cancer cells. Although nuclear NF- $\kappa$ B did not correlate with the histological grade, there was a tendency towards higher nuclear staining in moderately and poorly differentiated tissues (Table 1) indicating that the aberrant activation of NF- $\kappa$ B may occur after the initial steps of carcinogenesis.

In a second study the Gleason score and NF- $\kappa$ B localization were compared with patient outcome. As expected, higher Gleason scores correlated with poor outcome, but moderately differentiated tissues (Gleason 5-7) represented over half of specimens in both outcome groups, and thus cancer progression could not have been predicted based on histological grade alone. The combination of Gleason score and nuclear NF- $\kappa$ B staining significantly improved the prediction of outcome. However, some patients were still incorrectly categorized, suggesting that a combination of several markers will eventually provide the best overall strategy.

There are different factors that can be used to define a poor outcome in prostate cancer. We chose the progression to bone metastases as it is the lethal form of the disease and the existence of a molecular marker capable of predicting such progression would help in tailoring treatment protocols. Second, NF- $\kappa$ B is also important in osteoclastogenesis [27] and is constitutively activated in the bone metastases-derived PC-3 prostate cancer cell line. This suggests that the activation of NF- $\kappa$ B might play a role in bone metastasis in prostate cancer. Recently, NF- $\kappa$ B has also been shown to bind a  $\kappa$ B response element in the promoter of the PSA gene, thereby activating PSA expression [13]. We are presently testing whether the nuclear localization of NF- $\kappa$ B could help to predict a biochemical relapse after radical prostatectomy.

Overall, NF- $\kappa$ B expression is detectable mainly in basal cells of normal prostate glands and in prostate cancer tissues. A nuclear localization of NF- $\kappa$ B (p65) is detectable in prostate cancer tissues but does not correlate with the degree of histological differentiation. NF- $\kappa$ B may be useful combined with the Gleason score, to stratify patients into low- and high-risk categories of cancer progression. . These results justify continuing a larger scale study analysing NF- $\kappa$ B as a prognostic marker. NF- $\kappa$ B may eventually aid in tailoring therapy according to risk categories.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Dr Christine Maugard for statistical assistance. This research was funded in part by the Canadian Uro-Oncology Group and Astra-Zeneca Research Award. L.L. is funded by La Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal, the Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, and Canderel (Institut du cancer de Montréal). A.-M.M.-M. is a recipient of a Chercheur National fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**REFERENCES**

1. Bostwick D.G. Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies. *Am J Surg Pathol* 1994; **18**:796-803.
2. Grossfeld G.D. Chang J.J., Broering J.M. et al. Under staging and under grading in a contemporary series of patients undergoing radical prostatectomy: results from the Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor database. *J Urol* 2001; **165**:851-6.
3. Gilmore T.D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 1999; **18**:6842-4.
4. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000, **18**:621-63.
5. Ghosh, S., Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; **109** Suppl: S81-96.
6. Barkett M., Gilmore T.D. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**:691024.7. Baldwin A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 2001; **107**:241-6.
8. Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Rev Cancer* 2002; **2**: 301-10.
9. Wang, W., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Larry, L., Cleary, K.R., Chiao, P.J. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 119-27.7.
10. Sovak M.A., Bellas R.E., Kim D.W. et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; **100**:2952-60.

11. Kim D.W., Sovak M.A., Zanieski G. et al. Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis* 2000: **21**:8719.
12. Sumitomo M., Tachibana M., Nakashima J. et al. An essential role for nuclear factor kappa B in preventing TNF-alpha- induced cell death in prostate cancer cells. *J Urol* 1999: **161**:674-9.
13. Hermann JL., Beham, AW., Sarkiss M. et al. Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF-kB pathway. *Exp Cell Res* 1997: **237**:101-09.
14. Chen, C.D., Sawyers, C.S. NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol* 2002: **22**: 2862-70.
15. Gasparian, A.V., Yao, Y.J., Kowalczyk, D., et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 2002: **115**: 141-51.
16. Palayoor, S.T., Younell, M.Y., Calderwood, S.K., Coleman, C.N., Price, B.D. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 1999: **18**: 7389-94.
17. Suh, J., Payvandi, F., Edelstein, L.C., et al. Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* 2002: **52**: 183-200.
18. Gleason D.F.: Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human Path* 1992: **23**:273-9.
19. Wang C.Y., Mayo M.W., Baldwin A.S.Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996: **274**:784-7.
20. Wang C.Y., Mayo M.W., Korneluk R.G. et al. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c- IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998: **281**:1680-3.



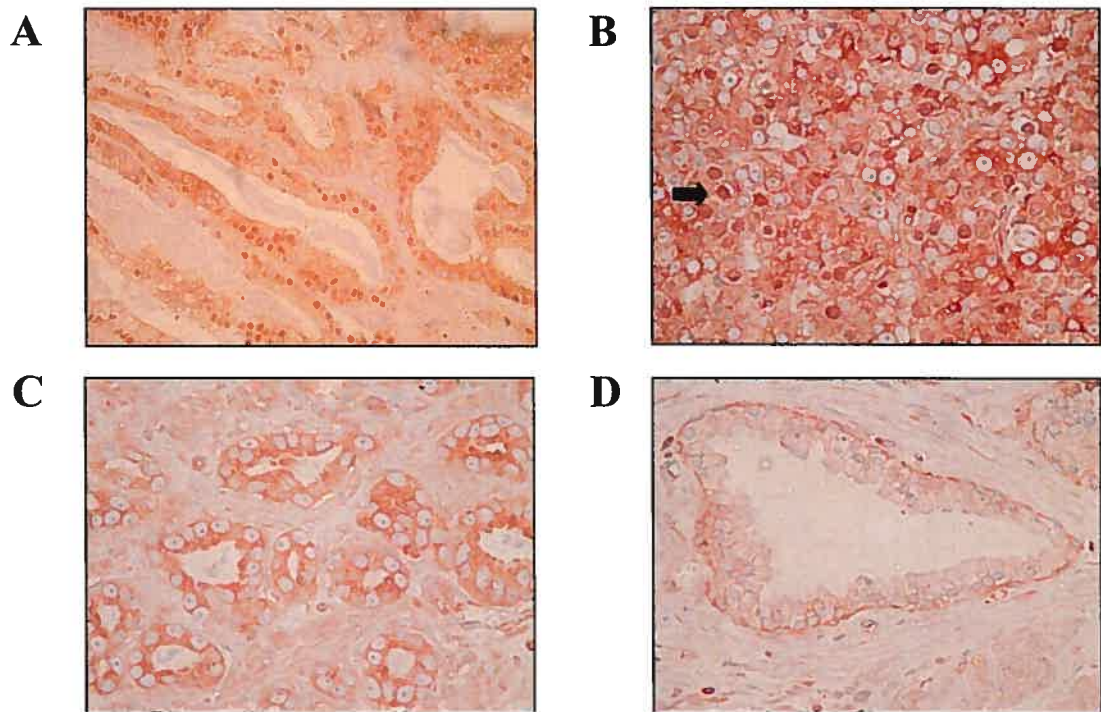
21. Lindholm P.F., Bub J., Kaul S., Shidham, V.B., Kajdascy-Balla, A. The role of constitutive NF-kappaB activity in PC-3 human prostate cancer cell invasive behavior. *Clin Exp Metastasis* 2000: **18**:471-9.
22. Huang S., Pettaway C.A., Uehara H., Bucana, C.D., Fidler, I.J. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001: **20**:4188-97.
23. Gustin J.A., Maehama T., Dixon J.E., Donner, D.B. The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor- induced nuclear factor kappa B activity. *J Biol Chem* 2001: **276**:27740-4.
24. Abate-Shen C., Shen M.M.: Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 2000: **14**:2410-34.
25. De Bosscher K., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Plaisance, S., Boone, E., Haegeman, G. Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000: **97**:3919-24.
26. Chung T.D., Yu J.J., Spiotto M.T., Bartkowski, M., Simons, J.W. Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. *Prostate* 1999: **38**:199-207.
27. Okamoto M., Lee C., Oyasu R. Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1997: **57**:141-6.
28. Giri D., Ozen M., Ittmann M. Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *Am J Pathol* 2001: **159**:2159-65.
29. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrinol Rev* 1999: **20**: 347-57.

**Table 1: Detection of nuclear NF- $\kappa$ B in prostate cancer tissues stratified by Gleason category**

Nuclear staining	Gleason score		
	2-4	5-7	8-10
<i>Initial study</i>			
Positive	1/9	10/24	7/12
Negative	8/9	14/24	5/12
<i>Second study</i>			
Nuclear score (%)			
0-10	4/5	11/17	3/8
>10	1/5	6/17	5/8

**Table 2: Clinical outcomes stratified by Gleason score and according to NF- $\kappa$ B nuclear staining**

Group	Good outcome (%)	Poor outcome (%)	P value
Number	13	17	
Gleason Score			
2-4	4 (31)	1 (6)	
5-7	8 (62)	9 (53)	
8-10	1 (7)	7 (41)	0.05
Overall staining (%)			
0	4 (31)	3 (18)	
1-10	7 (55)	4 (24)	
10-30	1 (7)	5 (29)	
30-100	1 (7)	5 (29)	>0.05
0-10	11 (85)	7 (41)	
>10	2 (15)	10 (59)	0.026
Risk Category			
Low	11 (85)	5 (29)	
High	2 (15)	12 (71)	0.004



**Figure 1. NF- $\kappa$ B immunostaining patterns in the prostate, showing nuclear and/or cytoplasmic staining in:**

a) prostate cancer of Gleason score 5 (x200)

b) Gleason score 9 (x400)

c) cytoplasmic only in Gleason score 6 (x400)

d) cytoplasmic staining only of basal cells in normal tissue surrounding a tumour. (x400)

Arrow: Stained nucleus

### CHAPITRE III.

## **NF-kappaB Nuclear Localization is Predictive of Biochemical Recurrence in Patients with Positive Margin Prostate Cancer**

**Vincent Fradet<sup>a</sup>, \*Laurent Lessard<sup>b</sup>, Louis R. Bégin<sup>c</sup>, Pierre Karakiewicz<sup>a</sup>,  
Anne-Marie Mes Masson<sup>b,d</sup> and Fred Saad<sup>a,b</sup>**

*Département de chirurgie (urologie), CHUM –Montréal, Québec, Canada<sup>a</sup>,  
Centre de recherche du CHUM, and Institut du Cancer de Montréal, Montréal,  
Québec, Canada<sup>b</sup>, Service d'anatomopathologie, Hôpital du Sacré-Cœur de  
Montréal, Montréal, Québec, Canada<sup>c</sup>, and Département de médecine, Université de  
Montréal, Québec, Canada<sup>d</sup>.*

Article publié dans:

**Clin Can Res., vol. 10: 8460-8464, 2004**

**Key Words:** radical prostatectomy; prognostic marker; immunohistochemistry

*\*L. Lessard (40%) et V. Fradet (45%) sont responsables d'environ 85% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. L.R. Bégin, pathologiste, a révisé les lames histologiques et P.I. Karakiewicz a effectué les analyses statistiques. A.-M Mes-Masson et F. Saad ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

**ABSTRACT**

**PURPOSE:** Radical prostatectomy (RP) patients with positive surgical margins are at increased risk for recurrence emphasizing the need for prognostic markers to stratify probable outcome for optimal patient management decisions. We tested the hypothesis that the nuclear localization of nuclear factor - kappaB (NF- $\kappa$ B), a transcription factor involved in the regulation of cell growth, angiogenesis, invasion and apoptosis, is associated with an increased risk of biochemical recurrence after RP.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** Analyses addressed data from 42 patients, aged 52 to 72 years (mean 63.7), who exhibited positive surgical margins after RP. Immunohistochemical analysis of NF- $\kappa$ B (p65) was performed on the positive margin tissue. A nuclear staining cutoff of  $>5\%$  was considered positive. The relation between nuclear NF- $\kappa$ B expression and biochemical recurrence (PSA  $>0.3\text{ng/ml}$  and rising) after RP was tested in univariate and multivariate Cox regression models.

**RESULTS:** Biochemical recurrence was recorded in 23 patients (54.8%) (median follow-up 3.2 years). Univariate Cox regression demonstrated a 4.9-fold (95% CI: 1.5-16.7,  $p=0.01$ ) higher rate of recurrence in men with NF- $\kappa$ B  $>5\%$ . In the multivariate model, after controlling for primary ( $p=0.004$ ), and secondary ( $p=0.7$ ) Gleason patterns, lymph node ( $p=0.06$ ) and seminal vesicle invasion ( $p=0.2$ ), and pre-operative PSA ( $p=0.009$ ), NF- $\kappa$ B  $>5\%$  was associated with a 6.2-fold higher risk of biochemical recurrence (95% CI: 1.7-23.5,  $p=0.007$ ).

**CONCLUSION:** In univariate and multivariate analysis, NF- $\kappa$ B nuclear expression was strongly predictive of biochemical recurrence in patients with positive surgical margins after RP. We propose that nuclear NF- $\kappa$ B may serve as a useful independent molecular marker for stratifying patients at risk for recurrence.

## INTRODUCTION

Prostate cancer is the most commonly diagnosed cancer, and the second leading cause of cancer related deaths in North-American men. Radical prostatectomy (RP) represents one of two standard treatment options for men with clinically localized prostate cancer. It is still controversial whether immediate adjuvant treatment should be instituted in the presence of pathologically confirmed positive surgical margins after RP. Several candidate molecular markers, including RNaseL, GSTP1, p21, p27, p53, NKX3.1, PTEN and TERT, have been or are currently being studied in an effort to enhance the accuracy of pathologic stage and grade and pretreatment serum prostate-specific antigen (PSA), in predicting the risk of biochemical failure after RP (1-3). To date, none have been adopted into routine clinical practice.

Classical nuclear factor (NF)- $\kappa$ B transcription factor is a heterodimer formed by the p50 and RelA (p65) proteins (4-7). It is expressed in most cells but kept inactive and maintained in the cytoplasm by interaction with I $\kappa$ B inhibitors. Normally, the activation of NF- $\kappa$ B requires signals that lead to the phosphorylation (by the activated IKK complex), ubiquitination and proteasome-dependent degradation of I $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B then translocates to the nucleus and activates the expression of various genes involved in cell growth, differentiation, inflammatory responses and the regulation of apoptosis. There is growing evidence that NF- $\kappa$ B is implicated in oncogenesis (8, 9). NF- $\kappa$ B is constitutively activated in many lymphoid and nonlymphoid cancers (10, 11). NF- $\kappa$ B can prevent cell death by apoptosis in many cell types (including the human prostate cancer PC-3 and DU145 cells lines) after chemotherapy, radiotherapy or TNF- $\alpha$  treatment (12, 13). More recently, constitutive activation of NF- $\kappa$ B has been detected in androgen-independent prostate cancer cell lines as well as in prostate cancer tissues (14-17). In particular, strong nuclear NF- $\kappa$ B staining was observed in PCa lymph node metastases (18). Moreover, NF- $\kappa$ B expression in RP specimen was shown to correlate with progression to bone metastasis (19). NF- $\kappa$ B aberrant activation has been shown to promote cell growth, survival, and metastasis in cell lines and xenograft models (20-25).

While the role of NF- $\kappa$ B in prostate carcinogenesis and cancer progression is becoming more apparent, the clinical usefulness of NF- $\kappa$ B as a predictor of disease progression has not yet been fully investigated. We tested the hypothesis that NF- $\kappa$ B could be a prognostic marker for eventual biochemical recurrence in men with positive pathological surgical margins after RP.

## **PATIENTS AND METHODS**

After providing informed consent, 90 consecutive patients with positive margins were initially identified in a patient database but 48 were excluded for the following reasons: absence of tissue blocks with true positive margins after central pathological review; detectable postoperative PSA; and neo-adjuvant hormone therapy or adjuvant therapy before PSA recurrence. Tissue slides of the remaining 42 formalin-fixed paraffin-embedded specimens were immunostained for NF- $\kappa$ B transcription factor by the biotin-streptavidin-peroxidase method using the NF- $\kappa$ B p65 (F-6) monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA) that recognizes NH<sub>2</sub>-terminal sequences of the p65 subunit.

Tissue sections were deparaffinized with toluene, rehydrated through graded EtOH, treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to eliminate endogenous peroxidase activity, and incubated 10 minutes at 95°C in citrate buffer (pH 6.0) for antigen unmasking. Unspecific antigen was blocked with a protein blocking serum-free reagent (Dako Diagnostics Canada Inc., Mississauga, Canada). Slides were then incubated for 60 minutes in a humidified chamber with the specific p65 antibody. Optimal concentration (1 $\mu$ g/ml) was determined by serial dilutions. Twenty-minute incubations with the secondary biotinylated antibody and Steptavidin-HRP (Dako Diagnostics Canada Inc.) were performed sequentially. Reaction products were developed using diaminobenzidine containing 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a substrate for peroxidase. Hematoxylin counterstaining was done for ease of reading. Substitution of the primary antibody with PBS served as a negative control.



Slides were examined under standard light microscopy, and subcellular staining was identified. NF- $\kappa$ B nuclear localization was evaluated as an overall proportion of tumor cells with positive nuclear staining. An average of 20 fields per tumor (100 cells per field) were analyzed at 400x. Positive nuclear staining was defined as a sharp brown coloration in the nucleus of a cell. All slides were independently analyzed by two blinded observers. Interpretations diverging <10% were independently reanalyzed resulting in concordance scores. We used >5% positive tumor cell nuclear staining as a cutoff indicating significant NF- $\kappa$ B activation in cancer tissue. Univariate biochemical-free survival analyses revealed that 5% represented the most statistically significant cutoff in this data set.

Pretreatment serum prostate specific antigen (pPSA), pathologic Gleason score, presence of extracapsular extension, seminal vesicle invasion, pelvic lymph node metastasis, and surgical margin status were recorded for each patient. Positive surgical margins were defined by the presence of tumor cells at the inked margin of resection.

Postoperative follow-up consisted of physical examination and serial serum PSA measurements. The Hybritech PSA assay (Hybritech Tandem R, San Diego, CA) was used principally, but not exclusively, for both pretreatment evaluation and disease follow-up. PSA failures were defined as serum levels >0.3 ng/ml and rising, and failure time was dated back to first PSA >0.3ng/ml. PSA assays were generally obtained at one month after surgery, then every 3 months for the first year, every 6 months for two subsequent years, and then annually. For statistical purposes, patients who did not relapse were censored at the date of their last undetectable PSA assay.

The probability of remaining free from recurrence [mean with 95% confidence intervals (CIs)] was calculated using the Kaplan-Meier method. Univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models were used to test the association of clinical and pathological variables with biochemical failure. All statistical tests were performed using SPSS, version 10 (SPSS, Inc., Chicago, IL) and

S-PLUS Professional, version 1 (MathSoft Inc., Seattle, WA). Two-sided tests with significance level at 0.05 were used.

## RESULTS

Table 1 shows clinical and pathological characteristics of our patient cohort. Age at surgery was 52 to 72 years (mean 63.7). Preoperative PSA ranged from 3 to 36 ng/ml (mean 12.9). In all, 64% of patients had a Gleason sum of 7. Follow-up ranged from 0.3 to 12.2 years (mean 3.6, median follow-up, 3.2 years). Biochemical recurrence occurred in 23 (54.8%) patients. RP tissues were evaluated for NF- $\kappa$ B staining and classified as having staining either >5% or <5% nuclear staining in tumor cells. Normal prostate glands demonstrated cytoplasmic staining mainly in the basal cell layer (Figure 1A). Cancer glands almost always demonstrated cytoplasmic staining of the NF- $\kappa$ B marker, mostly of high intensity (Figure 1B). Nuclear staining was only observed in cancerous glands although it was quite heterogeneous within the tumor (Figure 1C). We found no correlation between the intensity of the staining and prognosis.

Table 2 shows the univariate and multivariate Cox survival analyses addressing the association between NF- $\kappa$ B and biochemical prostate cancer recurrence (PSA >0.3ng/mL and rising) after RP. Covariates include age, pPSA, pathologic Gleason score, seminal vesicle and lymph node metastases. Kaplan-Meier survival curves were constructed to show the biochemical recurrence free survival difference between patient with positive and negative nuclear NF- $\kappa$ B staining (Figure 2) and these results indicate a clear difference between the two groups in terms of recurrence.

Univariate Cox regression demonstrated a 4.9-fold (95% CI: 1.5-16.7,  $p=0.01$ ) higher rate of recurrence in men with >5% NF- $\kappa$ B nuclear staining. In the multivariate model, after controlling for pathologic Gleason sum ( $p=0.03$ ), lymph node metastases ( $p=0.07$ ), seminal vesicle invasion ( $p=0.6$ ), and pPSA ( $p=0.01$ ), nuclear NF- $\kappa$ B >5% was associated with a 6.3-fold higher risk of biochemical recurrence (95% CI: 1.7-23.5,  $p=0.007$ ; Table 2). These results indicate that NF- $\kappa$ B status appears to represent

the most statistically significant predictor of biochemical recurrence in presence of positive surgical margins after RP.

## **DISCUSSION**

PSA recurrence after RP is a precursor of cancer progression with a mean time to metastases estimated at 8 years from the time of PSA elevation. Time to biochemical progression, PSA doubling time, and Gleason score have been identified as predictors of progression to metastatic disease. Once metastatic disease has occurred, the median time to death is 5 years (26). Therefore, PSA recurrence represents a valuable surrogate marker of cancer progression.

Patients with positive margins have a 2-fold higher recurrence rate when compared with patients with negative margins. The progression-free probability at 5 years for patients who have negative margins at radical prostatectomy is approximately 80% compared with 42% to 64% for men with positive margins (27, 28). Adjuvant radiation therapy is more effective if administered early before clinical failure. However, radiation may not be required in an appreciable proportion of patients who will not fail, despite having positive surgical margins. The identification of prognostic factors predictive of recurrence may help in developing a risk-adjusted approach to timely adjuvant therapy after RP.

Several pathological features have been shown to predict biochemical recurrence including preoperative PSA level, pathologic T stage, Gleason score (biopsy and prostatectomy), margin status, lymph node and seminal vesicle involvement, perineural invasion, and tumor volume (27, 29). Although histological grading is one of the most important predictors, its usefulness is limited since the majority of cases are moderately differentiated tumors (Gleason 6 or 7). The multivariate input of multiple predictors has been used in nomogram format to provide the most accurate and bias-free estimates of recurrence. (30, 31) However, restrained input from predictor variables limits the accuracy of these tools. Therefore, there is a clear need

for novel molecular markers that can complement standard predictors and increase the accuracy of existing predictive tools.

Several nuclear markers have been evaluated for their prognostic value in prostate cancer. Over expression of the cell-cycle inhibitor protein p21 has been shown as an independent predictor of response to salvage radiotherapy after RP (30). Progression to androgen independence has also been correlated with p21 (31). Expression of p53 and the combined loss of PTEN and p27 have been shown as independent predictors of disease-free survival in multivariate analyses (32, 33). Other promising candidate biomarkers currently under investigation and associated with disease progression include RNASEL, GSTP1, NKX3.1, and TERT (2, 3).

The results of the study we report here demonstrate that positive NF- $\kappa$ B nuclear staining of cancer cells at the margin is associated with a 6-fold increase in the risk of biochemical recurrence in patients with positive RP surgical margins. In a multivariate analysis, we confirmed the value of NF- $\kappa$ B as an independent prognostic variable in this patient population. To date none of the molecular prognostic markers have been applied to routine clinical practice, although with further confirmatory studies, we believe that the expression nuclear NF- $\kappa$ B, either alone or in combination with other molecular markers, may eventually be useful in improving the value of parameters commonly used to help predict outcome in patients with prostate cancer.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by a grant from the Canadian Prostate Cancer Research Foundation and the Canadian Uro-Oncology/AstraZenca award. A.-M. M. M. is a recipient of a Chercheur National fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), P.K. receives a Chercheur-boursier clinicien Junior 1 award from the FRSQ, and L.L. is supported by a Canadian Institute of Health Research/Canadian Prostate Cancer Research Initiative studentship. The authors thank Jean-Baptiste Lattouf, M.D., Christine Maugard, M.D., Ph.D., the CHUM division of Urology and the pathology department of Notre-Dame Hospital for their contribution to this research.

**REFERENCES**

1. Miller JC, Zhou H, Kwekel J, et al. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* 2003;3:56-63.
2. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349:366-81.
3. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res* 2004;10:3943-53.
4. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6910-24.
5. Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 1999;18:6842-4.
6. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-63.
7. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109 Suppl:S81-96.
8. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 2001;107:241-6.
9. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-10.
10. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997;100:2952-60.
11. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:119-27.
12. Sumitomo M, Tachibana M, Nakashima J, et al. An essential role for nuclear factor kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death in prostate cancer cells. *J Urol* 1999;161:674-9.

13. Flynn V, Jr., Ramanitharan A, Moparty K, et al. Adenovirus-mediated inhibition of NF-kappaB confers chemo-sensitization and apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2003;23:317-23.
14. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 1999;18:7389-94.
15. Chen CD, Sawyers CL. NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol* 2002;22:2862-70.
16. Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 2002;115:141-51.
17. Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, et al. Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* 2002;52:183-200.
18. Ismail HA, Lessard L, Mes-Masson AM, Saad F. Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate* 2004;58:308-13.
19. 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 Int* 2003;91:417-20.
20. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001;20:4188-97.
21. Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Xu K, Tsao SW, Wong YC. Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene* 2003;22:4498-508.
22. Hodge JC, Bub J, Kaul S, Kajdacsy-Balla A, Lindholm PF. Requirement of RhoA activity for increased nuclear factor kappaB activity and PC-3 human prostate cancer cell invasion. *Cancer Res* 2003;63:1359-64.
23. Levine L, Lucci JA, 3rd, Pazdrak B, et al. Bombesin stimulates nuclear factor kappa B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:3495-502.

24. Suh J, Rabson AB. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004;91:100-17.
25. Cinar B, Yeung F, Konaka H, et al. Identification of a negative regulatory cis-element in the enhancer core region of the prostate-specific antigen promoter: implications for intersection of androgen receptor and nuclear factor-kappaB signalling in prostate cancer cells. *Biochem J* 2004;379:421-31.
26. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *Jama* 1999;281:1591-7.
27. Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, Walsh PC. Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 1996;20:286-92.
28. Ohori M, Wheeler TM, Kattan MW, Goto Y, Scardino PT. Prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol* 1995;154:1818-24.
29. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. A multivariate analysis of clinical and pathological factors that predict for prostate specific antigen failure after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol* 1995;154:131-8.
30. Rigaud J, Tiguert R, Decobert M, et al. Expression of p21 cell cycle protein is an independent predictor of response to salvage radiotherapy after radical prostatectomy. *Prostate* 2004;58:269-76.
31. Fizazi K, Martinez LA, Sikes CR, et al. The association of p21((WAF-1/CIP1)) with progression to androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:775-81.
32. Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi KF, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 1995;1:1295-300.
33. Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased



risk of recurrent disease in localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1474-9.

**Table 1. Clinical and pathological characteristics of 42 evaluable patients who were treated with RP.**

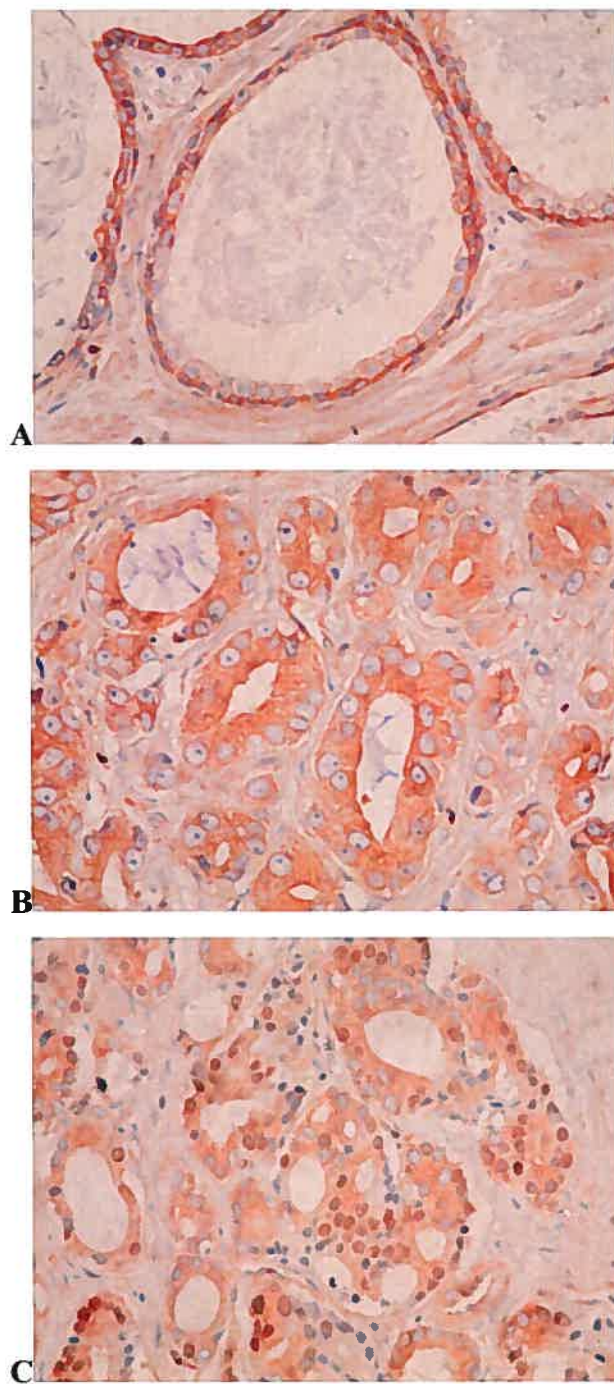
	<b>NF-<math>\kappa</math>B &gt; 5%</b>	<b>NF-<math>\kappa</math>B <math>\leq</math> 5%</b>	<b>p value</b>
<b>No. of patients</b>	27	15	-
<b>Age (y)</b> Mean (SE)	64.1 (0.99)	63.1 (1.6)	0.6
<b>PSA (ng/mL)</b> Mean (SE)	13.9	10.96 (1.56)	0.2
<b>Gleason sum (%)</b>			
6	4 (14.8)	4 (26.7)	0.1
7	17 (63.0)	10 (66.7)	
8	0	1 (6.7)	
9	6 (22.2)	0	
<b>Seminal vesicle invasion</b>	3	2	0.8
<b>Lymph node metastases</b>	4	0	0.1

**NOTE: Data are tabulated according to NF- $\kappa$ B nuclear staining status**

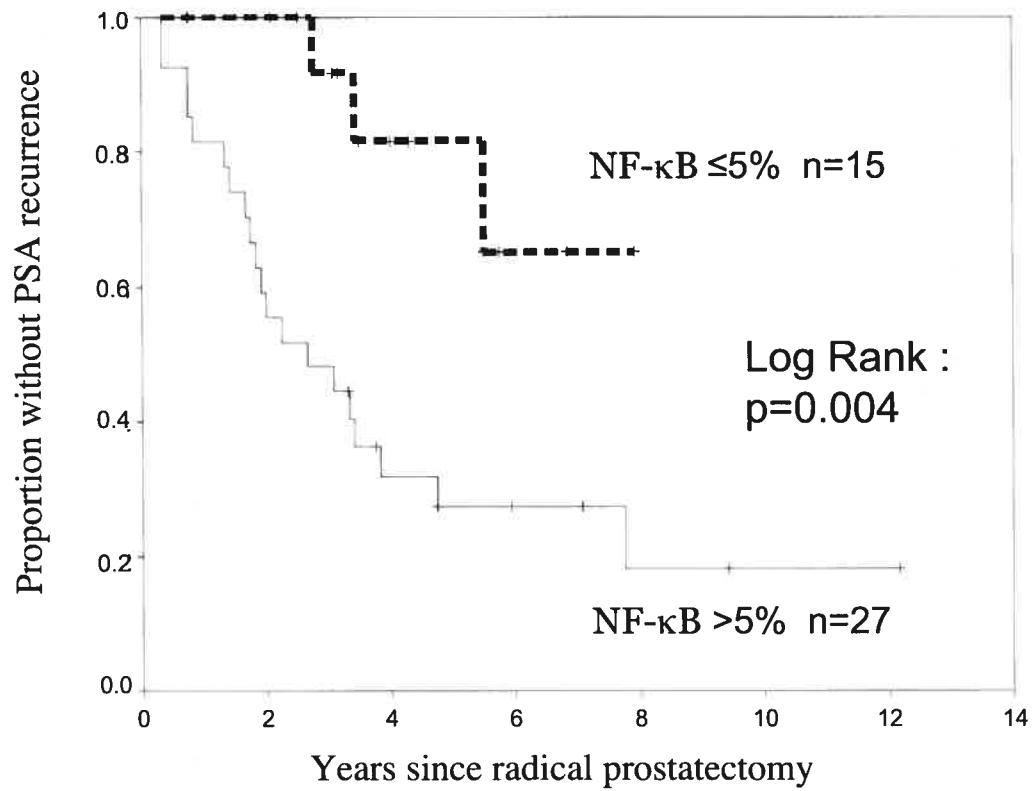
**Table 2. Univariate and multivariate Cox survival analyses addressing the association between NF- $\kappa$ B and biochemical prostate cancer recurrence (PSA >3 ng/ml and rising) after RP**

Predictors variable	Biochemical recurrence after RP	
	Univariate – rate ratio and its 95% confidence interval	Multivariate – rate ratio and its 95% confidence interval
NF- $\kappa$ B	4.9 (1.47 – 16.70), p=0.01	6.2 (1.64 – 23.53), p=0.007
Age (y)	0.97 (0.90 – 1.05), p=0.4	0.95 (0.88 – 1.03), p=0.2
pPSA (ng/mL)	0.96 (0.91 – 1.02), p=0.2	0.91 (0.85 – 0.98), p=0.01
Gleason sum	-, p=0.009	-, p=0.03
Seminal vesicle invasion	2.5 (0.83 – 7.46), p=0.1	2.2 (0.65 – 7.40), p=0.2
Lymph nodes metastases	2.2 (0.64 – 7.68), p=0.2	4.8 (0.99 – 23.62), p=0.052

**NOTE: Covariates include age, pPSA, Gleason sum, seminal vesicle invasion, lymph node metastases. Primary and secondary Gleason patterns were used to define the Gleason sum.**



**Figure 1. Immunohistochemical detection of NF- $\kappa$ B (p65 subunit) in prostate tissues. Note the strong cytoplasmic staining in normal prostate basal cells (A), whereas tumor tissues show either predominant cytoplasmic staining (B) or cytoplasmic and nuclear staining (C)**



**Figure 2. Kaplan-Meier curve of biochemical recurrence-free survival according to NF-κB status.**

**CHAPITRE IV.**

**Nuclear Localization of NF- $\kappa$ B p65 in Primary Prostate Tumors is  
Highly Predictive of Pelvic Lymph Node Metastases**

**Laurent Lessard, Pierre I. Karakiewicz, Pascale Bellon-Gagnon, Mona Alam-Fahmy, Hazem Ismail A., Anne-Marie Mes-Masson, Fred Saad\***

*Centre de recherche du CHUM, Institut du cancer de Montréal, and the Department of Surgery (Urology), Hôpital Notre-Dame, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1*

Article publié dans:

**Clin Can Res., vol: 12. 5741-5745, 2006**

**Key words:** Prostatic Neoplasms, Lymph Nodes, NF-kappaB, Prognosis, Immunohistochemistry

*\*L. Lessard est responsable d'environ 60% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. P.I. Karakiewicz a effectué les analyses statistiques et a contribué à la rédaction de l'article. P. Bellon-Gagnon et H.A. Ismael ont coloré les lames histologiques et P. Bellon-Gagnon a analysé les résultats avec L. Lessard. M. Alam-Fahmy, pathologiste, a révisé les lames sélectionnées dans cette étude. A.-M Mes-Masson et F. Saad ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

**ABSTRACT**

**PURPOSE:** Lymph node invasion (LNI) is associated with increased risk of prostate cancer progression. Unfortunately, pelvic lymph node dissections are fraught with a high rate of false-negative findings, emphasizing the need for highly accurate markers of LNI. Because nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) is a candidate marker of PCa progression, we tested the association between nuclear localization of NF- $\kappa$ B in radical prostatectomy specimens and the presence of LNI.

**EXPERIMENTAL DESIGN:** NF- $\kappa$ B expression in radical prostatectomy specimens was assessed with a monoclonal NF- $\kappa$ B p65 antibody, in 20 patients with LNI and in 31 controls with no LNI and no biochemical relapse 5 years after radical prostatectomy. Univariate and multivariate logistic regression models were used. The accuracy of multivariate predictions with and without NF- $\kappa$ B was quantified with the area under the receiver operating characteristics curve and 200 bootstrap resamples were used to reduce overfit bias.

**RESULTS:** Univariate regression models demonstrated a 7% increase in the odds of observing LNI for each 1% increase in NF- $\kappa$ B nuclear staining (odds ratio, 1.07;  $p=0.003$ ). In multivariate models, each 1% increase in NF- $\kappa$ B was associated with an 8% increase in the odds of LNI (odds ratio, 1.08;  $p=0.03$ ) and its statistical significance was only surpassed by the presence of seminal vesicle invasion ( $p=0.003$ ). Addition of NF- $\kappa$ B to all other predictors increased the accuracy of LNI prediction by 2.3% (from 84.8 to 87.1%;  $p<0.001$ ).

**CONCLUSION:** This is the first study that shows that the extent of nuclear localization of NF- $\kappa$ B in primary prostate tumors is highly accurately capable of predicting the probability of locoregional spread of prostate cancer.

## INTRODUCTION

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the second leading cause of cancer-related mortality in North American men. Most tumors are now detected at an early stage due to prostate specific antigen (PSA) screening. Definitive treatment of localized PCa predominantly consists of radical prostatectomy or radiation therapy. Unfortunately, pelvic lymph node metastases may be present in a significant number of patients at the time of surgery and are associated with an increased risk of disease recurrence and progression to distant metastases and death (1-3). Lymph node status is frequently unknown since pelvic lymph node dissections are often omitted. When pelvic lymph node dissection is done, many surgeons limit the dissections to the obturator lymph nodes. Recent data suggest that more extensive pelvic lymph node dissection might be necessary to detect occult lymph nodes metastases, as prevalence of lymph nodes invasion (LNI) might be directly related to pelvic lymph node dissection extent (4-6). Indeed, a more extensive pelvic lymph node dissection identifies metastases that would not be detected by limited dissections, as prostate cancer nodal metastases do not follow a predefined pathway of metastatic spread (7). This observation was confirmed by several studies, where a limited pelvic lymph node dissection was associated with a high prevalence of false-negative findings (4, 5, 7-15). For example, Bader et al. (4) reported that up to 19% of patients with LNI may have metastases in the internal iliac distribution, which is not subjected to routine pelvic lymph node dissection.

