

UNIVERSITÉ PARIS-EST

**ECOLE DOCTORALE DE SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTÉ**

ANNÉE 2008

N°

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Kaili MAO

Né le 01 avril 1965 à Shanghai (Chine)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 27 NOVEMBRE 2008

TITRE :

**RÔLE DU VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A
(VEGF-A) ET DE SON RECEPTEUR VEGFR-1
DANS LE CANCER PROSTATIQUE LOCALISÉ**

Président du Jury : Pr Bernard DEBRÉ
Directeur de Thèse : Pr Anh Tuan DINH-XUAN

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Pr **Bernard Debré** pour son soutien et son amitié. Il m'a énormément apporté, tant sur le plan médical que personnel. Son dynamisme, son enthousiasme et sa générosité sont un exemple pour moi.

Je remercie également le Pr **Anh Tuan Dinh-Xuan**, qui a accepté de diriger mes travaux de recherche. Sa disponibilité et sa maîtrise scientifique sont remarquables. Notre collaboration va certainement se poursuivre, à Paris comme à Shanghai.

Merci au Pr **Thierry Flam**, qui m'a été d'une grande aide. J'admire sa rigueur scientifique et ses qualités chirurgicales.

Merci au Pr **Michaël Peyromaure**, qui a guidé mes débuts à Paris et dont les conseils sont toujours précieux.

Merci au Pr **Laurent Salomon**, qui a accepté de critiquer ce travail.

| |
|----------------------------|
| COMPOSITION DU JURY |
|----------------------------|

Rapporteurs : Pr Bernard Debré, hôpital Cochin, Paris

Pr Thierry Flam, hôpital Cochin, Paris

Examineur : Pr Laurent Salomon, hôpital Henri Mondor, Créteil

Pr Michaël Peyromaure, hôpital Necker, Paris

Directeur de Thèse : Pr Anh Tuan Dinh-Xuan, hôpital Cochin, Paris

SOMMAIRE

| | |
|---|-------------|
| 1. Introduction | <i>p 5</i> |
| Limites actuelles du PSA | <i>p 5</i> |
| VEGF, angiogénèse et cancer de prostate | <i>p 7</i> |
| Impact du VEGF dans le cancer prostatique avancé | <i>p 11</i> |
| 2. VEGF-A plasmatique et tissulaire dans le cancer prostatique localisé | <i>p 14</i> |
| Rationnel de l'étude | <i>p 14</i> |
| Matériels et méthodes | <i>p 24</i> |
| Résultats | <i>p 27</i> |
| Commentaires | <i>p 37</i> |
| Conclusion | <i>p 42</i> |
| 3. Impact pronostique du VEGF-A et du VEGFR-1 tissulaire dans le cancer prostatique localisé | <i>p 43</i> |
| Rationnel | <i>p 43</i> |
| Poursuite de l'étude antérieure | <i>p 45</i> |
| 3.2.a. Matériels et méthodes | <i>p 45</i> |
| 3.2.b. Résultats | <i>p 46</i> |
| 3.2.c. Commentaires | <i>p 47</i> |
| Deuxième étude | <i>p 48</i> |
| 3.3.a. Rationnel | <i>p 48</i> |
| 3.3.b. Matériels et méthodes | <i>p 48</i> |
| 3.3.c. Résultats | <i>p 51</i> |
| 3.3.d. Commentaires | <i>p 54</i> |
| 3.3.e. Conclusion | <i>p 60</i> |
| 4. Conclusions et perspectives | <i>p 61</i> |
| 5. Bibliographie | <i>p 64</i> |
| 6. Publications | <i>p 72</i> |
| 7. Résumé | <i>p 91</i> |

1. INTRODUCTION

1.1.1. Limites actuelles du PSA

En Europe et aux Etats-Unis, le cancer prostatique est le cancer le plus fréquent de l'homme de plus de 50 ans, et représente la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme. Son incidence est en constante augmentation en raison du dépistage par le PSA (antigène spécifique de la prostate) et du vieillissement de la population. L'utilisation croissante du PSA permet de diagnostiquer de plus en plus de cancers localisés, donc accessibles à un traitement curatif. Grâce au taux croissant de tumeurs localisées, et à l'amélioration des traitements curatifs, une baisse de la mortalité liée au cancer prostatique est prévisible. Une étude récente menée aux Etats-Unis a estimé la survie à long terme des patients chez qui un cancer prostatique avait été diagnostiqué en 2003 [Mariotto, 2006]. D'après cette étude, le taux de survie à 15 ans attendu pour ces patients, tous stades confondus, serait de 97%. Le PSA représente donc aujourd'hui un marqueur diagnostique déterminant du cancer prostatique. Néanmoins, la sensibilité du PSA pour la détection du cancer prostatique est limitée. Elle est d'environ 90% lorsque le PSA est supérieur à 10 ng/ml, mais inférieure à 80% pour une valeur comprise entre 4 et 10 ng/ml [Catalona, 1991]. D'autre part, sa spécificité est faible, et il est impossible, lorsque le PSA n'est que modérément élevé, de distinguer un cancer prostatique d'une pathologie prostatique bénigne.

La mesure du rapport PSA libre/total améliore le rendement des biopsies prostatiques. Plus ce rapport est bas, plus le risque de cancer est élevé. Cependant, le rendement diagnostique de ce marqueur est également limité lorsque le PSA total est inférieur à 10 ng/ml, ce qui est la situation la plus fréquente aujourd'hui. En effet, la spécificité du rapport

PSA libre/total est d'à peine 60% lorsque le PSA total est inférieur à 10 ng/ml, d'où un grand nombre de faux positifs [Trinkler, 1998]. Ainsi, on estime aujourd'hui qu'environ la moitié des biopsies prostatiques sont réalisées inutilement.

D'autres marqueurs dérivés du PSA sont en cours d'évaluation pour la détection précoce du cancer prostatique, dont le PSA complexé, le pro-PSA (précurseur du PSA) et le BPSA (« benign PSA »). Le pro-PSA semble avoir des résultats encourageants, mais il n'est pas encore disponible sur le marché et ne peut donc être utilisé en pratique courante [Peyromaure, 2004].

Outre sa valeur diagnostique, le PSA a une valeur pronostique, puisque son taux est corrélé à l'extension du cancer prostatique et au risque de décès spécifique. Dans une étude qui a inclus 2260 patients ayant un cancer cliniquement localisé et opérés par prostatectomie radicale, les facteurs indépendants prédictifs de l'extension extra-capsulaire sur la pièce opératoire étaient le PSA pré-opératoire, le score de Gleason, le pourcentage de biopsies envahies, et le pourcentage de tissu envahi par biopsie positive [Tsuzuki, 2005]. Un seuil de 10 ng/ml était retenu pour définir les cancers à haut risque d'extension extra-capsulaire. Or aujourd'hui, la plupart des cancers prostatiques sont détectés à un stade précoce, avec un PSA inférieur à cette valeur. D'autres études ont montré qu'avec des taux peu élevés de PSA, ce facteur n'était pas prédictif de l'extension extra-capsulaire [Horiguchi, 2003; Ozgur, 2004]. La valeur pronostique du PSA total, tout comme sa valeur diagnostique, sont donc limitées lorsque son taux sérique est inférieur à 10 ng/ml.

Au total, le PSA a un rôle fondamental dans la détection du cancer prostatique et dans l'évaluation de son extension. Néanmoins, son rendement est limité lorsque son taux est

inférieur à 10 ng/ml. En dessous de ce seuil, la sensibilité et la spécificité du PSA ne sont pas optimales pour la détection du cancer, ce qui aboutit à un taux élevé de biopsies inutiles. D'autre part, la corrélation entre le PSA et l'extension du cancer prostatique n'est pas suffisante pour distinguer les cancers localisés des cancers extra-capsulaires. Il est donc nécessaire, pour améliorer la valeur diagnostique et pronostique du PSA, de trouver d'autres marqueurs du cancer prostatique. L'objectif de notre travail a été d'analyser la valeur potentielle d'un facteur d'angiogénèse, le vascular endothelial growth factor (VEGF), dans le cancer prostatique cliniquement localisé.

1.1.2. VEGF, angiogénèse, et cancer de prostate

Le VEGF est une glycoprotéine déterminante dans la différenciation des cellules endothéliales, leur migration, leur prolifération, et la formation des microvaisseaux [Fong, 1995]. Le VEGF est donc un facteur stimulant l'angiogénèse. Le VEGF est produit par une grande variété de types cellulaires. Une surexpression tissulaire du VEGF et une élévation de sa concentration sérique sont détectables dans de nombreux types de tumeurs, dont le cancer colo-rectal, le cancer du sein, de l'ovaire et du rein [Dirix, 1997]. La famille du VEGF comprend cinq formes, qui proviennent de séquences différentes d'un même gène: le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, et le VEGF-E. Le VEGF-A est la forme la plus étudiée, car son rôle a été prouvé dans le développement de beaucoup de types de cancers. Cinq isoformes de VEGF-A ont été décrites, en fonction de leur nombre d'acides aminés: le VEGF 121, le VEGF 145, le VEGF 165, le VEGF 189, et le VEGF 206. D'autre part, trois récepteurs au VEGF ont été identifiés: le VEGFR-1, le VEGFR-2, et le VEGFR-3. Les deux premiers, qui se lient au VEGF-A, jouent le rôle de médiateurs dans la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales [Hicklin, 2005].

La relation entre la microangiogénèse et le cancer de la prostate est aujourd'hui bien établie. Il a été montré il y a plus de vingt ans que la castration réduit la prolifération des cellules endothéliales dans la prostate, ce qui suggère une régulation de l'angiogénèse par les androgènes [English, 1985]. De plus, une corrélation existe entre la densité microvasculaire et l'agressivité de nombreuses tumeurs, dont le cancer prostatique. Par exemple, Wakui et al ont montré que la densité microvasculaire est plus importante dans les cancers prostatiques métastatiques que dans les tumeurs non métastatiques [Wakui, 1992]. De même, Brawer et al ont analysé la densité microvasculaire sur des pièces de prostatectomies radicales réalisées pour des cancers cliniquement localisés, et sur des copeaux de résections trans-urétrales réalisées pour des cancers métastatiques [Brawer, 1994]. Ces auteurs ont montré que la densité microvasculaire était corrélée au stade pathologique de la tumeur et à la présence de métastases.

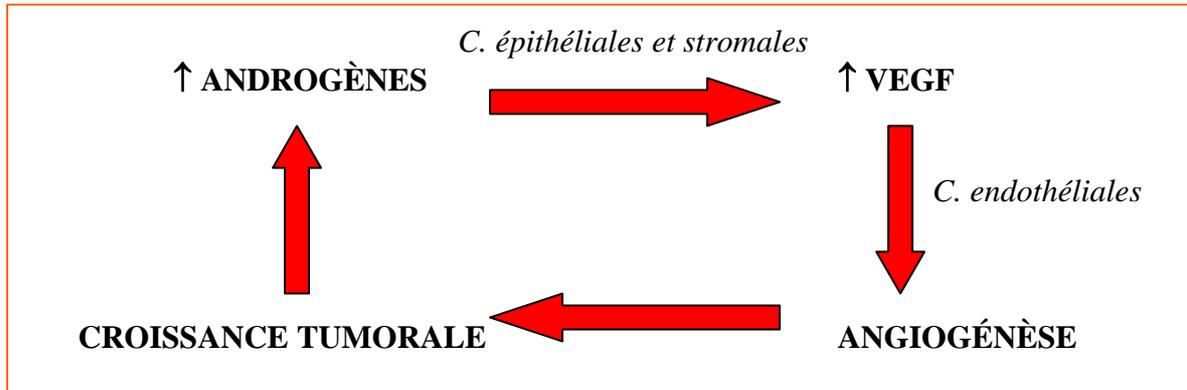
Le VEGF est régulé par les androgènes à la fois dans le tissu prostatique normal et dans le cancer prostatique. Des études préliminaires menées chez le rat ont montré que la castration induit une baisse de l'expression tissulaire du VEGF dans le cancer prostatique, qui est associée à une baisse de la densité microvasculaire [Mukherjee, 1999]. Chez l'homme, Stewart et al ont rapporté une baisse de l'expression de l'ARNm du VEGF dans les cellules malignes prostatiques après suppression androgénique [Stewart, 2001]. D'autre part, le VEGF dans la prostate est corrélé à la microangiogénèse et à la présence de cancer. Stefanou et al ont étudié la densité microvasculaire et l'expression du VEGF sur 60 pièces opératoires de cancer prostatiques et sur 64 pièces d'hypertrophie bénigne de prostate [Stefanou, 2004]. Ces auteurs ont noté que l'angiogénèse était plus importante dans le tissu malin que dans le tissu bénin. De plus, la densité microvasculaire était associée à l'expression tissulaire du VEGF: une

immunoreactivité était visible dans tous les cas de cancer, mais seulement dans 81% des cas d'hypertrophie bénigne. Dans une autre étude, Li et al ont trouvé que le récepteur au VEGF était exprimé dans 62% des cas de cancer, dans 71% des cas d'hypertrophie bénigne, et dans 40% des cas contrôles [Li, 2004]. Cependant, l'intensité du marquage tissulaire était très forte dans la moitié des cas de cancer, alors qu'elle était le plus souvent faible dans les deux autres types de tissu.

Toutes ces études montrent que le VEGF a un rôle important dans le développement du cancer prostatique. Une étude génétique a conforté cette notion [Lin, 2003]. Dans cette étude, le polymorphisme -460 C/T du gène VEGF a été comparé entre 96 patients ayant un cancer prostatique et 19 sujets témoins. La fréquence de l'homozygotie TT était significativement plus importante chez les patients ayant un cancer prostatique. L'odds ratio par copie de l'allèle T était de 2,3. Les auteurs concluaient que le cancer prostatique est associé à des variantes génétiques spécifiques du gène VEGF.

Le rôle du VEGF dans la croissance du cancer prostatique fait intervenir la microangiogénèse. Néanmoins, la régulation de l'angiogénèse est un processus complexe qui implique de nombreux facteurs stimulants et inhibiteurs. Aujourd'hui, peu d'informations sont disponibles concernant les interactions entre ces différents facteurs, et les mécanismes d'action précis du VEGF dans la croissance tumorale restent à déterminer, notamment dans le cancer prostatique [Barry Delongchamps, 2006].

Interactions entre VEGF, microangiogénèse, et croissance du cancer prostatique.



1.2. Impact du VEGF dans le cancer prostatique avancé

L'importance du VEGF dans le cancer prostatique métastatique a été démontrée chez l'animal par l'utilisation d'anticorps neutralisants. Chez la souris notamment, il a été rapporté que les anticorps monoclonaux anti-VEGF inhibent la croissance des tumeurs prostatiques et le développement des métastases [Melnyk, 1999].

Chez l'homme, la concentration sérique ou plasmatique du VEGF, ainsi que son expression tissulaire, sont élevées dans de nombreux types de tumeurs à un stade avancé. L'impact du VEGF dans le cancer prostatique avancé a été documenté par quelques études. L'expression tissulaire du VEGF et/ou de son récepteur dans le cancer de prostate est associée au score de Gleason, à la présence de métastases ganglionnaires, et à la survie sans progression [Tsurusaki, 1999; Strohmeyer, 2000; West, 2001; Li, 2004]. Un des mécanismes qui aboutit à la survenue de métastases ganglionnaires est la formation de vaisseaux lymphatiques au sein de la tumeur. Le VEGF-C et le VEGF-D ont un rôle dans la lymphoangiogénèse. Tsurusaki et al ont montré une nette corrélation entre l'expression du VEGF-C dans les cellules prostatiques malignes et la présence de métastases ganglionnaires [Tsurusaki, 1999]. Ces résultats ont été confirmés par Jennbacken et al, qui, en mesurant l'expression du VEGF-C et de son récepteur sur 22 pièces histologiques de cancer prostatique, ont montré que l'intensité du marquage de ces deux facteurs était beaucoup plus importante chez les patients ayant une atteinte ganglionnaire [Jennbacken, 2005]. Dans cette étude, le récepteur au VEGF-C était exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques, les cellules endothéliales des microvaisseaux sanguins, et les cellules épithéliales tumorales. Les autres formes de VEGF sont également impliquées dans le cancer prostatique métastatique, en particulier le VEGF-A. Les patients qui ont un cancer prostatique métastatique ont des

concentrations plasmatiques de VEGF-A plus élevées que ceux qui ont un cancer localisé [Duque, 1999; Shariat, 2004]. En augmentant la perméabilité vasculaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, le VEGF pourrait faciliter l'entrée des cellules tumorales dans la circulation et l'apparition de métastases à distance. D'autre part, une étude *in vitro* a suggéré que le VEGF-A stimulait l'action ostéoblastique au niveau des lésions osseuses métastatiques [Dai, 2004].

Des essais sont en cours pour déterminer le bénéfice clinique des anticorps anti-VEGF dans le cancer prostatique hormono-résistant. D'après les résultats préliminaires d'une large étude américaine, l'association du bevacizumab, anticorps monoclonal murin anti-VEGF, et du docetaxel permet un taux de réponse biologique de 65% [Picus, 2003].