In individuals at risk of LNI, accurate markers are needed to predict the probability of occult locoregional spread. Moreover, informative preoperative markers are also needed to more accurately predict in whom a pelvic lymph node dissection should be done and what should be its extent. Given that the ability of clinical markers is limited, the focus has shifted to molecular markers. Among several novel markers, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) represents a promising predictor of stage and prognosis.

The NF- $\kappa$ B family of transcription factors comprises five subunits that interact to form homodimers or heterodimers (16). These include c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B2/p52 and



the classical p65 and NF- $\kappa$ B1/p50 subunits. The p65-p50 dimer is normally retained in the cytoplasm by the I $\kappa$ B ( $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\epsilon$ ) family of inhibitory proteins. Activation and nuclear import of p65-p50 requires the induction of signaling pathways that converge to the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex composed of IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , and NEMO/IKK- $\gamma$ . The activated IKK complex phosphorylates I $\kappa$ B proteins that are subsequently degraded by the proteasome. Once released from its inhibitor, the p65-p50 dimer translocates into the nucleus and binds consensus promoter sequences to activate transcription. NF- $\kappa$ B target genes are involved in multiple cellular processes, such as inflammation, proliferation, survival, angiogenesis, and invasion, which have been shown to function aberrantly in several cancers. As such, elevated NF- $\kappa$ B activity has been observed in many tumors (17, 18), including prostate cancer (19). In metastatic prostate cancer, inhibition of NF- $\kappa$ B activity in PC-3 cells is associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-8 (IL-8), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and a concomitant decrease in angiogenesis, invasion, and metastasis in nude mice (20).

We and others have shown that assessment of the expression (21) or the nuclear localization (22-24) of NF- $\kappa$ B (p65) can improve the predictions of biochemical recurrence (BCR) in patients with prostate cancer. Additionally, we recently detected high levels of NF- $\kappa$ B p65 nuclear localization in >80% of prostate cancer lymph node metastases (25). However to date, the ability of NF- $\kappa$ B to predict LNI has not been explored. Based on this consideration, we hypothesized that NF- $\kappa$ B represents a statistically significant, independent and informative predictor of LNI after accounting for powerful and established variables, such as pathologic stage, grade and PSA. To test this hypothesis, we assessed the association between the extent of nuclear expression of NF- $\kappa$ B and the rate of LNI, after accounting for radical prostatectomy stage, grade and preoperative PSA.

## PATIENTS AND METHODS

### *Selection of patients*

Following informed consent, patients who underwent a radical prostatectomy at our institution between years 1990 and 2000 were selected from the laboratory database according to their LNI status and radical prostatectomy specimen availability. A total of 51 patients were included. Of these, 20 had LNI and 31 without LNI were used as controls. The selection of controls was performed from a subset of patients who remained free of biochemical recurrence for at least 5 years after radical prostatectomy. No patient received neoadjuvant radiotherapy or hormonal therapy.

### *Immunohistochemistry*

NF- $\kappa$ B expression in prostate tumor sections was assessed with the monoclonal p65 NF- $\kappa$ B F6 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) that recognizes an NH<sub>2</sub>-terminal sequence of the p65 subunit. Immunostaining was done with the biotin-streptavidin-peroxidase method. Briefly, formalin-fixed paraffin-embedded sections were deparaffinized in toluene and rehydrated through graded ethanol followed by distilled water. Endogenous peroxidase was quenched in 3% hydrogen peroxide and antigen retrieval was done by boiling slides in the microwave for 15 minutes in citrate buffer (pH 6,0). Nonspecific sites were blocked with serum-free protein block for 5 minutes (Dako Diagnostics Canada Inc., Mississauga Ontario) and slides were then incubated with the primary antibody at a 1:50 dilution for 1 hour at room temperature. A biotinylated secondary antibody followed by streptavidin-HRP (Dako Diagnostics Canada Inc., Mississauga Ontario) were applied for 20 minutes each. All rinsing steps between antibodies were done in PBS for 5 minutes. Chromogen reaction using a 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solution kit (Dako Diagnostics Canada Inc., Mississauga Ontario) was carried out for 5 minutes. Slides were counterstained with Harris Hematoxylin for 10 seconds, dehydrated in ethanol and toluene and then mounted. Negative controls were included where the primary antibody was replaced by PBS.

### *Evaluations and quantification*

Between two and three slides per patient were analyzed for the extent of nuclear localization of NF- $\kappa$ B by two evaluators. The average proportion of cancer cells with

nuclear NF- $\kappa$ B staining was estimated for each slide. For each patient, the tumor specimen with the highest proportion of nuclear NF- $\kappa$ B staining was selected for data analysis. Interpretations diverging >10% were independently reanalyzed, resulting in concordance scores.

### *Statistics*

Statistical tests were performed with S-PLUS Professional, version 1. Univariate and multivariate logistic regression was used to test the association between NF- $\kappa$ B and LNI. Multivariate models were adjusted for the contribution of pre-operative PSA, radical prostatectomy Gleason sum, extra-capsular extension, and seminal vesicle invasion. NF- $\kappa$ B, like PSA, was coded as a continuous variable and each unit corresponded to the recorded proportion (%) of cancer cells that showed nuclear NF- $\kappa$ B staining. The predictive accuracy of multivariate models with and without NF- $\kappa$ B was quantified using receiver operating characteristics-derived area under the curve. To reduce overfit bias, we used 200 bootstrap resamples. The distributions of predictive accuracy estimates, of models with and without NF- $\kappa$ B, were compared using the independent sample t-test.

## **RESULTS**

Table 1 shows the clinical and pathological features of our patient cohorts. Age at surgery ranged from 52 to 72 years old for metastatic patients (mean, 63.3 years) and from 51 to 72 years old for the control group (mean, 62.1 years). Mean pre-operative PSA was 13.9 (range, 4.0 to 36.3) for LNI patients compared with 9.7 (range, 0.67 to 32.0) for controls. Median Gleason sum was 7 for metastatic patients and 6 for controls. In patients with LNI, extracapsular extension was present in 50%, versus 25.8% for controls. The mean number of resected lymph nodes was 12.7 for LNI patients and 12.1 for the control group. The average number of positive lymph nodes was 1.4.

Cytoplasmic staining was observed in cancer glands, prostate intraepithelial neoplasia (PIN), and, to a lesser extent, in normal glands. Nuclear staining was found mostly in cancer cells (Figure 1). A significant difference in nuclear staining of cancer glands

was observed between the two groups. Primary tumors of patients with LNI had an average of 21.25% of tumor cells with nuclear NF- $\kappa$ B expression as opposed to 9.42% of tumor cells of control patients ( $p=0.001$ ; Table 1). Most benign and high grade PIN glands in both cohorts had  $<5\%$  of cells positive for nuclear NF- $\kappa$ B. The nuclear staining of benign glands was not specific to areas immediately surrounding cancer or to presence of inflammation. These observations indicate that nuclear NF- $\kappa$ B expression is elevated in invasive cancer epithelium. Moreover, our findings show that within that epithelium, it is differentially expressed according to the rate of LNI.

We tested the strength and the statistical significance of the association between the extent of NF- $\kappa$ B staining and LNI in univariate and multivariate logistic regression models (Table 2). In univariate analyses, all predictors, including NF- $\kappa$ B (odds ratio, 1.07;  $p=0.003$ ), were statistically significant (all  $p$  values  $\leq 0.006$ ), except for pre-operative serum PSA ( $p=0.1$ ) and extracapsular extension ( $p=0.08$ ). The univariate NF- $\kappa$ B odds ratio of 1.07 demonstrated that the odds of lymph node metastases increases by 7% for each unit increase in observed extent of nuclear NF- $\kappa$ B staining.

In multivariate analyses, the association between NF- $\kappa$ B and LNI was adjusted for the effect of preoperative PSA, radical prostatectomy Gleason sum, extracapsular extension and seminal vesicle invasion. In the multivariate model, NF- $\kappa$ B demonstrated a statistically significant ( $p=0.03$ ) odds ratio of 1.08. It indicates that after accounting for all covariates, the odds of lymph node metastases increases by 8% for each one unit increase in the extent of nuclear NF- $\kappa$ B staining. It is noteworthy that, along with seminal vesicle invasion ( $p=0.003$ ), NF- $\kappa$ B represented the only statistically significant predictor of LNI. The significance of NF- $\kappa$ B exceeded that of PSA, extracapsular extension and of radical prostatectomy Gleason sum, which represent highly established predictors of LNI.

Assessment of overall model accuracy, with and without NF- $\kappa$ B, demonstrated that the addition of NF- $\kappa$ B (multivariate  $p=0.03$ ) to all covariates (i.e., PSA, radical prostatectomy Gleason sum, seminal vesicle invasion and extracapsular extension)

increased accuracy from 84.8% to 87.1%. This 2.3% (95% confidence interval, 1.29-3.43%) increase was highly statistically significant when the means of 200 bootstrap-corrected accuracy estimates were compared ( $p < 0.001$ ).

## DISCUSSION

In this study, we tested the hypothesis that NF- $\kappa$ B can improve the prediction of LNI. The average proportion of cancer cells positive for nuclear NF- $\kappa$ B was quantified for LNI-positive and LNI-negative patients. The LNI positive group distinguished itself from the controls by an elevated nuclear NF- $\kappa$ B staining ( $p = 0.001$ ). In univariate logistic regression models, NF- $\kappa$ B emerged as a highly significant predictor variable ( $p = 0.003$ ). In multivariate analyses, NF- $\kappa$ B represented the second most significant predictor of LNI ( $p = 0.03$ ). Its significance was only exceeded by seminal vesicle invasion ( $p = 0.003$ ), which represented the only other statistically significant predictor of LNI. This suggests that the association between NF- $\kappa$ B and LNI is stronger than that of PSA, radical prostatectomy Gleason sum and extracapsular extension, as these variables failed to reach statistical significance. Although the significance of covariates was potentially undermined by sample size, it can be postulated that NF- $\kappa$ B represents a strong marker of LNI.

Kattan recommends that a novel marker should not only be judged according to its multivariate statistical significance. Instead, he suggests that the addition of a truly informative novel marker to established predictors of the outcome of interest should increase the combined predictive accuracy of base predictors, in addition to confirming the independent, multivariate predictor status of this marker (26). We followed this recommendation and tested the accuracy of the model without including NF- $\kappa$ B. After 200 bootstrap resamples, which were used to reduce potential overfit bias, we found the model to be 84.8% accurate in predicting the probability of LNI. Inclusion of NF- $\kappa$ B increased the accuracy by 2.3% (95% confidence interval, 1.3-3.4%;  $p < 0.001$ ). This result indicates that NF- $\kappa$ B satisfies the Kattan criterion, as it improves the predictive ability of the model in a highly statistically significant fashion.

Our findings indicate that if predictions were applied to a cohort of 1000 patients, use of NF- $\kappa$ B, relative to a model without NF- $\kappa$ B, would result in correct classification of LNI in 24 additional patients. Although such gain may appear trivial, it might be important to the affected individuals, who deserve the most accurate prediction of their disease stage. Moreover, such differences in predictions may be important, when risk stratification is used within protocol settings. Finally, increments in predictive accuracy related to the inclusion of a novel predictor should not be interpreted in isolation. Instead, they should be assessed in the light of their combined effect with established predictors, as well as with other novel predictors. Thus, the increments related to the addition of NF- $\kappa$ B to pathologic stage, grade and PSA may be further amplified with additional biomarkers. For example, continuously coded serum PSA was shown to improve the accuracy of staging in prostate cancer (9, 27). Recently, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) were shown to further improve the accuracy of models, which included continuously coded serum PSA (28). Taken together, these findings indicate that small accuracy gains resulting from the addition of one informative predictor may be enhanced with those of other predictors.

Besides showing that NF- $\kappa$ B represents an informative marker of LNI when radical prostatectomy specimens are used, our findings also justify further studies to validate NF- $\kappa$ B as a preoperative molecular LNI marker. It can be postulated that NF- $\kappa$ B might exert an even stronger effect on the accuracy of LNI predictions when preoperative variables are included instead of radical prostatectomy-derived stage and grade. Clinical stage, PSA and biopsy Gleason sum are routinely used to predict LNI (8, 9, 29). However, their prognostic ability is lower than that of pathologic variables, as evidenced by substantially lower predictive accuracy of the preoperative biochemical recurrence nomogram (73%) relative to the postoperative biochemical recurrence nomogram (89%) (29, 30). Thus, it can be argued that the multivariate association between NF- $\kappa$ B and LNI would be stronger if the covariates consisted of less informative preoperative variables, rather than highly informative postoperative variables. To formally test this hypothesis, we are presently optimizing

immunohistochemical protocols to quantify NF- $\kappa$ B in biopsy cores, with the intent of determining whether it can be used to predict LNI prior to definitive treatment.

Sample size represents one of the limitations of our study. Although, it clearly did not affect the ability of NF- $\kappa$ B to predict LNI, it could have undermined the ability of other predictors to reach statistical significance in the multivariate models. Despite power limitations, NF- $\kappa$ B did achieve a highly statistically significant predictor status, which underscores the strength of the association between NF- $\kappa$ B and LNI. Sample size and power are less instrumental to predictive accuracy than to statistical significance. However, a different sample size may change the strength of the association between NF- $\kappa$ B and LNI, which may also be reflected in predictive accuracy estimates. Moreover, our results should be confirmed in prospective series.

Our findings are biologically plausible. The extent of staining noted in radical prostatectomy specimens correlates well with high levels of nuclear NF- $\kappa$ B observed in lymph node metastases (25) and with the increased invasive metastatic potential of PCa cells that display elevated NF- $\kappa$ B activity (20, 31). Interestingly, a recent study has shown that the presence of nuclear NF- $\kappa$ B in prostate cancer cells located in the perineural space is associated with the expression of antiapoptotic genes and with a decrease in recurrence-free survival (22). Perineural invasion is believed to be an important mechanism by which prostate cancer cells can spread to extraprostatic tissues. Overall, the activation of NF- $\kappa$ B may confer a selective advantage to prostate cancer cells by inducing the expression of genes involved in survival, angiogenesis, motility, and invasion. Taken together, these observations support our findings, which identify radical prostatectomy specimen NF- $\kappa$ B as an indicator of locoregional cancer spread.

In summary, this is the first study that shows that the extent of nuclear localization of NF- $\kappa$ B in primary prostate tumors is highly accurately capable of predicting the probability of locoregional spread of PCa.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by a grant from the Canadian Prostate Cancer Research Foundation. A.-M. M. M. is a recipient of a Chercheur National fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). PIK is partially supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), the CHUM Foundation, the Department of Surgery and Les Urologues Associés du CHUM. L.L. is supported by a Canadian Institute of Health Research/Canadian Prostate Cancer Research Initiative studentship. The authors thank CHUM division of Urology and the pathology department of Notre-Dame Hospital for their contribution to this research.



**REFERENCES**

1. Cheng L, Zincke H, Blute ML, Bergstralh EJ, Scherer B, Bostwick DG. Risk of prostate carcinoma death in patients with lymph node metastasis. *Cancer* 2001;91:66-73.
2. Palapattu GS, Allaf ME, Trock BJ, Epstein JI, Walsh PC. Prostate specific antigen progression in men with lymph node metastases following radical prostatectomy: results of long-term followup. *J Urol* 2004;172:1860-4.
3. Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE. Disease progression and survival of patients with positive lymph nodes after radical prostatectomy. Is there a chance of cure? *J Urol* 2003;169:849-54.
4. Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE. Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer? *J Urol* 2002;168:514-8; discussion 18.
5. Heidenreich A, Varga Z, Von Knobloch R. Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis. *J Urol* 2002;167:1681-6.
6. Allaf ME, Palapattu GS, Trock BJ, Carter HB, Walsh PC. Anatomical extent of lymph node dissection: impact on men with clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2004;172:1840-4.
7. McLaughlin AP, Saltzstein SL, McCullough DL, Gittes RF. Prostatic carcinoma: incidence and location of unsuspected lymphatic metastases. *J Urol* 1976;115:89-94.
8. Partin AW, Kattan MW, Subong EN, et al. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *Jama* 1997;277:1445-51.
9. Cagiannos I, Karakiewicz P, Eastham JA, et al. A preoperative nomogram identifying decreased risk of positive pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer. *J Urol* 2003;170:1798-803.

10. Kattan MW, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. Evaluation of a nomogram used to predict the pathologic stage of clinically localized prostate carcinoma. *Cancer* 1997;79:528-37.
11. Gerstenbluth RE, Seftel AD, Hampel N, Oefelein MG, Resnick MI. The accuracy of the increased prostate specific antigen level (greater than or equal to 20 ng./ml.) in predicting prostate cancer: is biopsy always required? *J Urol* 2002;168:1990-3.
12. Bochner BH, Herr HW, Reuter VE. Impact of separate versus en bloc pelvic lymph node dissection on the number of lymph nodes retrieved in cystectomy specimens. *J Urol* 2001;166:2295-6.
13. DiMarco DS, Zincke H, Sebo TJ, Slezak J, Bergstralh EJ, Blute ML. The extent of lymphadenectomy for pTXNO prostate cancer does not affect prostate cancer outcome in the prostate specific antigen era. *J Urol* 2005;173:1121-5.
14. Clark T, Parekh DJ, Cookson MS, et al. Randomized prospective evaluation of extended versus limited lymph node dissection in patients with clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2003;169:145-7; discussion 47-8.
15. Burkhard FC, Schumacher M, Thalmann GN, Studer UE. Is pelvic lymphadenectomy really necessary in patients with a serum prostate-specific antigen level of <10 ng/ml undergoing radical prostatectomy for prostate cancer? *BJU Int* 2005;95:275-8.
16. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004;18:2195-224.
17. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-10.
18. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6:203-8.
19. Suh J, Rabson AB. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004;91:100-17.

20. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001;20:4188-97.
21. Ross JS, Kallakury BV, Sheehan CE, et al. Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res* 2004;10:2466-72.
22. Ayala GE, Dai H, Ittmann M, et al. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:6082-90.
23. 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. *Clin Cancer Res* 2004;10:8460-4.
24. Domingo-Domenech J, Molina R, Castel T, et al. Serum protein s-100 predicts clinical outcome in patients with melanoma treated with adjuvant interferon--comparison with tyrosinase rt-PCR. *Oncology* 2005;68:341-9.
25. Ismail HA, Lessard L, Mes-Masson AM, Saad F. Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate* 2004;58:308-13.
26. Kattan MW. Judging new markers by their ability to improve predictive accuracy. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:634-5.
27. Karakiewicz P, Lattouf JB, Perrotte P, Valiquette L, Bernard F., McCormack M., Menard C., Lebeau T., Benayoun S., Ramirez A., Ouakin S., Saad, F. Validation of 1997 Partin Tables' Lymph Node Invasion Prediction in Men Treated with Radical Prostatectomy in Montreal, Quebec. *Can J Urol* 2005;12:2588-92.
28. Kattan MW, Shariat SF, Andrews B, et al. The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor beta1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3573-9.

29. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:766-71.
30. Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1499-507.
31. Lindholm PF, Bub J, Kaul S, Shidham VB, Kajdacsy-Balla A. The role of constitutive NF-kappaB activity in PC-3 human prostate cancer cell invasive behavior. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:471-9.

**Table 1. Clinical and pathological characteristics of 51 patients treated by radical prostatectomy**

<b>CLINICAL AND PATHOLOGICAL FEATURES</b>			
Variable	Metastatic patients n=20	Controls n=31	p value
Mean Percent Nuclear NF-kB Staining	21.25 [0-40]	9.42 [0-30]	0.001
Mean Age at Surgery (yrs)	63.3 [52-72]	62.1 [51-72]	0.5
Mean Pre-op PSA (ng/ml)	13.9 [4.0-36.3]	9.8 [0.67-32.0]	0.09
Pathological Gleason score			
4	0	1 (3.2%)	0.02
5	0	11 (35.5%)	
6	4 (20%)	7 (22.6%)	
7	12 (60 %)	11 (35.5%)	
8	3 (15%)	1 (3.2%)	
9	1 (5%)	0	
Extraprostatic Extension			
Positive	10 (50%)	8 (25.8%)	0.1
Negative	10 (50%)	23 (74.2%)	
Seminal Vesicle Invasion			
Positive	11 (55%)	1 (3.2%)	< 0.001
Negative	9 (45%)	30 (96.8%)	
Mean number of resected lymph nodes	12.7 [4-26]	12.1 [5-26]	0.7
Mean number of met+ lymph nodes	1.4	-	-

**Table 2. . Univariate and multivariate models predicting lymph node metastasis at surgery.**

Putative predictive variables	PREDICTION OF LYMPH NODE METASTASIS AT SURGERY			
	univariate - odds ratio (95% confidence interval) p-value	multivariate model A - odds ratio (95% confidence interval) p-value	multivariate model B - odds ratio (95% confidence interval) p-value	
Pre-operative PSA	1.06 (0.99 - 1.14) p=0.1	1.05 (0.95 - 1.16) p=0.2	1.07 (0.95 - 1.21) p=0.2	
RP Gleason sum (2-6 vs 7-9)	6.33 (1.69 - 25.00) p=0.006	4.83 (0.03 - 1.27) p=0.08	2.57 (0.05 - 2.87) p=0.35	
SVI	36.67 (4.15 - 323.84) p=0.001	38.98 (3.62 - 419.42) p=0.003	39.56 (3.51 - 445.98) p=0.003	
ECE	2.87 (0.87 - 9.45) p=0.08	2.34 (0.48 - 11.41) p=0.3	2.67 (0.47 - 15.14) p=0.3	
Nuclear NF-κB Predictive Accuracy (%)*	1.075 (1.02 - 1.13) p=0.003		1.08 (1.01-1.16) p=0.03	
		84.8		87.1

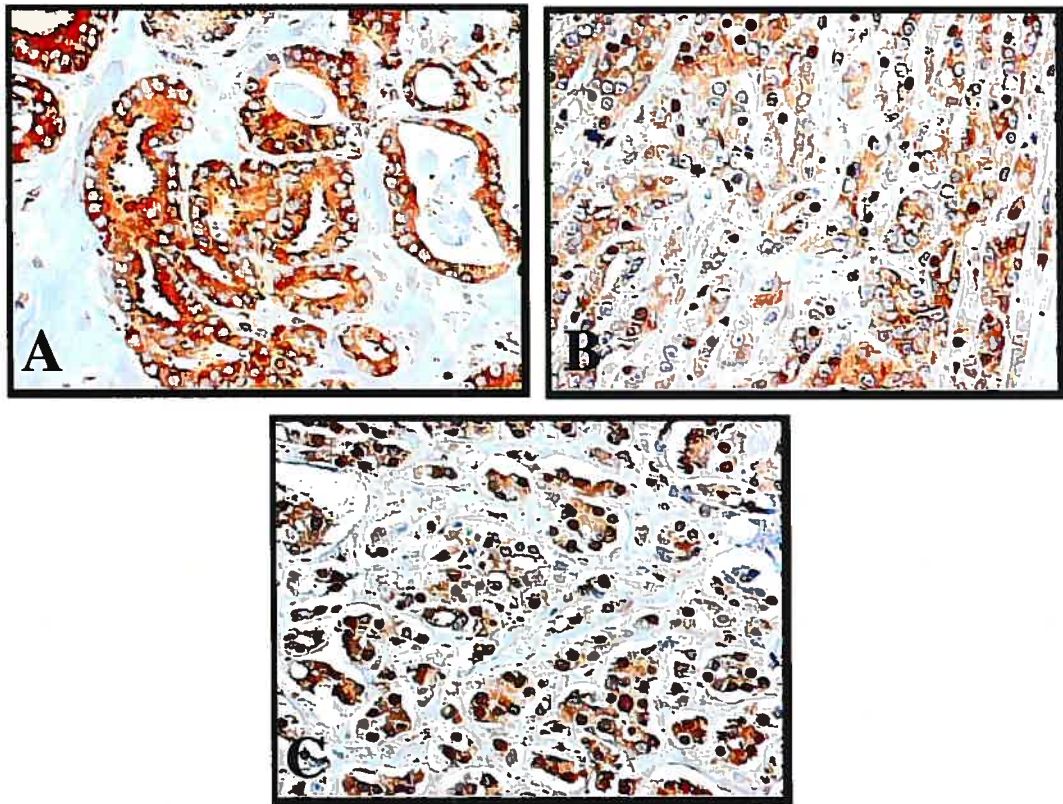
A - model without NF-κB

B - model with NF-κB

\* : p < 0.001

SVI: seminal vesicle invasion

ECE: extracapsular extension



**Figure 1. Immunohistochemical detection of NF- $\kappa$ B p65 in prostate cancer tissues. A, predominant cytoplasmic staining. B, cytoplasmic and nuclear staining. C, predominant nuclear staining. Magnification, x200**

## CHAPITRE V.

### **Nuclear Localisation of NF-kappaB Transcription Factors in Prostate Cancer: an Immunohistochemical Study**

**\*Laurent Lessard<sup>1</sup>, Louis R Bégin<sup>2</sup>, Martin E Gleave<sup>3</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,4</sup> and Fred Saad<sup>1,5</sup>**

*<sup>1</sup>Centre de recherche du CHUM, and Institut du cancer de Montréal, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1;*

*<sup>2</sup>Service d'anatomopathologie, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada, H4J 1C5;*

*<sup>3</sup>The Prostate Centre, Vancouver General Hospital, University of British Columbia, D-9, 2733 Heather Street, Vancouver, British Columbia, Canada, V5Z 3J5;*

*<sup>4</sup>Département de médecine, Université de Montréal, Québec, Canada and*

*<sup>5</sup>Département de chirurgie (urologie), CHUM-Notre-Dame, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1*

Article publié dans:

**Br. J Cancer, vol 93: 1019-1023, 2005**

**Key words:** prostate cancer, NF-kappaB, immunohistochemistry, tissue microarray, gleason grade

*\*L. Lessard est responsable d'environ 90% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. L.R. Bégin, pathologiste, a analysé les tissus colorés et confirmé le % de coloration nucléaire. M.E. Gleave a fourni le micro-étalage de tissus et la base de données. A.-M Mes-Masson et F.Saad ont supervisé l'ensemble de l'étude.*



**ABSTRACT**

Several reports suggest that the canonical NF-kappaB (NF-κB) pathway is constitutively activated in a subset of prostate cancer cells. However, except for RelA (*p65*), little is known about the status of NF-κB transcription factors in prostate cancer tissues. To clarify the status of NF-κB subunits, we analyzed the expression and subcellular localisation of RelA, RelB, c-Rel, p50, and p52 on tissue array sections containing respectively 344, 346, 369, 343, and 344 cores from 75 patients. The subcellular localisation of NF-κB factors was tested against relevant clinical parameters (preoperative prostate-specific antigen, pathological stage, and postoperative Gleason grade). With the exception of c-Rel, each subunit was detected in the nucleus of cancer cells: significant nuclear expression of RelB, RelA, p52, and p50 was seen in 26.6, 15.6, 10.7, and 10.5% of cores, respectively. Surprisingly, cores expressing both nuclear RelA and p50 canonical pathway proteins were less frequently observed than cores expressing other subunit combinations such as RelB-p52 and RelA-RelB. In addition, the nuclear localisation of RelB correlated with patient's Gleason scores (Spearman correlation: 0.167;  $p=0.018$ ). The nuclear localisation of both canonical and noncanonical NF-κB subunits in prostate cancer cells suggests for the first time that different NF-κB pathways and dimers may be activated in the progression of the disease.

## INTRODUCTION

In Caucasian men, prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and a leading cause of cancer death. Presently, the majority of clinically localised tumours are detected early and treated aggressively even though some early-stage tumours can remain latent and may not require aggressive therapy. New prognostic tools are needed to distinguish between low- and high-risk tumours in order to tailor treatment strategies. Understanding the molecular mechanisms of prostate cancer progression will undoubtedly lead to the development of new molecular prognostic markers.

The nuclear-factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) transcription factor family is composed of five structurally related members that possess an N-terminal Rel-Homology (RH) domain involved in protein-protein interactions and DNA-binding (Ghosh & Karin, 2002). The NF- $\kappa$ B proteins can be divided into two classes based on sequences C-terminal to their RH domain. The class 1 includes Rel (c-Rel), RelA (p65), and RelB proteins that are characterized by a C-terminal transactivation domain. NF- $\kappa$ B1 (p50 and its precursor p105) and NF- $\kappa$ B2 (p52 and its precursor p100) form the second class; p105 and p100 contain inhibitory C-terminal ankyrin repeats that are cleaved to create transcriptionally active p50 and p52 proteins. Rel/NF- $\kappa$ B proteins exist as homo- and heterodimers. The best studied dimers include the canonical (RelA/p50) and noncanonical (RelB/p52) NF- $\kappa$ B complexes. Normally, the activation of NF- $\kappa$ B requires signals that converge to I $\kappa$ B kinases (IKKs). In the canonical pathway the IKK complex (IKK $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) phosphorylates I $\kappa$ Bs, which are then ubiquitinated and targeted for proteasome-dependent degradation. In the noncanonical pathway, IKK $\alpha$  regulates the processing of the p100 precursor. As a result of the activation of either pathway, NF- $\kappa$ B dimers translocate to the nucleus and activate the expression of various genes involved in cell growth, differentiation, inflammatory responses, and the regulation of apoptosis (Aggarwal, 2004).

NF- $\kappa$ B pathways and genes are frequently altered in lymphoid and nonlymphoid cancers (Rayet & Gelinas, 1999). For instance, chromosomal alterations involving

the c-Rel and NF- $\kappa$ B2 genes have been detected in several B- and T-cell lymphomas (Liptay *et al.*, 1997; Munzert *et al.*, 2000). It has been shown that constitutively nuclear and active RelA/p50 dimers can prevent cell death by apoptosis in many cancer cell types after chemotherapy, radiotherapy or TNF- $\alpha$  treatment (Baldwin, 2001; Barkett & Gilmore, 1999) and have also been detected in the nuclei of pancreatic and breast carcinomas (Sovak *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). More recently, constitutive activation of NF- $\kappa$ B (RelA/p50) has been detected in androgen-independent prostate cancer cell lines as well as in prostate cancer tissues (Ayala *et al.*, 2004; Chen & Sawyers, 2002; Gasparian *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2002; Sweeney *et al.*, 2004) and appears to promote cell growth, survival, and metastasis (Hodge *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2001; Levine *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2003). In particular, we and others have shown that nuclear localisation of RelA in primary prostate tumours is linked to poor clinical outcomes (Ayala *et al.*, 2004; Fradet *et al.*, 2004; Ismail *et al.*, 2004; Lessard *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2004).

While RelA has become a candidate prognostic marker of prostate cancer progression, little is known about the expression and the subcellular localisation of other NF- $\kappa$ B subunits. The present study provides the first large-scale immunohistochemical characterisation of all NF- $\kappa$ B transcription factors in tissue-arrayed prostate cancer specimens. Our results show that all NF- $\kappa$ B subunits are expressed in prostate tissues and that except for c-Rel, they are often detected in the nucleus of cancer cells. Interestingly, nuclear RelA and p50 are less frequently detected in the same cores than all other subunit combinations. In addition, the number of nuclear RelB-positive cores increased significantly with increasing Gleason scores. These results suggest that most NF- $\kappa$ B transcription factors, especially noncanonical subunits, may play a role in the progression of prostate cancer.

## MATERIALS AND METHODS

### *Prostate tissue microarray preparation*

Archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) human prostate tumour specimens were used to construct a human prostate tissue array of benign, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), and cancer (adenocarcinoma) tissue samples. The array was sub-divided into normal, PIN, low gleason (2, 2/3, 3), and high gleason (3/4, 4, 4/5, 5) cores. Benign tissue cores were obtained from transition zone biopsies of radical prostatectomy specimens. Core tissue biopsy specimens (0.6 mm diameter) were obtained from preselected regions of individual paraffin-embedded donor blocks and precisely arrayed into a new recipient paraffin block with a tissue arrayer (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA). After the block construction was completed, 5 µm sections were cut with a microtome using an adhesive-coated tape sectioning system (Instrumedics, Hackensack, NJ, USA) to support the adhesion of the array elements.

### *Immunohistochemical staining*

Tissue sections were immunostained for NF-κB transcription factors using the biotin–streptavidin immunoperoxidase method as previously described (Fradet *et al.*, 2004). Briefly, FFPE tissue array slides were initially deparaffinized with toluene and rehydrated through graded ethanol. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 min. An antigen retrieval technique was applied by boiling slides for 10 min at 95°C in a 0.01M sodium citrate buffer pH 6.0. The staining of c-Rel was enhanced using 1mM EDTA (pH 8.0) instead of citrate. Tissue sections were incubated with a protein blocking serum-free reagent (Dako Diagnostics, Mississauga, ON, Canada) for 15 min to block nonspecific binding. NF-κB subunit expression was studied using mouse monoclonal NF-κB RelA (p65) F-6, rabbit polyclonal RelB C-19, mouse monoclonal c-Rel B6, rabbit polyclonal NF-κB p50 NLS (all from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and mouse monoclonal NF-κB p52 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). Primary antibodies were applied at a concentration of 1:10 (c-Rel) or 1:50 (RelA, RelB, p50, p52) in PBS and were incubated for 2h at room temperature. Immune complexes were revealed using a biotin-conjugated broad spectrum secondary antibody (20 min), then

streptavidin-peroxidase conjugate for 20 min (DakoCytomation, Mississauga, ON, Canada), followed by chromogen (0.06% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.01% hydrogen peroxide in PBS) for 5 min. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and then mounted. Negative controls were performed by omitting the primary antibody.

### *Analysis*

Damaged or nonrepresentative tissue cores (eg., absence of epithelial tissue) were excluded from the analysis, leaving 344 (RelA), 346 (RelB), 369 (c-Rel), 343 (p52), and 344 (p50) cores from 75 patients. Cores were scored either as positive (1) or negative (0) for unequivocal brown nuclear NF- $\kappa$ B staining in at least 5% of cancer cells. Clinical data were also available in a subset of samples in which preoperative serum prostate-specific antigen (pPSA), pathologic Gleason score (sum), and pathologic stage were available for 41, 47, and 46 patients, respectively. All statistical tests were performed using SPSS, version 10 (SPSS, Chicago, IL, USA).

## **RESULTS**

### *NF- $\kappa$ B subunit expression and subcellular localisation in prostatic tissues*

As shown in Figure 1, all NF- $\kappa$ B subunits were expressed in prostatic tissues. Most benign glands were characterized by a strong cytoplasmic staining of the basal cell constituent and a variable cytoplasmic staining of the secretory (luminal) cells. NF- $\kappa$ B nuclear expression was usually not detected in benign tissues with the exception of a few cores in which RelB (two out of 40) and p52 (one out of 39) were localised in the nucleus of secretory cells. PIN samples expressed weak to strong cytoplasmic levels of NF- $\kappa$ B subunits and only one core (one out of 23) demonstrated RelA nuclear staining. Finally, all NF- $\kappa$ B proteins were present in the cytoplasm of cancer cells and all except c-Rel were detected in the nuclei of cancer tissues at variable frequencies. Table 1 compares the frequencies of NF- $\kappa$ B nuclear staining between normal, PIN, and cancer specimens. In all cases, the frequency of positive cores was significantly higher in cancer tissues as compared to noncancerous tissues. Within cancer specimens, nuclear RelB expression was the most commonly detected

followed by RelA, p52, and p50. When cancer tissues were divided into low- to intermediate-grade (Gleason's 2, 2/3, 3) and high-grade (Gleason's 3/4, 4, 4/5, 5) tumours, no statistically significant difference was observed between the two groups, but there was a trend towards increased RelB nuclear staining in high-grade specimens (Table 2).

#### *Nuclear detection of several NF- $\kappa$ B subunits in individual cores*

NF- $\kappa$ B proteins function as homo- and heterodimers. To assess the relative importance of these dimers in prostatic tissues, we calculated the proportion of cores in which both subunits of a NF- $\kappa$ B heterodimer were detected in the nucleus of prostatic cells (Figure 2). Importantly, although all subunit combinations were observed in cancer cores, the canonical RelA-p50 pair was less frequently detected than other subunit pairs. In particular, the proportion of cores positive for both RelA and RelB (class 1 subunits) was significantly higher than that of cores positive for RelA and p50 ( $p=0.008$ ).

#### *Relationship between nuclear NF- $\kappa$ B and clinical parameters in prostate cancer patients*

We performed statistical analyses to identify possible correlations and/or associations between NF- $\kappa$ B nuclear staining and pPSA levels, pathological stage, and patient's Gleason score. No significant relationship was obtained between nuclear NF- $\kappa$ B and pPSA or pathological stage. In contrast, the number of nuclear RelB positive cores increased significantly with increasing Gleason scores (Spearman coefficient: 0.167;  $p=0.018$ ; Table 3).

## **DISCUSSION**

Although prostate cancer can be detected in its early stages, it is still difficult to predict whether it will remain latent or progress to an advanced, metastatic disease. This is largely due to the lack of clinically proven molecular markers of prostate cancer progression. There are hundreds of candidate genes and proteins under investigation but few have been validated in multivariate analyses (Tricoli *et al.*,

2004). We and others have recently shown that RelA, a member of the NF- $\kappa$ B transcription factor family, is an independent predictor of biochemical recurrence (Ayala et al., 2004; Ross et al., 2004; Fradet *et al.*, 2004). In addition, we have detected high levels of nuclear RelA staining in lymph node metastases and in patients who developed bone metastases (Ismail *et al.*, 2004; Lessard *et al.*, 2003). Hence, RelA appears to play a role in the progression of prostate cancer but little is known about the status of other NF- $\kappa$ B family members, and no simultaneous analysis of the subcellular localisation of these subunits has been previously reported in prostate tissues.

In the present study, we characterized the expression and the subcellular localisation of RelA, p50, RelB, p52, and c-Rel. All subunits are expressed in prostatic tissues, and all but c-Rel can be detected in the nucleus of prostatic cells, more frequently in cancerous tissues. This suggests that both canonical (RelA, p50) and the noncanonical (eg., RelB, p52) NF- $\kappa$ B subunits can be activated in prostate cancer cells, whereas c-Rel remains inactive. Notably, a recent study reported a negative or nonspecific p50 expression in prostate tumours (Shukla *et al.*, 2004). Conversely, we observed high levels of cytoplasmic p50 expression in cancer tissues. This discrepancy may be related to use of different antibodies.