Il est donc aujourd'hui clairement établi que les différentes formes de VEGF ont un rôle important dans le cancer prostatique métastatique, même si leurs mécanismes d'action restent à clarifier. En effet, plusieurs études ont montré que le VEGF circulant et le VEGF tissulaire sont corrélés à l'extension du cancer prostatique. Cependant, très peu de données ont été publiées concernant l'impact du VEGF dans le cancer prostatique non métastatique, qu'il s'agisse des formes localement avancées ou intra-capsulaires. Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier le rôle du VEGF circulant et tissulaire dans le cancer prostatique non métastatique. Plus précisément, nous avons analysé la valeur diagnostique et pronostique d'une forme de VEGF, le VEGF-A, dans le cancer prostatique cliniquement localisé. Tout d'abord, nous avons étudié le VEGF-A sérique chez des patients qui avaient une suspicion clinique et/ou biologique de cancer prostatique, et soumis à des biopsies prostatiques. L'objectif de cette première partie était de déterminer si le VEGF-A sérique peut améliorer le rendement du PSA pour la détection du cancer prostatique. Ensuite, nous avons étudié le

VEGF-A plasmatique chez des patients soumis à une prostatectomie radicale pour un cancer prostatique cliniquement localisé. Nous avons ainsi analysé la corrélation entre le VEGF-A circulant et les facteurs pronostiques classiques du cancer prostatique, dont le score de Gleason et le stade pathologique de la tumeur. Puis nous avons étudié l'expression tissulaire du VEGF-A sur les pièces opératoires, dans cette même population. L'objectif était de chercher une association entre le VEGF-A plasmatique, le VEGF-A tissulaire, et les facteurs pronostiques du cancer prostatique. Enfin, la troisième partie du travail a consisté à étudier l'expression tissulaire du VEGF-A sur pièces de prostatectomie radicale, en comparant deux groupes de patients: un groupe ayant récidivé après traitement, et l'autre groupe n'ayant pas récidivé. L'objectif de cette dernière partie était de déterminer l'impact pronostique du VEGF-A tissulaire sur le devenir clinique des patients traité pour un cancer prostatique cliniquement localisé.

2. VEGF-A PLASMATIQUE ET TISSULAIRE DANS LE CANCER PROSTATIQUE LOCALISÉ

2.1. Rationnel de l'étude

Traitement du cancer prostatique métastatique et impact thérapeutique du VEGF

Outre la valeur diagnostique du VEGF, de nombreux points restent à clarifier avec ce marqueur dans le cancer prostatique. En particulier, très peu de données ont été publiées concernant le rôle du VEGF dans le cancer prostatique localisé, la majorité des études ayant analysé l'impact du VEGF dans le cancer avancé. Il a été montré *in vitro* que la progression du cancer prostatique s'accompagne d'une élévation de l'expression du VEGF dans les cellules prostatiques tumorales, et de la formation de nouveaux vaisseaux [Doll, 2001]. D'autre part, la transition de lignées cellulaires androgéno-dépendantes vers des lignées androgéno-indépendantes est associée à une augmentation de l'angiogénèse et à des changements de morphologie des vaisseaux au sein de la tumeur [Gustavsson, 2005]. Le VEGF pourrait donc jouer un rôle déterminant dans la survenue de l'hormono-résistance du cancer prostatique.

Dans le cancer prostatique avancé, peu de progrès thérapeutiques ont été réalisés ces trente dernières années. L'hormonothérapie reste le traitement de référence du cancer prostatique métastatique. Depuis les travaux précurseurs de Huggins et Hodges [Huggins, 1941], l'efficacité du traitement hormonal dans le cancer prostatique a pu être clairement établie. La castration chirurgicale ou médicale par des agents qui inhibent la synthèse ou l'action périphérique de la testostérone permet, dans le cancer prostatique avancé, un taux de réponse supérieur à 60% et une survie médiane supérieure à 2 ans [Denis, 1993]. Cependant,

le traitement hormonal dans le cancer prostatique a des limites. D'une part, il occasionne certains effets secondaires précoces quasi-constants: bouffées de chaleur, troubles sexuels, asthénie. D'autre part, lorsqu'il est administré de façon continue, le traitement hormonal a des effets tardifs qui peuvent altérer la qualité de vie: déminéralisation osseuse, anémie, perte de la masse musculaire, et dépression. Enfin et surtout, l'efficacité de l'hormonothérapie continue dans le cancer prostatique est transitoire. Dans la majorité des cas, le cancer va progresser au bout de 2 à 3 ans malgré une castration efficace sur la testostérone: c'est la phase d'hormono-résistance [Mc Leod, 2003]. La survenue de l'hormono-résistance est associée à une progression rapide de la maladie et au décès du patient dans les deux ans.

Ces dernières années, le développement de certaines chimiothérapies, en particulier du docétaxel, a permis une augmentation de la durée médiane de survie des patients ayant un cancer hormono-résistant [Tannock, 2004]. Cependant, la survie spécifique n'est augmentée par le docétaxel que de trois mois en moyenne, et la survenue de l'hormono-résistance signifie encore de nos jours que le patient va décéder dans les années qui suivent. D'autres thérapeutiques sont donc en cours d'évaluation pour améliorer la survie des patients ayant un cancer prostatique avancé, notamment en phase d'hormono-résistance. Des traitements anti-angiogéniques sont à l'étude, en particulier anti-VEGF. Le bevacizumab, anticorps monoclonal anti-VEGF, a été testé en association avec le docétaxel chez des patients ayant un cancer prostatique avancé. Les résultats préliminaires de cet essai ont montré un taux de réponse partielle de 53% et un taux de réponse biologique de 65% [Picus, 2003]. À notre connaissance, les résultats définitifs de cet essai n'ont pas encore été publiés. Alors que les traitements anti-angiogéniques ont une efficacité clairement reconnue dans le cancer du rein métastatique, leurs résultats dans le cancer prostatique ne sont pas encore disponibles

aujourd'hui. Ils représentent toutefois une des principales voies de recherche dans ce domaine.

Traitement du cancer prostatique non métastatique

Pour le cancer prostatique localisé, il existe trois options thérapeutiques validées dont l'efficacité à long terme est reconnue: la prostatectomie radicale, la radiothérapie externe, et la curiethérapie. L'efficacité de ces trois traitements est en constante amélioration, en raison à la fois d'une meilleure sélection des patients et d'une meilleure maîtrise technique. La prostatectomie radicale, par exemple, est aujourd'hui associée à un taux réduit de récurrences à long terme. L'analyse de la littérature montre que dans des centres experts, la prostatectomie radicale s'accompagne de taux de survie spécifique à 10 ans supérieurs à 95%, et de taux de survie globale supérieurs à 80% [Hull, 2002; Han, 2003; Roehl, 2004]. Dans le cancer prostatique non métastatique, le problème essentiel n'est donc pas, comme dans le cancer métastatique, de prolonger la survie des patients de quelques mois. Il est d'optimiser la sélection des patients pour leur proposer le traitement qui aura les meilleures chances d'apporter une guérison définitive. Tout l'enjeu, dans cette situation, consiste à distinguer les cancers strictement intra-capsulaires de ceux qui ont une extension extra-prostatique. En effet, les cancers intra-capsulaires (stades pT1-T2) sont associés à un taux très faible de récurrence biologique après traitement local. À l'inverse, les cancers extra-capsulaires (stade \geq pT3) récidivent dans plus de 50% des cas en l'absence de traitement adjuvant.

Aujourd'hui, les principaux critères de récurrence biologique et de survie à long terme après prostatectomie radicale sont le PSA préopératoire, le stade clinique, le score de Gleason, le stade pathologique du cancer sur la pièce opératoire, et le statut des marges chirurgicales [Hull, 2002; Han, 2003; Roehl, 2004]. La définition d'une marge chirurgicale positive est la

présence de cellules cancéreuses au contact de la zone de section chirurgicale. Le stade pathologique est lui-même un facteur prédictif indépendant des marges chirurgicales. Dans les séries récentes, les taux de marges chirurgicales positives sont compris entre 2,1% et 6,9% pour les stades pT2a, 9,9% et 18,6% pour les stades pT2b, 25,2% et 30% pour les stades pT3a, et 34% et 42% pour les stades pT2b [Guillonnet, 2003; Rassweiler, 2005]. Or, en cas de marges chirurgicales positives, le risque de récurrence biologique dans les deux ans suivant la prostatectomie radicale est d'environ 50% [D'Amico, 1995]. Il a été récemment montré qu'en cas de marges chirurgicales positives, le risque de récurrence biologique est multiplié par 3,7 [Karakiewicz, 2005].