NF- $\kappa$ B subunits can potentially form six heterodimers: RelA/p50, RelB/p52, RelA/p52, RelB/p50, RelA/RelB and p50/p52. Importantly, each dimer may differently affect the cellular transcriptome, thus influencing disease progression. While in this study we did not directly assess the presence of specific heterodimers in prostate cancer specimens, our results provide an indication of those subunits present in the nucleus of cancer cells. Our results clearly demonstrate that within a given sample, we were more likely to find nuclear RelA and RelB, while the nuclear localisation of RelA and p50 was less frequently observed. If these subunits are relocalised within the same cell, this would suggest that noncanonical dimers are more frequently activated in prostate cancer, which is in contrast with the more usually observed activation of the canonical pathway in other cancers. Since RelA-

RelB dimers are not regulated by I $\kappa$ B proteins, they may act together or in concert with other transcription factors to attract histone acetyl transferases and co-factors and constitutively drive the transcription of specific genes. On the other hand, it has been reported that RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA in mouse embryonic fibroblasts (Marienfeld *et al.*, 2003). In this model, RelB sequesters RelA and thereby represses RelA-dependent transcription. Whether RelA-RelB complexes exist in prostate cancer cells remains to be elucidated, but our results justify further investigation.

There is also a possibility that the RelB-p52 combination is more frequent than the canonical RelA-p50 pair (Figure 2). Given that RelB and p52 have been shown to be activated in other tumour types such as B- and T-cells lymphomas as well as in breast carcinoma (Cogswell *et al.*, 2000; Dejardin *et al.*, 1998; Rayet & Gelinas, 1999), they may also play a role in prostate cancer development and progression. Interestingly, both nuclear RelB and nuclear p52 were also detected in a subset of benign tissues (Table 1). However, it is important to note that all benign tissues collected were from cancerous prostates. Consequently, the nuclear localisation of RelB and p52 may evoke a normal transient activation, but may also reflect a cellular response to the tumour environment or a transitional state towards transformation. To test this hypothesis, we are presently characterising the activation status of NF- $\kappa$ B subunits in cancer-free prostate specimens obtained from young male autopsies.

Correlation analyses between NF- $\kappa$ B subunits and relevant clinical parameters revealed a significant relationship between RelB nuclear expression and patient's Gleason score (Table 3). Similarly, there was also a trend towards higher RelB nuclear staining in high-grade cancer tissue cores (Table 2). Whether RelB or other subunits confer a more aggressive phenotype to prostatic carcinoma remains to be determined. To this end, we are presently expanding the analysis to more clearly define the role of RelB in prostate cancer progression.



The absence of a correlation between RelA nuclear expression and patient's Gleason score confirms our previous observations (Lessard *et al.*, 2003). Despite this, RelA acts as an independent predictor of patient's outcome (Fradet *et al.*, 2004) which suggests that p50 and p52 should also be analyzed to assess their potential as prognostic markers.

To our knowledge, this is the first large-scale immunohistochemical characterisation of NF- $\kappa$ B transcription factors in the same cohort of prostate cancer patients. Our results not only provide further evidence for a role of the canonical NF- $\kappa$ B pathway in prostate cancer but also suggest a potential role for other NF- $\kappa$ B subunits and pathways. Studies are ongoing to validate the usefulness of specific NF- $\kappa$ B subunits, or combinations, as prognostic markers.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by a grant from The Cancer Research Society of Canada. FS holds the University of Montreal Chair in Prostate Cancer Research. A.-M. M.-M. is a recipient of a Chercheur National fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). L.L. is supported by a Canadian Institute of Health Research/Canadian Prostate Cancer Research Initiative studentship. The authors thank Cécile Le Page, Ph.D., and Jean-Simon Diallo for their critical review of the manuscript and David Iannuzzi for statistical assistance.

**REFERENCES**

- Aggarwal, BB (2004) Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* **6**: 203-208
- Ayala, GE, Dai, H, Ittmann, M, Li, R, Powell, M, Frolov, A, Wheeler, TM, Thompson, TC, Rowley, D (2004) Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res* **64**: 6082-6090
- Baldwin, AS (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107**: 241-246
- Barkett, M , Gilmore, TD (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**: 6910-6924
- Chen, CD , Sawyers, CL (2002) NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol* **22**: 2862-2870
- Cogswell, PC, Guttridge, DC, Funkhouser, WK , Baldwin, AS, Jr. (2000) Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* **19**: 1123-1131
- Dejardin, E, Deregowski, V, Greimers, R, Cai, Z, Chouaib, S, Merville, MP , Bours, V (1998) Regulation of major histocompatibility complex class I expression by NF-kappaB-related proteins in breast cancer cells. *Oncogene* **16**: 3299-3307
- Fradet, V, Lessard, L, Begin, LR, Karakiewicz, P, Masson, AM , Saad, F (2004) Nuclear factor-kappaB nuclear localisation is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 8460-8464
- Gasparian, AV, Yao, YJ, Kowalczyk, D, Lyakh, LA, Karseladze, A, Slaga, TJ, Budunova, IV (2002) The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* **115**: 141-151
- Ghosh, S ,Karin, M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109** Suppl: S81-96
- Hodge, JC, Bub, J, Kaul, S, Kajdacsy-Balla, A , Lindholm, PF (2003) Requirement of RhoA activity for increased nuclear factor kappaB activity and PC-3 human prostate cancer cell invasion. *Cancer Res* **63**: 1359-1364

- Huang, S, Pettaway, CA, Uehara, H, Bucana, CD , Fidler, IJ (2001) Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* **20**: 4188-4197
- Ismail, HA, Lessard, L, Mes-Masson, AM , Saad, F (2004) Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate* **58**: 308-313
- Lessard, L, Mes-Masson, AM, Lamarre, L, Wall, L, Lattouf, JB , Saad, F (2003) NF-kappa B nuclear localisation and its prognostic significance in prostate cancer. *BJU Int* **91**: 417-420
- Levine, L, Lucci, JA, 3rd, Pazdrak, B, Cheng, JZ, Guo, YS, Townsend, CM, Jr., Hellmich, MR (2003) Bombesin stimulates nuclear factor kappa B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer Res* **63**: 3495-3502
- Ling, MT, Wang, X, Ouyang, XS, Xu, K, Tsao, SW , Wong, YC (2003) Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene* **22**: 4498-4508
- Liptay, S, Seriu, T, Bartram, CR , Schmid, RM (1997) Germline configuration of nfkb2, c-rel and bcl3 in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia* **11**: 1364-1366
- Marienfeld, R, May, MJ, Berberich, I, Serfling, E, Ghosh, S ,Neumann, M (2003) RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem* **278**: 19852-19860
- Munzert, G, Kreitmeier, S , Bergmann, L (2000) Normal structure of NFKB2, C-REL and BCL-3 gene loci in lymphoproliferative and myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* **38**: 395-400
- Rayet, B , Gelinas, C (1999) Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **18**: 6938-6947
- Ross, JS, Kallakury, BV, Sheehan, CE, Fisher, HA, Kaufman, RP, Jr., Kaur, P, Gray, K, Stringer, B (2004) Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res* **10**: 2466-2472

- Shukla, S, MacLennan, GT, Fu, P, Patel, J, Marengo, SR, Resnick, MI , Gupta, S (2004) Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia* **6**: 390-400
- Sovak, MA, Bellas, RE, Kim, DW, Zanieski, GJ, Rogers, AE, Traish, AM , Sonenshein, GE (1997) Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* **100**: 2952-2960
- Suh, J, Payvandi, F, Edelstein, LC, Amenta, PS, Zong, WX, Gelinas, C , Rabson, AB (2002) Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* **52**: 183-200
- Sweeney, C, Li, L, Shanmugam, R, Bhat-Nakshatri, P, Jayaprakasan, V, Baldrige, LA, Gardner, T, Smith, M, Nakshatri, H , Cheng, L (2004) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* **10**: 5501-5507
- Tricoli, JV, Schoenfeldt, M , Conley, BA (2004) Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res* **10**: 3943-3953
- Wang, W, Abbruzzese, JL, Evans, DB, Larry, L, Cleary, KR , Chiao, PJ (1999) The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* **5**: 119-127

**Table 1. Nuclear localisation of NF- $\kappa$ B transcription factors in prostatic tissue cores.**

Tissue Type	RelA			p50			RelB			p52		
	<i>N</i>	<i>n</i> Positive (%)	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>n</i> Positive (%)	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>n</i> Positive (%)	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>n</i> Positive (%)	<i>P</i>
Normal	39	0 (0)		37	0 (0)		40	2 (5.0)		39	1 (2.6)	
PIN	23	1 (4.3)		21	0 (0)		24	0 (0)		24	0 (0)	
Cancer	282	44 (15.6)	0.001	285	30 (10.5)	0.004	282	75 (26.6)	<0.001	281	30 (10.7)	0.025

**NOTE: Chi-Square was used to test the association of nuclear NF- $\kappa$ B expression with tissue type (cancer versus non-cancer). *P* value less than 0.05 was considered as significant.**

**Table 2. Nuclear localisation of NF- $\kappa$ B transcription factors in low to intermediate (2, 2/3, 3) and high (3/4, 4, 4/5, 5) Gleason grade cores.**

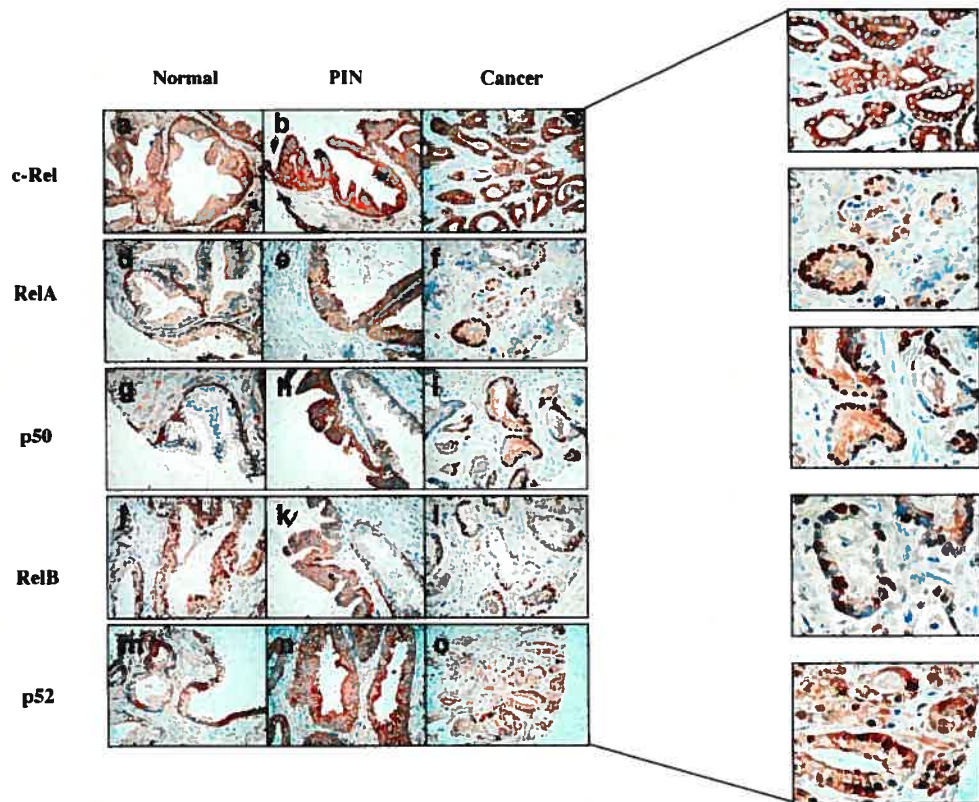
Gleason group	RelA			p50			RelB			p52		
	<i>N</i>	<i>n</i> Positive (%)	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>n</i> Positive (%)	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>n</i> Positive (%)	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>n</i> Positive (%)	<i>P</i>
Low	170	24 (14.1)		174	16 (9.2)		169	40 (23.7)		167	16 (9.6)	
High	112	20 (17.9)	0.405	111	14 (12.6)	0.431	113	35 (31.0)	0.104	114	14 (12.3)	0.555

**NOTE: Chi-Square was used to test the association between nuclear NF- $\kappa$ B and tissue grade. *P* value less than 0.05 was considered as significant.**

**Table 3. Correlation between NF- $\kappa$ B nuclear localisation and patient's Gleason scores.**

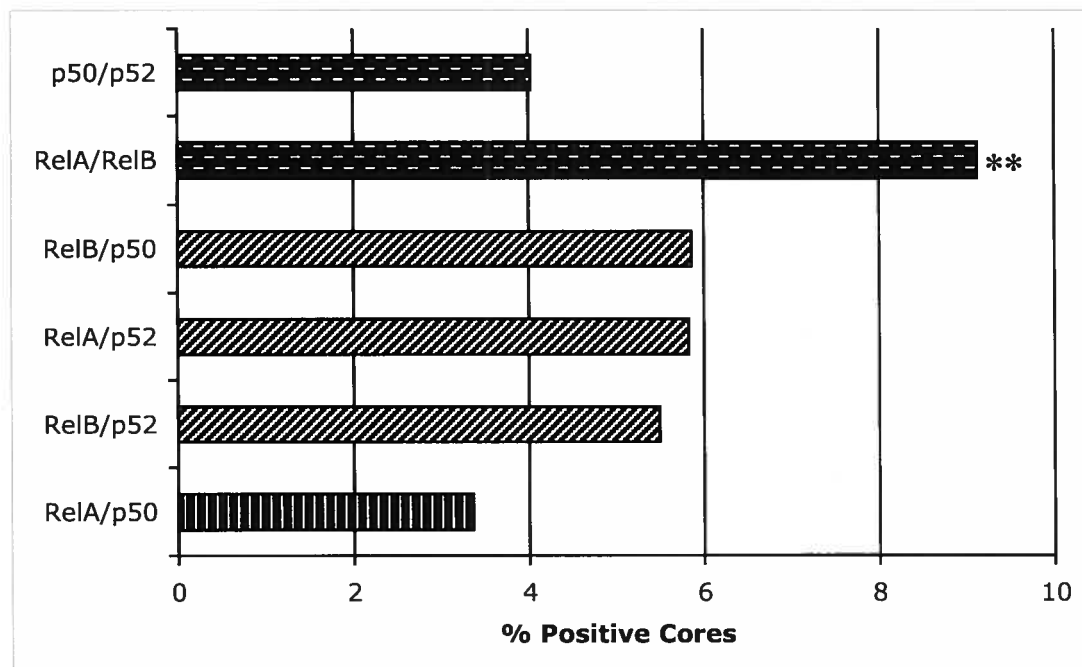
Subunits	Coefficient	p value
RelA	0.078	0.272
p50	-0.018	0.803
RelB	0.167	0.018*
p52	-0.019	0.793

**NOTE: Spearman's rho coefficient was used to test the relationship between nuclear NF- $\kappa$ B expression and Gleason scores. *P* value less than 0.05 was considered as significant.**



**Figure 1: Immunohistochemical detection of c-Rel (a-c), RelA (d-f), p50 (g-i), RelB (j-l), and p52 (m-o) in normal, PIN and cancerous prostate tissues (x400). Note nuclear RelB staining in a subset of normal glands (j). Also note a mixture of weak and strong p52 cytoplasmic staining in normal glands (m). Enlargements are provided to more clearly distinguish the subcellular localisation in cancer specimens.**





**Figure 2: Frequencies of NF- $\kappa$ B Subunit Combinations in the Prostate Cancer Cores.** The vertical pattern is for the canonical RelA-p50 pair. Noncanonical combinations are represented as follow: the diagonal pattern is for other class1/class2 dimers, and the dashed pattern is for class1/class1 or class2/class2 dimers. \*\*P < 0.01 Chi-square between RelA-p50 and RelA-RelB.

## CHAPITRE VI.

### **NF- $\kappa$ B2 Processing and p52 Nuclear Accumulation after Androgenic Stimulation of LNCaP Prostate Cancer Cells**

**\*Laurent Lessard, Fred Saad, Cécile Le Page, Jean-Simon Diallo, Benjamin Péant, Nathalie Delvoye, Anne-Marie Mes-Masson**

*Université de Montréal, Centre de recherche du CHUM et Institut du cancer de Montréal, 1560 Sherbrooke East, Montréal, Qc, Canada, H2L 4M1*

Article publié dans:

**Cell. Signal., vol 19: 1093-1100, 2007**

**Keywords:** NF-kappaB, Prostate Cancer, Androgen Receptor, LNCaP, Signalling

*\*L. Lessard est responsable d'environ 90% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. J.S. Diallo et B. Péant ont participé à l'élaboration des travaux et N. Delvoye a assisté L.Lessard dans les expériences. C. Le Page, F. Saad, et A.-M Mes-Masson ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

**ABSTRACT**

Several reports suggest that androgen signalling interferes with canonical RelA-p50 activity in androgen-sensitive cells. Whether this also occurs with non-canonical NF- $\kappa$ B subunits has not been studied. Here we report that androgenic stimulation of LNCaP cells with the androgen analogue R1881 appears to positively regulate the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway as p52 accumulates both in the cytoplasm and nucleus after 48-72hrs of stimulation. In contrast to TNF- $\alpha$  stimulation, androgen stimulation fails to induce RelB expression and is absent from nucleus of R1881-treated LNCaP cells. Electromobility shift assays reveal a time-dependent change in the nature of NF- $\kappa$ B complexes actively bound to DNA after 72hrs of androgenic stimulation concomitant with the appearance of p52-containing complexes. Co-immunoprecipitation studies indicate that newly produced p52 can exist as a heterodimer with RelA or p50, but may be mainly present as a homodimer. RNAi experiments targeting IKK- $\alpha$  and IKK- $\beta$  show that the R1881-induced nuclear accumulation of p52 is IKK- $\alpha$ -dependent. These results point to a novel mechanism by which androgens regulate NF- $\kappa$ B and provide a rationale for further studies into the biological significance of non-canonical NF- $\kappa$ B signalling in prostate cancer.

## INTRODUCTION

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death in North American men. Treatment of prostate cancer depends on its stage and currently includes surgery, radiotherapy, chemotherapy, and androgen deprivation therapy. A large proportion of patients with advanced prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy eventually develop hormone-refractory prostate cancer for which treatment is essentially palliative [1-3].

Although mutations inducing overly active androgen receptor signalling may often underlie the hormone-refractory phenotype of prostate tumors [4-6], evidence suggests that diverse survival and growth-promoting pathways can also be aberrantly activated in the absence or presence of defective androgen receptor signalling. In particular, the constitutive activation of the Nuclear-Factor kappaB (NF- $\kappa$ B) signalling pathway has been associated with the aggressive androgen-independent phenotype of prostate cancer [7].

The NF- $\kappa$ B transcription factor family is composed of 5 structurally related members that possess a N-terminal Rel-Homology (RH) domain involved in protein-protein interactions and DNA-binding [8, 9]. NF- $\kappa$ B proteins can be divided into 2 classes based on sequences C-terminal to their RH domain. The first class includes Rel (c-Rel), RelA (p65), and RelB proteins that are characterized by a C-terminal transactivation domain. NF- $\kappa$ B1 (p50 and its precursor p105) and NF- $\kappa$ B2 (p52 and its precursor p100) form the second class in which the precursors contain inhibitory C-terminal ankyrin repeats that are cleaved to create transcriptionally active p50 and p52 proteins. NF- $\kappa$ B proteins exist as homo- and heterodimers, the best-studied being RelA-p50. The RelA-p50 dimer is expressed in many cells but kept inactive and maintained in the cytoplasm by I $\kappa$ B inhibitors. Normally, the activation of RelA-p50 requires signals that converge to the trimeric IKK complex (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , and IKK $\gamma$ /NEMO). The activated kinase complex phosphorylates I $\kappa$ Bs (I $\kappa$ B $\alpha$  or I $\kappa$ B $\beta$ ) that are then ubiquitinated and targeted for proteasome-dependent degradation.

Subsequently, the RelA-p50 dimer translocates to the nucleus and activates the expression of various genes involved in cell growth, differentiation, inflammatory response and the regulation of apoptosis. More recently, a non-canonical NF- $\kappa$ B signalling pathway has also been uncovered [10]. While the generation of p50 results mainly from the constitutive cleavage p105, the production of p52 depends upon the inducible degradation of p100 which act as an I $\kappa$ B-like molecule. The processing of p100 requires the activation of the NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) by different inducers such as TNF- $\alpha$ , lymphotoxin, lipopolysaccharides and the viral proteins Tax and LMP-1. NIK in turn activates IKK- $\alpha$ , leading to the phosphorylation and proteasome-dependent processing of p100. Newly generated p52-containing dimers are then free to translocate into the cell nucleus and bind to specific gene promoters.

Elevated RelA-p50 DNA-binding activity has been detected in androgen-independent prostate cancer cell lines [11, 12], and sustained inhibition of the canonical NF- $\kappa$ B pathway in PC-3 cells diminished their proliferative, angiogenic, invasive, and metastatic potentials [13-15]. Moreover, androgen-independent LNCaP derivatives have elevated RelA-p50 activity compared to original androgen-sensitive LNCaP prostate cancer cells [16]. These findings suggest that prostate cancer cells with elevated RelA-p50 activity may be positively selected in androgen-deprived conditions. Alternatively, RelA-p50 activity may be restrained in androgen-dependent cells. Pertinent to this issue, a mechanism of mutual transcriptional interference has been observed between the androgen receptor and RelA [17]. This interference was proposed to stem in part from competition for co-factors and/or DNA response elements [18, 19]. In androgen-sensitive LNCaP prostate cancer cells, NF- $\kappa$ B has been found to bind and repress transcription from an androgen response element of the prostate specific antigen (PSA) promoter [20]. Moreover, the addition of the synthetic androgen R1881 was also shown to increase I $\kappa$ B- $\alpha$  levels and inhibit NF- $\kappa$ B transcriptional activity after 24-48 hours of treatment [12, 21-24]. Similarly, the transfection of wild-type androgen receptor in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells followed by R1881 stimulation diminished significantly the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B [12].

With regard to the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway, no modulation by androgens has been previously reported. Our findings suggest that the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway is activated following androgenic stimulation of LNCaP prostate cancer cells.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cell culture and reagents**

LNCaP, PC-3, DU145, and 22RV1 cells (ATTC, Rockville, MD) were maintained at 37°C and in 5% CO<sub>2</sub> in RPMI supplemented with 10% FBS (or 10% charcoal-stripped FBS), 50  $\mu$ g/ml gentamicin, and 250 ng/ml amphotericin B (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). R1881 (androgen analogue) was obtained from Perkin Elmer (Boston, MA) and TNF- $\alpha$  from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Bicalutamide (Casodex) was provided by Astra-Zeneca Canada (Toronto, ON). In all experiments, cells were cultured 3 days in charcoal-stripped FBS prior to R1881 treatment to eliminate residual androgens.

### **Cytoplasmic and nuclear extracts**

To prepare cellular extracts,  $4 \times 10^6$  cells were washed twice in cold PBS and resuspended in 300  $\mu$ l of lysis buffer containing 10 mM Hepes pH 7.9/ 10 mM NaCl/ 5 mM MgCl<sub>2</sub>/ 10 mM sodium vanadate/protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Laval, QC). After swelling cells for 30 min on ice, 0.1% Nonidet P-40 and 10% glycerol (v/v) were added and lysed cells were centrifuged for 5 min at 4°C at 3,000 rpm. Supernatants were carefully decanted for cytoplasmic extracts. Nuclei pellets were resuspended for 1 hr in 50-100  $\mu$ l of lysis buffer containing 10 mM Hepes pH 7.9/ 400 mM NaCl/ 0.1 mM EDTA/ 0.5 mM DTT/ 10 mM sodium vanadate/protease inhibitor cocktail. Particulate matter was eliminated by centrifugation for 10 min at 13,000 rpm at 4°C. Protein concentration was determined using the Bradford's method.

### **Immunoprecipitation and Western blot analysis**

Ten micrograms of cytoplasmic or nuclear proteins were used for Western blot analyses. For immunoprecipitation studies, protein samples (50-100 ug) were incubated overnight at 4°C with specific antibodies (1 µg/ml) and 30 µl of protein A/G-Sepharose (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was added for 2 hrs at 4°C. The precipitated proteins were washed with cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT/ 1 mM NaF/ 10 mM sodium vanadate/ protease inhibitor cocktail). Both protein extracts and immunoprecipitated proteins were boiled in loading buffer, separated by SDS-PAGE, and transferred on a nitrocellulose membrane under refrigerated conditions (100 V, 1 hr). The membrane was saturated with 5% milk/ PBS/ 0.1% Tween 20. Immunodetection was done as described in the protocol of the ECL kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Briefly, membranes were incubated 2 hrs at room temperature with the specific antibody (0.5 to 1µg/ml), washed 2 times with PBS/ 0.1% Tween 20 and incubated for another 30 min at room temperature with peroxidase conjugated antibodies (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). For Western blot and/or immunoprecipitation studies, antibodies against RelA (sc-8008), RelB (sc-226), and c-Rel (sc-6955), HDAC-1 (sc-8410), and  $\alpha$ -tubulin (sc-8035) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies against p100/p52 (05-361), p105/p50 (06-886), IKK- $\alpha$  (05-536), and IKK- $\beta$  (05-535) were obtained from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA), and the anti-AR (AR-441) from Lab Vision/Neomarkers (Fremont, CA).

### **Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

Nuclear cell extracts were prepared using  $5 \times 10^6$  cells incubated with the indicated inhibitors or the vehicle alone. Five micrograms were subjected to EMSA by using either a  $^{32}\text{P}$ -labelled probe (5'-AGTTGAGGCGACTTTTCCCAGGC-3') that corresponds to the NF- $\kappa$ B-binding element from the Igk-chain promoter or the Oct-1 protein loading control probe (5'-TGTCGAATGCAAATCACTAGAA-3'). Binding reactions were carried out on ice for 30 min in binding buffer (20 mM Tris pH 8.0,

5% glycerol, 0.1 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 0.2 EGTA pH 8.0, 0.5  $\mu$ g poly(dIdC)). The resulting protein-DNA complexes were separated on 5% non-denaturing polyacrylamide gel in 1X Tris-Glycine-EDTA buffer. Gels were dried and exposed at  $-80^{\circ}\text{C}$  for autoradiography.

### **Transfection of siRNA**

siRNA targeting IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , and the androgen receptor (AR), and the RISC-free siGLO fluorescent siRNA control were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). Briefly, LNCaP cells were transfected as recommended by the manufacturer using the Dharmafect 3 transfection reagent. Cells were incubated in the transfection medium for 24 hrs, trypsinized and plated in charcoal-stripped 10% FCS-supplemented RPMI 1640 for 72 hrs, after which 10 nM R1881 was added for another 72 hrs before protein extraction.

### **Quantitative analysis and statistics**

Densitometric analyses under linear conditions were performed using the Quantity One® software (Biorad, Hercules, CA). Statistical significance was assessed using a Mann-Whitney U test (SPSS, Chicago, IL). *P*-values below 0.05 were considered as significant.

## **RESULTS**

### **NF- $\kappa$ B p100/p52 cytoplasmic and nuclear protein levels vary among prostate cancer cell lines**

The expression and the sub-cellular localization of the p52 subunit and its p100 precursor in prostate cancer cells has not been characterized. Figure 1 shows that p52 and p100 protein levels vary among prostate cancer cell lines in androgen-deprived conditions. Notably, androgen-independent PC-3 and DU145 cells have elevated p52 cytoplasmic and nuclear levels relative to androgen-dependent LNCaP cells. Interestingly, androgen-independent (but sensitive) 22RV1 cells also display high p52 levels relative to LNCaP cells.



### **Androgenic stimulation induces p52 production and nuclear accumulation in LNCaP cells**

Since p52 protein levels vary according to the androgen-dependency status of prostate cancer cell lines, we assessed whether p52 production could be modulated by the androgenic stimulation of LNCaP cells. As shown in Figures 2A-B, p52 accumulates both in the cytoplasm and in the nucleus of LNCaP cells after 48-72hrs of 10nM R1881 stimulation. Similar results were obtained in androgen receptor-expressing 22RV1 cells (Figure 2C). In contrast, p52 levels remain unchanged from 0 to 72 hrs in androgen receptor negative PC-3 and DU145 cells (Figure 2C). Hence, the androgenic stimulation of androgen-receptor expressing prostate cancer cells induces p52 production and nuclear accumulation.

### **Modulation of p52 is androgen-receptor dependent**

To confirm that R1881 exerts its effect through the androgen receptor, we treated LNCaP cells with the androgen receptor inhibitor bicalutamide (Casodex). At a concentration of 20  $\mu$ M, bicalutamide clearly inhibited p52 nuclear accumulation (Figure 2D). Similarly, RNAi depletion of the androgen receptor blocked p52 accumulation at 72 hrs (Figure 6B). These results show that the androgenic modulation of p52 in LNCaP cells is androgen receptor-dependent.

### **Androgen signalling-induced modulation of other NF- $\kappa$ B subunits.**

We investigated whether other NF- $\kappa$ B subunits could accumulate in the nucleus of LNCaP cells after R1881 treatment (Figure 3A, left panel). Induction of androgen signalling promoted the accumulation of nuclear p100 and a transitory modulation of RelA nuclear levels. The levels of p50 remained steady while RelB was undetectable. The fold-changes in nuclear levels of detectable NF- $\kappa$ B subunits after 72hrs of R1881 treatment, relative to time zero, are shown in Figure 3B.

In parallel, we also performed a time-course experiment with TNF- $\alpha$  since it has been shown to induce the nuclear accumulation of all NF- $\kappa$ B subunits in other cellular

systems [25]. As expected, TNF- $\alpha$  induced the rapid nuclear accumulation of p100, RelA, p50, and p52 (Figures 3A-B). In addition, TNF- $\alpha$  promoted the nuclear accumulation of RelB.

The differential expression of nuclear RelB between R1881- and TNF- $\alpha$ -stimulated cells suggested a TNF- $\alpha$ -dependent regulation of RelB expression [26]. Indeed, as shown in Figure 3C, cytosolic RelB expression was only induced in TNF- $\alpha$ -treated LNCaP cells. Interestingly, while basal RelB levels were extremely low in the cytosol of androgen-receptor expressing LNCaP and 22RV1 cells, they were strongly elevated in androgen-independent PC-3 and DU145 cells (Figure 3D). Notably, c-Rel was undetectable in all conditions tested (data not shown).

#### **Androgen signalling induces the formation of active p52-containing complexes**

To determine whether the androgenic stimulation of LNCaP cells modulates the DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B subunits, we carried out gel shift experiments. As previously reported by other groups [21, 23], R1881 treatment inhibited NF- $\kappa$ B DNA-binding after 24-48 hrs (Figure 4A). Strikingly, however, long-term R1881 stimulation resulted in the re-appearance of NF- $\kappa$ B complexes. Moreover, the nature of these DNA-binding complexes differed from untreated cells. At 72 hrs, we observed an increase in the high to low molecular weight ratio of NF- $\kappa$ B complexes in comparison to untreated cells (Figure 4A and lane 1-2 of Figure 4B). To identify the specific NF- $\kappa$ B subunits involved, we performed supershift assays (Figure 4B). In untreated cells, we detected the presence of RelA and p50, but no p52. In contrast, at 72 hrs, p52 was supershifted in addition to RelA and p50. As expected, we did not detect the presence of RelB or c-Rel (data not shown) since both subunits are not expressed in the nucleus of R1881-treated LNCaP cells (Figure 3A). These findings indicate that the androgenic stimulation of LNCaP cells induces a temporal change in the activity and the nature of NF- $\kappa$ B DNA-binding complexes. They also confirm that the nuclear accumulation of p52 leads to active p52 DNA-binding.

**A small fraction of androgen signalling-induced p52 interacts with RelA and p50.**

To further characterize the nature of p52-containing complexes modulated by R1881, we immunoprecipitated RelA and p50 from cytoplasmic and nuclear extracts of LNCaP cells and assessed the presence of p52. Results show that R1881 treatment promotes the production of RelA-p52 and p50-p52 dimers at 72 hrs (Figure 5A). However, only a small fraction of nuclear p52 is bound to RelA (Figure 5B) or p50 (data not shown). Since RelB and c-Rel are not expressed in these conditions, these findings suggest that nuclear p52 may function mainly as a homodimer in R1881-treated LNCaP cells at 72hrs.

**The production and nuclear accumulation of p52 is IKK- $\alpha$  dependent.**

The inducible generation of p52 requires the IKK- $\alpha$ -dependent activation of the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway [27]. To validate this mechanism in LNCaP cells, we blocked the expression of either IKK- $\alpha$  or IKK- $\beta$  by RNAi (Figure 6A) and evaluated the impact of their depletion on R1881-induced p52 accumulation (Figure 6B). Results demonstrate that IKK- $\alpha$  is necessary for p52 nuclear accumulation, whereas IKK- $\beta$  is dispensable. These observations strongly suggest that the androgenic stimulation of LNCaP cells activates the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway responsible for p52 accumulation.

**DISCUSSION**

Understanding the interplay between NF- $\kappa$ B and androgen receptor signalling is of particular importance considering the role of these two pathways in the progression of prostate cancer. Several reports suggest that canonical NF- $\kappa$ B signalling is restrained in androgen-dependent cells but confers a selective survival advantage in androgen-deprived conditions. With the emergence of new evidence that implicates the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in the development of lymphoid and solid tumors [28-32], and recent results that report the expression and nuclear localization of non-canonical RelB and p52 subunits in prostate cancer tissues [33], we tested whether this alternate

NF- $\kappa$ B pathway could also be activated in prostate cancer cells and regulated by androgens.

We observed elevated cytoplasmic and nuclear p52/p100 ratio and p52 levels in androgen-independent PC-3 and DU145 cells compared to androgen-sensitive LNCaP cells (Figure 1). Notably, 22RV1 cells also showed elevated p52 basal levels but, like LNCaP cells, p52 production increased in the presence of R1881 (Figure 2C). This correlates well with their androgen-dependence status: these cells can easily survive in androgen-deprived conditions but they also express the androgen receptor and respond to androgenic stimulation [34]. Overall, elevated p52 levels suggest that the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway is also constitutively activated in androgen-independent cells.

We then further investigated whether the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway could be modulated by androgen treatment. Sustained treatment of LNCaP (Figure 2A) with the androgen analogue R1881 induced the IKK- $\alpha$ -dependent nuclear accumulation of p52 (Figure 6). This is particularly intriguing since several stimuli have been shown to activate both the canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B signalling pathways in a cell-specific and time-dependent manner. For instance, activation of cell surface receptors [i.e. BAFF [35], CD40 [36], TLR4 [37], and LT $\beta$ 1 [38, 39] among others] induces a rapid activation of the canonical pathway followed by a delayed and sustained activation of the non-canonical pathway. In contrast, we report here that although androgens inhibit canonical NF- $\kappa$ B binding ([21, 23], Figure 4A), they can also activate the alternate NF- $\kappa$ B pathway. While cell surface receptor-mediated non-canonical NF- $\kappa$ B signalling predominantly increases the amount of active RelB-p52 dimers, androgen receptor mediated non-canonical NF- $\kappa$ B signalling appears to primarily induce the formation of p52 homodimers (Figure 5B). The predominance of p52 homodimers may provoke a competition with canonical RelA-p50 dimers for specific promoter sequences and result in the repression of a subset of NF- $\kappa$ B-dependent genes over a long period. Conversely, in androgen-independent PC-3 and DU145 cells, elevated RelB (Figure 3C) and p52 (Figure 1) levels may mimic the

traditional cell-surface receptor induction of RelB-p52 dimers that promote sustained activation of NF- $\kappa$ B-dependent genes.

Notably, p100 is detected in the nucleus of prostate cancer cells (Figure 1) and accumulates in the nucleus of androgen-stimulated LNCaP cells (Figure 2A, 3A). In contrast to p52, however, nuclear p100 is also present in charcoal- and Casodex-treated LNCaP cells (Figure 2). While p100 nuclear expression and translocation has already been observed in other cell types [25], additional studies are required to address the biological significance of this phenomenon. The presence of p100 in the nucleus may regulate NF- $\kappa$ B activity by sequestering a fraction of p52-containing and/or RelA-p50 dimers. As such, p100 clearly interacts with RelA and p50 (Figure 5A).

Timeline experiments also revealed a temporal change in RelA nuclear levels (Figure 4A) and the re-appearance of RelA and p50 DNA-binding complexes at 72 hrs (Figure 5B). In addition, supershift experiments showed that most DNA-binding complexes at 72 hrs are composed of RelA and p50-containing subunits since the p52 antibody only shifted a small fraction of NF- $\kappa$ B complexes. Moreover, co-immunoprecipitation assays confirmed the presence of RelA-p50 dimers (Figure 5A). Hence, our results do not exclude the possibility that canonical NF- $\kappa$ B dimers may also be re-activated after a prolonged R1881 treatment and may explain the few reports where an increase in NF- $\kappa$ B DNA-binding, rather than a decrease, is observed after androgen treatment [40, 41]. Ultimately, chromatin immunoprecipitation experiments would be required in order to characterize the nature of NF- $\kappa$ B complexes bound to different NF- $\kappa$ B-dependent gene promoters *in vivo* after androgenic stimulation of LNCaP cells.

The molecular mechanisms used by the androgen receptor signalling pathway to modulate non-canonical NF- $\kappa$ B signalling remain elusive. Since the accumulation of p52 occurs a long time after the initiation of androgenic stimulation, it is conceivable that the activated androgen receptor controls the transcription or translation of ligands and/or other mediators of non-canonical NF- $\kappa$ B signalling. The expression of the p52

precursor, p100, may be a candidate androgen receptor-modulated gene. As shown in Figure 2A, p100 levels remain stable in the cytoplasm of R1881-stimulated LNCaP cells despite increased p52 production suggesting a net increase in p100 levels. Previously, TNF- $\alpha$ -induced p100 expression has been shown to be dependent upon canonical NF- $\kappa$ B activity [42]. In androgen-stimulated LNCaP cells, however, the inhibition of canonical NF- $\kappa$ B signalling may reflect an androgen receptor-dependent increase in p100 levels at the transcriptional and/or translational level(s).