Taux de survie à 10 ans après prostatectomie radicale rétropubienne.

| Référence | Nombre de patients | Suivi (mois) | Survie spécifique (%) | Survie sans progression (%) | Survie globale (%) |
|-------------|--------------------|--------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|
| Hull, 2002 | 1000 | 53,2 | 97,6 | 75 | 86,6 |
| Han, 2003 | 2091 | 70,8 | 96 | 72 | - |
| Roehl, 2004 | 3478 | 65 | 97 | 68 | 83 |

Taux de marges chirurgicales positives en fonction du stade pathologique.

| Référence | Nombre de patients | Stade pathologique | Marges positives |
|------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| Guillonnet, 2003 | 1000 | pT2a : 20,3% | 6,9% |
| | | pT2b : 57,2% | 8,6% |
| | | pT3a : 14,2% | 30% |
| | | pT3b : 8,3% | 34% |
| Rassweiler, 2005 | 500 | pT2a : 17,9% | 2,1% |
| | | pT2b : 56,9% | 9,9% |
| | | pT3a : 21,4% | 25,2% |
| | | pT3b : 3,8% | 42% |

Toute la difficulté consiste donc, avant d'envisager le traitement d'un cancer prostatique non métastatique, d'en estimer le risque d'extension loco-régionale. En cas d'extension extra-capsulaire, le risque de marges chirurgicales positives après prostatectomie radicale est élevé, et le risque de récurrence biologique est d'environ 50%. De même, le risque de récurrence après radiothérapie externe ou après curiethérapie devient élevé si le cancer est extra-prostatique. En conséquence, la suspicion d'une extension extra-capsulaire sur le bilan pré-thérapeutique, notamment sur l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) endorectale, représente pour la majorité des auteurs une contre-indication à la curiethérapie et à la radiothérapie externe exclusive. Les patients chez qui une extension extra-capsulaire est prouvée lors du bilan pré-thérapeutique, soit formellement par la présence de cancer dans la graisse péri-prostatique sur les biopsies prostatiques (stade T3 biopsique), soit indirectement par l'IRM (stade T3 radiologique), ne relèvent donc pas, en théorie, d'un traitement local exclusif. Le traitement de référence est alors basé sur l'association radiothérapie pelvienne et hormonothérapie. Ce traitement est associé, dans les cancers prostatiques extra-capsulaires

mais non métastatiques (stade localement avancé), à un taux de survie sans progression à 10 ans d'environ 60%, et à un taux de survie globale à 10 ans de 75% [Bolla, 2002].

En résumé, pour choisir le traitement optimal d'un cancer prostatique non métastatique, il est indispensable de pouvoir distinguer les cancers localisés à la glande prostatique de ceux qui ont une extension extra-capsulaire. Les cancers strictement localisés à la prostate peuvent être traités par prostatectomie radicale, radiothérapie externe exclusive, ou curiethérapie avec un faible taux de récurrence. Les cancers extra-capsulaires relèvent en général d'une association radiothérapie et hormonothérapie.

Facteurs pré-opératoires prédictifs de l'extension loco-régionale du cancer prostatique

Les facteurs qui permettent d'estimer l'extension extra-capsulaire d'un cancer prostatique sont multiples. L'étude de Tsuzuki, qui a inclus 2660 patients opérés, a montré que les facteurs prédictifs de l'extension extra-capsulaire sur pièce de prostatectomie radicale sont le PSA pré-opératoire (avec un seuil de 10 ng/ml), le score de Gleason sur les biopsies (seuil de 7), le pourcentage de biopsies envahies (seuil de 33%), et le pourcentage de tissu envahi par biopsie positive (seuil de 20%) [Tsuzuki, 2005]. De nombreuses études ont confirmé l'importance de ces facteurs pour stadifier le cancer. À partir de ces critères, certains auteurs ont élaboré des tables ou des nomogrammes qui aident à prédire le risque d'extension extra-capsulaire [Partin, 2001; Stephenson, 2006]. Il est classique de distinguer trois situations: risque faible d'extension extra-capsulaire (PSA \leq 10ng/ml, Gleason \leq 6, et pourcentage de biopsies positives \leq 20%), risque modéré (PSA \leq 10ng/ml, Gleason 6 ou 7, et pourcentage de biopsies positives entre 20 et 50%), et risque élevé (PSA $>$ 10 ng/ml, Gleason \geq 8, ou nombre de biopsies positives \geq 50%).

Estimation du risque d'extension extra-capsulaire.

| | Risque faible | Risque modéré | Risque élevé |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| PSA total | ≤ 10 | ≤ 10 | > 10 |
| Score de Gleason | ≤ 6 | 6-7 | ≥ 8 |
| % de biopsies positives | ≤ 20% | 20 – 50% | ≥ 50% |

D'autre part, l'IRM endorectale permet de visualiser la capsule prostatique et les tissus péri-prostatiques. Un foyer cancéreux dans la prostate peut se voir sous la forme d'un hyposignal en séquence T2. Une extension extra-capsulaire se traduit par une interruption du liseré capsulaire, une hypodensité dans la graisse péri-prostatique, une extension au sphincter strié ou aux bandelettes vasculo-nerveuses. Une atteinte des vésicules séminales se traduit par une désorganisation de leur architecture, et une atteinte ganglionnaire par la présence d'adénopathies pelviennes [Cornud, 2006]. Bien que la valeur de cet examen soit controversée, de nombreuses études suggèrent que l'IRM permet d'optimiser la stadification du cancer prostatique. Par exemple, Nakashima et al ont trouvé, dans une série de 95 patients opérés pour un cancer prostatique cliniquement localisé, que l'IRM seule avait une sensibilité de 57% et une spécificité de 82% pour détecter une extension extra-capsulaire [Nakashima, 2004]. Des auteurs ont également suggéré que la sensibilité de l'IRM endorectale pour détecter une atteinte des vésicules séminales ou une atteinte ganglionnaire est supérieure à 90% [Harisinghani, 2003; Sala, 2006]. Une IRM endorectale est recommandée, pour certains, lorsque le risque d'extension extra-capsulaire est significatif, c'est-à-dire si le PSA total est supérieur à 10 ng/ml, le score de Gleason supérieur à 6, et/ou si plus de 20% des biopsies sont

envahies. Il est probable que les progrès de l'IRM endorectale permettront, en couplant cet examen aux autres facteurs prédictifs de l'extension du cancer, d'optimiser la stadification pré-thérapeutique du cancer prostatique.

Aujourd'hui, malgré une sélection de plus en plus rigoureuse des patients, le taux des tumeurs extra-capsulaires après prostatectomie radicale (stade pathologique \geq pT3) reste supérieur à 20% [Guillonnet, 2003; Rassweiler, 2005]. Certes, ces résultats s'expliquent en partie par un choix délibéré de certains praticiens et de leurs patients. Chez les patients particulièrement jeunes qui ont une forte suspicion de cancer extra-prostatique, il n'est pas illogique de proposer malgré le risque élevé de marges positives une prostatectomie radicale. Le patient doit être prévenu de la possibilité de récurrence biologique. Cette notion est aujourd'hui discutée, certaines équipes suggérant que la prostatectomie radicale pourrait représenter une étape du traitement et non pas un traitement exclusif. Mais le taux élevé de cancers extra-prostatiques s'explique également par l'impossibilité de prédire avec certitude l'extension extra-capsulaire.

Facteurs post-opératoires de récurrence biologique après prostatectomie radicale

Lorsque le traitement consiste en une prostatectomie radicale, les informations apportées par l'analyse histologique de la pièce opératoire sont fondamentales pour estimer l'agressivité du cancer et son risque de récurrence. De même qu'il existe des nomogrammes pré-thérapeutiques pour prédire l'extension du cancer prostatique, certaines équipes ont proposé des nomogrammes pour prédire le risque de récurrence et la survie après prostatectomie radicale [Kattan, 1999; Blute, 2001]. Les facteurs post-opératoires les plus importants sont le score de Gleason sur la pièce de prostatectomie, le stade pathologique de la tumeur, et le statut des marges chirurgicales [Khan, 2003]. Par exemple, D'Amico et al ont montré que le taux de

survie sans récurrence à 5 ans était de 90% en cas de cancer intra-capsulaire avec marges négatives, de 69% en cas d'extension extra-capsulaire focale avec marges négatives, de 45% en cas d'extension extra-capsulaire étendue avec marges négatives, et de 33% en cas d'extension extra-capsulaire avec marges positives [D'Amico, 2000].

En cas de tumeur à haut risque de récurrence (score de Gleason ≥ 8 , stade pathologique $> pT3a$ et/ou marges chirurgicales positives), certains auteurs recommandent un traitement complémentaire immédiat. Ce traitement consiste classiquement en une radiothérapie adjuvante [Teh, 2006]. Le bénéfice d'une hormonothérapie immédiate par anti-androgène seul, le bicalutamide, est en cours d'évaluation chez les patients à haut risque de récurrence après prostatectomie radicale [Mc Leod, 2006]. Le bénéfice d'un traitement adjuvant est controversé, car peu de données comparatives ont été publiées. De nombreux points restent à clarifier, comme la nature du traitement adjuvant optimal, le meilleur délai pour commencer ce traitement, et surtout les critères de sélection des patients qui vont bénéficier d'un traitement adjuvant.

Rôle potentiel du VEGF dans le cancer prostatique localisé

Très peu d'auteurs se sont intéressés au VEGF dans le cancer prostatique localisé. L'impact potentiel du VEGF à ce stade semble limité sur le plan thérapeutique, puisque plusieurs traitements permettant un contrôle satisfaisant de la maladie à long terme sont déjà disponibles. En revanche, le VEGF pourrait, en théorie, avoir deux rôles importants dans le cancer prostatique cliniquement localisé. D'une part, il pourrait aider à prédire l'extension du cancer avant traitement. Il aiderait alors à distinguer les cancers intra-capsulaires des cancers extra-capsulaires, donc à guider la décision thérapeutique. Pour prédire l'extension du cancer, deux méthodes d'analyse pré-thérapeutiques du VEGF pourraient être utilisées en pratique

courante: sa concentration plasmatique, et son expression tissulaire sur les biopsies prostatiques. D'autre part, le VEGF pourrait, chez les patients qui ont eu une prostatectomie radicale, aider à apprécier l'agressivité du cancer et à prédire le risque de progression tumorale. Cela pourrait intervenir dans l'indication éventuelle d'un traitement adjuvant. C'est alors l'expression tissulaire du VEGF sur la pièce opératoire qui serait utilisée.

Dans cette deuxième partie de notre travail, nous avons donc étudié la concentration plasmatique du VEGF chez des patients opérés pour un cancer prostatique cliniquement localisé. Nous avons également mesuré l'expression tissulaire du VEGF chez ces mêmes patients. L'objectif était de rechercher une corrélation entre le VEGF plasmatique avant prostatectomie radicale, l'expression du VEGF sur les pièces de prostatectomie radicale, et les facteurs pronostiques habituels du cancer prostatique: PSA, score de Gleason, stade pathologique, et marges chirurgicales.

2.2. Matériels et méthodes

Sélection des patients

Cent patients à qui une prostatectomie radicale a été réalisée consécutivement pour un cancer prostatique cliniquement localisé entre juin et novembre 2005 ont été inclus. Tous ces patients ont été opérés dans le service d'Urologie de l'hôpital Cochin. Le protocole de recherche a été validé auprès du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Cochin. Tous les patients ont donné leur consentement écrit. Ils avaient tous un cancer prostatique prouvé par des biopsies. Tous ont eu un bilan préopératoire incluant scanner abdomino-pelvien, scintigraphie osseuse, et IRM endorectale. Aucun n'avait de suspicion clinique ni radiologique de métastases à distance ou d'atteinte ganglionnaire au moment de la prostatectomie radicale. Aucun n'avait reçu une hormonothérapie, une radiothérapie pelvienne ou une chimiothérapie avant l'intervention. Chez tous les patients, un curage ilio-obturateur a été réalisé au moment de l'intervention. Les stades cliniques et pathologiques des cancers prostatiques ont été déterminés selon la classification TNM 2002.

Détermination des marqueurs circulants (PSA et VEGF)

Le sang était prélevé la veille de l'intervention, au moment de l'admission des patients dans le service. Pour chacun d'entre eux, deux tubes de 7 ml étaient prélevés. Un tube était adressé dans le service de Médecine nucléaire de l'hôpital pour le dosage sérique des différentes formes de PSA : PSA total, PSA libre, et PSA complexé (Bayer Immuno 1). L'autre tube, qui contenait de l'héparine, était adressé dans le service d'Immunologie biologique pour le dosage plasmatique du VEGF. Le sang était centrifugé à 2500g pendant 10 minutes, puis le plasma pauvre en plaquettes était retiré et placé dans un tube de 5 ml, conservé à -80° . Après décongélation, les mesures du VEGF se faisaient selon la méthode

décrite dans la première partie, par technique ELISA. L'anticorps anti-VEGF-A utilisé reconnaît les 5 isoformes du VEGF-A (Bender MedSystems, Vienne, Autriche).

Microarrays tissulaires

Les sections obtenues à partir des pièces de prostatectomie radicale ont été revues. Les zones représentatives de la tumeur avec le score de Gleason le plus élevé ont été circonscrites. Les microarrays ont été réalisés à l'aide d'un microarrayer manuel (Beecher Instruments, Alphelys). Des prélèvements de 0,6 mm ont été obtenus en double à partir des zones cerclées, puis transférés sur blocs de paraffine. Au total, huit blocs ont été obtenus, incluant les coordonnées d'origine de chaque prélèvement.

Immunohistochimie

Le marquage immunohistochimique a été réalisé à partir des sections déposées sur des lames de verre recouvertes de poly-L-Lysine. Avant incubation avec les anticorps primaires, les sections déparaffinées et rehydratées ont été incubées avec un bloqueur avidine/biotine (laboratoires Vector, Burlingame, USA), et les récepteurs bloqués par du sérum humain à 5%. L'extraction antigénique a été obtenue par chauffage des lames à 97° dans une solution tampon citratée pendant 5 minutes. Un anticorps anti-VEGF-A (clone sc-152; Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA) a été utilisé à la dilution de 1/200 pendant une heure. Après rinçage dans du PBS, l'anticorps secondaire était appliqué pendant 30 minutes. Pour voir la réaction, les tranches étaient incubées avec un substrat chromogène (Dakocytomation, Copenhague, Danemark) pendant 15 minutes à température ambiante. Les sections étaient ensuite recouvertes de Glycergel (Dakocytomation) et analysées sous microscopie optique conventionnelle. Des tissus de cancer mammaire ont été utilisés comme contrôles positifs.

Évaluation de l'immunomarquage

Un système semi-quantitatif a été utilisé pour l'évaluation du marquage. Deux anatomo-pathologistes non informés des données cliniques ont lu séparément les lames. Le score d'intensité du marquage était classé en 0 (marquage nul), 1 (marquage faible), 2 (marquage modéré), ou 3 (marquage fort). Le score de pourcentage du marquage était classé en 0 (aucune cellule positive), 1 (moins de 33% de cellules positives), 2 (entre 33% et 66% de cellules positives), et 3 (plus de 66% de cellules positives). En raison de la nature double des microarrays, deux valeurs étaient obtenues pour chaque patient. La plus forte valeur était retenue pour l'analyse finale. L'index final de marquage était obtenu en additionnant le score d'intensité et le score de pourcentage du marquage. L'expression du VEGF-A était considérée comme soit faible (index final ≤ 3), soit élevée (index final > 3). Des contrôles négatifs ont été obtenus à partir de tissu prostatique bénin, et des témoins positifs à partir de tissu hépatique.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel SAS, version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Les données quantitatives ont été exprimées en valeurs médianes. Les tests de Wilcoxon et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer les valeurs de PSA sérique et de VEGF-A plasmatique en fonction des données pré-opératoires, post-opératoires, et de l'expression tissulaire du VEGF-A. Le coefficient de corrélation de Spearman a été utilisé pour étudier les associations entre les variables quantitatives. Les associations entre le VEGF-A tissulaire et les variables qualitatives ont été recherchées par le test exact de Fisher. La signification statistique a été définie par une valeur de $p < 0,05$.

2.3. Résultats

Le taux plasmatique médian de VEGF-A était de 145,5 pg/ml (extrêmes 0-4100). L'expression tissulaire du VEGF-A a pu être déterminée dans 89 cas. Elle était faible chez 53 patients (59,6%) et élevée chez 36 patients (40,4%). Il n'y avait aucune association entre les valeurs de VEGF-A (ni dans le plasma ni dans le tissu prostatique) et l'âge des patients, le volume prostatique, ou les différentes formes de PSA sérique.

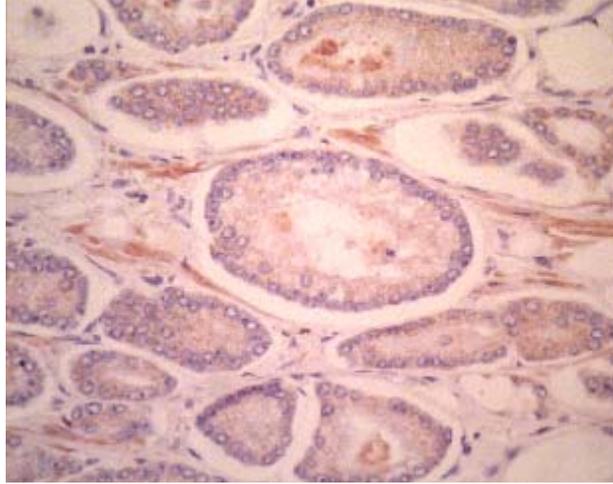
Il n'y avait pas d'association entre le VEGF-A plasmatique et l'expression tissulaire du VEGF-A.