## CONCLUSIONS

In conclusion, we show that androgenic stimulation of LNCaP cells induces the production and nuclear accumulation of the non-canonical p52 subunit. This effect is androgen receptor and IKK- $\alpha$ -dependent, and leads to the formation of p52-containing DNA binding complexes. Interestingly, this induction differs from TNF- $\alpha$ -mediated p52 production as it occurs less rapidly and it is not accompanied by the induction of RelB expression. To our knowledge, this is the first evidence of non-canonical NF- $\kappa$ B induction by a steroidal hormone. These findings build on a growing body of research dedicated in clarifying the role of NF- $\kappa$ B signalling in the the progression of prostate cancer and other hormone-regulated neoplasia.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

F.S. holds a University of Montreal Chair in Prostate Cancer Research and is supported by the Division of Urology of the CHUM. L.L. is supported by a Canadian Institute of Health Research/Canadian Prostate Cancer Research Initiative studentship. This work was supported in part by a NCIC/CUOG/Astra-Zeneca Prostate Cancer Research grant.

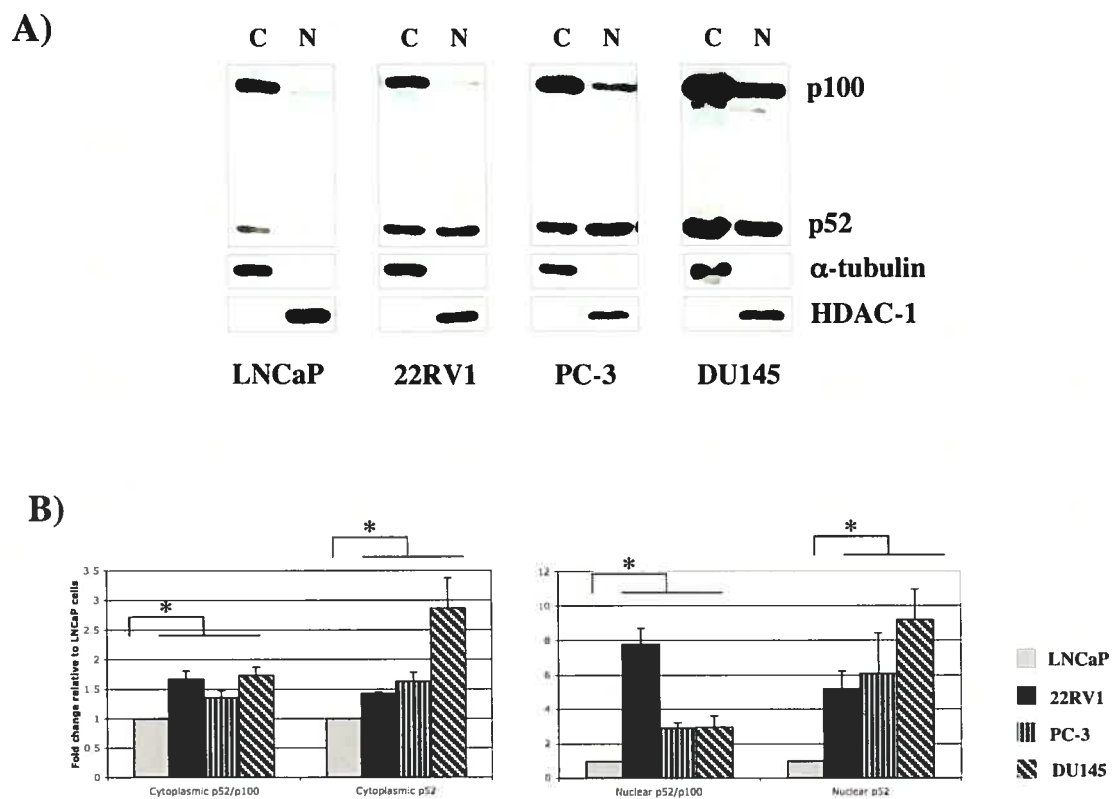
**REFERENCES**

1. E.D. Crawford, M.A. Eisenberger, D.G. McLeod, J.T. Spaulding, R. Benson, F.A. Dorr, B.A. Blumenstein, M.A. Davis, P.J. Goodman, *N Engl J Med.* 321 (1989) 419.
2. S. Culine, J.P. Droz, *Ann Oncol.* 11 (2000) 1523.
3. M.J. Morris, H.I. Scher, *Cancer.* 89 (2000) 1329.
4. S.S. Coughlin, I.J. Hall, *Ann Epidemiol.* 12 (2002) 182.
5. Y. Shang, M. Myers, M. Brown, *Mol Cell.* 9 (2002) 601.
6. C.A. Heinlein, C. Chang, *Endocr Rev.* 25 (2004) 276.
7. J. Suh, A.B. Rabson, *J Cell Biochem.* 91 (2004) 100.
8. M.S. Hayden, S. Ghosh, *Genes Dev.* 18 (2004) 2195.
9. A. Hoffmann, D. Baltimore, *Immunol Rev.* 210 (2006) 171.
10. J.L. Pomerantz, D. Baltimore, *Mol Cell.* 10 (2002) 693.
11. A.V. Gasparian, Y.J. Yao, D. Kowalczyk, L.A. Lyakh, A. Karseladze, T.J. Slaga, I.V. Budunova, *J Cell Sci.* 115 (2002) 141.
12. J. Suh, F. Payvandi, L.C. Edelstein, P.S. Amenta, W.X. Zong, C. Gelinas, A.B. Rabson, *Prostate.* 52 (2002) 183.
13. S. Huang, C.A. Pettaway, H. Uehara, C.D. Bucana, I.J. Fidler, *Oncogene.* 20 (2001) 4188.
14. P.F. Lindholm, J. Bub, S. Kaul, V.B. Shidham, A. Kajdacsy-Balla, *Clin Exp Metastasis.* 18 (2000) 471.
15. A. Yemelyanov, A. Gasparian, P. Lindholm, L. Dang, J.W. Pierce, F. Kisseljev, A. Karseladze, I. Budunova, *Oncogene.* 25 (2006) 387.
16. C.D. Chen, C.L. Sawyers, *Mol Cell Biol.* 22 (2002) 2862.
17. J.J. Palvimo, P. Reinikainen, T. Ikonen, P.J. Kallio, A. Moilanen, O.A. Janne, *J Biol Chem.* 271 (1996) 24151.
18. P. Aarnisalo, J.J. Palvimo, O.A. Janne, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (1998) 2122.
19. P. Aarnisalo, H. Santti, H. Poukka, J.J. Palvimo, O.A. Janne, *Endocrinology.* 140 (1999) 3097.



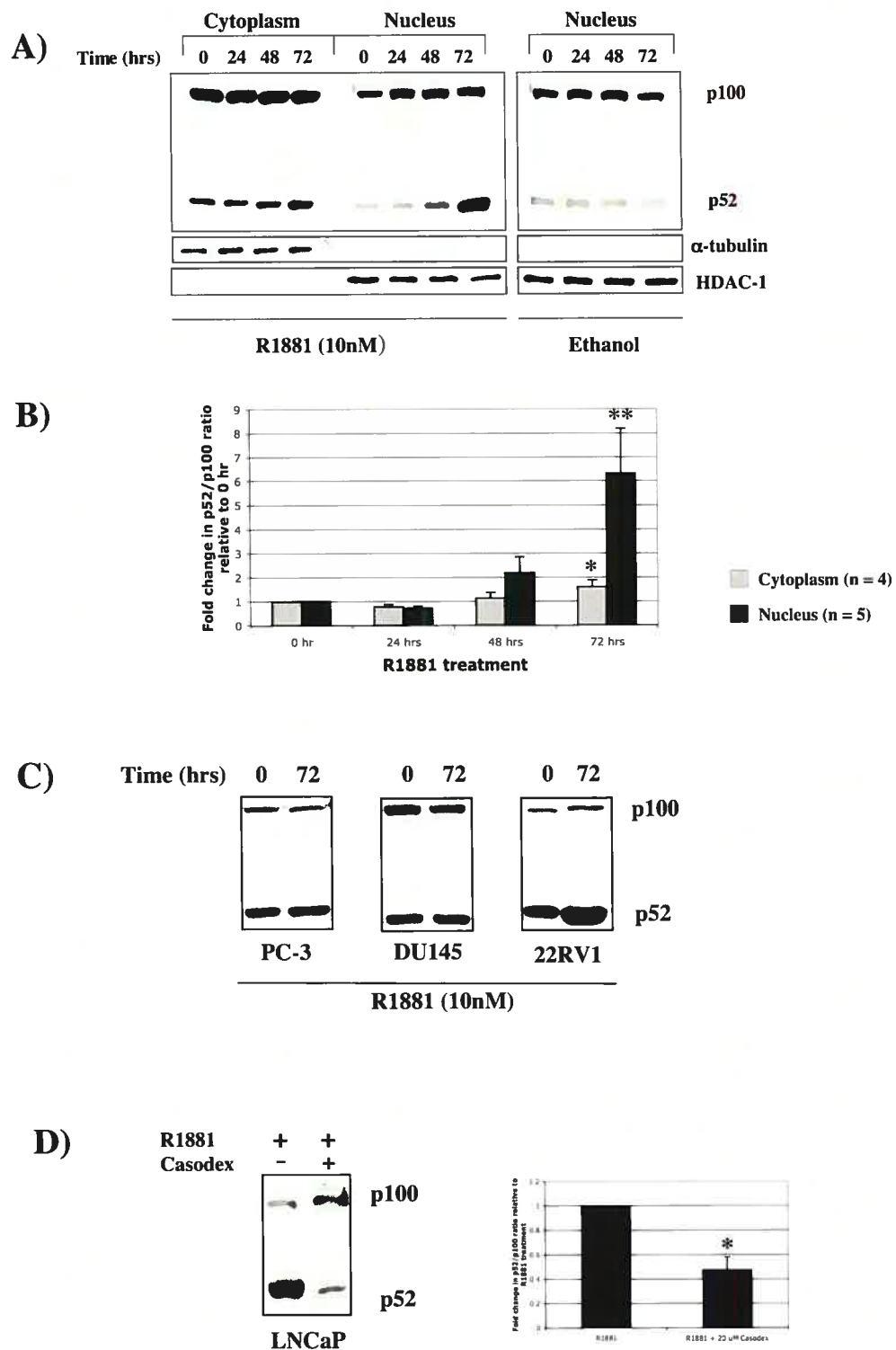
20. B. Cinar, F. Yeung, H. Konaka, M.W. Mayo, M.R. Freeman, H.E. Zhau, L.W. Chung, *Biochem J.* 379 (2004) 421.
21. S. Altuwaijri, H.K. Lin, K.H. Chuang, W.J. Lin, S. Yeh, L.A. Hanchett, M.M. Rahman, H.Y. Kang, M.Y. Tsai, Y. Zhang, L. Yang, C. Chang, *Cancer Res.* 63 (2003) 7106.
22. S.D. Catz, J.L. Johnson, *Oncogene.* 20 (2001) 7342.
23. E.T. Keller, C. Chang, W.B. Ershler, *J Biol Chem.* 271 (1996) 26267.
24. K. Kimura, M. Markowski, C. Bowen, E.P. Gelmann, *Cancer Res.* 61 (2001) 5611.
25. S. Sacconi, S. Pantano, G. Natoli, *Mol Cell.* 11 (2003) 1563.
26. G.D. Bren, N.J. Solan, H. Miyoshi, K.N. Pennington, L.J. Pobst, C.V. Paya, *Oncogene.* 20 (2001) 7722.
27. G. Xiao, A. Fong, S.C. Sun, *J Biol Chem.* 279 (2004) 30099.
28. E.G. Demicco, K.T. Kavanagh, R. Romieu-Mourez, X. Wang, S.R. Shin, E. Landesman-Bollag, D.C. Seldin, G.E. Sonenshein, *Mol Cell Biol.* 25 (2005) 10136.
29. M. Nonaka, R. Horie, K. Itoh, T. Watanabe, N. Yamamoto, S. Yamaoka, *Oncogene.* 24 (2005) 3976.
30. J. Pallares, J.L. Martinez-Guitarte, X. Dolcet, D. Llobet, M. Rue, J. Palacios, J. Prat, X. Matias-Guiu, *J Pathol.* 204 (2004) 569.
31. N.D. Perkins, *Oncogene.* 22 (2003) 7553.
32. A. Vacca, M.P. Felli, R. Palermo, G. Di Mario, A. Calce, M. Di Giovine, L. Frati, A. Gulino, I. Screpanti, *Embo J.* 25 (2006) 1000.
33. L. Lessard, L.R. Begin, M.E. Gleave, A.M. Mes-Masson, F. Saad, *Br J Cancer.* 93 (2005) 1019.
34. R.M. Sramkoski, T.G. Pretlow, 2nd, J.M. Giaconia, T.P. Pretlow, S. Schwartz, M.S. Sy, S.R. Marengo, J.S. Rhim, D. Zhang, J.W. Jacobberger, *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35 (1999) 403.
35. N. Kayagaki, M. Yan, D. Seshasayee, H. Wang, W. Lee, D.M. French, I.S. Grewal, A.G. Cochran, N.C. Gordon, J. Yin, M.A. Starovasnik, V.M. Dixit, *Immunity.* 17 (2002) 515.

36. H.J. Coope, P.G. Atkinson, B. Huhse, M. Belich, J. Janzen, M.J. Holman, G.G. Klaus, L.H. Johnston, S.C. Ley, *Embo J.* 21 (2002) 5375.
37. B. Mordmuller, D. Krappmann, M. Esen, E. Wegener, C. Scheidereit, *EMBO Rep.* 4 (2003) 82.
38. E. Dejardin, N.M. Droin, M. Delhase, E. Haas, Y. Cao, C. Makris, Z.W. Li, M. Karin, C.F. Ware, D.R. Green, *Immunity.* 17 (2002) 525.
39. J.R. Muller, U. Siebenlist, *J Biol Chem.* 278 (2003) 12006.
40. M.O. Ripple, W.F. Henry, S.R. Schwarze, G. Wilding, R. Weindruch, *J Natl Cancer Inst.* 91 (1999) 1227.
41. R.N. Coffey, R.W. Watson, A.J. O'Neill, K. Mc Eleny, J.M. Fitzpatrick, *Prostate.* 53 (2002) 300.
42. S. Liptay, R.M. Schmid, E.G. Nabel, G.J. Nabel, *Mol Cell Biol.* 14 (1994) 7695.



**Figure 1 NF- $\kappa$ B p100/p52 expression in prostate cancer cells in androgen-deprived conditions.**

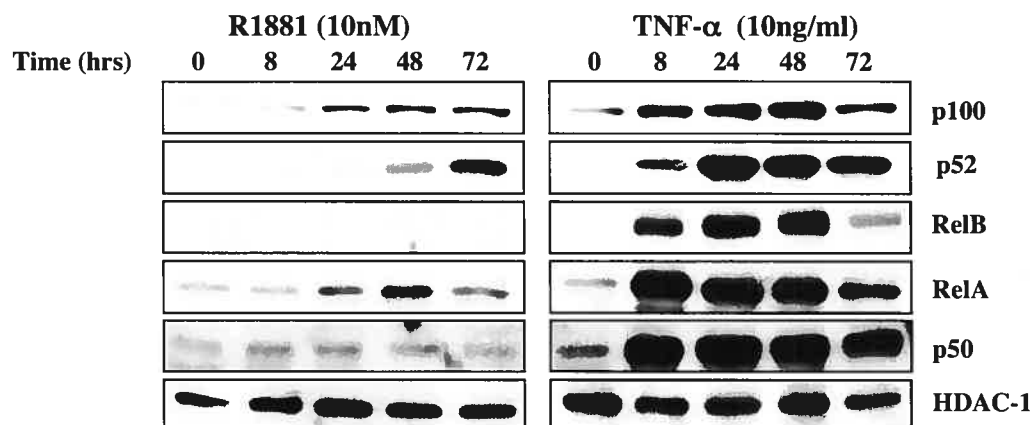
**Figure 1 NF- $\kappa$ B p100/p52 expression in prostate cancer cells in androgen-deprived conditions.** (A) PC-3, DU145, 22RV1, and LNCaP were cultured 3 days in charcoal-stripped FBS and cytoplasmic and nuclear lysates were analyzed for p100, p52,  $\alpha$ -tubulin (cytoplasmic control), and HDAC-1 (nuclear control) levels by immunoblot, as indicated. C: Cytosolic fraction. N: Nuclear fraction. (B) Densitometric analysis of results obtained in A. *Left panel:* cytoplasmic p52/p100 ratios and p52 levels in prostate cancer cells relative to LNCaP. *Right panel:* nuclear p52/p100 ratios and p52 levels in prostate cancer cells relative to LNCaP. Results shown are the mean  $\pm$  S.E. of 3 independent experiments. \*:  $p < 0.05$



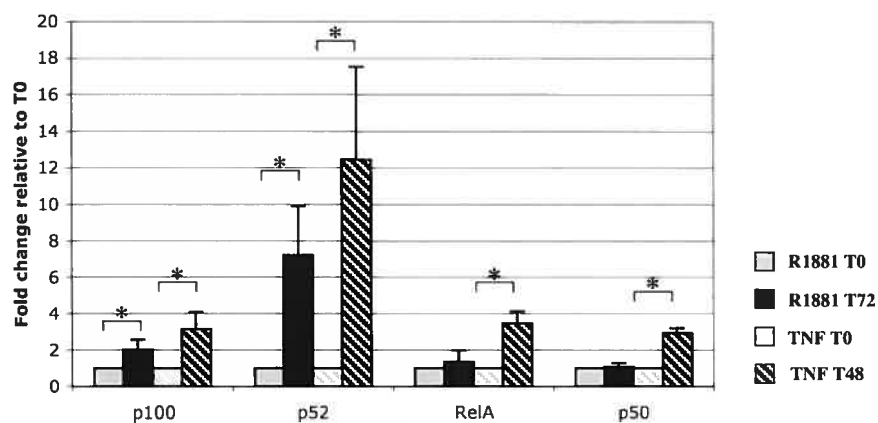
**Figure 2** NF- $\kappa$ B p52 production and nuclear accumulation in R1881-treated androgen-sensitive prostate cancer cells.

**Figure 2 NF- $\kappa$ B p52 production and nuclear accumulation in R1881-treated androgen-sensitive prostate cancer cells.** (A) LNCaP cells were treated with 10 nM R1881 or vehicle (ethanol) for 0, 24, 48, and 72 hrs. For each time point, cells were fractionated and lysates were analyzed for p100 and p52 (different exposures are presented in top left panel for clarity) as well as  $\alpha$ -tubulin (cytoplasmic control) and HDAC-1 (nuclear control). (B) Densitometric analysis of results obtained in A. Data represent the change in the p52/p100 ratio in R1881-stimulated LNCaP cells relative to T0. Results shown are the mean  $\pm$  S.E. of 4 (cytoplasmic fraction) and 5 (nuclear fraction) independent experiments. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ . (C) PC-3, DU145, and 22RV1 were treated with 10 nM R1881 for 72 hrs and nuclear lysates were subjected to immunoblot analysis for p100 and p52. (D) *Left panel:* LNCaP cells were treated for 72 hrs with either 10 nM R1881 or 10 nM R1881 + 20  $\mu$ M bicalutamide (androgen receptor inhibitor). Nuclear lysates were analyzed for p100 and p52 by immunoblot. *Right panel:* Densitometric analysis of results obtained in left panel. Data represent the change in the p52/p100 ratio in LNCaP cells treated with both R1881 and bicalutamide relative to cells treated with R1881 alone. Results shown are the mean  $\pm$  S.E. of 3 independent experiments. \*:  $p < 0.05$ .

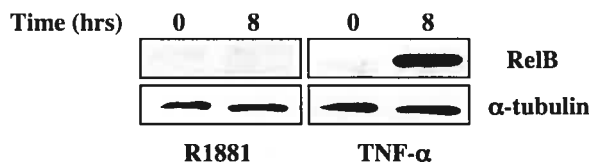
A)



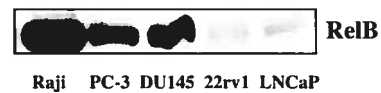
B)



C)



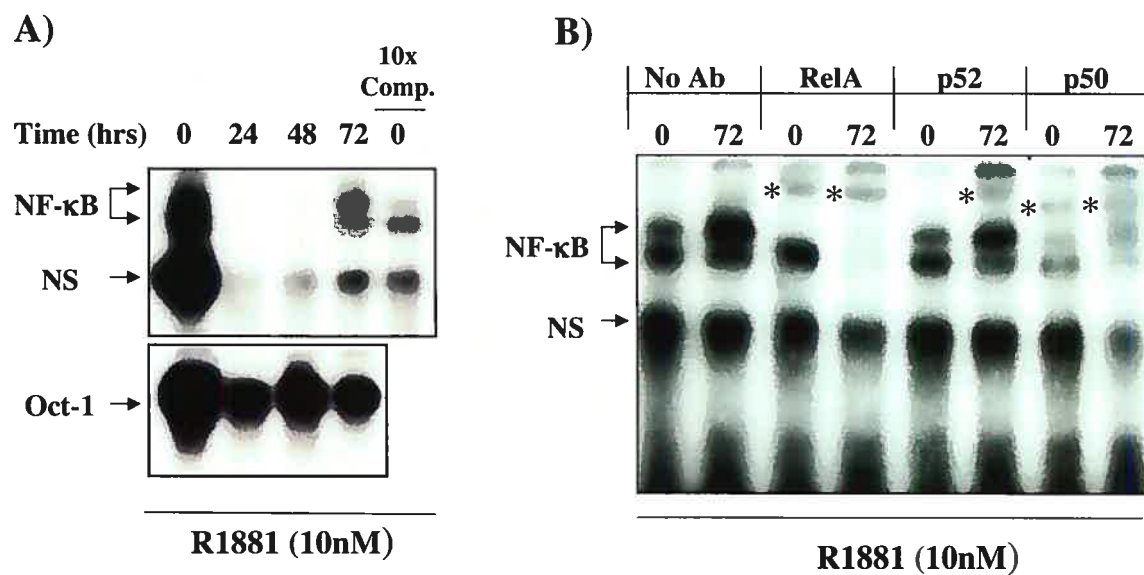
D)



**Figure 3 Differential modulation of NF-κB subunits by R1881 and TNF-α.**

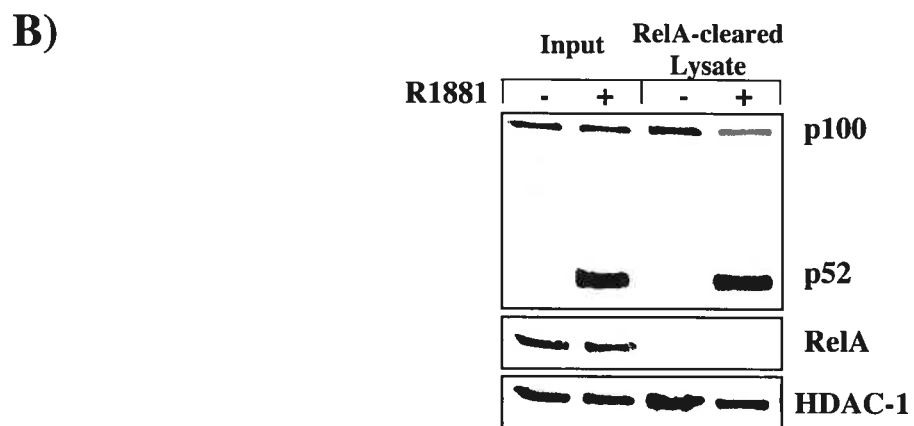
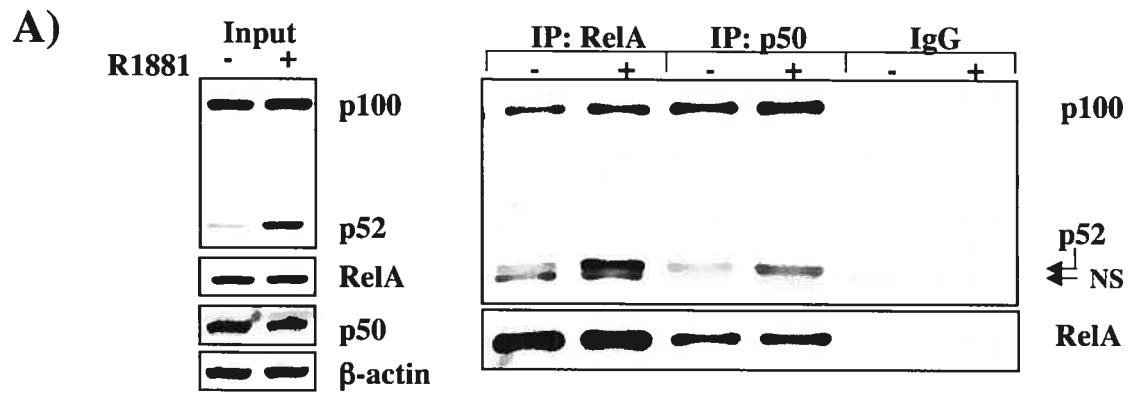
**Figure 3 Differential modulation of NF- $\kappa$ B subunits by R1881 and TNF- $\alpha$ .** (A) LNCaP cells were treated with 10 nM R1881 or 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 0, 8, 24, 48, and 72 hrs. For each time point, nuclear lysates were analyzed for p100, p52, RelB, RelA, p50, and HDAC-1 (loading control) by immunoblot, as indicated. (B) Densitometric analysis of results obtained in A. Data represent the change in NF- $\kappa$ B subunit levels in R1881 (72hrs) or TNF- $\alpha$  (48hrs) stimulated LNCaP cells relative to T0. Results shown are the mean  $\pm$  S.E. 3 independent experiments. \*:  $p < 0.05$ . (C) Cytosolic lysates of LNCaP cells treated 8 hrs with 10 nM R1881 or 10 ng/ml TNF- $\alpha$  were analyzed for RelB and  $\alpha$ -tubulin (loading control) by immunoblot. (D) Cytosolic extracts of PC-3, DU145, 22RV1, and LNCaP cells were probed for the presence of RelB by immunoblot. A Raji nuclear extract was used as a positive control for RelB expression.





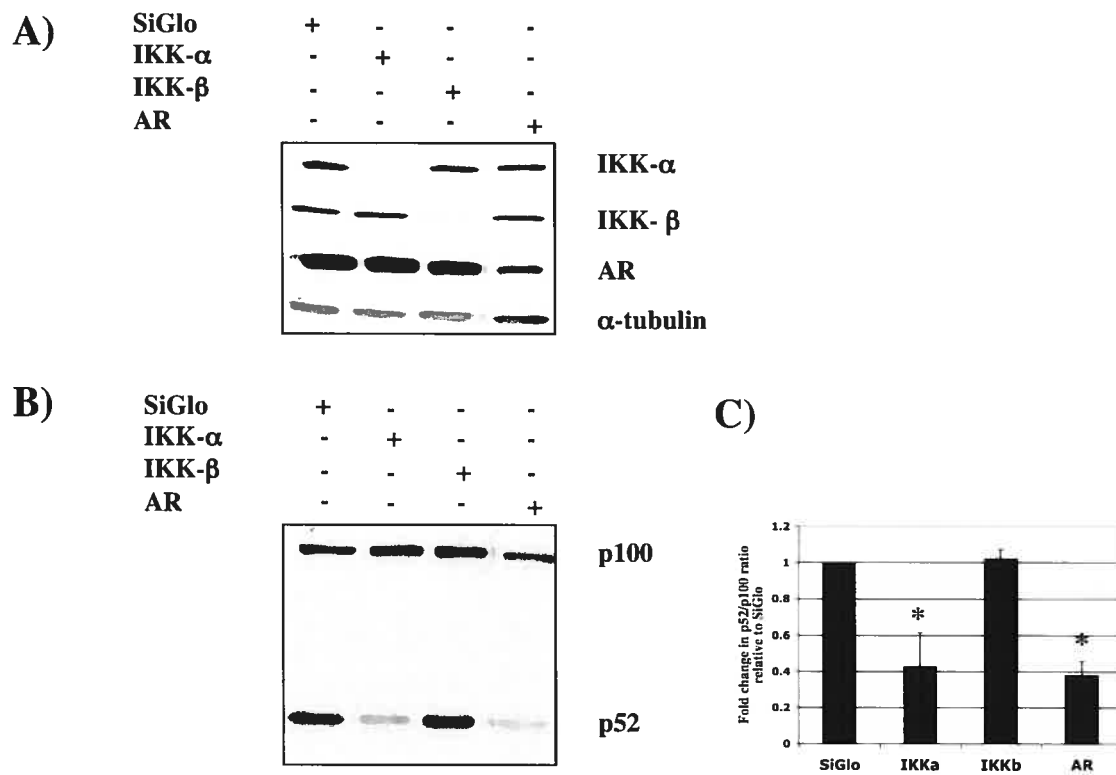
**Figure 4** Time-dependent modulation of NF- $\kappa$ B DNA-binding and variation in the nature of DNA-binding complexes during androgenic stimulation of LNCaP cells.

**Figure 4 Time-dependent modulation of NF- $\kappa$ B DNA-binding and variation in the nature of DNA-binding complexes during androgenic stimulation of LNCaP cells.** (A) LNCaP cells were treated with 10 nM R1881 for 0, 24, 48, and 72 hrs. Nuclear proteins were incubated with a radiolabeled probe containing the I $\kappa$ B consensus sequence or Oct-1 sequence (protein loading control) and DNA-binding activities were analyzed by EMSA. Note that the interaction of nuclear proteins with the I $\kappa$ B probe at T0 was diminished in the presence of 10x excess cold probe (Lane 5) (B) The nature of DNA-binding complexes at 0 and 72 hrs was examined with antibodies against RelA, p52, and p50 as indicated. Asterisks represent supershifted bands. NS.: Non-specific. Data are representative of 2 independent experiments.



**Figure 5. Androgen signalling-induced p52 interacts with RelA and p50.**

**Figure 5 Androgen signalling-induced p52 interacts with RelA and p50.** LNCaP cells were treated with 10 nM R1881 or ethanol (control) for 72hrs. **(A) Left Panel:** The cytosolic protein immunoprecipitation inputs were immunoblotted for p100, p52, RelA, p50, and  $\beta$ -actin (loading control) to determine their respective levels in untreated and treated conditions. *Right Panel:* Cytosolic proteins were immunoprecipitated with anti-RelA or anti-p50 antibody and immunoblotted with an anti-p100/p52 or anti-RelA antibody. Immunoprecipitated p50 is not shown since it migrates along with the IgG heavy chain. Similar results were obtained with nuclear lysates **(B)** Nuclear protein immunoprecipitation inputs and RelA-cleared lysates were analyzed for p100, p52, RelA, and HDAC-1 (loading control) levels by immunoblot. Similar results were obtained with p50-cleared lysates. Data are representative of 2-3 independent experiments. NS: non-specific.



**Figure 6. The accumulation of p52 is IKK- $\alpha$ -dependent.**

**Figure 6. The accumulation of p52 is IKK- $\alpha$ -dependent.** LNCaP cells transfected with control (SiGlo) or specific siRNAs against IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , or the androgen receptor (AR) were treated with 10 nM R1881 for 72 hrs. **(A)** Cytosolic lysates were analyzed for IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , AR, and  $\alpha$ -tubulin (loading control) expression by immunoblot. **(B)** Nuclear lysates were analyzed for p100 and p52 levels by immunoblot. **(C)** Densitometric analysis of results obtained in A. Data represent the change in the p52/p100 ratio in siRNA-treated LNCaP cells relative to control SiGlo siRNA. Results shown are the mean  $\pm$  S.E. of 3 independent experiments. \*:  $p < 0.05$ .

## CHAPITRE VII. DISCUSSION

### 7.1 Chapitres II, III et IV

#### 7.1.1 Résumé

L'objectif principal des trois premiers chapitres consistait à valider RelA, une sous-unité classique de la famille NF- $\kappa$ B, en tant que marqueur pronostique du cancer de la prostate. Dans la première partie du chapitre II, l'analyse immunohistochimique du statut de RelA dans les spécimens de prostatectomie radicale a révélé une expression cytoplasmique dans la majorité des tissus cancéreux et des glandes normales adjacentes, et une localisation nucléaire uniquement dans les cellules tumorales [205]. Le pourcentage de noyaux positifs variait d'une tumeur à l'autre et n'était pas significativement lié au grade histologique. Il y avait toutefois une tendance vers une fréquence nucléaire de RelA plus élevée dans les tissus modérément et pauvrement différenciés. D'autres groupes ont aussi observé une localisation nucléaire de RelA dans les tumeurs prostatiques, laissant ainsi présager l'existence d'une sur-activation de NF- $\kappa$ B dans le cancer de la prostate [198, 199, 206, 207]. À cet effet, Shukla et al. ont plus tard montré que cette localisation nucléaire coïncidait avec la sur-expression de gènes connus pour être activés par NF- $\kappa$ B tels que VEGF, cycline D1 et Bcl-2 [208]. La présence de RelA au noyau pourrait donc favoriser la progression du cancer en induisant, entre autres, l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse, la prolifération et la résistance à l'apoptose. Ce rôle dans la progression de la maladie peut être indirectement investigué en regardant la valeur pronostique de RelA.

Nous avons donc évalué, dans la deuxième partie du chapitre II, le potentiel pronostique de RelA en comparant son statut dans les tumeurs primaires de deux groupes de patients ayant vécu une évolution clinique différente [205]. Le premier groupe était constitué de tumeurs de 13 patients considérés comme guéris, c'est-à-dire n'ayant subi aucune rechute biochimique dans les 5 années suivant la prostatectomie radicale. Le second groupe était composé de tumeurs de 17 patients décédés suite au

développement de métastases osseuses. Les résultats ont révélé que 59% des patients décédés présentaient une tumeur dont les cellules avaient une haute fréquence de RelA nucléaire (> 10% des cellules cancéreuses) contrairement à seulement 15% des patients guéris. De plus, tel qu'observé en clinique, les patients décédés avaient en général un grade Gleason plus élevé que les patients guéris. Cependant, dans les deux groupes, les tumeurs modérément différenciées (Gleason 5-7) représentaient au-delà de 50% des patients. Nous avons donc voulu vérifier si l'ajout du marqueur RelA pouvait aider, dans ce cas, à mieux classer les patients à risque de progression. En regroupant les grades Gleason intermédiaires de type RelA-nucléaire positifs avec les grades Gleason élevés, 71% des patients décédés étaient correctement classés dans le groupe à haut risque de progression. De façon similaire, en regroupant les grades Gleason intermédiaires de type RelA-nucléaire négatifs avec les grades Gleason faibles, 85% des patients guéris étaient correctement classés dans le groupe à faible risque de progression. Ces travaux montraient donc pour la première fois le potentiel pronostique de NF- $\kappa$ B dans le cancer de la prostate.

Dans le chapitre III, nous avons directement analysé le potentiel pronostique de RelA en le confrontant à la rechute biochimique, l'indicateur de progression le plus couramment utilisé [209]. Cette rechute est particulièrement difficile à prédire chez les patients présentant des marges chirurgicales positives. En effet, même si l'analyse pathologique révèle une résection incomplète de la tumeur, les patients ne rechutent pas tous pour autant [210, 211]. Puisque les marqueurs cliniques ne sont pas suffisants pour prédire l'évolution de la maladie, entre autres parce que ces tumeurs sont majoritairement de grade Gleason intermédiaire [141], l'utilisation de RelA comme marqueur pronostique a été envisagée. Dans une étude chez 42 patients avec marges chirurgicales positives, nous avons déterminé en analyse multivariée qu'une localisation nucléaire de RelA dans >5% des cellules cancéreuses augmentait de 6 fois le risque d'une rechute biochimique. En outre, les patients avec une expression nucléaire de RelA élevée rechutaient beaucoup plus rapidement que les patients présentant de faibles niveaux. Parallèlement à cette étude, d'autres groupes ont aussi



associé la localisation nucléaire de RelA à la rechute biochimique, faisant de RelA un sérieux candidat comme marqueur pronostique du cancer de la prostate [206, 207].

Au chapitre IV, nous avons vérifié si RelA pouvait aider à prédire la présence de métastases aux ganglions, un autre indicateur de mauvais pronostic [212]. Le statut des ganglions est le plus souvent inconnu parce que le chirurgien omet de les réséquer ou, lorsqu'il le fait, il limite la résection à une sous-population de ganglions augmentant ainsi la probabilité d'établir un diagnostic faux négatif [213]. Cette situation a stimulé le développement de nomogrammes qui combinent une série de marqueurs cliniques permettant de calculer la probabilité d'avoir des métastases ganglionnaires [60, 214]. Ces marqueurs étant limités, l'ajout de marqueurs moléculaires améliorerait l'exactitude de prédiction de ces nomogrammes. Ayant au préalable observé une forte localisation nucléaire de RelA dans les métastases ganglionnaires du cancer de la prostate [215], nous avons voulu déterminer si l'expression nucléaire de RelA dans les tumeurs primaires pouvait aider à prédire la présence de métastases aux ganglions. En comparant un groupe contrôle de patients n'ayant pas rechuté 5 ans après la chirurgie à un groupe de patients métastatiques, nous avons observé une plus haute fréquence de RelA nucléaire chez ces derniers. De plus, en analyse multivariée, chaque 1% d'augmentation de la fréquence de RelA nucléaire augmentait le risque d'avoir des métastases ganglionnaires de 8%. Bref, RelA pourrait potentiellement être inclus dans les nomogrammes pour évaluer la probabilité d'une atteinte des ganglions pelviens. RelA pourrait être combiné à d'autres marqueurs comme TGF- $\beta$  et IL-6, lesquels ont également permis d'accroître l'exactitude de prédiction de ces nomogrammes [216].

### 7.1.2 Discussion et perspectives

Les résultats des chapitres II, III et IV suggèrent que RelA pourrait éventuellement s'ajouter aux marqueurs cliniques afin de mieux prédire l'évolution du cancer. La sous-unité RelA est d'autant plus intéressante qu'elle a la particularité de contrôler l'expression de plusieurs gènes qui sont eux-mêmes des marqueurs moléculaires du

cancer de la prostate. Ceux-ci incluent les cyclines D [217, 218], VEGF [219], Bcl-2 [203], c-myc [220], Pim-1 [221], KAI-1 [222] et IL-6 [223]. De plus, RelA est connu pour interférer avec le fonctionnement de la protéine p53 [224] et du RA [225]. Le caractère multi-cibles de RelA rassemble plusieurs gènes qui, individuellement, contribuent à l'hétérogénéité moléculaire des tumeurs. Collectivement, par contre, l'implication de ces gènes dans la pathogénèse du cancer expliquerait l'efficacité de RelA en tant que marqueur pronostique. Cette efficacité pourrait aussi être attribuable au degré d'activité associé à la détection nucléaire de RelA par immunohistochimie qui reflète fort probablement une activité NF- $\kappa$ B très élevée. Cette hypothèse se base sur les propriétés des lignées cellulaires prostatiques. Ainsi, même si les cellules PC-3 et DU145 ont une activité basale de RelA-p50 élevée, telle que détectée par EMSA et essais rapporteurs [199], les sous-unités RelA et p50 sont tout de même majoritairement localisées au cytoplasme. En fait, pour observer une augmentation significative de RelA au noyau, il faut en général stimuler les cellules de façon soutenue avec des agents reconnus pour activer fortement la voie NF- $\kappa$ B. Par exemple, une stimulation des cellules DU145 par le rétinoïde synthétique CD437 entraîne une importante relocalisation de RelA au noyau détectable par immunofluorescence [226]. Concrètement, dans le tissu cancéreux prostatique, la localisation nucléaire de RelA pourrait donc représenter une forte activation de NF- $\kappa$ B sous l'influence de divers stimuli autocrins et/ou paracrins.

La sur-expression de RelA a aussi été confrontée aux marqueurs cliniques en analyses multivariées. En théorie, la sur-expression de RelA pourrait entraîner une saturation au niveau des mécanismes de rétention cytoplasmique et favoriser la translocation nucléaire du RelA excédentaire. Par contre, les résultats sont controversés: dans un cas, RelA semble être un marqueur indépendant de rechute biochimique [227] alors que dans l'autre, il n'a aucune valeur prédictive [228]. Ces différences découlent peut-être du système de pointage de l'intensité qui varie souvent d'une étude à l'autre et qui est moins quantitatif que le simple décompte de noyaux positifs. Il se peut aussi, contrairement à la localisation nucléaire, que l'activité NF- $\kappa$ B engendrée par la

sur-expression de RelA soit trop faible ou trop variable pour clairement influencer le pronostic.

Mise à part la localisation nucléaire des autres sous-unités de la famille NF- $\kappa$ B (chapitre V), il existe d'autres façons d'estimer le degré d'activation de NF- $\kappa$ B par immunohistochimie. Entre autres, l'expression de I $\kappa$ B- $\alpha$  a déjà été investiguée sans toutefois aboutir à des résultats concluants. Que ce soit dans le cancer de la prostate ou d'autres types de tumeurs, les études rapportent soit une sur-expression ou une sous-expression de I $\kappa$ B- $\alpha$  [184, 185, 208, 227, 229-231]. Ces observations contradictoires sont peut-être dues au mécanisme d'auto-inhibition de la voie NF- $\kappa$ B classique. En effet, bien qu'I $\kappa$ B- $\alpha$  soit dégradé lorsque la voie NF- $\kappa$ B classique est activée, le dimère RelA-p50 induit rapidement la transcription du gène I $\kappa$ B- $\alpha$  (section 1.6). Bref, le niveau d'expression de I $\kappa$ B- $\alpha$  n'est pas le meilleur moyen d'évaluer l'activité de la voie NF- $\kappa$ B. L'utilisation d'un anticorps spécifique pour la forme phosphorylée de I $\kappa$ B- $\alpha$  (S32,36) serait une alternative envisageable, mais les résultats pourraient être encore difficiles à interpréter étant donné la variation du niveau total de I $\kappa$ B- $\alpha$ . D'autres cibles intra-cellulaires potentielles incluent les formes phosphorylées de RelA et des kinases IKK. Cependant, les anticorps reconnaissant ces épitopes sont pour la plupart incompatibles avec les tissus fixés dans la formaline, lesquels forment la grande majorité des tissus archivés. Advenant le développement d'anticorps fonctionnels en paraffine, il serait tout de même pertinent de comparer la valeur pronostique de ces marqueurs avec celle de la localisation nucléaire de RelA.

D'un point de vue statistique, la taille limitée des cohortes n'a pas empêché de faire ressortir la capacité prédictive de RelA. Cependant, un échantillon plus important et représentatif de l'ensemble des patients diagnostiqués aiderait à consolider la valeur pronostique de RelA. Pour ce faire, l'utilisation de micro-étalages de tissus (« *tissue microarray*; TMA ») est une option attrayante [232]. Grâce aux TMA, il est possible de détecter RelA sur des centaines de tissus simultanément, réduisant du même coup la variabilité des résultats d'immunohistochimie. Les TMA peuvent être construits en fonction du type de tissu (normal, NIP, cancer; voir chapitre V), ou à l'aide d'une

série de patients consécutifs ayant un suivi clinique accessible à fin d'analyse pronostique. En général, chaque patient est représenté par 3-4 carottes de tissu provenant d'un bloc représentatif du grade histologique de la tumeur. Le grand nombre de patients permet de confronter le statut de RelA à une variété d'évolutions cliniques dont la rechute biochimique, le développement de métastases ganglionnaires et/ou osseuses, l'apparition d'un cancer hormono-réfractaire et la survie. Par ailleurs, une fois la valeur prédictive de RelA confirmée, il faudra retourner aux lames traditionnelles afin de mettre au point un système d'évaluation de coloration nucléaire approprié permettant d'évaluer le risque de progression réel de chaque patient. En effet, les TMA aident à valider un marqueur mais ne reflètent pas la réalité clinique car en pratique, pour chaque patient, le pathologiste analyse différents blocs de tissu prostatique et détecte souvent du cancer sur plus d'un bloc. Il sera donc important de déterminer la meilleure méthode d'analyse du statut de RelA. Par exemple, est-ce que la détection du statut de RelA sur un seul bloc représentatif du grade histologique serait suffisante (ex. : chapitre II et III), ou est-ce que la sélection du spécimen avec la plus haute fréquence nucléaire de RelA serait plus efficace (ex. : chapitre IV)? Éventuellement, la méthode de choix permettra d'élaborer un système de pointage qui pourrait s'intégrer aux nomogrammes post-opératoires existants afin de calculer le risque de récurrence et/ou prédire la présence de cancer avancé.

Les études futures s'attarderont aussi au potentiel de RelA en tant que marqueur pré-traitement en analysant sa localisation nucléaire sur des spécimens de biopsies. Il pourrait, entre autres, améliorer la prédiction du stade pathologique et influencer le choix entre une PR ou la RTx. Cependant, la piètre qualité des tissus biopsiés et la quantité limitée de tissus disponibles sont des facteurs qui risquent de nuire à la validation pronostique. Les analyses nécessiteront donc un nombre élevé de patients et une optimisation du protocole d'immunohistochimie. Hormis l'évolution naturelle et le stade pathologique du cancer, le statut pré- et/ou post-opératoire de RelA pourrait servir de marqueur de réponse à une thérapie adjuvante comme la TPA ou le docetaxel. À cet effet, dans le cancer du sein, la localisation nucléaire de RelA est associée à la résistance à la doxorubicine et aux taxanes [233]. Enfin, la présence de

RelA au noyau permettrait même de sélectionner les candidats qui bénéficieraient d'un traitement adjuvant à l'aide d'inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (section 1.6.9). L'administration de ces inhibiteurs pourrait à elle seule ralentir la progression du cancer ou, lorsque combinée avec un agent conventionnel, sensibiliser les tumeurs à ce dernier. Par ailleurs, les agents anti-NF- $\kappa$ B ne ciblent pas spécifiquement RelA ou la voie NF- $\kappa$ B classique [197]. Sans une connaissance plus approfondie du statut et du rôle des autres sous-unités de la famille NF- $\kappa$ B dans le cancer de la prostate, l'utilisation de tels inhibiteurs pourraient être risquée s'il s'avérait, par exemple, que la voie non classique ait une fonction protectrice.

## 7.2 Chapitre V

### 7.2.1 Résumé

L'expression de RelB, p52, p50, et c-Rel dans les tissus cancéreux prostatiques demeurait hypothétique jusqu'à tout récemment. Dans une étude systématique analysant l'expression et la localisation intra-cellulaire des sous-unités NF- $\kappa$ B, nous avons confirmé leur expression dans les tumeurs primaires [234]. Toutes ont été détectées dans les noyaux cellulaires excepté c-Rel qui était strictement cytoplasmique. Remarquablement, la sous-unité RelB était la plus fréquemment localisée au noyau, suivie de RelA, p52 et p50. Par ailleurs, l'expression nucléaire de RelB corrélait significativement avec le grade histologique des patients. De plus, le calcul de la fréquence à laquelle deux sous-unités se retrouvaient dans les noyaux cellulaires d'un même tissu a révélé que la co-expression nucléaire de RelA et p50 était la moins fréquente. En d'autres termes, ces résultats suggèrent non seulement une activation du dimère classique RelA-p50, mais aussi une activation encore plus fréquente de sous-unités non classiques dans le cancer de la prostate.

### 7.2.2 Discussion et perspectives

Le chapitre V a permis de caractériser l'expression et la localisation intra-cellulaire de tous les membres de la famille NF- $\kappa$ B. À prime abord, en ce qui concerne le statut de RelA, l'étude a confirmé les données immunohistochimiques observées dans les chapitres II, III et IV. Les résultats de l'ensemble de ces chapitres permettent d'ailleurs de dresser un portrait du patron d'expression de RelA dans le cancer de la prostate. Ainsi, la plupart des glandes normales présentent une coloration cytoplasmique prononcée des cellules basales et généralement plus faible pour les cellules luminales. Au niveau de la NIP et du tissu cancéreux, l'intensité de coloration se rapproche de celle des cellules basales. Pour sa part, la localisation nucléaire de RelA est quasi exclusive au tissu tumoral, mais peut tout de même être détectée à l'occasion dans la NIP (chapitre IV et V) et les glandes normales (chapitre IV). Bien que la majorité des études ait rapporté une coloration nucléaire de RelA dans les cellules cancéreuses, il semble exister une controverse au sujet du statut de RelA dans les cellules normales. En effet, alors que certains groupes, incluant le nôtre, observent une faible fréquence nucléaire de RelA dans ce tissu ( $\leq 5\%$ ) [207, 208, 234], d'autres affirment le contraire [199, 227]. Ces différences peuvent difficilement s'expliquer par le type d'anticorps utilisé puisque tous sont en mesure de détecter RelA dans les noyaux des cellules cancéreuses. Par contre, le nombre limité de tissu normal analysé dans ces études serait une explication possible. Il se peut aussi que l'AIP, nouvellement proposée comme le stade transitoire entre le tissu normal et la NIP, ait été considérée comme du tissu bénin. Dans ce cas, une expression différentielle des sous-unités NF- $\kappa$ B entre le tissu normal et les cellules épithéliales de l'AIP pourrait expliquer les résultats contradictoires concernant la localisation nucléaire de RelA dans les glandes dites « bénignes ». D'ailleurs, il ne serait pas étonnant d'observer une coloration nucléaire de RelA dans l'AIP puisque NF- $\kappa$ B est directement impliqué dans le processus inflammatoire (section 1.6.2). L'activation de RelA dans l'AIP permettrait même de renforcer le lien entre l'inflammation et le cancer de la prostate.

Le patron d'expression des autres sous-unités NF- $\kappa$ B est très similaire à celui de RelA. Un des points en commun est la variation de l'intensité de coloration entre les cellules basales et luminales des glandes normales. Le caractère non différencié des cellules basales suggère un lien entre l'expression des sous-unités NF- $\kappa$ B et le degré de différenciation cellulaire. Qui plus est, les cellules basales sont soupçonnées d'être la cible du processus de transformation cellulaire menant au cancer [16]. Le niveau d'expression élevé des membres de la famille NF- $\kappa$ B dans les cellules basales, la NIP et le cancer est peut-être le reflet de cette théorie. Il faut par contre souligner que le tissu normal analysé est le plus souvent adjacent aux cellules tumorales ou provient d'une prostate cancéreuse. Dans les études futures, l'analyse de prostates non cancéreuses de patients autopsiés permettrait de confirmer le patron d'expression des sous-unités NF- $\kappa$ B dans les glandes normales. De plus, l'inclusion de spécimens d'AIP permettrait de raffiner l'analyse de l'expression des sous-unités dans les stades précoces de la carcinogénèse prostatique.

La localisation nucléaire des sous-unités RelB, p50 et p52 dans le tissu cancéreux soulève évidemment un intérêt du point de vue pronostique. La validation de ces sous-unités en tant que marqueurs moléculaires sera effectuée sur les mêmes TMA que ceux utilisés pour RelA (section 7.1.2). Chaque sous-unité sera analysée non seulement de manière individuelle, mais aussi en combinaison avec les autres sous-unités. En effet, un des avantages des TMA est la possibilité de caractériser l'expression de plusieurs marqueurs à l'intérieur d'une minuscule région tissulaire. Dans le chapitre V, nous avons évalué la fréquence à laquelle 2 sous-unités se trouvaient localisées dans les noyaux cellulaires d'une même région tumorale et nous avons fait ressortir plusieurs combinaisons possibles. Dans une étude pronostique, ces combinaisons pourraient être plus efficaces qu'une seule sous-unité afin de prédire une évolution clinique particulière. De plus, les sous-unités non classiques (RelB, p52) ont peut-être une valeur pronostique contraire à celle des sous-unités classiques (RelA, p50). Il faut par contre être prudent quant à l'interprétation des résultats concernant p52 car tous les anticorps existants ciblent la région amino-terminale de NF- $\kappa$ B2 qui est présente à la fois dans p100 et p52. Même si p100 est

majoritairement cytoplasmique, les résultats du chapitre VI montrent que p100 peut aussi être localisé au noyau. Il serait donc intéressant de développer un anticorps reconnaissant spécifiquement p100 afin d'évaluer sa véritable localisation intracellulaire dans les tissus cancéreux prostatiques.

L'immunohistochimie est certainement utile pour analyser l'expression de marqueurs moléculaires, mais elle ne permet pas de comprendre la fonction de ceux-ci. Dans le cas de NF- $\kappa$ B, il est probable que les différentes sous-unités agissent en activant l'expression de gènes impliqués dans la progression du cancer. L'expression de certains gènes candidats, connus pour être régulés par NF- $\kappa$ B, a déjà été détectée dans les tissus prostatiques [208] mais rien ne prouve que ces gènes sont sur-exprimés uniquement dans les cellules présentant une localisation nucléaire d'une ou plusieurs sous-unités NF- $\kappa$ B. Afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés entre les cellules positives et négatives pour une sous-unité NF- $\kappa$ B localisée au noyau, l'utilisation d'un microscope à dissection au laser est une alternative excitante. Cette technique consiste à prélever, à l'échelle cellulaire, la quantité de tissu désirée à l'aide d'un laser. Celui-ci fait fondre une mince pellicule de plastique insérée à l'intérieur d'un petit capuchon. Au contact avec le tissu, le plastique refroidit et adhère aux cellules ciblées. Une fois la dissection terminée, le capuchon est immédiatement déposé dans un tube contenant un tampon de lyse. L'ARN est ensuite isolé et amplifié à des fins d'analyse génomique. Grâce à cet outil, il serait possible de caractériser le transcriptome des cellules NF- $\kappa$ B nucléaire-positives et de le comparer avec les cellules négatives. En plus d'identifier des gènes connus, cette étude pourrait mener à la découverte de nouveaux gènes qui deviendraient eux-mêmes des marqueurs pronostiques du cancer de la prostate. Par exemple, dans les cellules de type RelA-nucléaire, l'identification d'un gène d'une protéine sécrétée pourrait conduire au développement d'un test sanguin ou d'urine qui aiderait à établir un pronostic sans avoir besoin d'échantillon prostatique.



## 7.3 Chapitre VI

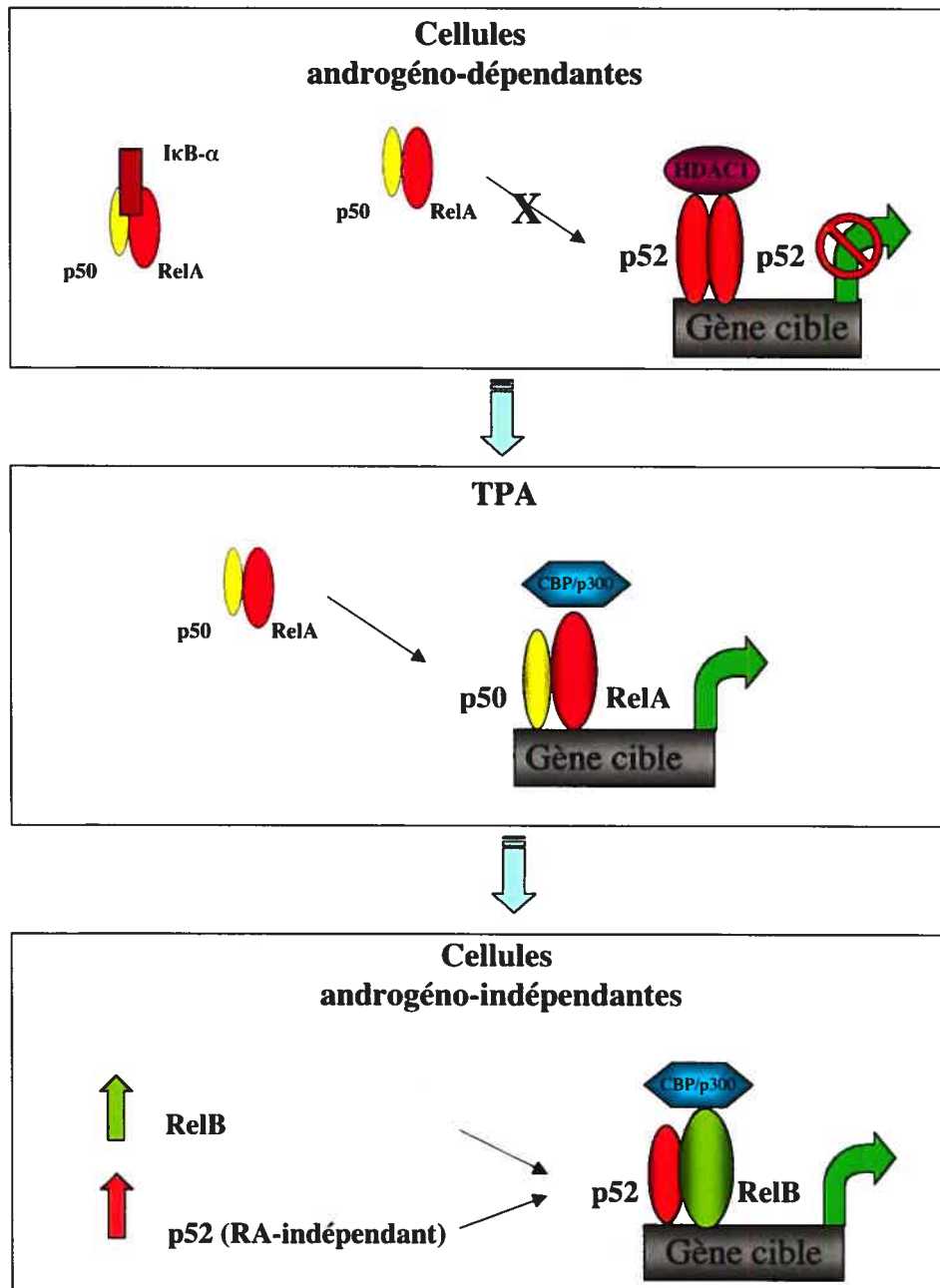
### 7.3.1 Résumé

Le chapitre VI visait à mieux comprendre l'influence du RA sur les voies NF- $\kappa$ B. En ce qui a trait à la voie NF- $\kappa$ B classique, il semble que l'activité du dimère RelA-p50 soit initialement inhibée par le R1881 pour ensuite réapparaître après 48-72hrs de stimulation. De plus, après 72hrs, la nature des complexes NF- $\kappa$ B liant l'ADN diffère de ceux à 0hr et contiennent une petite quantité de p52. À cet effet, la découverte majeure de cette étude est la génération et l'accumulation nucléaire de la sous-unité non classique p52 suite à une stimulation androgénique des cellules LNCaP. Ce mécanisme est apparemment médié par la voie NF- $\kappa$ B non classique puisque seule l'ablation de IKK- $\alpha$ , et non IKK- $\beta$ , empêche l'accumulation de p52. Contrairement aux cellules androgéno-indépendantes PC-3 et DU145 qui expriment de hauts niveaux de p52 et RelB, l'absence de RelB dans les LNCaP traitées au R1881 suggère que cette sous-unité n'est pas le partenaire principal de p52 dans ces conditions. Les expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) ont révélé une interaction de p52 avec RelA et p50, mais l'analyse des lysats cellulaires avant et après les co-IP supporte la prédominance d'homodimères p52-p52.

### 7.3.2 Discussion et perspectives

#### 7.3.2.1 Activité des dimères NF- $\kappa$ B aux promoteurs endogènes

L'accumulation nucléaire de dimères p52-p52 pourrait compléter l'inhibition rapide de la voie NF- $\kappa$ B classique. En effet, en présence d'androgènes, ces dimères pourraient contribuer à la répression à long terme d'un sous-groupe de gènes régulés par NF- $\kappa$ B (Figure 8, 1<sup>er</sup> cadre) en favorisant le recrutement d'histones déacétylases (HDAC) [152, 235]. De plus, l'occupation par p52-p52 de sites  $\kappa$ B normalement reconnus par RelA-p50 (ou d'autres dimères) pourrait mener à la re-localisation de celui-ci sur d'autres promoteurs. La répression médiée par p52-p52 pourrait aussi



**Figure 8. Modulation de l'activité transcriptionnelle de NF-κB lors de la progression du cancer la prostate vers une maladie hormono-réfractaire.** Dans les cellules androgéno-dépendantes (1<sup>er</sup> cadre), la présence d'androgènes inhiberait l'expression de gènes transactivés par NF-κB en augmentant l'expression de IκB-α et en favorisant l'accumulation nucléaire d'homodimères p52-p52. Au contraire, lors d'une TPA (2<sup>e</sup> cadre), l'activation de la voie NF-κB classique et la disparition des dimères p52-p52 favoriseraient l'expression de gènes anti-apoptotiques et/ou pro-prolifératifs par RelA-p50. Enfin, dans les cellules androgéno-indépendantes (3<sup>e</sup> cadre), la ré-activation de la voie NF-κB non classique combinée à la sur-expression de RelB favoriseraient la transcription soutenue de gènes anti-apoptotiques et/ou pro-prolifératifs par les dimères RelB-p52 (voir le texte pour plus de détails).

empêcher la liaison d'autres facteurs de transcription indépendants des voies NF- $\kappa$ B. Globalement, le contrôle de l'activité des voies et des dimères NF- $\kappa$ B par le RA jouerait un rôle dans l'homéostasie des cellules androgéno-dépendantes. Dans un contexte de privation d'androgène, ce contrôle du RA sur de l'activité NF- $\kappa$ B serait perdu au profit d'autres médiateurs (ex. : signaux de détresse) qui moduleraient à leur façon les voies et les dimères NF- $\kappa$ B et favoriseraient l'acquisition d'un phénotype androgéno-indépendant.

Afin de valider ce modèle, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) permettraient, contrairement à l'EMSA, d'obtenir une image précise du rôle endogène des différents dimères NF- $\kappa$ B en présence et en absence d'androgène. En effet, même si la présence de complexes capables de lier l'ADN et composés des sous-unités RelA, p50 et/ou p52 n'est pas remise en question (Figure 5, chap. VI), l'activité NF- $\kappa$ B détectée par EMSA n'est pas nécessairement le reflet exact de la réalité. D'abord, la sonde consensus utilisée interagit préférentiellement avec les dimères RelA-p50 et p50-p50 [163], minimisant la contribution des dimères contenant p52. Alternativement, une sonde « non classique » a récemment été développée, mais elle ne reconnaît que les dimères contenant la sous-unité RelB [236]. L'absence de RelB dans les cellules LNCaP traitées au R1881 n'a donc pas permis de détecter d'activité (données non présentées). Au-delà de la séquence, l'EMSA ne permet pas d'évaluer l'impact de chaque dimère sur la transcription. Par exemple, RelA-p50 pourrait agir comme activateur ou répresseur de transcription dépendamment du gène cible et des modifications post-traductionnelles de RelA. En effet, même s'il est traditionnellement reconnu comme un activateur transcriptionnel, RelA-p50 peut aussi inhiber la transcription en recrutant des HDAC [237]. Cette dualité fonctionnelle existe aussi avec les homodimères p52-p52 et p50-p50 qui, en interagissant avec le co-facteur Bcl-3, peuvent activer ou réprimer la transcription de certains gènes [235, 238-240]. Outre l'EMSA, une autre technique permettant de mesurer l'activité NF- $\kappa$ B est l'essai rapporteur. La méthode consiste à insérer la séquence consensus NF- $\kappa$ B en amont d'un gène rapporteur, le plus souvent la luciférase de la mouche à feu, qui a déjà été introduit à l'intérieur d'un plasmide. Par

contre, tout comme l'EMSA, l'essai rapporteur n'utilise qu'une simple séquence  $\kappa B$  et ne reflète pas l'activité transcriptionnelle des dimères NF- $\kappa B$  aux différents promoteurs endogènes. De plus, cette approche est incompatible avec les cellules LNCaP traitées au R1881 car les androgènes activent les promoteurs traditionnellement considérés comme constitutifs (ex. : CMV) qui sont utilisés dans les plasmides mesurant l'efficacité de transfection [241]. Les analyses de ChIP semblent donc les plus adéquates afin d'évaluer l'importance des dimères NF- $\kappa B$  dans la régulation de gènes cibles lors d'une stimulation androgénique.

L'analyse de l'activité de dimères NF- $\kappa B$  par ChIP requiert toutefois la sélection d'un promoteur qui est en mesure d'être reconnu par ce dimère. Il peut s'agir d'un promoteur déjà connu pour lier un dimère NF- $\kappa B$  ou d'un promoteur sélectionné à la suite d'une analyse d'expression génique. Pour ce faire, une série d'oligonucléotides représentant l'ensemble des 200 à 300 gènes connus pour être régulés par NF- $\kappa B$  peut être étalée sur une biopuce d'ADN. À l'aide de cette biopuce, l'expression des divers gènes peut être comparées entre les cellules induites et non induites au R1881. Les promoteurs des gènes candidats ayant les différences d'expression les plus marquées peuvent ensuite être utilisés pour les expériences de ChIP. L'immunoprécipitation de complexes ADN-protéines à l'aide d'anticorps contre RelA, p50, p52, HDAC, et Bcl-3, suivie d'une amplification par Q-PCR des régions contenant les sites  $\kappa B$ , donnerait une indication de la présence et du degré d'activité des différents dimères NF- $\kappa B$ . En particulier, cette approche permettrait de valider le modèle de répression transcriptionnelle médiée par p52-p52. Parallèlement, l'identification des gènes différentiellement modulés par les dimères NF- $\kappa B$  en présence d'androgènes donnerait un aperçu de la fonction biologique de ce mécanisme.

#### 7.3.2.2 Mécanisme(s) d'induction de la voie NF- $\kappa B$ non classique par le RA

Le ou les mécanisme(s) reliant le RA à l'activation de la voie NF- $\kappa B$  non classique demeure(nt) inexplicé(s). Puisque le RA est un facteur de transcription, il est possible qu'il induise l'expression de gènes impliqués dans l'activation de la voie NF-

$\kappa$ B non classique. La sur-expression de formes mutantes du RA incapables de lier l'ADN ou de transloquer au noyau permettrait de vérifier cette hypothèse. Advenant une inhibition de l'accumulation de p52 en présence de ces mutants, l'étape suivante consisterait à identifier la ou les cibles transcriptionnelle(s) du RA capable(s) d'activer la voie NF- $\kappa$ B non classique. Jusqu'à présent, la plupart des études semblent indiquer que cette voie s'enclenche suite à l'activation d'un récepteur de surface par son ligand spécifique [152]. Il est donc possible que le RA induise l'expression d'un ligand et/ou d'un récepteur responsable(s) de l'activation de la voie non classique. L'exposition de cellules LNCaP naïves à un milieu conditionné de cellules LNCaP pré-traitées au R1881 permettrait d'examiner la contribution de facteurs sécrétés. Parallèlement, la co-culture de cellules LNCaP naïves exprimant GFP-p100 avec des cellules LNCaP pré-traitées au R1881 permettrait de vérifier la thèse de la sur-expression de récepteurs et/ou de ligands non-solubles (liés à la membrane). Conceptuellement, l'utilisation d'une lignée LNCaP sur-exprimant GFP-p100 servirait à séparer l'activité NF- $\kappa$ B non classique induite dans les cellules naïves de celle des cellules pré-traitées au R1881. Enfin, une approche plus systématique consisterait à utiliser un régiment d'inhibiteurs de kinases qui pourrait mener à l'identification d'une voie de signalisation en amont de la voie non classique et, subséquentement, d'un récepteur et/ou ligand induit(s) par le RA. Il faudra toutefois confirmer les résultats obtenus à l'aide d'autres techniques (RNAi, dominants négatifs) pour s'assurer de la spécificité des inhibiteurs.

En plus de son rôle transcriptionnel, le RA peut aussi interagir physiquement avec diverses protéines faisant partie de voies de signalisation [145, 242]. Théoriquement, il pourrait donc interagir avec des membres de la voie NF- $\kappa$ B non classique. À prime abord, puisqu'il a récemment été montré qu'un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires, le récepteur à l'estrogène alpha ( $RE\alpha$ ), interagit directement avec IKK- $\alpha$  [243], il est possible que le RA en fasse de même. En se liant à IKK- $\alpha$ , le RA pourrait favoriser l'interaction physique entre IKK- $\alpha$  et p100. Ce mécanisme est d'ailleurs utilisé par l'oncoprotéine virale Tax pour activer la voie NF- $\kappa$ B non classique [159]. Alternativement, IKK- $\alpha$  pourrait phosphoryler le RA et moduler son

activité transcriptionnelle. En effet, en plus de p100, IKK- $\alpha$  cible un bon nombre de facteurs impliqués dans le contrôle de la transcription [244]. Par exemple, l'interaction entre IKK- $\alpha$  et le RE $\alpha$  mène à la phosphorylation IKK- $\alpha$  dépendante du ER $\alpha$  et d'autres composants du complexe de transcription dont SRC-3 et l'histone H3 [243]. De manière similaire, dans les cellules prostatiques, l'activation de IKK- $\alpha$  par le RA pourrait non seulement moduler la voie NF- $\kappa$ B non classique mais aussi, par un mécanisme de rétroaction positive, façonner l'activité transcriptionnelle du RA. Enfin, il est aussi possible que le RA agisse par l'intermédiaire d'autres protéines comme, par exemple, les chaperones moléculaires Hsp90/cdc37. D'une part, Hsp90/cdc37 sont bien connues pour interagir avec le RA dans des conditions de privation d'androgène [245]. D'autre part, elles font aussi partie du complexe IKK et sont requises pour l'activité kinase [246]. Ces caractéristiques laissent entrevoir un mécanisme par lequel Hsp90/cdc37 se dissocieraient du RA en présence d'androgène et se re-localiseraient au niveau de IKK- $\alpha$ , stimulant du même coup son activité. La combinaison de co-IP, d'essais kinase et de RNAi permettra de valider toutes ces hypothèses. Par contre, IKK- $\alpha$ , Hsp90 et cdc37 ne sont pas les seules protéines qui pourraient interagir avec le RA. Une approche protéomique (gel 2-D, spectrométrie de masse de type MALDI-TOF) pourrait mener à l'identification d'autres partenaires ayant un lien avec la voie NF- $\kappa$ B non classique.

### 7.3.2.3 L'importance biologique des sous-unités non classiques RelB et p52

Depuis le tournant du siècle, plus de 200 publications ont rapporté le rôle de la voie NF- $\kappa$ B classique et du dimère RelA-p50 dans la résistance à l'apoptose, la prolifération, la différenciation, l'angiogénèse, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses prostatiques (Tableau 7; [247]). De façon générale, il semble que RelA-p50 influence ces processus de manière à favoriser l'agressivité et la progression du cancer. À cet effet, le groupe de Huang *et al.* a montré que des cellules PC-3 sur-exprimant le super-répresseur I $\kappa$ B-SR perdent leurs caractéristiques invasives, angiogéniques et métastatiques lorsqu'elles sont injectées dans la prostate de souris nues [248]. En plus d'être liée à l'agressivité des cellules tumorales, l'activité NF- $\kappa$ B

classique semble être associée au degré de dépendance à l'androgène. Ainsi, le modèle actuel suggère que la voie NF- $\kappa$ B classique est réprimée par l'androgène dans les cellules androgéno-dépendantes et que son activation, en absence d'androgène, induit l'expression de facteurs de survie qui favorisent le développement d'un cancer hormono-réfractaire [249]. Mais qu'en est-il de la voie NF- $\kappa$ B non classique et, en particulier, de l'implication des sous-unités RelB et p52? Est-ce que celles-ci jouent un rôle dans l'agressivité et la progression du cancer de la prostate? En y regardant de plus près, l'expression constitutive de RelB et p52 dans les cellules androgéno-indépendantes PC-3 et DU145 (Figures 1 et 3, chap. VI) fait pencher dans cette direction.

Rôles de NF- $\kappa$ B	Exemples
Anti-apoptotique	Agents naturels et pharmaceutiques qui favorisent/ induisent l'apoptose en inhibant NF- $\kappa$ B
Pro-apoptotique	L'activation de NF- $\kappa$ B induit l'apoptose
Prolifération	L'inhibition de NF- $\kappa$ B ralentit ou inhibe la croissance cellulaire Facteurs qui activent NF- $\kappa$ B
Angiogénèse	Molécules pro-angiogéniques qui agissent par l'entremise de NF- $\kappa$ B L'inhibition de NF- $\kappa$ B inhibe l'expression de molécules pro-angiogéniques
Différenciation	NF- $\kappa$ B induit la différenciation des cellules prostatiques
Migration / Invasion	Molécules favorisant la migration et l'invasion qui agissent par l'entremise de NF- $\kappa$ B L'inhibition de NF- $\kappa$ B diminue le potentiel migratoire et invasif

**Tableau 7. Rôles de NF- $\kappa$ B dans le cancer de la prostate [247]**

D'un point de vue expérimental, l'utilisation d'ARN interférant contre IKK- $\alpha$ , RelB ou NF- $\kappa$ B2 permettrait d'évaluer la contribution de la voie NF- $\kappa$ B non classique au phénotype agressif des cellules androgéno-indépendantes. D'ailleurs, dans une étude récente, il a été montré que la déplétion de RelB par RNAi sensibilise les cellules PC-3 à la radiation [250]. Parallèlement, la sur-expression de RelB, p52 et/ou une forme constitutivement active d'IKK- $\alpha$  dans les cellules LNCaP privées d'androgène permettrait d'apprécier le rôle de la voie non classique dans la progression du cancer

vers une maladie hormono-réfractaire. Il faudra par contre s'assurer que la déplétion et la sur-expression d'IKK- $\alpha$  n'affecte pas l'activité de la voie NF- $\kappa$ B classique puisque cette kinase fait partie du complexe trimérique responsable de la phosphorylation de I $\kappa$ B- $\alpha$ . À ce sujet, dans d'autres modèles cellulaires, il semble qu'IKK- $\alpha$  ne soit pas requise pour l'induction normale de la voie NF- $\kappa$ B classique suite à une stimulation au TNF- $\alpha$  [176].

En ce qui a trait à RelB et p52, il serait pertinent de valider un modèle selon lequel la privation d'androgène induirait l'expression de RelB et, subséquentement, l'activation RA-indépendante de dimères non classiques RelB-p52 (Figure 8, 2<sup>ième</sup> et 3<sup>ième</sup> cadres). Ce modèle s'inspire de la cinétique observée lors d'une stimulation au TNF- $\alpha$  (Figure 3, chap. VI). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B classique par le TNF- $\alpha$  induit l'expression de la sous-unité RelB [153, 251] qui, suite à l'activation subséquente de la voie NF- $\kappa$ B non classique, se re-localise au noyau sous la forme de dimères RelB-p52. De manière similaire, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B classique en absence d'androgène pourrait éventuellement induire l'expression de RelB. De cette façon, advenant l'activation RA-indépendante de la voie non classique par certains facteurs de survie, la production de dimères RelB-p52 serait favorisée. L'analyse du statut de RelB et de la voie NF- $\kappa$ B non classique dans des clones androgéno-indépendants (LNCaP-AI) dérivés de cellules LNCaP aiderait à valider ce modèle [92]. L'avantage des clones LNCaP-AI par rapport aux cellules PC-3 et DU145 est l'existence de cellules parentales androgéno-dépendantes, ce qui permettra d'établir un lien plus direct entre la voie NF- $\kappa$ B non classique et le développement du cancer hormono-réfractaire.