Associations entre les taux plasmatiques de VEGF-A et les autres variables quantitatives.

| | VEGF-A plasmatique r | p* |
|---------------------------|-------------------------------------|-----------|
| Âge | 0,12 | 0,22 |
| Volume prostatique | 0,07 | 0,46 |
| PSA total | 0,07 | 0,48 |
| PSA libre/total | 0,01 | 0,91 |
| PSA complexé | 0,07 | 0,51 |

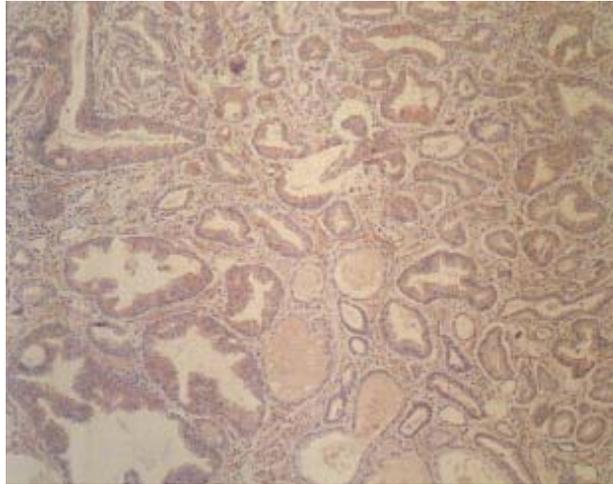
* Test de corrélation de Spearman

*Exemple de marquage faible au VEGF-A (score d'intensité 1)
grossissement X 400*

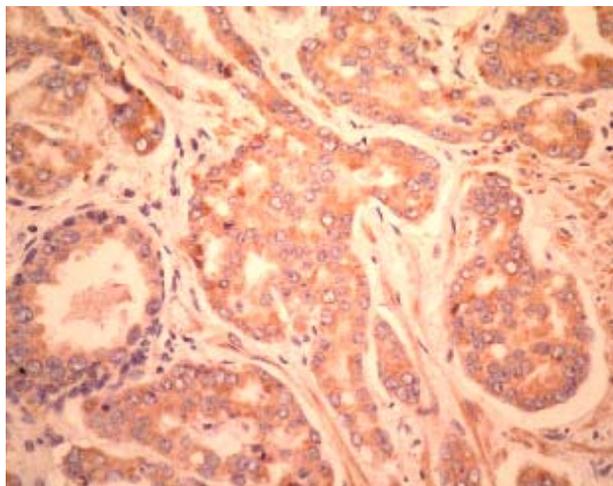


Exemple de marquage modéré au VEGF-A (score d'intensité 2)

grossissement X 200

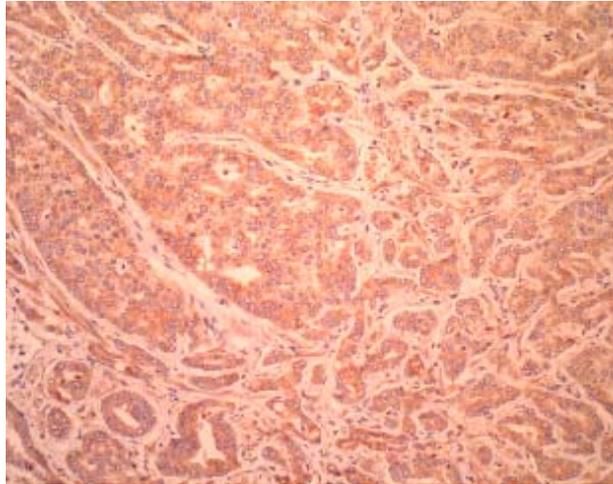


grossissement X 400

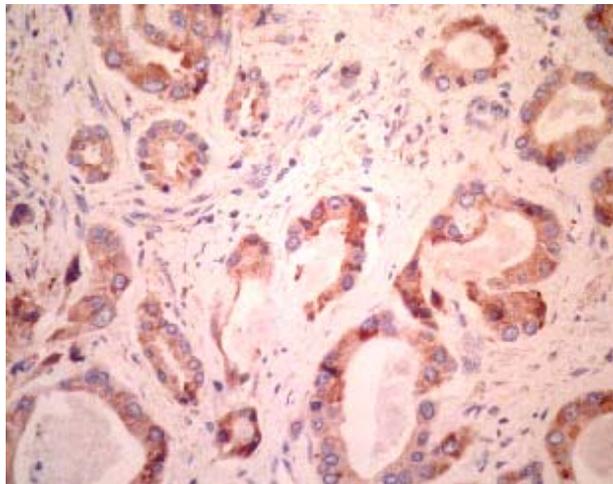


Exemple de marquage fort au VEGF-A (score d'intensité 3)

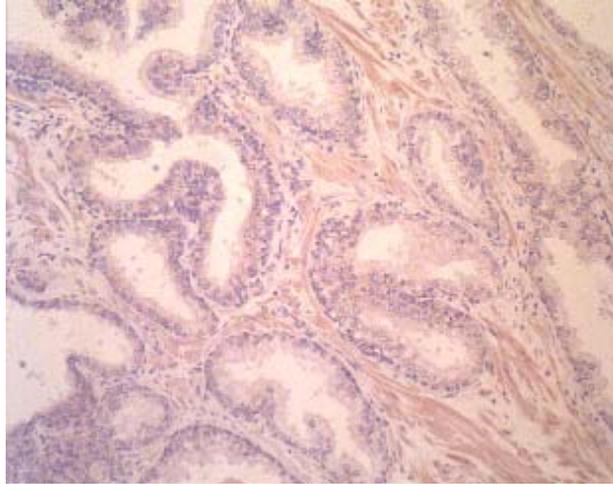
grossissement X 200



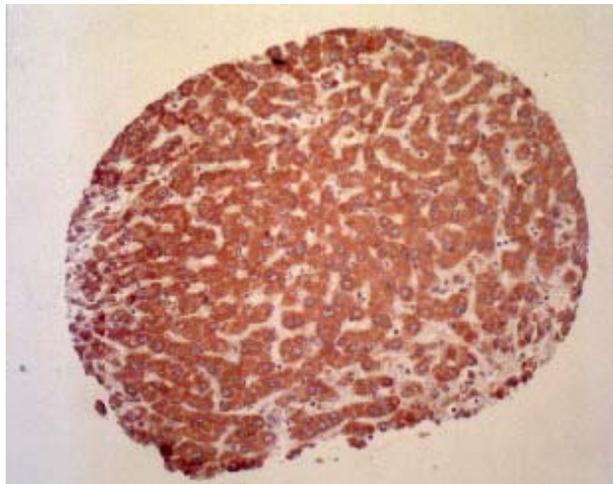
grossissement X 400



Contrôle négatif (tissu prostatique bénin)
grossissement X 200



Contrôle positif (tissu hépatique)
grossissement X 200



Associations entre l'expression tissulaire du VEGF-A et les variables quantitatives.

| | Expression faible du VEGF-A | Expression élevée du VEGF-A | p** |
|---------------------------------------|--|--|------|
| Âge* (années) | 62 | 63 | 0,42 |
| Volume prostatique* (gr) | 44 | 46 | 0,42 |
| PSA total* (ng/ml) | 5,5 | 5,6 | 0,28 |
| PSA libre/total* (%) | 14 | 11,5 | 0,19 |
| PSA complexé* (ng/mL) | 4,8 | 4,8 | 0,29 |
| VEGF-A plasmatique* (pg/mL) | 151 | 139 | 0,70 |

* Valeur médiane

** Test de Wilcoxon

Il n'y avait aucune association entre les taux plasmatiques de VEGF-A et les caractéristiques tumorales pré-opératoires. Sur les pièces de prostatectomie radicale, 52% des tumeurs avaient un score de Gleason ≤ 6 , et 64% étaient intra-capsulaires (stade pathologique pT2). Aucun patient n'avait d'envahissement ganglionnaire. Les taux plasmatiques de VEGF-A étaient plus bas chez les patients qui avaient un score de Gleason plus élevé ($p=0,04$). Cependant, il n'y avait pas d'association entre les taux plasmatiques de VEGF-A et le stade pathologique des tumeurs ($p=0,57$) ou le statut des marges chirurgicales ($p=0,48$).