Il semble toutefois exister une importante différence concernant le statut de RelB entre les cellules androgéno-dépendantes en culture et le tissu cancéreux prostatique pré-TPA. Alors que RelB est absent des cellules LNCaP traitées au R1881 (Figure 3, chap. VI), il est fréquemment détecté *in situ* dans les noyaux cellulaires de cellules tumorales (Tableau 1, chap. V). Cette situation pourrait s'expliquer, entre autres, par l'absence dans le milieu de culture de cytokines ou d'autres facteurs modulant

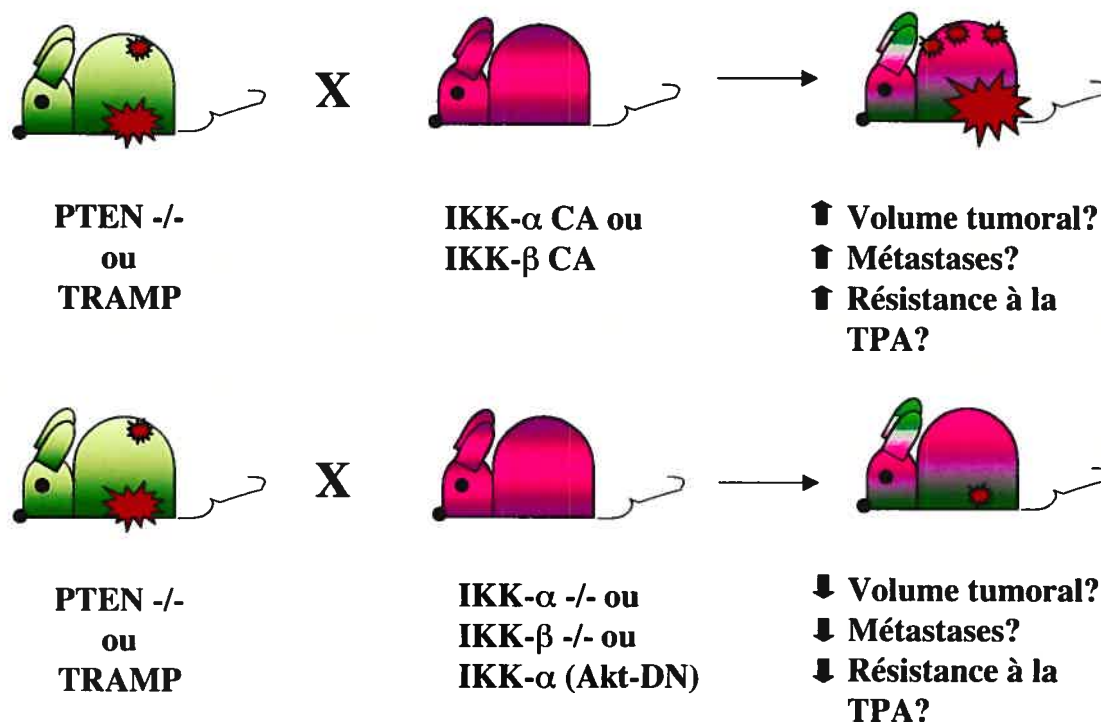


l'expression de RelB qui sont normalement présents dans le tissu tumoral. D'un point de vue fonctionnel, au niveau du tissu tumoral, la présence de RelB dans un sous-groupe de cellules pourrait leur conférer des propriétés plus agressives et/ou un statut androgéno-indépendant leur permettant de survivre malgré l'absence d'androgène. Au contraire, RelB pourrait agir comme répresseur de transcription en dimérisant avec RelA [252]. D'ailleurs, les résultats du chapitre V montrent que RelB et RelA sont les sous-unités les plus fréquemment retrouvées dans les noyaux cellulaires des mêmes tissus cancéreux prostatiques. Ultiment, la combinaison d'études pronostiques, d'expression génique *in situ* (à l'aide de la dissection au laser), et d'analyses fonctionnelles dans les lignées cellulaires permettront de clarifier le rôle biologique de RelB dans la progression du cancer de la prostate. De plus, ces expériences aideront peut-être au développement de thérapies mieux ciblées. Par exemple, dans l'éventualité d'une corrélation positive entre l'expression de RelB et l'agressivité des tumeurs, une thérapie ciblant directement l'expression et/ou la stabilité de RelB pourrait s'avérer plus efficace que l'inhibition complète de la voie NF- $\kappa$ B non classique. Ainsi, tout en éliminant les effets néfastes de RelB, cette approche favoriserait la production « par défaut » de dimères p52-p52 par la voie non classique et amplifierait l'effet inhibiteur de la thérapie.

#### 7.4 Contribution de NF- $\kappa$ B dans la pathogénèse moléculaire du cancer de la prostate

Afin de compléter les analyses immunohistochimiques et les études fonctionnelles dans les lignées cellulaires, il serait intéressant d'évaluer la contribution directe des voies NF- $\kappa$ B dans le développement et la progression du cancer de la prostate à l'aide de modèles murins. Tout d'abord, l'impact d'une sur-activation des voies NF- $\kappa$ B sur la carcinogénèse prostatique pourrait être étudié en exprimant des formes constitutivement actives de IKK- $\alpha$  ou IKK- $\beta$  à l'aide d'un promoteur prostate-spécifique comme PB ou de ses dérivés (section 1.4.3). À elles seules, les voies NF- $\kappa$ B ne seraient peut-être pas suffisantes pour transformer les cellules prostatiques, mais chacune d'elles pourrait promouvoir ou ralentir la

progression d'un modèle tumoral existant. Par exemple, dans les souris TRAMP [95] ou PTEN  $-/-$  (prostate-spécifique; [106]), la sur-activation de la voie NF- $\kappa$ B classique pourrait accélérer l'acquisition du phénotype androgéno-indépendant et/ou le développement de métastases (Figure 9). L'ablation génétique conditionnelle de IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  ou de sous-unités NF- $\kappa$ B dans les modèles murins du cancer de la prostate permettrait aussi d'examiner le rôle de NF- $\kappa$ B dans la progression du cancer (Figure 9) et, en particulier, le lien possible entre la voie PI3K-Akt et NF- $\kappa$ B. Dans les lignées cellulaires, la kinase Akt est capable d'activer les voies NF- $\kappa$ B en phosphorylant directement la kinase IKK- $\alpha$  [253]. De la même manière, *in vivo*, l'hyperactivation d'Akt détectée dans les souris TRAMP et PTEN  $-/-$  pourrait aussi moduler l'activité des voies NF- $\kappa$ B. D'ailleurs, dans le modèle TRAMP, Shukla *et al.* ont observé une sur-activation de la voie NF- $\kappa$ B classique qui corrélait avec une activité élevée de la voie PI3K-Akt [254]. Le croisement des souris TRAMP ou PTEN  $-/-$  avec les KO conditionnels des membres des voies NF- $\kappa$ B aiderait donc à clarifier le rôle de NF- $\kappa$ B dans une proportion significative de tumeurs prostatiques caractérisées par une hyperactivation de la voie PI3K-Akt (section 1.4.4.1). Par ailleurs, une approche encore plus spécifique consisterait en la création de souris « *knock-in* » dans lesquelles la kinase IKK- $\alpha$  endogène serait remplacée par une forme mutée au site de phosphorylation ciblé par Akt (Thr 23; [253]). Cette stratégie permettrait d'évaluer l'influence réelle de l'axe Akt-NF- $\kappa$ B sur l'activité globale des voies NF- $\kappa$ B *in vivo* et sur la progression tumorale.



**Figure 9.** Croisement entre différents modèles murins afin d'analyser la contribution de NF-κB dans le cancer de la prostate primaire et métastatique (taches brunes). CA : constitutivement active. IKK-α (Akt-DN) : kinase IKK-α mutée au site de phosphorylation ciblé par Akt.

Les modèles murins pourraient aussi être utilisés pour investiguer le lien entre l'inflammation, NF-κB et le cancer de la prostate. Même si les modèles de prostatite chronique présentement à l'étude ne développent pas spontanément d'adénocarcinome prostatique, l'inflammation pourrait promouvoir la progression tumorale [21]. D'ailleurs, dans le modèle de cancer colorectal AOM-DSS (section 1.6.8), l'agent inflammatoire DSS n'est pas carcinogénique mais agit plutôt de concert avec le carcinogène AOM pour favoriser le développement de tumeurs. Ainsi, il serait intéressant d'induire une inflammation chronique dans les modèles murins du cancer de la prostate et, en particulier, dans les souris ne développant que des lésions pré-néoplasiques (ex. : PTEN +/-, Nkx3.1-/-, p27<sup>KIP</sup>-/-). L'apparition de tumeurs invasives chez ces dernières confirmerait l'importance de l'inflammation dans la pathogénèse du cancer de la prostate. Subséquemment, ces souris pourraient

être croisées avec le KO myéloïde-spécifique de IKK- $\beta$  afin d'étudier l'implication de NF- $\kappa$ B dans le processus inflammatoire lié au cancer de la prostate.

## 7.5 Conclusion

Les deux objectifs principaux de ce projet de doctorat visaient à valider NF- $\kappa$ B en tant que marqueur moléculaire du cancer de la prostate et à mieux comprendre l'influence du RA sur l'activité de NF- $\kappa$ B. Dans un premier temps, les études d'immunohistochimie ont révélé une forte valeur prédictive de la sous-unité RelA qui pourrait, dans un avenir rapproché, s'ajouter aux marqueurs cliniques actuels afin de mieux prédire l'évolution du cancer et la réponse aux traitements. Nos résultats indiquent aussi qu'en plus de RelA, d'autres membres de la famille NF- $\kappa$ B, dont les sous-unités non classiques RelB et p52, pourraient aspirer au statut de marqueurs pronostiques. En ce qui a trait au second objectif, la découverte d'une activation de la voie NF- $\kappa$ B non classique par le RA a permis d'élaborer un nouveau modèle de régulation de NF- $\kappa$ B dans les cellules androgéno-dépendantes. L'existence d'un mécanisme de répression transcriptionnelle médié par p52-p52 pourrait servir d'inspiration pour de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à perpétuer cette répression lors d'une TPA. Alternativement, dans le cancer hormono-réfractaire, ce concept de répression transcriptionnelle pourrait aussi être utilisé à des fins thérapeutiques malgré l'activation RA-indépendante de dimères RelB-p52. Il s'agirait de cibler directement RelB pour l'empêcher d'interagir avec p52 afin que la production constitutive de dimères p52-p52 soit favorisée.

En conclusion, ce projet de doctorat a contribué à l'émergence de NF- $\kappa$ B en tant que facteur étroitement impliqué dans la progression du cancer de la prostate. Les résultats de ces travaux, combinés aux études futures, pourraient mener à une meilleure gestion clinique et thérapeutique de la maladie.

## CHAPITRE VIII BIBLIOGRAPHIE

1. Partin, A.W., Coffey, D.S., *The Molecular Biology, Endocrinology and Physiology of the Prostate and Seminal Vesicles*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Retik, A.B., Vaughan, Jr., E.D., Wein, A.J., Editor. 1998, Saunders: Philadelphia. p. 1381-1428.
2. Cunha, G.R., et al., *Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004. **92**(4): p. 221-36.
3. Sciavolino, P.J., et al., *Tissue-specific expression of murine Nkx3.1 in the male urogenital system*. *Developmental Dynamics*, 1997. **209**(1): p. 127-38.
4. Bhatia-Gaur, R., et al., *Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer*. *Genes Dev*, 1999. **13**(8): p. 966-77.
5. Freestone, S.H., et al., *Sonic hedgehog regulates prostatic growth and epithelial differentiation*. *Dev Biol*, 2003. **264**(2): p. 352-62.
6. Donjacour, A.A., Thomson, A.A., and G.R. Cunha, *FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate*. *Dev Biol*, 2003. **261**(1): p. 39-54.
7. Podlasek, C.A., et al., *Hoxa-10 deficient male mice exhibit abnormal development of the accessory sex organs*. *Dev Dyn*, 1999. **214**(1): p. 1-12.
8. Marker, P.C., et al., *fucosyltransferase1 and H-type complex carbohydrates modulate epithelial cell proliferation during prostatic branching morphogenesis*. *Dev Biol*, 2001. **233**(1): p. 95-108.
9. Brooks, J.D., *Anatomy of the Lower Urinary Tract and Male Genitalia*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Retik, A.B., Vaughan, Jr., E.D., Wein, A.J., Editor. 1998, Saunders: Philadelphia. p. 89-128.
10. McNeal, J.E., *The zonal anatomy of the prostate*. *Prostate*, 1981. **2**(1): p. 35-49.
11. McNeal, J.E., *Origin and development of carcinoma in the prostate*. *Cancer*, 1969. **23**(1): p. 24-34.
12. McNeal, J., *Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology*. *Urol Clin North Am*, 1990. **17**(3): p. 477-86.

13. Lam, J.S. and R.E. Reiter, *Stem cells in prostate and prostate cancer development*. Urol Oncol, 2006. **24**(2): p. 131-40.
14. Bonkhoff, H., *Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status*. Prostate Suppl, 1998. **8**: p. 18-22.
15. Chatterjee, B., *The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer*. Mol Cell Biochem, 2003. **253**(1-2): p. 89-101.
16. Schalken, J.A. and G. van Leenders, *Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology*. Urology, 2003. **62**(5 Suppl 1): p. 11-20.
17. Mann, T., *Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction*. J Reprod Fertil, 1974. **37**(1): p. 179-88.
18. Aumuller, G. and J. Seitz, *Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands*. Int Rev Cytol, 1990. **121**: p. 127-231.
19. Lepor, H., L. Kaci, and X. Xue, *Continence following radical retropubic prostatectomy using self-reporting instruments*. J Urol, 2004. **171**(3): p. 1212-5.
20. Hua, V.N. and A.J. Schaeffer, *Acute and chronic prostatitis*. Med Clin North Am, 2004. **88**(2): p. 483-94.
21. Palapattu, G.S., et al., *Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights*. Carcinogenesis, 2005. **26**(7): p. 1170-81.
22. De Marzo, A.M., et al., *Human prostate cancer precursors and pathobiology*. Urology, 2003. **62**(5 Suppl 1): p. 55-62.
23. Roehrborn, C.G., *Benign prostatic hyperplasia: an overview*. Rev Urol, 2005. **7 Suppl 9**: p. S3-S14.
24. McConnell, J.D., *Epidemiology, Etiology, Pathophysiology, and Diagnosis of Benign Prostatic Hyperplasia*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Retik, A.B., Vaughan, Jr., E.D., Wein, A.J., Editor. 1998, Saunders: Philadelphia. p. 1429-1452.
25. McNeal, J.E., *Origin and evolution of benign prostatic enlargement*. Invest Urol, 1978. **15**(4): p. 340-5.

26. Lee, K.L. and D.M. Peehl, *Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 2004. **172**(5 Pt 1): p. 1784-91.
27. Lepor, H., *Natural History, Evaluation, and Nonsurgical Management of Benign Prostatic Hyperplasia*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Retik, A.B., Vaughan, Jr., E.D., Wein, A.J., Editor. 1998, Saunders: Philadelphia. p. 1453-1478.
28. Oesterling, J.E., *Retropubic and Suprapubic Prostatectomy*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Retik, A.B., Vaughan, Jr., E.D., Wein, A.J., Editor. 1998, Saunders: Philadelphia. p. 1529-1542.
29. Marcelli, M. and G.R. Cunningham, *Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(10): p. 3463-8.
30. Guess, H.A., *Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer*. Epidemiol Rev, 2001. **23**(1): p. 152-8.
31. *Canadian Cancer Statistics 2006*. Canadian Cancer Society/National Cancer Institute of Canada, 2006: p. 17.
32. Crawford, E.D., *Epidemiology of prostate cancer*. Urology, 2003. **62**(6 Suppl 1): p. 3-12.
33. *Canadian Cancer Statistics 2006*. Canadian Cancer Society/National Cancer Institute of Canada, 2006: p. 55.
34. Carter, H.B., S. Piantadosi, and J.T. Isaacs, *Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer*. J Urol, 1990. **143**(4): p. 742-6.
35. Bratt, O., *Hereditary prostate cancer: clinical aspects*. J Urol, 2002. **168**(3): p. 906-13.
36. Carter, B.S., et al., *Mendelian inheritance of familial prostate cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3367-71.
37. Hughes, C., et al., *Molecular pathology of prostate cancer*. J Clin Pathol, 2005. **58**(7): p. 673-84.
38. Smith, J.R., et al., *Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1371-4.

39. Carpten, J., et al., *Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1*. Nat Genet, 2002. **30**(2): p. 181-4.
40. Rebbeck, T.R., et al., *Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(4): p. 1014-9.
41. Noda, D., et al., *ELAC2, a putative prostate cancer susceptibility gene product, potentiates TGF-beta/Smad-induced growth arrest of prostate cells*. Oncogene, 2006. **25**(41): p. 5591-600.
42. Cybulski, C., et al., *NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1215-9.
43. Dong, X., et al., *Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 270-80.
44. Xu, J., et al., *Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk*. Nat Genet, 2002. **32**(2): p. 321-5.
45. Hakimi, J.M., et al., *Androgen receptor variants with short glutamine or glycine repeats may identify unique subpopulations of men with prostate cancer*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(9): p. 1599-608.
46. Zeegers, M.P., et al., *How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(11 Pt 1): p. 1765-71.
47. Bennett, C.L., et al., *Racial variation in CAG repeat lengths within the androgen receptor gene among prostate cancer patients of lower socioeconomic status*. J Clin Oncol, 2002. **20**(17): p. 3599-604.
48. Chamberlain, N.L., E.D. Driver, and R.L. Miesfeld, *The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(15): p. 3181-6.
49. Correa-Cerro, L., et al., *Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer*. Hum Genet, 1999. **105**(3): p. 281-7.



50. Nam, R.K., et al., *V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression*. *Urology*, 2001. **57**(1): p. 199-204.
51. Schulz, W.A., M. Burchardt, and M.V. Cronauer, *Molecular biology of prostate cancer*. *Mol Hum Reprod*, 2003. **9**(8): p. 437-48.
52. Chan, J.M., P.H. Gann, and E.L. Giovannucci, *Role of diet in prostate cancer development and progression*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(32): p. 8152-60.
53. Cooperberg, M.R., J.W. Moul, and P.R. Carroll, *The changing face of prostate cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(32): p. 8146-51.
54. Scher, H.I. and C.L. Sawyers, *Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(32): p. 8253-61.
55. Carter, H.B., Partin, A.W., *Diagnosis and Staging of Prostate Cancer*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Retik, A.B., Vaughan Jr., E.D., Wein, A.J., Editor. 1998, Saunders: Philadelphia. p. 2519-2538.
56. Nelson, W.G., A.M. De Marzo, and W.B. Isaacs, *Prostate cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(4): p. 366-81.
57. Gleason, D.F., *Classification of prostatic carcinomas*. *Cancer Chemother Rep*, 1966. **50**(3): p. 125-8.
58. Epstein, J.I., et al., *Update on the Gleason grading system for prostate cancer: results of an international consensus conference of urologic pathologists*. *Adv Anat Pathol*, 2006. **13**(1): p. 57-9.
59. Sooriakumaran, P., S.J. Khaksar, and J. Shah, *Management of prostate cancer. Part 2: localized and locally advanced disease*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006. **6**(4): p. 595-603.
60. Partin, A.W., et al., *Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update*. *Jama*, 1997. **277**(18): p. 1445-51.
61. Klotz, L., *Active surveillance for prostate cancer: for whom?* *J Clin Oncol*, 2005. **23**(32): p. 8165-9.

62. Vicini, F.A., et al., *An interinstitutional and interspecialty comparison of treatment outcome data for patients with prostate carcinoma based on predefined prognostic categories and minimum follow-up*. *Cancer*, 2002. **95**(10): p. 2126-35.
63. Kupelian, P.A., et al., *Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004. **58**(1): p. 25-33.
64. Jani, A.B., *Management strategies for locally advanced prostate cancer*. *Drugs Aging*, 2006. **23**(2): p. 119-29.
65. Freedland, S.J., et al., *Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy*. *Jama*, 2005. **294**(4): p. 433-9.
66. Sharifi, N., J.L. Gulley, and W.L. Dahut, *Androgen deprivation therapy for prostate cancer*. *Jama*, 2005. **294**(2): p. 238-44.
67. Shah, J., S.J. Khaksar, and P. Sooriakumaran, *Management of prostate cancer. Part 3: metastatic disease*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006. **6**(5): p. 813-21.
68. Mancuso, A., S. Oudard, and C.N. Sternberg, *Effective chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer (HRPC): Present status and perspectives with taxane-based treatments*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007. **61**(2): p. 176-85.
69. DeMarzo, A.M., et al., *Pathological and molecular aspects of prostate cancer*. *Lancet*, 2003. **361**(9361): p. 955-64.
70. De Marzo, A.M., et al., *Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(6): p. 1985-92.
71. Zha, S., et al., *Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma*. *Cancer Res*, 2001. **61**(24): p. 8617-23.

72. Shah, R., et al., *Postatrophic hyperplasia of the prostate gland: neoplastic precursor or innocent bystander?* Am J Pathol, 2001. **158**(5): p. 1767-73.
73. Tsujimoto, Y., et al., *Postatrophic hyperplasia of the prostate in Japan: histologic and immunohistochemical features and p53 gene mutation analysis.* Prostate, 2002. **52**(4): p. 279-87.
74. Nakayama, M., et al., *Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection.* Am J Pathol, 2003. **163**(3): p. 923-33.
75. Putzi, M.J. and A.M. De Marzo, *Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia.* Urology, 2000. **56**(5): p. 828-32.
76. Billis, A. and L.A. Magna, *Inflammatory atrophy of the prostate. Prevalence and significance.* Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(7): p. 840-4.
77. Bostwick, D.G. and J. Qian, *High-grade prostatic intraepithelial neoplasia.* Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 360-79.
78. Sakr, W.A., et al., *The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients.* J Urol, 1993. **150**(2 Pt 1): p. 379-85.
79. Sakr, W.A., et al., *Epidemiology of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia.* Scand J Urol Nephrol Suppl, 2000(205): p. 11-8.
80. Davidson, D., et al., *Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for adenocarcinoma: predictive accuracy in needle biopsies.* J Urol, 1995. **154**(4): p. 1295-9.
81. Emmert-Buck, M.R., et al., *Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia.* Cancer Res, 1995. **55**(14): p. 2959-62.
82. Qian, J., et al., *Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization.* Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5408-14.

83. Erdamar, S., et al., *Levels of expression of p27KIP1 protein in human prostate and prostate cancer: an immunohistochemical analysis*. *Mod Pathol*, 1999. **12**(8): p. 751-5.
84. Nagle, R.B., et al., *Phenotypic relationships of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostatic carcinoma*. *Am J Pathol*, 1991. **138**(1): p. 119-28.
85. Baltaci, S., et al., *Bcl-2 proto-oncogene expression in low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*. *BJU Int*, 2000. **85**(1): p. 155-9.
86. Harper, M.E., et al., *Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate*. *J Pathol*, 1998. **186**(2): p. 169-77.
87. Tsuji, M., et al., *Biologic markers in prostatic intraepithelial neoplasia: immunohistochemical and cytogenetic analyses*. *J Med Invest*, 1999. **46**(1-2): p. 35-41.
88. Yasunaga, Y., et al., *Different patterns of p53 mutations in prostatic intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma: analysis of microdissected specimens*. *Lab Invest*, 1998. **78**(10): p. 1275-9.
89. Pallares, J., et al., *Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues*. *Histol Histopathol*, 2006. **21**(8): p. 857-65.
90. van Bokhoven, A., et al., *Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines*. *Prostate*, 2003. **57**(3): p. 205-25.
91. Sobel, R.E. and M.D. Sadar, *Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 2*. *J Urol*, 2005. **173**(2): p. 360-72.
92. Sobel, R.E. and M.D. Sadar, *Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1*. *J Urol*, 2005. **173**(2): p. 342-59.
93. Kasper, S., *Survey of genetically engineered mouse models for prostate cancer: analyzing the molecular basis of prostate cancer development, progression, and metastasis*. *J Cell Biochem*, 2005. **94**(2): p. 279-97.

94. Greenberg, N.M., et al., *The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice*. Mol. Endocrinol., 1994. **8**(2): p. 230-9.
95. Greenberg, N.M., et al., *Prostate cancer in a transgenic mouse*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. **92**(8): p. 3439-43.
96. Garabedian, E.M., P.A. Humphrey, and J.I. Gordon, *A transgenic mouse model of metastatic prostate cancer originating from neuroendocrine cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15382-7.
97. Perez-Stable, C., et al., *Prostate cancer progression, metastasis, and gene expression in transgenic mice*. Cancer Res., 1997. **57**(5): p. 900-6.
98. Skalnik, D.G., et al., *Restriction of neuroblastoma to the prostate gland in transgenic mice*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(9): p. 4518-27.
99. Gabril, M.Y., et al., *Prostate targeting: PSP94 gene promoter/enhancer region directed prostate tissue-specific expression in a transgenic mouse prostate cancer model*. Gene Ther, 2002. **9**(23): p. 1589-99.
100. Masumori, N., et al., *A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2239-49.
101. DiGiovanni, J., et al., *Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3455-60.
102. Ellwood-Yen, K., et al., *Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors*. Cancer Cell, 2003. **4**(3): p. 223-38.
103. Li, Z., et al., *Prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma in mice expressing a probasin-Neu oncogenic transgene*. Carcinogenesis, 2006. **27**(5): p. 1054-67.
104. Hill, R., et al., *Heterogeneous tumor evolution initiated by loss of pRb function in a preclinical prostate cancer model*. Cancer Res, 2005. **65**(22): p. 10243-54.

105. Han, G., et al., *Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1151-6.
106. Wang, S., et al., *Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer*. Cancer Cell, 2003. **4**(3): p. 209-21.
107. Di Cristofano, A., et al., *Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(2): p. 222-4.
108. Abate-Shen, C., et al., *Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 3886-90.
109. Cordon-Cardo, C., et al., *Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(17): p. 1284-91.
110. Schneider, A., et al., *Targeted disruption of the Nkx3.1 gene in mice results in morphogenetic defects of minor salivary glands: parallels to glandular duct morphogenesis in prostate*. Mech Dev, 2000. **95**(1-2): p. 163-74.
111. He, W.W., et al., *A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer*. Genomics, 1997. **43**(1): p. 69-77.
112. Lei, Q., et al., *NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss*. Cancer Cell, 2006. **9**(5): p. 367-78.
113. Philipp-Staheli, J., S.R. Payne, and C.J. Kemp, *p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 148-68.
114. Chow, L.M. and S.J. Baker, *PTEN function in normal and neoplastic growth*. Cancer Lett, 2006. **241**(2): p. 184-96.
115. Dahia, P.L., *PTEN, a unique tumor suppressor gene*. Endocr Relat Cancer, 2000. **7**(2): p. 115-29.

116. Suzuki, H., et al., *Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues*. *Cancer Res*, 1998. **58**(2): p. 204-9.
117. Lee, W.H., et al., *CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997. **6**(6): p. 443-50.
118. Elo, J.P. and T. Visakorpi, *Molecular genetics of prostate cancer*. *Ann Med*, 2001. **33**(2): p. 130-41.
119. Ittmann, M.M. and R. Wiczorek, *Alterations of the retinoblastoma gene in clinically localized, stage B prostate adenocarcinomas*. *Hum Pathol*, 1996. **27**(1): p. 28-34.
120. Narla, G., et al., *KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer*. *Science*, 2001. **294**(5551): p. 2563-6.
121. Tomlins, S.A., et al., *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer*. *Science*, 2005. **310**(5748): p. 644-8.
122. Chung, L.W., et al., *Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment*. *J Urol*, 2005. **173**(1): p. 10-20.
123. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(6): p. 442-54.
124. Meyers, F.J., et al., *Very frequent p53 mutations in metastatic prostate carcinoma and in matched primary tumors*. *Cancer*, 1998. **83**(12): p. 2534-9.
125. Eastham, J.A., et al., *Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 1995. **1**(10): p. 1111-8.
126. Quinn, D.I., et al., *Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy*. *Cancer Res*, 2000. **60**(6): p. 1585-94.
127. Singh, A.S. and W.D. Figg, *In vivo models of prostate cancer metastasis to bone*. *J Urol*, 2005. **174**(3): p. 820-6.
128. Roodman, G.D., *Mechanisms of bone metastasis*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(16): p. 1655-64.

129. Pinski, J. and T.B. Dorff, *Prostate cancer metastases to bone: pathophysiology, pain management, and the promise of targeted therapy*. Eur J Cancer, 2005. **41**(6): p. 932-40.
130. Heinlein, C.A. and C. Chang, *Androgen receptor in prostate cancer*. Endocr Rev, 2004. **25**(2): p. 276-308.
131. Edwards, J. and J.M. Bartlett, *The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor*. BJU Int, 2005. **95**(9): p. 1320-6.
132. Sack, J.S., et al., *Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 4904-9.
133. Koivisto, P., T. Visakorpi, and O.P. Kallioniemi, *Androgen receptor gene amplification: a novel molecular mechanism for endocrine therapy resistance in human prostate cancer*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1996. **226**: p. 57-63.
134. Edwards, J. and J.M. Bartlett, *The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways*. BJU Int, 2005. **95**(9): p. 1327-35.
135. Mulholland, D.J., et al., *PTEN and GSK3beta: key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer*. Oncogene, 2006. **25**(3): p. 329-37.
136. Ismail, A.H., et al., *Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate*. Prostate, 2002. **51**(2): p. 117-25.
137. Mosca, A., et al., *The neuroendocrine phenotype in prostate cancer: basic and clinical aspects*. J Endocrinol Invest, 2005. **28**(11 Suppl): p. 141-5.
138. Furuya, Y., et al., *Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(2): p. 389-98.
139. Albertsen, P.C., et al., *Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer*. Jama, 1998. **280**(11): p. 975-80.
140. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 292-306.



141. Rasiah, K.K., et al., *Prognostic significance of Gleason pattern in patients with Gleason score 7 prostate carcinoma*. *Cancer*, 2003. **98**(12): p. 2560-5.
142. Quinn, D.I., S.M. Henshall, and R.L. Sutherland, *Molecular markers of prostate cancer outcome*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(6): p. 858-87.
143. Tricoli, J.V., M. Schoenfeldt, and B.A. Conley, *Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 3943-53.
144. Murillo, H., et al., *Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state*. *Endocrinology*, 2001. **142**(11): p. 4795-805.
145. Xie, S., et al., *Regulation of interleukin-6-mediated PI3K activation and neuroendocrine differentiation by androgen signaling in prostate cancer LNCaP cells*. *Prostate*, 2004. **60**(1): p. 61-7.
146. Bruckheimer, E.M., et al., *Regulation of Bcl-2 expression by dihydrotestosterone in hormone sensitive LNCaP-FGC prostate cancer cells*. *J Urol*, 2003. **169**(4): p. 1553-7.
147. Sen, R. and D. Baltimore, *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. *Cell*, 1986. **46**(5): p. 705-16.
148. Hoffmann, A. and D. Baltimore, *Circuitry of nuclear factor kappaB signaling*. *Immunol Rev*, 2006. **210**: p. 171-86.
149. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. *Genes Dev*, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
150. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. *Cell*, 2002. **109 Suppl**: p. S81-96.
151. Tergaonkar, V., et al., *Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(9): p. 921-3.
152. Dejardin, E., *The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(9): p. 1161-79.
153. Saccani, S., S. Pantano, and G. Natoli, *Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers*. *Mol Cell*, 2003. **11**(6): p. 1563-74.

154. Coope, H.J., et al., *CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52*. *Embo J*, 2002. **21**(20): p. 5375-85.
155. Kayagaki, N., et al., *BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2*. *Immunity*, 2002. **17**(4): p. 515-24.
156. Nonaka, M., et al., *Aberrant NF-kappaB2/p52 expression in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and CD30-transformed rat fibroblasts*. *Oncogene*, 2005. **24**(24): p. 3976-86.
157. Muller, J.R. and U. Siebenlist, *Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 12006-12.
158. Mordmuller, B., et al., *Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism*. *EMBO Rep*, 2003. **4**(1): p. 82-7.
159. Sun, S.C. and S. Yamaoka, *Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation*. *Oncogene*, 2005. **24**(39): p. 5952-64.
160. Atkinson, P.G., et al., *Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(51): p. 51134-42.
161. Viatour, P., et al., *Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(1): p. 43-52.
162. Campbell, K.J. and N.D. Perkins, *Post-translational modification of RelA(p65) NF-kappaB*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 6): p. 1087-9.
163. Leung, T.H., A. Hoffmann, and D. Baltimore, *One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers*. *Cell*, 2004. **118**(4): p. 453-64.
164. Werner, S.L., D. Barken, and A. Hoffmann, *Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity*. *Science*, 2005. **309**(5742): p. 1857-61.

165. Agalioti, T., et al., *Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter*. Cell, 2000. **103**(4): p. 667-78.
166. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death [see comments]*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
167. Doi, T.S., et al., *Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2994-9.
168. Rosenfeld, M.E., et al., *Prevention of hepatic apoptosis and embryonic lethality in RelA/TNFR-1 double knockout mice*. Am J Pathol, 2000. **156**(3): p. 997-1007.
169. Burkly, L., et al., *Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells*. Nature, 1995. **373**(6514): p. 531-6.
170. Gerondakis, S., et al., *Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6888-95.
171. Pasparakis, M., T. Luedde, and M. Schmidt-Supprian, *Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 861-72.
172. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
173. Ishikawa, H., et al., *Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF-kappaB2*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 999-1014.
174. Ishikawa, H., et al., *Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 985-96.
175. Beg, A.A., et al., *Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice*. Genes Dev, 1995. **9**(22): p. 2736-46.

176. Hu, Y., et al., *Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkkappaB kinase*. Science, 1999. **284**(5412): p. 316-20.
177. Li, Q., et al., *Severe liver degeneration in mice lacking the IkkappaB kinase 2 gene*. Science, 1999. **284**(5412): p. 321-5.
178. Rudolph, D., et al., *Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice*. Genes Dev, 2000. **14**(7): p. 854-62.
179. Zhang, J.Y., et al., *The v-rel oncogene of avian reticuloendotheliosis virus transforms immature and mature lymphoid cells of the B cell lineage in vitro*. Virology, 1991. **183**(2): p. 457-66.
180. Dawson, C.W., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 3694-704.
181. Rayet, B. and C. Gelinas, *Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6938-47.
182. Wang, W., et al., *The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(1): p. 119-27.
183. Sovak, M.A., et al., *Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2952-60.
184. Pallares, J., et al., *Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 569-77.
185. Oya, M., et al., *Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma*. Carcinogenesis, 2003. **24**(3): p. 377-84.
186. Duffey, D.C., et al., *Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaBalpha of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo*. Cancer Res, 1999. **59**(14): p. 3468-74.

187. Huang, S., et al., *Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(6): p. 2573-81.
188. Aggarwal, B.B., *Nuclear factor-kappaB: the enemy within*. Cancer Cell, 2004. **6**(3): p. 203-8.
189. Karin, M., *NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets*. Mol Carcinog, 2006. **45**(6): p. 355-61.
190. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
191. Pikarsky, E., et al., *NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*. Nature, 2004. **431**(7007): p. 461-6.
192. Greten, F.R., et al., *IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer*. Cell, 2004. **118**(3): p. 285-96.
193. van Hogerlinden, M., G. Auer, and R. Toftgard, *Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development*. Oncogene, 2002. **21**(32): p. 4969-77.
194. Dajee, M., et al., *NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia*. Nature, 2003. **421**(6923): p. 639-43.
195. Maeda, S., et al., *IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis*. Cell, 2005. **121**(7): p. 977-90.
196. Zhang, J.Y., et al., *NF-kappaB RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK*. Genes Dev, 2004. **18**(1): p. 17-22.
197. Nakanishi, C. and M. Toi, *Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 297-309.
198. Gasparian, A.V., et al., *The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 1): p. 141-51.
199. Suh, J., et al., *Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells*. Prostate, 2002. **52**(3): p. 183-200.

200. Chen, C.D. and C.L. Sawyers, *NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(8): p. 2862-70.
201. Aarnisalo, P., et al., *Transcription activating and repressing functions of the androgen receptor are differentially influenced by mutations in the deoxyribonucleic acid-binding domain*. Endocrinology, 1999. **140**(7): p. 3097-105.
202. Cinar, B., et al., *Identification of a negative regulatory cis-element in the enhancer core region of the prostate-specific antigen promoter: implications for intersection of androgen receptor and nuclear factor-kappaB signalling in prostate cancer cells*. Biochem J, 2004. **379**(Pt 2): p. 421-31.
203. Catz, S.D. and J.L. Johnson, *Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer*. Oncogene, 2001. **20**(50): p. 7342-51.
204. Keller, E.T., C. Chang, and W.B. Ershler, *Inhibition of NFkappaB activity through maintenance of IkappaBalpha levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 26267-75.
205. Lessard, L., et al., *NF-kappa B nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer*. BJU Int, 2003. **91**(4): p. 417-20.
206. Ayala, G.E., et al., *Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6082-90.
207. Domingo-Domenech, J., et al., *Activation of nuclear factor-kappaB in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse*. Br J Cancer, 2005. **93**(11): p. 1285-94.
208. Shukla, S., et al., *Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression*. Neoplasia, 2004. **6**(4): p. 390-400.
209. Fradet, V., et al., *Nuclear factor-kappaB nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8460-4.

210. Ohori, M., et al., *Prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens*. J Urol, 1995. **154**(5): p. 1818-24.
211. Epstein, J.I., et al., *Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up*. Am J Surg Pathol, 1996. **20**(3): p. 286-92.
212. Lessard, L., et al., *Nuclear localization of nuclear factor-kappaB p65 in primary prostate tumors is highly predictive of pelvic lymph node metastases*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(19): p. 5741-5.
213. Bader, P., et al., *Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer?* J Urol, 2002. **168**(2): p. 514-8; discussion 518.
214. Kattan, M.W., T.M. Wheeler, and P.T. Scardino, *Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer*. J Clin Oncol, 1999. **17**(5): p. 1499-507.
215. Ismail, H.A., et al., *Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases*. Prostate, 2004. **58**(3): p. 308-13.
216. Kattan, M.W., et al., *The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor beta1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(19): p. 3573-9.
217. Guttridge, D.C., et al., *NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5785-99.
218. Huang, Y., et al., *Direct trans-activation of the human cyclin D2 gene by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I*. Oncogene, 2001. **20**(9): p. 1094-102.
219. Chilov, D., et al., *Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25176-83.
220. Duyao, M.P., A.J. Buckler, and G.E. Sonenshein, *Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4727-31.

221. Zhu, N., et al., *CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 744-54.
222. Shinohara, T., et al., *Nuclear factor-kappaB-dependent expression of metastasis suppressor KAI1/CD82 gene in lung cancer cell lines expressing mutant p53*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 673-8.
223. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2327-34.
224. Webster, G.A. and N.D. Perkins, *Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3485-95.
225. Palvimo, J.J., et al., *Mutual transcriptional interference between RelA and androgen receptor*. J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 24151-6.
226. Jin, F., et al., *Activation of nuclear factor-kappaB contributes to induction of death receptors and apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in DU145 human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6354-63.
227. Ross, J.S., et al., *Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(7): p. 2466-72.
228. Sweeney, C., et al., *Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5501-7.
229. Wang, W., et al., *The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(1): p. 119-27.
230. Nair, A., et al., *NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix*. Oncogene, 2003. **22**(1): p. 50-8.



231. Abdel-Latif, M.M., et al., *NF-kappaB activation in esophageal adenocarcinoma: relationship to Barrett's metaplasia, survival, and response to neoadjuvant chemoradiotherapy*. *Ann Surg*, 2004. **239**(4): p. 491-500.
232. Hoos, A. and C. Cordon-Cardo, *Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations*. *Lab Invest*, 2001. **81**(10): p. 1331-8.
233. Buchholz, T.A., et al., *The nuclear transcription factor kappaB/bcl-2 pathway correlates with pathologic complete response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(23): p. 8398-402.
234. Lessard, L., et al., *Nuclear localisation of nuclear factor-kappaB transcription factors in prostate cancer: an immunohistochemical study*. *Br J Cancer*, 2005. **93**(9): p. 1019-23.
235. Perkins, N.D., *NF-kappaB: tumor promoter or suppressor?* *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(2): p. 64-9.
236. Bonizzi, G., et al., *Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers*. *Embo J*, 2004. **23**(21): p. 4202-10.
237. Campbell, K.J., S. Rocha, and N.D. Perkins, *Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B*. *Mol Cell*, 2004. **13**(6): p. 853-65.
238. Wessells, J., et al., *BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(48): p. 49995-50003.
239. Grundstrom, S., et al., *Bcl-3 and NFkappaB p50-p50 homodimers act as transcriptional repressors in tolerant CD4+ T cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 8460-8.
240. Dechend, R., et al., *The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators*. *Oncogene*, 1999. **18**(22): p. 3316-23.