Taux plasmatiques de VEGF-A en fonction des caractéristiques tumorales pré-opératoires.

| Facteurs pré-opératoires | n (%) | VEGF-A plasmatique Valeur médiane (pg/ml) |
|---|---------|---|
| Score de Gleason biopsique : | | |
| ≤ 6 | 59 (59) | 182 |
| 3+4 | 24 (24) | 80,5 |
| 4+3 | 11 (11) | 71 |
| > 7 | 6 (6) | 64 |
| p* | | 0,13 |
| Stade clinique du cancer : | | |
| T1c | 71 (71) | 163 |
| T2a | 23 (23) | 89 |
| T2b | 6 (6) | 460 |
| p* | | 0,11 |
| Pourcentage de biopsies envahies : | | |
| < 25% | 34 (34) | 152 |
| 25-49% | 34 (34) | 137,5 |
| 50-74% | 25 (25) | 134 |
| ≥ 75% | 7 (7) | 182 |
| p* | | 0,96 |
| IRM endorectale : | | |
| absence d'EEC** | 88 (88) | 139 |
| suspicion d'EEC** | 12 (12) | 163 |
| p* | | 0,75 |

* Test de Kruskal-Wallis

** Extension extra-capsulaire

Taux plasmatiques de VEGF-A en fonction des caractéristiques tumorales post-opératoires.

| Facteurs post-opératoires | n (%) | VEGF-A plasmatique Valeur médiane (pg/ml) |
|---------------------------------------|---------|---|
| Score de Gleason : | | |
| ≤ 6 | 52 (52) | 189 |
| 3+4 | 24 (24) | 139 |
| 4+3 | 16 (16) | 62,5 |
| > 7 | 6 (6) | 112 |
| p* | | 0,04 |
| Stade pathologique du cancer : | | |
| pT0 | 2 (2) | 122,5 |
| pT2a | 6 (6) | 264,5 |
| pT2b | 22 (22) | 139 |
| pT2c | 34 (34) | 125 |
| pT3a | 34 (34) | 152,5 |
| pT3b | 2 (2) | 218,5 |
| p* | | 0,57 |
| Marges chirurgicales : | | |
| positives | 19 (19) | 135 |
| negatives | 81 (81) | 154 |
| p* | | 0,48 |

* Test de Kruskal–Wallis

Il n'y avait aucune association entre l'expression tissulaire du VEGF-A sur les pièces de prostatectomie radicale et les caractéristiques tumorales pré-opératoires. Il n'y avait pas d'association entre l'expression tissulaire du VEGF-A et les caractéristiques tumorales post-opératoires, à l'exception du score de Gleason.

L'expression tissulaire du VEGF-A était significativement plus élevée chez les patients ayant un score de Gleason plus élevé (p=0,01). Cependant, il n'y avait pas d'association entre l'expression tissulaire du VEGF-A et le stade pathologique du cancer (p=0,38) ou le statut des marges chirurgicales (p=1).

Expression tissulaire du VEGF-A en fonction des caractéristiques tumorales pré- et post-opératoires.

| Caractéristiques tumorales | Expression faible du VEGF-A n (%) | Expression élevée du VEGF-A n (%) |
|--|---|---|
| Score de Gleason biopsique : | | |
| ≤ 6 | 36 (67,9) | 16 (44,4) |
| 3+4 | 10 (18,9) | 11 (30,5) |
| 4+3 | 4 (7,5) | 6 (16,7) |
| > 7 | 3 (5,7) | 3 (8,4) |
| p* | | 0,87 |
| Stade clinique du cancer : | | |
| T1c | 40 (75,4) | 23 (63,9) |
| T2a | 10 (18,9) | 10 (27,8) |
| T2b | 3 (5,7) | 3 (8,3) |
| p* | | 0,47 |
| Pourcentage de biopsies positives : | | |
| < 25% | 17 (32,2) | 10 (27,8) |
| 25-49% | 19 (35,8) | 11 (30,6) |
| 50-74% | 13 (24,5) | 12 (33,3) |
| ≥ 75% | 4 (7,5) | 3 (8,3) |
| p* | | 0,84 |
| IRM endorectale : | | |
| absence d'EEC** | 48 (90,6) | 29 (80,6) |
| suspicion d'EEC** | 5 (9,4) | 7 (19,4) |
| p* | | 0,21 |
| Score de Gleason définitif : | | |
| ≤ 6 | 34 (64,2) | 12 (33,3) |
| 3+4 | 12 (22,6) | 12 (33,3) |
| 4+3 | 7 (13,2) | 7 (19,5) |
| > 7 | | 5 (13,9) |
| p* | | 0,01 |
| Stade pathologique du cancer : | | |
| pT2a | 3 (5,7) | 1 (2,8) |
| pT2b | 12 (22,6) | 7 (19,4) |
| pT2c | 22 (41,5) | 12 (33,3) |
| pT3a | 15 (28,3) | 15 (41,7) |
| pT3b | 1 (1,9) | 1 (2,8) |
| p* | | 0,38 |
| Marges chirurgicales : | | |
| positives | 10 (18,9) | 7 (19,4) |
| negatives | 43 (81,1) | 29 (80,6) |
| p* | | 1 |

* Test exact de Fisher

** Extension extra-capsulaire

Seulement deux facteurs étaient associés au stade pathologique du cancer : le rapport PSA libre/total, et le score de Gleason définitif. Le rapport PSA libre/total médian était de 14% chez les patients ayant une tumeur pT2, versus 11,5% chez les patients ayant une tumeur pT3 (p=0,04). Les taux respectifs de tumeurs extra-capsulaires chez les patients ayant un score de Gleason définitif ≤ 6 , 3+4, 4+3, et > 7 étaient de 19,2%, 50%, 56,3%, et 83,3% (p=0,002).

Le seul facteur associé au statut des marges chirurgicales était le stade pathologique de la tumeur. Parmi les patients qui avaient des marges chirurgicales positives, 26,3% avaient une tumeur pT2 et 73,7% avaient une tumeur pT3 (p=0,001).

2.4. Commentaires

Nous n'avons trouvé aucune association entre le taux plasmatique pré-opératoire de VEGF-A et les différentes formes de PSA, le stade clinique du cancer prostatique, l'extension extra-capsulaire en IRM endorectale, le score de Gleason sur les biopsies, le stade pathologique du cancer, ou les marges chirurgicales. Dans notre expérience, le VEGF plasmatique n'est donc pas corrélé aux facteurs pronostiques classiques du cancer prostatique. Par extension, ces résultats suggèrent que le VEGF plasmatique n'a pas de valeur pour estimer l'extension et l'agressivité du cancer prostatique cliniquement localisé.

En revanche, nous avons trouvé que l'expression tissulaire du VEGF-A sur pièce de prostatectomie radicale était significativement associée au score de Gleason définitif. Plus le score de Gleason était élevé, plus l'expression tissulaire du VEGF-A était importante. Bien qu'aucune association avec le stade pathologique ou les marges chirurgicales n'ait été retrouvée, ce résultat suggère que l'expression tissulaire du VEGF pourrait avoir un rôle pronostique dans le cancer prostatique localisé.

Difficultés d'interprétation

Un de nos résultats est difficile à expliquer. Nous avons trouvé que les taux plasmatiques de VEGF-A étaient significativement plus bas chez les patients qui avaient un score de Gleason définitif plus élevé ($p=0,04$). Cependant, ce résultat est à interpréter avec prudence. En effet, la valeur de p est à la limite de la significativité. D'autre part, la majorité des patients avaient un score de Gleason définitif égal à 6. Sur les 100 patients, seulement 6

avaient un score de Gleason > 7 . Il est logique de penser qu'avec un taux plus important de scores de Gleason élevés, la différence n'aurait pas été statistiquement significative.

Limites de l'étude

Cette étude est limitée par l'absence de données sur le devenir carcinologique des patients opérés. Pour analyser l'impact pronostique réel du VEGF circulant ou tissulaire, il faut rapporter les différentes mesures du PSA durant le suivi post-opératoire. Cette étude a seulement montré une association entre le VEGF-A tissulaire et le score de Gleason définitif. Elle a suggéré que le VEGF avait un impact pronostique, mais sans montrer qu'il influençait le risque de récurrence biologique après l'intervention. Il s'agit donc d'une étude préliminaire.

Une étude du suivi carcinologique aurait nécessité un plus grand nombre de patients et un suivi de plusieurs années. En effet, grâce à une meilleure sélection des patients et à de nombreuses améliorations techniques, les taux de récurrence biologique et de progression tumorale après prostatectomie radicale sont en constante diminution. Dans les séries récentes de prostatectomie radicale issues de centres experts, les taux de récurrence biologique à 5 ans sont inférieurs à 15% [Rassweiler, 2006]. D'autre part, les récurrences biologiques après prostatectomie radicale surviennent souvent de façon retardée, plusieurs années après l'intervention. Swanson a récemment rapporté, dans une série de 131 patients opérés avec un recul d'au moins 22,5 ans, que le délai médian avant récurrence biologique était de 7 ans [Swanson, 2002]. Notre étude est toujours ouverte. Elle va être poursuivie à plus large échelle pour analyser prospectivement le devenir carcinologique des patients. L'impact exact du VEGF tissulaire sur le risque de récurrence biologique après prostatectomie radicale ne sera connu que dans plusieurs années.