241. Mulholland, D.J., et al., *Androgen responsiveness of Renilla luciferase reporter vectors is promoter, transgene, and cell line dependent*. Prostate, 2004. **59**(2): p. 115-9.
242. Baron, S., et al., *Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14579-86.
243. Park, K.J., et al., *Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation*. Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 71-82.
244. Gloire, G., E. Dejardin, and J. Piette, *Extending the nuclear roles of IkappaB kinase subunits*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1081-9.
245. Fang, Y., et al., *Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo*. J Biol Chem, 1996. **271**(45): p. 28697-702.
246. Chen, G., P. Cao, and D.V. Goeddel, *TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 401-10.
247. Lessard, L., A.M. Mes-Masson, and F. Saad, *[NFkappaB : a new marker kappable of predicting prostate cancer outcome]*. Bull Cancer, 2006. **93**(9): p. 891-9.
248. Huang, S., et al., *Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis*. Oncogene, 2001. **20**(31): p. 4188-97.
249. Suh, J. and A.B. Rabson, *NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon?* J Cell Biochem, 2004. **91**(1): p. 100-17.
250. Jossen, S., et al., *RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells*. Oncogene, 2006. **25**(10): p. 1554-9.
251. Bren, G.D., et al., *Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB*. Oncogene, 2001. **20**(53): p. 7722-33.

252. Jacque, E., et al., *RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14635-40.
253. Ozes, O.N., et al., *NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 82-5.
254. Shukla, S., et al., *Constitutive activation of P 13 K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model*. Prostate, 2005. **64**(3): p. 224-39.

CHAPITRE IX      ANNEXES

- 9.1    Annexe I    Expression of NF- $\kappa$ B in Prostate Cancer Lymph Node  
Metastasis  
(*Prostate, vol. 58 : 308-313, 2004*)

## Expression of NF- $\kappa$ B in Prostate Cancer Lymph Node Metastases

Hazem Ismail A.,<sup>1</sup> Laurent Lessard,<sup>2</sup> Anne-Marie Mes-Masson,<sup>2</sup>  
and Fred Saad<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Urologic Oncology Research Group, Department of Urology, University of Montreal (CHUM),  
Montreal, Quebec, Canada*

<sup>2</sup>*CHUM Research Center and Montreal Cancer Institute, Montreal, Quebec, Canada*

**INTRODUCTION.** Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is a transcription factor that transactivates genes involved in the regulation of cell growth, apoptosis, angiogenesis, and metastasis. Our aim was to assess NF- $\kappa$ B expression in lymph node (LN) metastases of prostate cancer.

**METHODS.** Immunohistochemical staining was performed using the p65 anti-NF- $\kappa$ B antibody. Seventy-seven paraffin-embedded LN specimens obtained from 54 prostate cancer patients were analyzed. Of the 54 patients, 32 had positive LN metastases, while 22 showed no evidence of metastasis and were considered as controls. The overall percentage of NF- $\kappa$ B-nuclear localization was assessed, as well as the intensity of staining.

**RESULTS.** Nuclear localization of NF- $\kappa$ B was significantly greater in the metastatic LN group compared to controls. In patients with positive-LN metastases, 84.4% showed >10% nuclear staining in tumor cells. Moreover, 64.4% of the malignant LN specimens had >10% nuclear staining in lymphocytes compared to 0% in controls. Intensity of cytoplasmic and nuclear staining was higher in the metastatic LN group than in controls ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSIONS.** Nuclear localization/activation of NF- $\kappa$ B is up-regulated in prostate cancer LN metastasis. Such up-regulation of NF- $\kappa$ B activity is observed in the tumor cells as well as in the surrounding lymphocytes. *Prostate* 58: 308–313, 2004. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** NF- $\kappa$ B; lymph nodes; prostate; human

### INTRODUCTION

The majority of prostate cancer deaths are due to metastases that are resistant to therapy [1]. The exact molecular events associated with carcinogenesis, progression, and metastasis in prostate cancer are still unclear. However, it is well documented that pathogenesis of cancer metastasis comprise a series of sequential and selective steps that include tumor cell proliferation, angiogenesis, invasion, survival, and growth in distant organs [2].

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is an inducible dimeric transcription factor that belongs to the Rel/NF- $\kappa$ B family [3,4]. Classical NF- $\kappa$ B transcription factor is formed by the p50 and RelA (p65) proteins [5–8]. NF- $\kappa$ B activation involves its release from its inhibitor, I $\kappa$ B, and its subsequent translocation from the cytoplasm to the nucleus, where it binds to cognate sequences in the promoter region of multiple genes

[3–8]. Regulation of gene expression by NF- $\kappa$ B is controlled mainly by the inhibitory I $\kappa$ B proteins, which include I $\kappa$ B $\alpha$  [8]. Upon stimulation, I $\kappa$ B $\alpha$  is rapidly phosphorylated and degraded via the ubiquitin-proteasome pathway, permitting activation and nuclear importing of NF- $\kappa$ B [8]. Numerous *in vivo* and *in vitro*

---

Grant sponsor: Prostate Cancer Research Foundation of Canada. A.-M. M.-M. is a recipient of a Chercheur national fellowship from the FRSQ L.L. is funded by a CIHR studentship.

\*Correspondence to: Dr. Fred Saad, MD, FRCSC, Associate Professor of Urology, Head of Urologic Oncology, Department of Urology, Notre Dame Hospital, University of Montreal Health Center (CHUM), 1560 Sherbrooke St. Montreal, Que., Canada H2L 4M1. E-mail: [REDACTED]

Received 25 February 2003; Accepted 12 June 2003  
DOI 10.1002/pros.10335

studies have shown that NF- $\kappa$ B/RelA plays an important role in the regulation of cell proliferation, apoptosis, adhesion, and growth [9–11]. Furthermore, NF- $\kappa$ B has been shown to regulate the expression of various angiogenic factors including vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin (IL)-8, and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) [13,14]. These factors are essential for angiogenesis, as well as tumor cell motility, invasiveness, and/or metastasis [13–15]. It has been recently reported that inhibition of NF- $\kappa$ B activity in PC-3 cells was associated with decreased expression of VEGF, IL-8, and MMP-9 [16]. Interestingly, inhibition of NF- $\kappa$ B activity resulted in decreased angiogenesis, invasion, and metastasis of human prostate cancer cells grown in the prostate of nude mice [17]. We previously reported that nuclear localization of NF- $\kappa$ B in prostate cancer tissues can be used in correlation with Gleason score as predictors for poor outcome, and that NF- $\kappa$ B activation correlated with bone metastases, and hence poor prognosis [18].

These data suggest that NF- $\kappa$ B expression might have an important role in the development of metastatic prostate disease. However, to the best of our knowledge, local NF- $\kappa$ B expression in prostate cancer lymph node (LN) metastasis has not been well documented. Our objective was to identify NF- $\kappa$ B expression in LN of patients with metastatic prostate disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissues

LN specimens were obtained from 54 patients with localized prostate cancer, who had undergone radical prostatectomy. No patients received hormonal treatment prior to surgery. Of the 54 patients, 32 had evidence of prostate cancer LN metastasis as confirmed by PSA staining, while 22 had no evidence of metastasis and were considered as controls. From the 32 metastatic prostate cancer patients, 55 LN specimens were evaluated, of which 45 were positive for metastasis, while ten were negative and were evaluated as internal controls. In addition, 32 LN specimens from the 22 patients with no evidence of metastasis were studied. One to two LN specimens were evaluated for each of the 54 patients.

### Immunohistochemistry

Tissue sections were immunostained for NF- $\kappa$ B using the biotin–streptavidin immunoperoxidase method as previously described [18]. Briefly, paraffin-embedded LN sections (4  $\mu$ m) were initially deparaffinized with toluene and rehydrated through graded ethanol. All steps were performed at room temperature. Following each step, sections were washed with 0.01 M phosphate

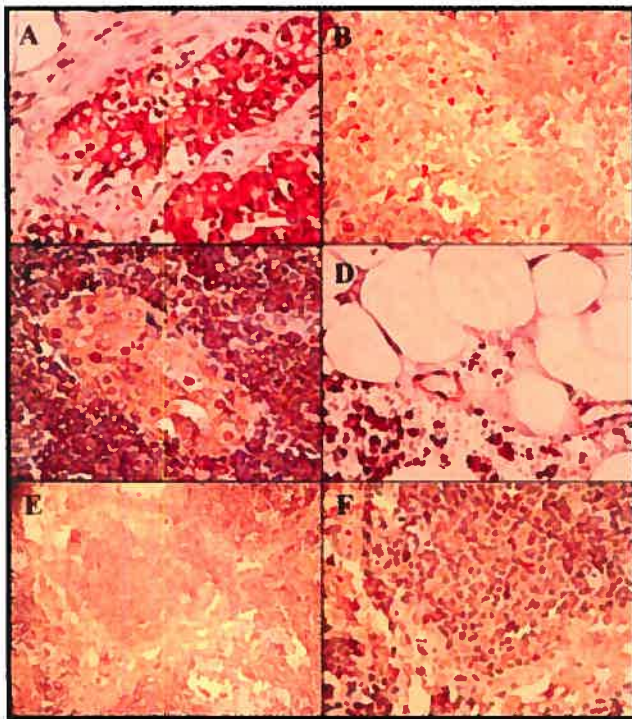
buffered saline (PBS solution) for 10 min. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide/50% methanol for 15 min. Tissue sections were incubated with a protein blocking serum-free reagent (Dako Diagnostics, Inc., Ont., Canada) for 15 min to block non-specific binding. An antigen retrieval technique was applied for NF- $\kappa$ B by boiling slides for 10 min at 95°C in a 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0). NF- $\kappa$ B expression was studied using monoclonal NF- $\kappa$ B p65 (F-6) antibody (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) that recognizes the amino-terminal sequences of the p65 subunit. The NF- $\kappa$ B primary antibody was applied at a concentration of 1:50 in PBS and was incubated for 60 min at room temperature. Immune complexes were revealed using a biotin-conjugated broad spectrum secondary antibody (20 min), then streptavidin-peroxidase conjugate for 20 min (Dako Diagnostics, Inc.), followed by chromogen (0.06% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.01% hydrogen peroxide in PBS). Sections were counter stained with Mayer's haematoxylin, dehydrated, and then mounted. Negative controls were included by omitting the primary antibody, while positive controls were included using prostate tissue sections.

### Quantification

LN sections were evaluated using light microscopy. NF- $\kappa$ B localization within the cell cytoplasm and/or nucleus was identified. Nuclear localization of NF- $\kappa$ B was categorized as positive or negative, as well as an overall proportion of cells (<1%, 1–10%, and >10%) with positive nuclear staining in the studied field at 100 $\times$  magnification [18]. For the positive-metastatic LN group, tumor cells and the surrounding lymphocytes were evaluated separately. A minimum of five different areas for each specimen were evaluated, and the mean was assessed. The intensity of NF- $\kappa$ B staining was evaluated semi-quantitatively on a scale ranging from 1 to 4+. Statistical analysis was performed using the  $\chi^2$ -test.

## RESULTS

The mean age of prostate cancer patients with LN metastases was  $64.2 \pm 4.7$  years as compared to  $65.1 \pm 4.3$  years in the control group ( $P = 0.6$ ). The mean Gleason score was similar in both groups (Gleason 8–10;  $P = 0.9$ ), while the mean preoperative prostate specific antigen (PSA) was  $18.3 \pm 7.8$   $\mu$ g/L in the metastatic prostate cancer patients compared to  $17.6 \pm 7.1$   $\mu$ g/L in controls ( $P = 0.8$ ). NF- $\kappa$ B staining was identified in the cytoplasm of lymphocytes in both groups, as well as in the malignant epithelial cells of the tumor-positive LN group. In contrast, nuclear localization of NF- $\kappa$ B was variably expressed (Fig. 1).



**Fig. 1.** Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) immunostaining patterns in lymph nodes (LN) of prostate cancer patients. Patients with positive LN metastases showed nuclear and cytoplasmic NF- $\kappa$ B staining in (A) malignant acini (400 $\times$ ), (B) lymphocytes (400 $\times$ ), (C) malignant acini and surrounding lymphocytes (400 $\times$ ), and (D) cells in the vicinity of lymphatic and vascular channels (staining of lymphocytes at lymphatics and vascular channels was similar in controls; data not shown). NF- $\kappa$ B-cytoplasmic staining in lymphocytes of patients with no metastases is shown in (E) (200 $\times$ ) and (F) (400 $\times$ ).

Table I shows NF- $\kappa$ B-nuclear localization in patients with positive LN metastases, where 27/32 (84.4%) of patients had >10% nuclear staining in tumor tissues as compared to 9.3 and 6.3% with <1% and 1–10% nuclear staining, respectively ( $P = 0.001$ ; Fig. 1A,B). Lymphocytic-nuclear localization of NF- $\kappa$ B of >10% was seen in 68.7% of patients with positive-LN metastases and 0% of controls ( $P = 0.0001$ , Table II, Fig. 1C,D). The negative LN specimens from patients with metastatic prostate cancer (internal controls;  $n = 10$ ) showed similar lymphocytic NF- $\kappa$ B-nuclear localization as controls

( $P = 0.8$ ), which was significantly different from the positive-LN specimens from the same patients (Table II).

The intensity of NF- $\kappa$ B staining in the LN specimens of metastatic prostate cancer patients and controls is shown in Table III. While 68.8% of patients with positive-LN metastases had 3 to 4+ intensity of staining in both lymphocytes and malignant cells, only 9.1% of the control group showed strong staining in the lymphocytes. It is noteworthy to mention that, in >90% of the metastatic LN specimens up-regulation of NF- $\kappa$ B activation and expression was observed simultaneously in lymphocytes and malignant cells. In all examined specimens, nuclear localization of NF- $\kappa$ B was persistently observed in lymphocytes and/or malignant cells in the vicinity of lymphatic or vascular channels.

## DISCUSSION

In the present study, we report for the first time NF- $\kappa$ B expression in prostate cancer LN metastasis. Our data shows that NF- $\kappa$ B nuclear localization/activation is up-regulated in tumor cells, as well as in the surrounding lymphocytes of metastatic LN of prostate cancer patients. It is well documented that Gleason score is an important prognostic marker for prostate cancer metastasis [19,20]. In addition, NF- $\kappa$ B has been reported to regulate the expression of PSA [21], another important marker for prostate cancer progression. Hence, the control group included in this study was selected to match the positive-LN group with respect to age, preoperative PSA, and Gleason score. Furthermore, to minimize the effect of known and/or unknown coexisting variables that may be responsible for increased NF- $\kappa$ B activity, LN with no evidence of malignancy, as confirmed by PSA staining, from patients with LN metastases were evaluated separately as internal controls. The internal control group showed similar NF- $\kappa$ B behavior as controls, which was significantly different from the positive-metastases LN group. Based on these observations, we hypothesize that the increased expression of NF- $\kappa$ B and its subcellular localization in metastatic LN is directly

**TABLE I. Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-Nuclear Localization in Tumor Cells of Patients With Positive-Prostate Cancer Lymph Node (LN) Metastases**

	Percentage of NF- $\kappa$ B nuclear localization			P value
	<1%	1–10%	>10%	
Patients (n = 32)	3 (9.3%)	2 (6.3%)	27 (84.4%)	0.001
Specimens <sup>a</sup> (n = 45)	5 (11.1%)	8 (17.8%)	32 (71.1%)	0.001

<sup>a</sup>One to two specimens were evaluated for each patient.



**TABLE II. NF- $\kappa$ B-Nuclear Localization in the Lymphocytes of Patients With Prostate Cancer LN Metastases and Controls**

NF- $\kappa$ B nuclear staining	Metastatic patients				Controls		
	Patients (n = 32)	Positive-LN specimens (a) (n = 45)	Negative-LN specimens (b) (n = 10)	P value (a vs. b)	Patients (n = 22)	Specimens (c) (n = 32)	P value (a vs. c)
<1%	3 (9.4%)	6 (13.3%)	7 (70%)	0.001	17 (77.3%)	24 (75%)	0.001
1–10%	7 (21.9%)	10 (22.2%)	3 (30%)	0.5	5 (22.7%)	8 (25%)	0.9
>10%	22 (68.7%)	29 (64.4%)	0	0.001	0	0	0.0001
P value <sup>a</sup>	0.005	0.003	0.001		0.001	0.001	

<sup>a</sup>Significance between <1 and >10% NF- $\kappa$ B localization in patients and specimens.

related to the process of malignant cell progression and ability to metastasize. This might in part explain our observation of persistent nuclear-NF- $\kappa$ B expression in malignant cells and lymphocytes in the vicinity of lymphatic and vascular channels.

NF- $\kappa$ B has been implicated in the development, activation, and function of B and T lymphocytes [22]. NF- $\kappa$ B importance for B and T cell function was proven by the fact that lymphocytes lacking either one of the two major inducible NF- $\kappa$ B transcription activators, C-Rel and RelA, have B and T cell proliferation defects in response to certain stimuli [23–25]. Hence, we observed diffuse cytoplasmic expression of NF- $\kappa$ B in all lymphocytes of the metastasis-positive LN group and controls. However, significant up-regulation of NF- $\kappa$ B nuclear expression was observed in the metastatic LN group especially in the lymphocytes surrounding malignant cells. It is noteworthy to mention that none of our positive-LN specimens had histological features suggestive of hyperplasia and/or an inflammatory reaction that might be responsible for the lymphocytic activation of NF- $\kappa$ B.

Several studies have previously suggested that NF- $\kappa$ B activation is associated with oncogenesis in mammalian systems [26–36]. Amplification and over expression of genes coding for RelA/NF- $\kappa$ B factors have been found in leukemia [26], lymphoma

[27], pancreatic adenocarcinoma [28], hepatocellular carcinoma [29], thyroid C-cell tumor [30], and breast cancer [31]. Furthermore, constitutive activation of NF- $\kappa$ B has been reported to be a common characteristic of many cell lines from hematopoietic and solid tumors [5,28,29]. The inactivation of NF- $\kappa$ B in carcinoma cell lines by different approaches has been shown to dramatically reduce their ability to form colonies in agar, as well as to grow in vivo and in vitro [32,33]. NF- $\kappa$ B has been also shown to have a key role in cell protection against diverse apoptotic stimuli including chemotherapeutic drugs and  $\gamma$ -irradiation through activation of the anti-apoptotic gene program in cells [5].

With respect to prostate cancer, NF- $\kappa$ B activation has been detected in a large number of prostate cancer cell lines, such as the androgen-resistant PC-3 and DU145 cell lines [12,34,35]. The tumor suppressor PTEN which inhibit NF- $\kappa$ B activation, has been implicated in prostate cancer [36]. In addition, it has recently been shown that *bcl-2* gene expression induced by tumor necrotic factor (TNF)- $\alpha$  in LNCAP cells is mediated by NF- $\kappa$ B binding to specific sites in the *bcl-2* P2 promoter [37]. A possible role for NF- $\kappa$ B in regulating apoptosis in androgen-independent prostate cancer cells has also been suggested by the fact that inhibition of NF- $\kappa$ B activity is necessary, although not sufficient, for the induction of apoptosis [38]. The *IL-6* gene, a target of NF- $\kappa$ B, has been shown to be overexpressed in localized prostate cancer and is thought to promote prostate cancer cell growth [39]. Furthermore inhibition of NF- $\kappa$ B activity in PC-3 cells was reported to be associated with decreased expression of various potent angiogenic factors, such as VEGF, IL-8, and MMP-9 [16]. Recently, it has been reported that inhibition of NF- $\kappa$ B activation by dehydroxymethylpoxiquinomicin (DHMEQ) results in suppression of hormone-refractory prostate cancer cells growth in nude mice [40]. Moreover, it has been stated that blockage of NF- $\kappa$ B activity is associated with reduced angiogenesis, invasion, and metastasis of human prostate cancer cells grown in vivo [17]. We previously

**TABLE III. Intensity of NF- $\kappa$ B Staining in Patients With Positive-Prostate Cancer LN Metastases and Controls**

Intensity of NF- $\kappa$ B staining	Patients with LN metastases (n = 32)	Controls (n = 22)	P value
1+	3 (9.4%)	15 (68.2%)	0.005
2+	7 (21.9%)	5 (22.7%)	0.8
3–4+	22 (68.8%)	2 (9.1%)	0.001
P value <sup>a</sup>	0.001	0.002	

<sup>a</sup>Significance between 1+ and 3–4+ intensity of NF- $\kappa$ B staining in both lymphocytes and malignant cells of metastatic patients and lymphocytes of controls.



reported that NF- $\kappa$ B-nuclear localization/activity in primary prostate cancer tissues correlates with poor patient outcome and bone metastasis [18]. The present study is in agreement with all these observations, as we were able to identify increased nuclear localization of NF- $\kappa$ B in prostate cancer LN-metastases. These results support and expand the possible role played by NF- $\kappa$ B, and its activators, in the development of metastatic prostate disease. However, further studies are essential to confirm such a hypothesis, as well as to correlate metastatic NF- $\kappa$ B expression to disease progression, and its possible implication as a predictor of poor prognosis. In addition, it would be interesting to determine whether our novel observation on NF- $\kappa$ B activation can correlate to clinical parameters such as time to recurrence and survival. Moreover, studies aiming at revealing the exact mechanisms by which the activation of NF- $\kappa$ B contributes to metastasis are essential. Finally, this study in conjunction with previously published reports [16–18] support the notion that targeting and/or blocking NF- $\kappa$ B signaling in positive-malignant cells may be a valid therapeutic strategy in the management of prostate cancer.

### CONCLUSIONS

We report for the first time NF- $\kappa$ B expression in prostate cancer LN metastases. Nuclear localization/activation of NF- $\kappa$ B is up-regulated in metastatic LN. Such observation suggests, and further supports, the possible role played by NF- $\kappa$ B in the development of metastatic prostate disease.

### REFERENCES

- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;50(1):7–33.
- Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: Twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990;50(19):6130–6138.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: Intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995;9(22):2723–2735.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappa B: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336(15):1066–1071.
- Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-Kappa B transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6910–6924.
- Gilmore TD. The Rel/NF-Kappa B signal transduction pathway: Introduction. *Oncogene* 1999;18:6842–6844.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-Kappa B puzzle. *Cell* 2002;109:s81–s96.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-Kappa B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621–663.
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappa B. *Science* 1996;274(5288):787–789.
- Higgins KA, Perez JR, Coleman TA, Dorshkind K, McComas WA, Sarmiento UM, Rosen CA, Narayanan R. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(21):9901–9905.
- Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappa B activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2573–2581.
- Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, Amenta PS, Zong WX, Gélinas C, Rabson A. Mechanisms of constitutive NF-Kb activation in human prostate cancer cells. *Prostate* 2002;52:183–200.
- Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 1994;56(5):554–581.
- Yokoo T, Kitamura M. Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1. *Am J Physiol* 1996;270(1 Pt 2):123–130.
- Chevalier S, Defoy I, Lacoste J, Hamel L, Guy L, Bégin LR, Aprikian AG. Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: More than angiogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002;189:169–179.
- Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF- $\kappa$ B activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001;20:4188–4197.
- Lindholm PF, Bub J, Kaul S, Shidham VB, Kajdacsy-Balla A. The role of constitutive NF-kappa B activity in PC-3 human prostate cancer cell invasive behavior. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:471–479.
- Lessard L, Mes-Masson A-N, Lamarre L, Wall L, Lattouf J-B, Saad F. NF-Kappa B nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. *BJU Int* 2003;91(4):417–420.
- Boswick DG. Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies. *Am J Surg Pathol* 1994;18:796–803.
- Grossfeld GD, Chang JJ, Broering JM, Li YP, Lubeck DP, Flanders SC, Carroll PR. Under staging and under grading in a contemporary series of patients undergoing radical prostatectomy: Results from the Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor Database. *J Urol* 2001;165(3):851–856.
- Chen CD, Sawyers CL. NF- $\kappa$ B activates prostate-specific antigen expression and is up-regulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol* 2002;22(8):2862–2870.
- Chen CL, Singh N, Yull FE, Strayhorn D, Van Kaer L, Kerr LD. Lymphocytes lacking I Kappa B-alpha develop normally, but have selective defects in proliferation and function. *J Immunol* 2000;165(10):5418–5427.
- Sha WC. Regulation of immune responses by NF- $\kappa$ B/Rel transcription factor. *J Exp Med* 1998;187(2):143–146.
- Boothby MR, Mora AL, Scherer DC, Brockman JA, Ballard DW. Perturbation of the T lymphocyte lineage in transgenic mice expressing a constitutive repressor of nuclear factor (NF)-kappaB. *J Exp Med* 1997;185(11):1897–1907.
- Bendall HH, Sikes ML, Ballard DW, Oltz EM. An intact NF-kappa B signaling pathway is required for maintenance of mature B cell subsets. *Mol Immunol* 1999;36(3):187–195.
- Rayet B, Gélinas C. Aberrant Rel/NF- $\kappa$ B genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18:6938–6947.

27. Krappmann D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dorken B, Scheidereit C. Molecular mechanisms of constitutive NF- $\kappa$ B/Rel activation in Hodgkin/Reed–Sternberg cells. *Oncogene* 1999;18(4):943–953.
28. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Karen R, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor- $\kappa$ B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5(1):119–127.
29. Tai DI, Tsai SL, Chang YH, Huang SN, Chen TC, Chang KS, Liaw YF. Constitutive activation of nuclear factor- $\kappa$ B in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:2274–2281.
30. Ludwig L, Kessler H, Wagner M, Hoang-Vu C, Dralle H, Adler G, Bohm BO, Schmid RM. Nuclear factor- $\kappa$ B is constitutively active in C-cell carcinoma and required for RET-induced transformation. *Cancer Res* 2001;61(11):4526–4535.
31. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, Sonenshein GE. Aberrant nuclear factor- $\kappa$ B/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997;100(12):2952–2960.
32. Duffey DC, Chen Z, Dong G, Ondrey FG, Wolf JS, Brown K, Siebenlist U, Van Waes C. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor- $\kappa$ B alpha of nuclear factor- $\kappa$ B in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1999;59(14):3468–3474.
33. Visconti R, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, Zeki K, Miano MP, De Nigris F, Casalino L, Curcio F, Santoro M, Fusco A. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NF- $\kappa$ B p65 protein expression. *Oncogene* 1997;15(16):1987–1994.
34. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of I  $\kappa$ B kinase alpha and NF- $\kappa$ B in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 1999;18:7389–7394.
35. Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV. The role of IKK in constitutive activation of NF- $\kappa$ B transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 2002;115(1):141–151.
36. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 2000;14:2410–2434.
37. Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor- $\kappa$ B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 2001;20:7342–7351.
38. Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and Fas1 to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res* 2001;61:7255–7263.
39. Chung TD, Yu JJ, Spiotto MT, Bartkowski M, Simons JW. Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. *Prostate* 1999;38:199–207.
40. Kikuchi E, Horiguchi Y, Nakashima J, Kuroda K, Oya M, Ohigashi T, Takahashi N, Shima Y, Umezawa K, Murai M. Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor in nude mice. *Cancer Res* 2003;63:107–110.

- 9.2 Annexe II NF- $\kappa$ B : un nouveau marqueur *kappable* de prédire l'évolution du cancer de la prostate  
(*Bull. Cancer*, vol.93(9) : 891-899, 2006)

# NFκB : un nouveau marqueur *kappable* de prédire l'évolution du cancer de la prostate

*NFκB : a new marker kappable of predicting prostate cancer outcome*

Laurent LESSARD  
Anne-Marie MES-MASSON  
Fred SAAD

Centre de recherche du CHUM et  
Institut du cancer de Montréal, 1560  
Sherbrooke Est, Montréal, Qc, Canada,  
H2L 4M1

**Résumé.** Le cancer de la prostate est la tumeur maligne la plus souvent diagnostiquée et la troisième plus meurtrière chez les hommes canadiens. Même si les adénocarcinomes prostatiques sont maintenant détectés à un stade précoce et traités efficacement, une proportion non négligeable progresse vers un stade métastatique et hormonoréfractaire où les options thérapeutiques sont essentiellement palliatives. Il est actuellement difficile d'identifier les cancers à risque de progression parce que les cliniciens disposent d'un nombre limité de marqueurs pronostiques cliniques. Afin de solutionner ce problème, la recherche uro-oncologique se tourne de plus en plus vers les marqueurs moléculaires pouvant être détectés biochimiquement dans le sang ou l'urine, ou par immunohistochimie sur les tissus cancéreux prostatiques. Ces marqueurs sont généralement impliqués dans divers processus cellulaires dont la prolifération, la survie, l'angiogenèse et l'invasion. Parmi les plus prometteurs, le facteur de transcription NFκB, lorsque présent dans le noyau cellulaire, contrôle l'expression de plusieurs gènes jouant un rôle dans l'oncogenèse. En particulier, des analyses immunohistochimiques ont montré que l'expression nucléaire de la sous-unité RelA dans les tumeurs primaires du cancer de la prostate est associée à une mauvaise évolution clinique. La localisation nucléaire de RelA permet ainsi d'apporter au grade histologique un autre argument afin de mieux classer les patients à risque. Il s'agit en outre d'un marqueur indépendant de la rechute biochimique et de la présence de métastases ganglionnaires. Les autres sous-unités de la famille NFκB pourraient, elles aussi, être des marqueurs pronostiques potentiels puisqu'elles ont été observées dans les noyaux cellulaires des tumeurs prostatiques. L'ajout de NFκB, voire d'autres marqueurs moléculaires, aux marqueurs cliniques actuels facilitera l'identification des tumeurs agressives et permettra de mieux guider les cliniciens dans le choix de la thérapeutique. ▲

**Mots clés :** cancer de la prostate, NFκB, marqueur moléculaire, immunohistochimie

**Abstract.** Prostate cancer is the most commonly diagnosed malignancy and the third cause of cancer-related death in Canadian men. Although most tumors are detected at an early stage and treated efficiently, a number of these cases will progress to a metastatic and hormone-refractory state where therapeutic options are essentially palliative. Due to a limited number of clinical prognostic markers, it is often difficult to identify cancers at risk of progression. To address this problem, uro-oncologic researchers are turning to molecular markers that can be detected biochemically in the blood or urine, as well as by immunohistochemistry on prostate cancer tissues. These markers are generally involved in cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. Among the most promising markers is the transcription factor NFκB that controls the expression of many genes that play a role in oncogenesis. In particular, immunohistochemical analyses have shown that the nuclear expression of the RelA subunit in primary prostate tumors is associated with poor clinical outcome. Indeed, the nuclear localization of RelA upgrades the histological grade to allow a better classification of patients at risk of progression. Moreover, nuclear RelA is an independent predictor of biochemical recurrence and lymph node metastasis. Other subunits of the NFκB family may also become useful prognostic markers since they are also detected in the nucleus of prostate cancer cells. The

Article reçu le 6 juillet 2006,  
accepté le 31 juillet 2006

Tirés à part : F. Saad

addition of NF $\kappa$ B and other molecular markers to current clinical markers will facilitate the identification of high risk patients and guide clinicians in the choice of an appropriate therapeutic approach. ▲

**Key words:** prostate cancer, NF $\kappa$ B, molecular marker, immunohistochemistry

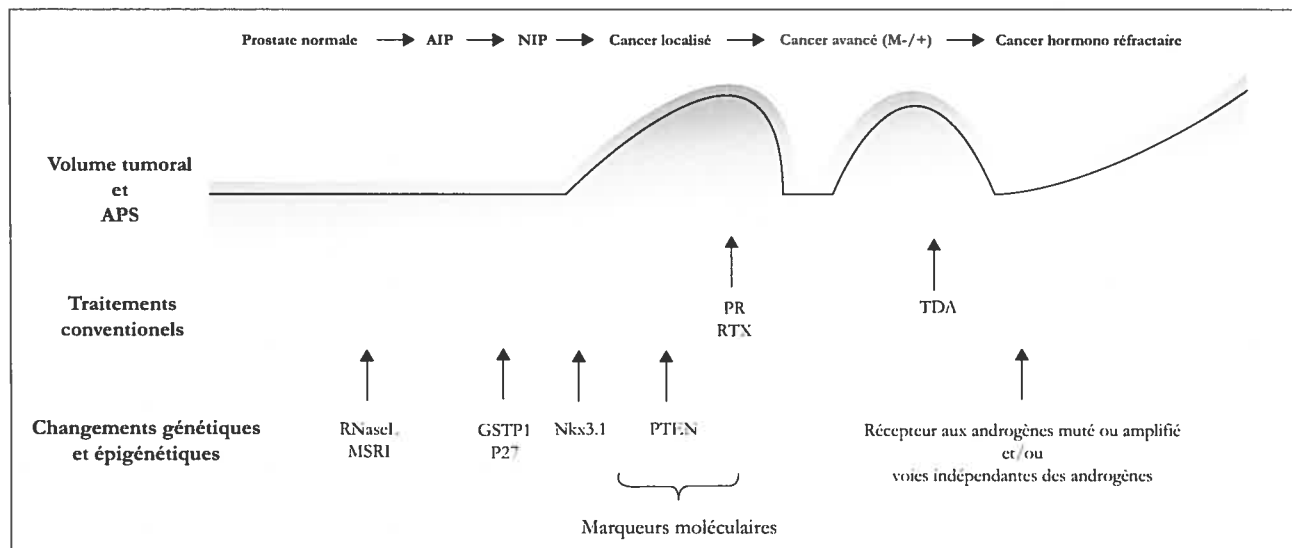
## Le cancer de la prostate

L'adénocarcinome de la prostate est le cancer le plus fréquent et la troisième cause de mortalité liée au cancer chez les hommes canadiens. Il est généralement diagnostiqué à un stade précoce grâce au dépistage mesurant le niveau sanguin de l'antigène prostatique spécifique (PSA) [1]. À ce stade, il est encore localisé à l'intérieur de la capsule prostatique et peut être traité par prostatectomie radicale ou radiothérapie (figure 1). Dans ce cas, le taux de survie des patients après 10 ans avoisine 85 à 90 %. Cependant, pour certains individus, le cancer réapparaît après une période de rémission. Cette récurrence, appelée rechute biochimique, correspond à une nouvelle augmentation du taux de PSA sanguin, trahissant la présence de cellules tumorales. Puisque ces cellules dépendent des androgènes pour survivre, les patients subissent alors une thérapie anti-androgénique afin d'induire une

mort cellulaire, ce qui se traduit par une baisse substantielle du taux de PSA sanguin. Malheureusement, cette hormonothérapie demeure essentiellement palliative car le cancer progresse dans une proportion significative des cas vers un stade métastatique et hormonoréfractaire [2]. À ce stade de la maladie, les options thérapeutiques curatives sont inexistantes, ce qui explique le niveau élevé de mortalité du cancer de la prostate.

## Prédire l'évolution d'un cancer de la prostate localisé

Des études récentes suggèrent que les cancers à un stade précoce sont, pour la plupart, en état de latence. En effet, il semble que des patients non traités et sous observation survivent presque aussi longtemps que ceux traités par prostatec-



**Figure 1.** Pathogenèse du cancer de la prostate, d'après Nelson et al. [101]. Le développement du cancer de la prostate est précédé de deux stades précurseurs appelés atrophie inflammatoire proliférative (AIP) et néoplasie intra-épithéliale prostatique (NIP). L'AIP se situe principalement dans la zone périphérique de la prostate où la NIP et le cancer se développent. Elle serait le résultat d'une accumulation de dommages oxydatifs due à une inflammation récurrente ou chronique. Les gènes RNaseL et MSRI, dont certaines mutations sont associées à un risque élevé de développer un cancer de la prostate, sont impliqués dans le processus inflammatoire et une atténuation de leur fonction pourrait promouvoir le développement de l'AIP. Par la suite, d'autres changements incluant l'hyperméthylation du gène GSTP1 et la sous-expression de l'inhibiteur de cycline p27 favorisent l'apparition de NIP. La NIP est officiellement reconnue comme le stade pré-invasif du cancer de la prostate et sa présence dans les biopsies prostatiques est un marqueur hautement prédictif de cancer. Il s'agit d'une prolifération anormale de cellules épithéliales à l'intérieur des acini prostatiques. D'un point de vue diagnostique, l'AIP et la NIP sont indétectables cliniquement et n'élèvent pas le niveau sanguin du PSA. Seul le cancer de la prostate module le PSA à la hausse. L'adénocarcinome de la prostate est caractérisé par une panoplie de changements moléculaires dont une absence fréquente des gènes Nkx3.1 et PTEN. Le cancer localisé à l'intérieur de la prostate peut être efficacement traité par prostatectomie radicale (PR) ou radiothérapie (RTx), ce qui fait baisser le taux sanguin du PSA. C'est à ce niveau que plusieurs marqueurs moléculaires sont à l'étude afin de prédire une rechute biochimique (hausse du PSA) et le développement d'un cancer avancé avec ou sans évidence de métastases (M +/-). Lors d'une rechute, le patient subit une thérapie de déplétion des androgènes (TDA) (ou hormonothérapie) qui a pour but de tuer les cellules cancéreuses prostatiques dépendantes des androgènes pour leur survie. Après une période de rémission où le niveau du PSA régresse, le cancer réapparaît sous une forme indépendante des androgènes et généralement métastatique. Cette résistance est due à des mutations ou à l'amplification du récepteur aux androgènes et/ou à l'activation de voies indépendantes des androgènes. À ce niveau, il n'existe pas de traitement curatif. La chimiothérapie peut, dans certains cas, aider à contrôler la croissance du volume tumoral sur une courte période, mais le cancer reprend rapidement le dessus.

tomie radicale ou radiothérapie [3, 4]. Malgré cela, il est plus prudent à l'heure actuelle de soigner les patients avec une longue espérance de vie puisqu'il est encore difficile de différencier les tumeurs latentes des tumeurs agressives. Ceci implique qu'une fraction des patients traités préventivement ne nécessiterait en fait aucune intervention, tandis qu'une autre fraction serait privée d'un traitement plus agressif qui pourrait retarder ou empêcher une récurrence.

On dispose actuellement de certains marqueurs cliniques pour aider à identifier les cancers localisés à risque de récurrence. Les trois principaux sont le PSA préopératoire, le stade pathologique et le grade histologique. Ce dernier, communément appelé score de Gleason (de 2 à 10), mesure le degré de différenciation des glandes prostatiques [5]. Un cancer bien différencié (Gleason < 5), c'est-à-dire un cancer dont l'architecture se rapproche de celle des glandes normales, a moins de chance de récidiver. À l'opposé, une tumeur pauvrement différenciée (Gleason ≥ 8) risque d'être plus agressive. Il devient beaucoup plus difficile de prédire l'évolution d'un cancer localisé lorsqu'il s'agit d'une tumeur modérément différenciée (Gleason 5-6 mais surtout Gleason 7), même en tenant compte du PSA préopératoire et du stade pathologique. Pourtant, les tumeurs dont le Gleason est de 7 sont celles qui sont les plus souvent diagnostiquées [6]. Il y a donc un besoin urgent de disposer d'autres marqueurs pouvant compléter les marqueurs cliniques et permettre de mieux classer les cancers à faible et à haut risques de progression.

### Marqueurs moléculaires de la progression du cancer de la prostate

Étant donné l'efficacité limitée des marqueurs cliniques, la recherche uro-oncologique se tourne de plus en plus vers l'identification de marqueurs moléculaires afin d'apporter un complément aux marqueurs cliniques et de mieux prédire l'évolution du cancer. La compréhension de la pathogenèse moléculaire du cancer de la prostate a permis d'identifier des protéines pouvant servir de cibles thérapeutiques mais aussi de marqueurs pronostiques potentiels [7]. Il s'agit généralement d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs impliqués dans divers processus tels que le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, l'adhésion et l'angiogenèse (tableau 1). De tous ces gènes candidats, le facteur de transcription NF-κappaB (NFκB) a récemment émergé comme un marqueur de progression solide. Ce facteur est d'autant plus intéressant qu'il a

**Tableau 1.** Marqueurs moléculaires de progression du cancer de la prostate. D'après Quinn *et al.* [7].

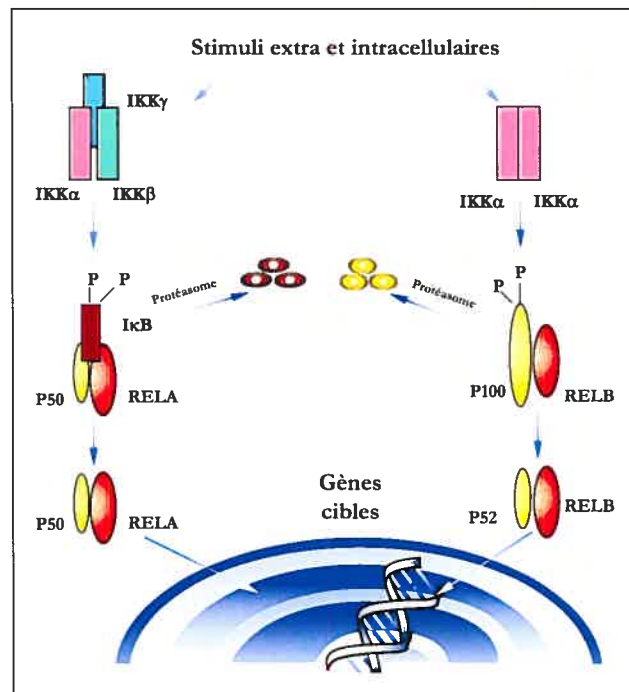
Processus biologiques	Marqueurs moléculaires	Références sélectionnées*
Cycle cellulaire	c-Myc, p16, p21, p27, p53, cycline A, cycline D	[17-22]
Apoptose	Bcl-2, p53	[23]
Adhésion	E-cadhérine	[24]
Angiogenèse	VEGF, VEGFR	[25, 26]
Développement	EZH2	[27]
Signalisation	AR, TGF, IL6, Akt, NFκB, Her2, β-caténine, Pim1	[28-34]
Autres	Hepsin, MUC1, MTA1, AZGP1, CD44	[34-38]

\* Une seule référence par marqueur est incluse par mesure de simplicité.

la particularité de contrôler l'expression de plusieurs gènes décrits dans le *tableau 1* comme les cyclines D [8, 9], le VEGF [10], Bcl2 [11], c-myc [12], Pim-1 [13], l'IL6 [14], en plus d'interférer avec le fonctionnement de la protéine p53 [15] et du récepteur aux androgènes [16].

### NFκB : nature et fonction

Le nom NFκB représente en fait une famille de cinq sous-unités caractérisées par un domaine d'homologie Rel (RHD pour *Rel-homology domain*) servant à la dimérisation et à la liaison à l'ADN [39, 40]. Cette famille peut être divisée en deux classes selon leur région en carboxy-terminal. La première classe inclut RelA (p65), RelB et c-Rel qui possèdent un domaine de transactivation. La deuxième classe est représentée par NFκB1 (p50 et son précurseur p105) et NFκB2 (p52 et p100). Le domaine carboxy-terminal des précurseurs p105 et p100 contient des répétitions de type ankyrine qui doivent être dégradées pour générer les sous-unités actives p50 et p52. Toutes ces sous-unités fonctionnent en tant qu'homo et hétérodimères, le dimère le plus connu et étudié étant composé des sous-unités RelA et p50. Dans la plupart des cellules normales, le dimère RelA-p50 est gardé inactif dans le cytoplasme par les inhibiteurs de la famille IκB (α et β). L'activation de RelA-p50 requiert l'induction de voies de signalisation convergeant vers le complexe trimérique IKK composé des kinases IKKα, IKKβ et IKKγ/NEMO (*figure 2*). Une fois activé, le complexe IKK phosphoryle l'inhibiteur IκB qui est subséquemment ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Ainsi libéré de son inhibiteur, le dimère RelA-p50 se dirige dans le noyau pour activer la transcription de divers gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la survie, l'angiogenèse, l'inflammation, l'adhésion cellulaire et l'invasion. Plus récemment, un autre voie d'activation ciblant



**Figure 2.** Voies de signalisation activant NFκB. Voir le texte pour la description des voies.

principalement le dimère RelB-p52 a été mise à jour (figure 2). Dans cette voie non classique, la kinase IKK $\alpha$  phosphoryle le précurseur p100, qui est ensuite partiellement dégradé pour générer la sous-unité p52. Le dimère RelB-p52 se déplace alors dans le noyau où il induit lui aussi l'expression de plusieurs gènes. D'un point de vue cinétique, l'activation de RelA-p50 est connue pour être extrêmement rapide, de l'ordre de quelques secondes, alors que l'induction de RelB-p52 débute après quelques heures de stimulation. Ce mode de fonctionnement permettrait, entre autres, d'activer certains gènes de façon soutenue [41]. En effet, l'activité du dimère RelA-p50 est rapidement réprimée parce qu'il induit l'expression de son propre inhibiteur, I $\kappa$ B $\alpha$ . Le dimère RelB-p52 pourrait alors remplacer RelA-p50 au niveau de certains promoteurs et, puisque I $\kappa$ B $\alpha$  n'interagit pas avec RelB-p52, l'activation de gènes pourrait s'étendre sur une plus longue période.

## NF $\kappa$ B et oncogénèse

Étant donné la nature des processus biologiques modulés par NF $\kappa$ B, il n'est pas étonnant d'observer une suractivation des sous-unités NF $\kappa$ B dans plusieurs cancers [42]. Un des premiers indices liant NF $\kappa$ B au cancer est venu de la découverte de l'oncogène rétroviral v-Rel, homologue viral de la sous-unité c-Rel, qui induit la formation de tumeurs lymphoïdes chez le poulet [43]. Par la suite, les effets oncogéniques d'autres protéines virales ont été montrés comme étant dépendants, du moins en partie, de leur capacité à activer les voies NF $\kappa$ B. C'est le cas de la protéine Tax du virus humain T-lymphotrope de type 1 (HTLV1) [44] et de la protéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr (EBV) [45]. Plusieurs altérations chromosomiques impliquant les gènes *c-rel* et *nf $\kappa$ b2* ont aussi été détectées dans des lymphomes à cellules B et T [46]. En ce qui concerne les tumeurs solides, une localisation nucléaire aberrante des sous-unités NF $\kappa$ B a été observée dans divers cancers, dont ceux du pancréas [47], du sein [48], de l'endomètre [49], du rein [50], de la tête et du cou [51], ainsi que dans le mélanome [52]. De plus, un grand nombre de lignées cellulaires présentant une activité élevée du dimère RelA-p50 sont résistantes à divers agents chimiothérapeutiques [53, 54]. Des études récentes suggèrent même que l'activation de NF $\kappa$ B dans les cellules inflammatoires entourant les cellules malignes serait requise pour stimuler la croissance et la progression tumorale [55]. Dans ce modèle, la voie NF $\kappa$ B serait cruciale, non seulement dans les cellules tumorales où elle protégerait contre l'apoptose, mais aussi dans les cellules inflammatoires où elle induirait l'expression de facteurs de croissance et de molécules pro-angiogéniques.

## NF $\kappa$ B et cancer de la prostate

Le cancer de la prostate n'échappe pas à l'« ouragan » NF $\kappa$ B. Depuis l'année 2000, plus de 200 publications ont rapporté le rôle de NF $\kappa$ B dans la résistance à l'apoptose, la prolifération, la différenciation, l'angiogénèse, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses prostatiques (tableau 2). Il semble que NF $\kappa$ B influence tous ces processus de manière à favoriser la progression du cancer. Ainsi, lorsque NF $\kappa$ B est inhibé suite à la transfection d'une forme mutante non dégra-

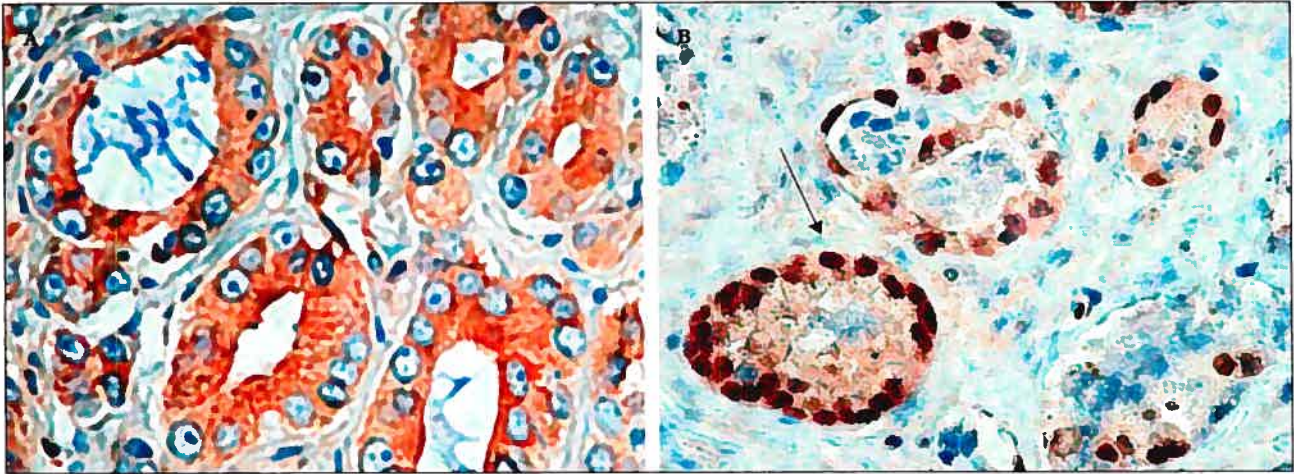
Tableau 2. Rôles de NF $\kappa$ B dans le cancer de la prostate

Rôles de NF $\kappa$ B	Exemples	Références sélectionnées
Anti-apoptotique	Agents naturels et pharmaceutiques qui favorisent ou induisent l'apoptose en inhibant NF $\kappa$ B	[59-68]
Pro-apoptotique	L'activation de NF $\kappa$ B induit l'apoptose	[69, 70]
Prolifération	L'inhibition de NF $\kappa$ B ralentit ou inhibe la croissance cellulaire Facteurs qui activent NF $\kappa$ B	[71, 72] [73]
Angiogenèse	Molécules pro-angiogéniques qui agissent par l'entremise de NF $\kappa$ B L'inhibition de NF $\kappa$ B inhibe l'expression de molécules pro-angiogéniques	[74, 75] [57, 76]
Différenciation	NF $\kappa$ B induit la différenciation des cellules prostatiques	[77, 78]
Migration/ Invasion	Molécules favorisant la migration et l'invasion qui agissent par l'entremise de NF $\kappa$ B L'inhibition de NF $\kappa$ B diminue le potentiel migratoire et invasif	[79, 80] [56, 81, 82]
Androgènes	Les androgènes inhibent l'activité de NF $\kappa$ B Les androgènes activent NF $\kappa$ B	[83-85] [86, 87]

dable de I $\kappa$ B $\alpha$ , les cellules PC3 perdent leurs caractéristiques agressives associées à la prolifération, l'invasion, l'angiogénèse et le développement de métastases [56, 57]. Ces découvertes stimulent la recherche d'inhibiteurs naturels ou chimiques de l'activité de NF $\kappa$ B [58] qui pourraient être utilisés dans le traitement du cancer de la prostate.

Il semble aussi exister un lien entre l'activité du dimère RelA-p50 et le degré de dépendance aux androgènes des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques. D'abord, les cellules androgéno-indépendantes PC3 et DU145 ont une activité basale de NF $\kappa$ B beaucoup plus élevée que les cellules androgénosensibles LNCaP et 22Rv1 [83, 88]. De plus, les sous-lignées androgéno-indépendantes dérivées des cellules LNCaP ont elles aussi une activité NF $\kappa$ B supérieure à celle des cellules d'origine [89]. La suractivation de NF $\kappa$ B serait donc associée au phénotype androgéno-indépendant et favoriserait la progression de la maladie. D'un autre côté, dans les cellules androgénosensibles, les observations sont plutôt contradictoires. D'une part, l'activation du récepteur aux androgènes atténuerait l'activité basale de NF $\kappa$ B soit par compétition pour des cofacteurs [90, 91] ou des sites de liaison à l'ADN [92], soit par augmentation des niveaux de I $\kappa$ B $\alpha$  [84, 85]; d'autre part, une augmentation de l'activité NF $\kappa$ B a aussi été détectée suite à une stimulation androgénique de cellules LNCaP [86, 87]. Il reste donc beaucoup à faire afin d'éclaircir les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de l'activité NF $\kappa$ B par la voie du récepteur aux androgènes et de comprendre leur rôle dans la pathogénèse du cancer de la prostate.





**Figure 3.** Détection de RelA par immunohistochimie (200 x). **A)** Localisation cytoplasmique de RelA (brun). **B)** Localisation nucléaire de RelA. La flèche pointe un noyau brun positif.

### Expression de NFκB dans les tissus prostatiques

Bien que la majorité des travaux décrits précédemment ait été faite sur des lignées de cellules cancéreuses humaines, il est aussi important de s'assurer de l'expression et/ou de l'activation de NFκB dans les tumeurs. Pour ce faire, la technique d'immunohistochimie peut être utilisée pour détecter la présence de NFκB et déterminer sa localisation à l'intérieur des cellules prostatiques. C'est ainsi que la sous-unité classique RelA a été observée dans les noyaux cellulaires de tissus cancéreux prostatiques [83, 88], laissant sous-entendre une possible activation de NFκB (*figure 3*). Cette découverte, combinée aux études moléculaires, a favorisé l'émergence d'une série de travaux visant à établir NFκB en tant que marqueur de progression du cancer de la prostate.

### Localisation nucléaire de RelA et grade histologique

Une des premières analyses réalisées a été de comparer la localisation nucléaire de RelA au grade histologique, un marqueur clinique établi [93]. Dans deux études indépendantes, nous avons observé une augmentation de l'expression nucléaire de RelA concomitante à l'augmentation du grade de Gleason. Bien que seulement tendancielle, cette relation suggérait un lien entre l'activité de RelA et l'agressivité du cancer. L'équipe de Shukla *et al.* a par la suite montré que la localisation nucléaire de RelA coïncidait avec la surexpression de gènes connus pour être activés par NFκB, tels que VEGF, cycline D1 et Bcl2 [94].

Nous avons ensuite évalué le potentiel pronostique de RelA en comparant son statut dans les tumeurs primaires de deux groupes de patients ayant vécu une évolution clinique différente (*tableau 3*) [93]. Le premier groupe était constitué de 13 patients considérés comme guéris, c'est-à-dire n'ayant subi aucune rechute biochimique dans les 5 années suivant la prostatectomie radicale. Le second groupe était composé de 17 patients décédés suite au développement de métastases osseuses. Les résultats ont révélé que 59 % des patients décédés présentaient une tumeur dont les cellules avaient une haute fréquence de RelA nucléaire (> 10 % des cellules

cancéreuses), contrairement à seulement 15 % des patients guéris. De plus, tel qu'observé en clinique, les patients décédés avaient en général un grade Gleason plus élevé que les patients guéris. Cependant, dans les deux groupes, les tumeurs modérément différenciées (Gleason 5-7) représentaient plus de 50 % des patients. Nous avons donc voulu vérifier si l'ajout du marqueur RelA pouvait aider, dans ce cas, à mieux classer les patients à risque de progression. En regroupant les grades Gleason intermédiaires RelA-nucléaire positifs avec les grades Gleason élevés, 71 % des patients décédés étaient correctement classés dans le groupe à haut risque de progression. De façon similaire, en regroupant les grades Gleason intermédiaires RelA-nucléaire négatifs avec les grades Gleason faibles, 85 % des patients guéris étaient correctement classés dans le groupe à faible risque de progression. Ces travaux montraient donc pour la première fois le potentiel pronostique de NFκB dans le cancer de la prostate.

**Tableau 3.** RelA aide à mieux classer les patients à faible et à haut risques de progression

Patients	Guéris (%)	Décédés (%)	p
RelA < 10 %	11 (85)	7 (41)	0,03
RelA > 10 %	2 (15)	10 (59)	
Gleason 2-4	4 (31)	1(6)	0,05
<b>Gleason 5-7</b>	<b>8 (62)</b>	<b>9 (53)</b>	
Gleason 8-10	1 (7)	7 (41)	
Faible risque Gleason 2-4 + Gleason 5-7 (RelA < 10 %)	11 (85)	5 (29 %)	
Haut risque Gleason 8-10 + Gleason 5-7 (RelA > 10 %)	2 (15)	12 (71 %) 0,004	

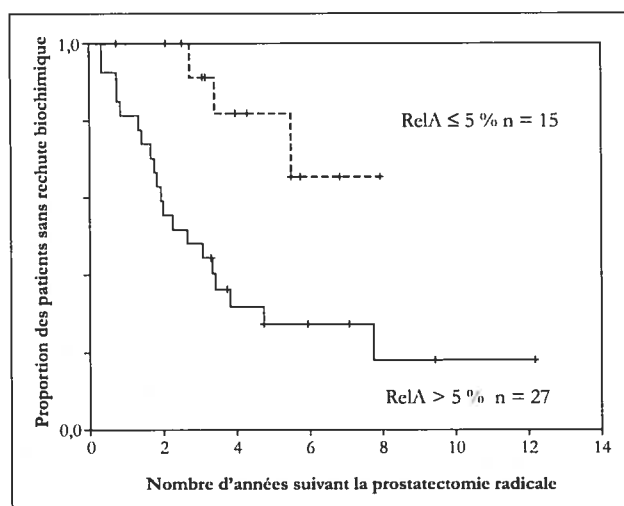


## Localisation nucléaire de RelA et rechute biochimique

L'indicateur de progression du cancer de la prostate le plus couramment utilisé est la rechute biochimique. Cette rechute est particulièrement difficile à prédire chez les patients présentant des marges chirurgicales positives. En effet, même si l'analyse pathologique révèle une résection incomplète de la tumeur, les patients ne rechutent pas tous pour autant. Puisque les marqueurs cliniques ne sont pas suffisants pour prédire l'évolution de la maladie, entre autres parce que ces tumeurs sont majoritairement de grade Gleason intermédiaire, l'utilisation de RelA comme marqueur pronostique a été envisagée. Dans une étude chez 42 patients avec marges chirurgicales positives, nous avons déterminé en analyse multivariée qu'une localisation nucléaire de RelA dans plus de 5 % des cellules cancéreuses augmentait de six fois le risque d'une rechute biochimique [31]. En outre, les patients avec une expression nucléaire de RelA élevée rechutaient beaucoup plus rapidement que ceux présentant de faibles niveaux (figure 4). D'autres études indépendantes ont aussi associé la localisation nucléaire [95, 96] ou la surexpression de RelA [97] à la rechute biochimique, faisant de RelA un marqueur de progression du cancer de la prostate pertinent.

## Localisation nucléaire de RelA et métastases ganglionnaires

La présence de métastases aux ganglions pelviens en périphérie de la prostate est aussi un indicateur de mauvais pronostic. Par contre, le statut des ganglions est le plus souvent inconnu puisque le chirurgien omet de les réséquer. Lorsqu'il le fait, il limite la résection à une sous-population de ganglions, augmentant ainsi la probabilité d'établir un diagnostic faux négatif. Cette situation a stimulé le développement de nomogrammes qui combinent une série de marqueurs cliniques permettant de calculer la probabilité d'avoir des métastases ganglionnaires. Ces marqueurs étant limités, l'ajout de mar-



**Figure 4.** NFκB prédit la rechute biochimique, d'après Fradet *et al.* [31]. Courbe de Kaplan-Meier montrant la probabilité de rechute biochimique en fonction de la fréquence nucléaire de RelA dans les tumeurs. Suivi clinique de 0,3 à 12,2 ans (moyenne 3,6 ans, médiane 3,2 ans), Log rank  $p = 0,004$ .

queurs moléculaires améliorerait l'exactitude de prédiction de ces nomogrammes.

Ayant au préalable observé une forte localisation nucléaire de RelA dans les métastases ganglionnaires du cancer de la prostate [98], nous avons voulu déterminer si l'expression nucléaire de RelA dans les tumeurs primaires pouvait aider à prédire la présence de métastases aux ganglions [99]. En comparant un groupe témoin de patients n'ayant pas rechuté 5 ans après la chirurgie à un groupe de patients métastatiques, nous avons observé une plus haute fréquence de RelA nucléaire chez ces derniers. De plus, en analyse multivariée, chaque 1 % d'augmentation de la fréquence de RelA nucléaire augmentait le risque d'avoir des métastases ganglionnaires de 8 %. En résumé, RelA est un marqueur moléculaire qui pourrait potentiellement être inclus dans les nomogrammes pour évaluer la probabilité d'une atteinte des ganglions pelviens. RelA pourrait être combiné à d'autres marqueurs comme TGFβ et IL6, lesquels ont également permis d'accroître l'exactitude de prédiction de ces nomogrammes [29].

## Expression des autres sous-unités de la famille NFκB

Bien que la sous-unité RelA soit un marqueur pronostique prometteur, il existe d'autres sous-unités NFκB qui pourraient avoir une valeur pronostique dans le cancer de la prostate. Cependant, l'expression de RelB, p52, p50 et c-Rel dans les tissus cancéreux prostatiques demeurait hypothétique jusqu'à tout récemment. Dans une étude systématique analysant l'expression et la localisation intracellulaire des sous-unités NFκB, nous avons confirmé leur expression dans les tumeurs primaires [100]. De plus, toutes ces sous-unités ont été détectées dans les noyaux cellulaires, excepté c-Rel qui était strictement cytoplasmique. Remarquablement, la sous-unité RelB était la plus fréquemment localisée au noyau, suivie de RelA, p52 et p50. Par ailleurs, l'expression nucléaire de RelB corrélait significativement avec le grade histologique des patients. Enfin, le calcul de la fréquence à laquelle deux sous-unités se retrouvaient dans les noyaux cellulaires d'un même tissu a révélé que la co-expression nucléaire de RelA et p50 était la moins fréquente. En d'autres termes, ces résultats suggèrent, non seulement une activation du dimère classique RelA-p50, mais aussi une activation fréquente de dimères non classiques dans le cancer de la prostate.

## Perspectives

L'étape suivante consistera en des études à grande échelle afin de valider la présence de RelA au noyau, mais aussi celle des autres sous-unités, en tant que marqueurs pronostiques. La combinaison de différentes sous-unités pourrait s'avérer encore plus efficace, alors que d'autres sous-unités pourraient même être associées à une bonne évolution clinique. L'évaluation du potentiel pronostique des facteurs NFκB se fera aussi sur des spécimens de biopsies afin de déterminer si la localisation nucléaire de NFκB peut prédire l'évolution de la maladie au moment du diagnostic. Si tel est le cas, l'approche thérapeutique pourrait être ajustée en conséquence.

En résumé, ces travaux permettront de mieux identifier les patients à risque de progression et de les traiter de façon appropriée. Entre autres, puisque plusieurs inhibiteurs des voies NFκB sont actuellement en développement, la connais-

sance du rôle des différentes sous-unités NFκB dans la progression du cancer de la prostate permettrait de mieux cibler les patients qui bénéficieraient d'une telle thérapie. Parallèlement, la compréhension des interactions possibles entre les voies NFκB et d'autres voies de signalisation, dont la voie du récepteur aux androgènes, aidera à l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques.

D'une manière ou d'une autre, le pronostic semble plus que favorable quant à l'avenir du marqueur NFκB dans le cancer de la prostate. ▼

**Remerciements.** Les auteurs voudraient remercier Benjamin Péant pour la lecture critique du manuscrit et madame Guislaine Plante pour l'assistance graphique.

## RÉFÉRENCES

- Narain V, Cher ML, Wood DP. Prostate cancer diagnosis, staging and survival. *Cancer Metastasis Rev* 2002 ; 21 : 17-27.
- Scher HI, Sawyers CL. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer : directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 8253-61.
- Cooperberg MR, Moul JW, Carroll PR. The changing face of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 8146-51.
- Klotz L. Active surveillance for prostate cancer : for whom? *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 8165-9.
- DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 2003 ; 361 : 955-64.
- Rasiah KK, Stricker PD, Haynes AM, Delprado W, Turner JJ, Golovsky D, et al. Prognostic significance of Gleason pattern in patients with Gleason score 7 prostate carcinoma. *Cancer* 2003 ; 98 : 2560-5.
- Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL. Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 2005 ; 41 : 858-87.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999 ; 19 : 5785-99.
- Huang Y, Ohtani K, Iwanaga R, Matsumura Y, Nakamura M. Direct trans-activation of the human cyclin D2 gene by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* 2001 ; 20 : 1094-102.
- Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 25176-83.
- Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 2001 ; 20 : 7342-51.
- Duyao MP, Buckler AJ, Sonenshein GE. Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4727-31.
- Zhu N, Ramirez LM, Lee RL, Magnuson NS, Bishop GA, Gold MR. CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. *J Immunol* 2002 ; 168 : 744-54.
- Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 2327-34.
- Webster GA, Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol* 1999 ; 19 : 3485-95.
- Palvimo JJ, Reinikainen P, Ikonen T, Kallio PJ, Moilanen A, Janne OA. Mutual transcriptional interference between RelA and androgen receptor. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 24151-6.
- Sato K, Qian J, Slezak JM, Lieber MM, Bostwick DG, Bergstralh EJ, et al. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999 ; 91 : 1574-80.
- Lee CT, Capodiceci P, Osman I, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, et al. Over-expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 977-83.
- Matsushima H, Sasaki T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kitamura T, et al. Immunohistochemical study of p21WAF1 and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance. *Hum Pathol* 1998 ; 29 : 778-83.
- Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, et al. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 542-8.
- Quinn DI, Henshall SM, Head DR, Golovsky D, Wilson JD, Brenner PC, et al. Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 1585-94.
- Aaltomaa S, Eskelinen M, Lipponen P. Expression of cyclin A and D proteins in prostate cancer and their relation to clinicopathological variables and patient survival. *Prostate* 1999 ; 38 : 175-82.
- Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol* 1996 ; 156 : 1511-6.
- Kuczyk M, Serth J, Machtens S, Bokemeyer C, Bathke W, Stief C, et al. Expression of E-cadherin in primary prostate cancer : correlation with clinical features. *Br J Urol* 1998 ; 81 : 406-12.
- Strohmeier D, Rossing C, Bauerfeind A, Kaufmann O, Schlechte H, Bartsch G, et al. Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. *Prostate* 2000 ; 45 : 216-24.
- Li R, Younes M, Wheeler TM, Scardino P, Otori M, Frolov A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate* 2004 ; 58 : 193-9.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002 ; 419 : 624-9.
- Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995 ; 9 : 401-6.
- Kattan MW, Shariat SF, Andrews B, Zhu K, Canto E, Matsumoto K, et al. The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor beta1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 3573-9.
- Le Page C, Koumakpayi IH, Alam-Fahmy M, Mes-Masson AM, Saad F. Expression and localisation of Akt-1, Akt-2 and Akt-3 correlate with clinical outcome of prostate cancer patients. *Br J Cancer* 2006 ; 94 : 1906-12.
- Frader 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. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 8460-4.
- Fox SB, Persad RA, Coleman N, Day CA, Silcocks PB, Collins CC. Prognostic value of c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor in stage A1 (T1a) prostatic adenocarcinoma. *Br J Urol* 1994 ; 74 : 214-20.
- Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Kench JG, Golovsky D, Brenner PC, et al. Lower levels of nuclear beta-catenin predict for a poorer prognosis in localized prostate cancer. *Int J Cancer* 2005 ; 113 : 415-22.
- Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001 ; 412 : 822-6.

35. Arai T, Fujita K, Fujime M, Irimura T. Expression of sialylated MUC1 in prostate cancer : relationship to clinical stage and prognosis. *Int J Urol* 2005 ; 12 : 654-61.
36. Hofer MD, Kuefer R, Varambally S, Li H, Ma J, Shapiro GI, et al. The role of metastasis-associated protein 1 in prostate cancer progression. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 825-9.
37. Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 811-6.
38. Ekici S, Ayhan A, Kendi S, Ozen H. Determination of prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy : prognostic value of CD44v6 score. *J Urol* 2002 ; 167 : 2037-41.
39. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 2195-224.
40. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev* 2006 ; 210 : 171-86.
41. Sacconi S, Pantano S, Natoli G. Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell* 2003 ; 11 : 1174-563.
42. Karin M. NF-kappaB and cancer : Mechanisms and targets. *Mol Carcinog* 2006 ; 45 : 355-61.
43. Zhang JY, Olson W, Ewert D, Bargmann W, Bose HR. The v-rel oncogene of avian reticuloendotheliosis virus transforms immature and mature lymphoid cells of the B cell lineage in vitro. *Virology* 1991 ; 183 : 457-66.
44. Sun SC, Yamaoka S. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* 2005 ; 24 : 5952-64.
45. Kaye KM, Izumi KM, Mosialos G, Kieff E. The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation ; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* 1995 ; 69 : 675-83.
46. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999 ; 18 : 6938-47.
47. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 119-27.
48. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997 ; 100 : 2952-60.
49. Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, et al. Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004 ; 204 : 569-77.
50. Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, et al. Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2003 ; 24 : 377-84.
51. Duffey DC, Chen Z, Dong G, Ondrey FG, Wolf JS, Brown K, et al. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaBalpha of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 3468-74.
52. Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 2573-81.
53. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999 ; 18 : 6910-24.
54. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 2001 ; 107 : 241-6.
55. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006 ; 441 : 431-6.
56. Lindholm PF, Bub J, Kaul S, Shidham VB, Kajdacsy-Balla A. The role of constitutive NF-kappaB activity in PC-3 human prostate cancer cell invasive behavior. *Clin Exp Metastasis* 2000 ; 18 : 471-9.
57. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001 ; 20 : 4188-97.
58. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 297-309.
59. Yemelyanov A, Gasparian A, Lindholm P, Dang L, Pierce JW, Kisseljov F, et al. Effects of IKK inhibitor PS1145 on NF-kappaB function, proliferation, apoptosis and invasion activity in prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2006 ; 25 : 387-98.
60. Agarwal C, Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal R. Inositol hexaphosphate inhibits constitutive activation of NF-kappa B in androgen-independent human prostate carcinoma DU145 cells. *Anticancer Res* 2003 ; 23 : 3855-61.
61. McEleny K, Coffey R, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int* 2004 ; 94 : 402-6.
62. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 1999 ; 18 : 7389-94.
63. Hour TC, Chen J, Huang CY, Guan JY, Lu SH, Pu YS. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21 (WAF1/CIP1) and C/EBPbeta expressions and suppressing NF-kappaB activation. *Prostate* 2002 ; 51 : 211-8.
64. Gasparian AV, Yao YJ, Lu J, Yemelyanov AY, Lyakh LA, Slaga TJ, et al. Selenium compounds inhibit I kappa B kinase (IKK) and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2002 ; 1 : 1079-87.
65. Davis JN, Kucuk O, Sarkar FH. Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 1999 ; 35 : 167-74.
66. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* 2003 ; 22 : 4851-9.
67. Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. Inhibition of NF-kappaB pathway in grape seed extract-induced apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *Int J Oncol* 2003 ; 23 : 721-7.
68. Kim BY, Kim KA, Kwon O, Kim SO, Kim MS, Kim BS, et al. NF-kappaB inhibition radiosensitizes Ki-Ras-transformed cells to ionizing radiation. *Carcinogenesis* 2005 ; 26 : 1395-403.
69. Kimura K, Gelmann EP. Propapoptotic effects of NF-kappaB in LNCaP prostate cancer cells lead to serine protease activation. *Cell Death Differ* 2002 ; 9 : 972-80.
70. Shim M, Eling TE. Protein kinase C-dependent regulation of NAG-1/placental bone morphogenic protein/MIC-1 expression in LNCaP prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 18636-42.
71. Mori A, Lehmann S, O'Kelly J, Kumagai T, Desmond JC, Pervan M, et al. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 3222-9.
72. Zerbini LF, Wang Y, Cho JY, Libermann TA. Constitutive activation of nuclear factor kappaB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 2206-15.
73. Hughes-Fulford M, Li CF, Boonyaratankornkit J, Sayyah S. Arachidonic acid activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling and induces gene expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 1427-33.
74. Shen H, Lentsch AB. Progressive dysregulation of transcription factors NF-kappa B and STAT1 in prostate cancer cells causes proangiogenic production of CXC chemokines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 ; 286 : C840-C847.
75. Levine L, Lucci 3rd JA, Pazdrak B, Cheng JZ, Guo YS, Townsend CM, et al. Bombesin stimulates nuclear factor kappa B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 3495-502.

76. Bao BY, Yao J, Lee YF. I[alpha], 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis* 2006 (in press).
77. Floryk D, Huberman E. Differentiation of androgen-independent prostate cancer PC-3 cells is associated with increased nuclear factor-kappaB activity. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 11588-96.
78. Meyer-Siegler K. COX-2 specific inhibitor, NS-398, increases macrophage migration inhibitory factor expression and induces neuroendocrine differentiation in C4-2b prostate cancer cells. *Mol Med* 2001 ; 7 : 850-60.
79. Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration : role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 9891-8.
80. Hodge JC, Bub J, Kaul S, Kajdacsy-Balla A, Lindholm PF. Requirement of RhoA activity for increased nuclear factor kappaB activity and PC-3 human prostate cancer cell invasion. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 1359-64.
81. Uzzo RG, Crispen PL, Golovine K, Makhov P, Horwitz EM, Kolenko VM. Diverse effects of zinc on NF-[kappa]B and AP-1 transcription factors : implications for prostate cancer progression. *Carcinogenesis* 2006 (in press).
82. Vayalil PK, Mittal A, Katiyar SK. Proanthocyanidins from grape seeds inhibit expression of matrix metalloproteinases in human prostate carcinoma cells, which is associated with the inhibition of activation of MAPK and NF kappa B. *Carcinogenesis* 2004 ; 25 : 987-95.
83. Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, Amenta PS, Zong WX, Gelinas C, et al. Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* 2002 ; 52 : 183-200.
84. 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. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 26267-75.
85. Altuwajri 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 Res* 2003 ; 63 : 7106-12.
86. Coffey RN, Watson RW, O'Neill AJ, Mc Eleny K, Fitzpatrick JM. Androgen-mediated resistance to apoptosis. *Prostate* 2002 ; 53 : 300-9.
87. Ripple MO, Hagopian K, Oberley TD, Schatten H, Weindruch R. Androgen-induced oxidative stress in human LNCaP prostate cancer cells is associated with multiple mitochondrial modifications. *Antioxid Redox Signal* 1999 ; 1 : 71-81.
88. 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. *J Cell Sci* 2002 ; 115 : 141-51.
89. Chen CD, Sawyers CL. NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 2862-70.
90. Aarnisalo P, Palvimo JJ, Janne OA. CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 2122-7.
91. Aarnisalo P, Santti H, Poukka H, Palvimo JJ, Janne OA. Transcription activating and repressing functions of the androgen receptor are differentially influenced by mutations in the deoxyribonucleic acid-binding domain. *Endocrinology* 1999 ; 140 : 3097-105.
92. Cinar B, Yeung F, Konaka H, Mayo MW, Freeman MR, Zhou HE, et al. Identification of a negative regulatory cis-element in the enhancer core region of the prostate-specific antigen promoter : implications for intersection of androgen receptor and nuclear factor-kappaB signalling in prostate cancer cells. *Biochem J* 2004 ; 379 : 421-31.
93. 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 Int* 2003 ; 91 : 417-20.
94. 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* 2004 ; 6 : 390-400.
95. Ayala GE, Dai H, Ittmann M, Li R, Powell M, Frolov A, et al. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 6082-90.
96. Domingo-Domenech J, Mellado B, Ferrer B, Truan D, Codony-Servat J, Sauleda S, et al. Activation of nuclear factor-kappaB in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse. *Br J Cancer* 2005 ; 95 : 1285-94.
97. Ross JS, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP, Kaur P, et al. Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas : correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 2466-72.
98. Ismail HA, Lessard L, Mes-Masson AM, Saad F. Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate* 2004 ; 58 : 308-13.
99. Lessard L, Karakiewicz P, Bellon-Gagnon P, Alam-Fahmy M, Ismail HA, Mes-Masson AM, et al. Nuclear localization of NF-kB p65 in primary prostate tumors is highly predictive of pelvic lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 2006 (in press).
100. Lessard L, Begin LR, Gleave ME, Mes-Masson AM, Saad F. Nuclear localisation of nuclear factor-kappaB transcription factors in prostate cancer : an immunohistochemical study. *Br J Cancer* 2005 ; 93 : 1019-23.
101. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 366-81.