Comparaison avec la littérature

Deux études antérieures ont analysé l'association entre le taux plasmatique de VEGF-A et les caractéristiques du cancer prostatique cliniquement localisé [Duque, 1999; Shariat, 2004]. Duque et al ont étudié les taux plasmatiques de VEGF-A chez 54 patients ayant un cancer prostatique localisé, 26 patients ayant un cancer prostatique métastatique, et 26 sujets contrôles [Duque, 1999]. Dans cette étude, seuls le stade clinique des cancers et le score de Gleason sur les biopsies étaient analysés. En revanche, aucune donnée anatomo-pathologique n'était rapportée à partir des pièces de prostatectomie radicale. Les résultats de cette étude sont similaires aux nôtres. En effet, il n'y avait pas d'association entre le taux plasmatique de VEGF-A et le score de Gleason sur les biopsies ($p=0,18$). D'autre part, en ne considérant que les patients qui avaient un cancer cliniquement localisé, le taux plasmatique de VEGF-A n'était pas associé au stade clinique du cancer ($p=0,54$). Enfin, il n'y avait pas d'association linéaire entre le VEGF-A plasmatique et le taux sérique de PSA total ($p=0,22$). Les patients qui avaient un PSA total supérieur à 20 ng/ml avaient des valeurs plasmatiques de VEGF-A plus élevées ($p<0,001$). Cependant, parmi ces patients, certains étaient métastatiques. Le résultat principal de cette étude était l'association très significative entre le VEGF-A plasmatique et la présence de métastases ($p<0,001$). D'après les auteurs de l'étude, ces résultats suggèrent donc que le VEGF plasmatique est un marqueur du cancer prostatique métastatique, mais non du cancer prostatique localisé.

L'étude de Shariat et al apporte plus d'informations, car elle a inclus 215 patients opérés d'un cancer cliniquement localisé [Shariat, 2004]. Dans cette étude, le score de Gleason, le stade pathologique et les marges chirurgicales sur les pièces de prostatectomie radicale ont été analysés. Certains résultats sont similaires aux nôtres. En particulier, il n'y avait pas d'association entre le taux plasmatique de VEGF-A et le stade clinique du cancer

($p=0,054$) ou les marges chirurgicales ($p=0,116$). En revanche, d'autres résultats sont différents des nôtres. En effet, les auteurs ont trouvé une association significative entre le VEGF-A plasmatique et le score de Gleason sur les biopsies ($p=0,036$), le score de Gleason définitif ($p=0,02$), et l'extension extra-capsulaire sur la pièce opératoire ($p=0,047$). Le taux médian de VEGF-A plasmatique était de 9,63 pg/ml en cas de tumeur intra-capsulaire, alors qu'il était de 12,38 pg/ml en cas de tumeur extra-capsulaire.

Trois raisons pourraient expliquer les différences de résultats entre notre étude et celle de Shariat et al. La première concerne l'anticorps utilisé pour le dosage du VEGF-A. Nous avons utilisé un anticorps qui reconnaît toutes les isoformes du VEGF-A, alors que Shariat et al ont utilisé un anticorps qui n'en reconnaît que deux. La deuxième concerne le nombre de patients inclus. Il est possible que notre étude, ayant inclus moins de patients que celle de Shariat et al, ait moins de puissance statistique. La troisième concerne la sélection des patients. Notre étude a inclus des tumeurs moins agressives que celle de Shariat et al. En effet, dans notre étude, 71% des tumeurs étaient de stade T1c, aucune n'était associée à un envahissement ganglionnaire, et 53% avaient un score de Gleason définitif ≤ 6 . Dans l'étude de Shariat et al, 45,1% des tumeurs étaient de stade T1c, 9,7% étaient associées à un envahissement ganglionnaire, et 42,7% seulement avaient un score de Gleason définitif ≤ 6 . Ainsi, les critères de sélection semblent avoir été moins stricts dans l'étude de Shariat et al, qui a probablement inclus une certaine proportion de tumeurs localement avancées.

En ce qui concerne l'expression tissulaire du VEGF-A, deux études antérieures ont analysé son association avec les caractéristiques du cancer prostatique [Strohmeyer, 2000; West, 2001]. L'étude de Strohmeyer et al a porté sur 55 pièces histologiques de cancer prostatique [Strohmeyer, 2000]. Dans cette étude, l'expression tissulaire du VEGF-A était

significativement associée au stade du cancer et au score de Gleason. De même, dans l'étude de West et al, qui a porté sur 67 cas de cancer prostatique, l'expression du VEGF-A était corrélée au stade du cancer et au score de Gleason [West, 2001]. Dans cette dernière étude, l'expression tissulaire du VEGF-A était également corrélée au taux de PSA sérique. Ces deux études ont donc, comme la notre, rapporté une association entre l'expression tissulaire du VEGF-A et le score de Gleason. Elles ont également trouvé, contrairement à la notre, une association avec le stade du cancer prostatique. Cependant, le stade étudié était le stade clinique, en sachant que ces deux études étaient très hétérogènes et avaient inclus des cancers métastatiques. Aucune conclusion ne peut donc être tirée de ces deux études concernant la valeur du VEGF-A tissulaire dans le cancer prostatique localisé. À notre connaissance, notre étude est la seule à avoir analysé l'expression tissulaire du VEGF-A uniquement sur des pièces histologiques de cancer cliniquement localisé.

2.5. Conclusion

Nous avons trouvé que le taux plasmatique de VEGF-A n'est pas associé aux facteurs pronostiques connus du cancer prostatique. En revanche, l'expression tissulaire du VEGF-A sur la pièce de prostatectomie radicale est associée au score de Gleason de la tumeur. L'expression du VEGF-A est plus importante lorsque le score de Gleason est élevé. Ces résultats suggèrent que le VEGF plasmatique n'a pas de valeur pronostique dans le cancer prostatique cliniquement localisé, et qu'il ne peut pas être utilisé pour prédire l'extension ou l'agressivité du cancer. En revanche, l'expression tissulaire du VEGF pourrait avoir un impact pronostique, et être utilisée comme élément prédictif de l'agressivité du cancer. Ces résultats restent à confirmer à plus large échelle, en incluant l'analyse du devenir carcinologique des patients.

3. IMPACT PRONOSTIQUE DU VEGF-A ET DU VEGFR-1 TISSULAIRE DANS LE CANCER PROSTATIQUE LOCALISÉ

Rationnel

Les facteurs qui influencent le risque de récurrence biologique, et par conséquent le risque de progression métastatique après prostatectomie radicale, ont été discutés dans la première partie de ce travail. Il s'agit essentiellement du PSA initial, du stade clinique du cancer, du score de Gleason, du stade pathologique, et du statut des marges chirurgicales. Tous ces facteurs ont donc un impact pronostique dans le cancer prostatique cliniquement localisé.

L'étude précédente a montré une corrélation entre l'expression tissulaire du VEGF-A et le score de Gleason chez 100 patients opérés par prostatectomie radicale. Même si l'expression tissulaire du VEGF-A n'était associée à aucun des autres facteurs pronostiques (PSA, stade clinique, stade pathologique et marges chirurgicales), son association avec le score de Gleason pourrait lui conférer une valeur pronostique dans le cancer prostatique localisé. Ainsi, l'expression tissulaire du VEGF-A pourrait représenter un facteur prédictif additionnel de récurrence biologique et de progression métastatique après traitement du cancer prostatique localisé. Pour confirmer cette hypothèse, il était nécessaire de mener une étude qui intègre le devenir clinique des patients après traitement.

Récepteurs du VEGF et VEGFR-1

Très peu de données sont connues concernant les récepteurs du VEGF. Trois

récepteurs ont été identifiés à ce jour : VEGFR-1 (ou Flt-1), VEGFR-2 et VEGFR-3. VEGF-A se lie à VEGFR-1 et à VEGFR-2 [Hicklin, 2005]. Ces deux récepteurs favorisent l'angiogénèse. Cependant, leurs fonctions respectives, ainsi que leurs interactions, n'ont pas encore été clairement identifiées. VEGFR-1 active VEGFR-2 dans certaines situations, alors qu'il aurait un effet de contrôle négatif dans d'autres situations. Les propriétés de VEGFR-1 sont mieux connues que celles de VEGFR-2 : VEGFR-1 participe au recrutement de cellules endothéliales et active certains facteurs de croissance à partir des cellules endothéliales hépatiques [LeCouter, 2003].

Certaines études histologiques ont montré une surexpression du VEGFR-1 dans le tissu prostatique malin [Ferrer, 1999 ; Kollerman, 2001]. L'expression du VEGFR-1 sur les cellules prostatiques malignes elles-mêmes suggère que le VEGF-A pourrait avoir une fonction autocrine [Kollerman, 2001]. De plus, une méthylation aberrante du gène VEGFR-1 est souvent présente dans le cancer prostatique [Yamada, 2003]. Ces données font donc penser que le VEGFR-1 joue un rôle positif, direct ou indirect, dans le développement du cancer prostatique. Or, aucun auteur n'a étudié la valeur pronostique du VEGFR-1 chez des patients traités pour un cancer prostatique.

Dans cette deuxième partie, nous avons donc analysé la corrélation entre l'expression tissulaire du VEGF-A, couplée à celle du VEGFR-1, et le devenir des patients après prostatectomie radicale. L'objectif était d'étudier la valeur pronostique du VEGF-A et de son récepteur principal, le VEGFR-1, dans le cancer prostatique localisé.

3.2. Poursuite de l'étude antérieure

3.2.a. Matériels et méthodes

Suivi des patients

Les 100 patients inclus dans l'étude précédente ont été suivis par dosage du PSA sérique tous les 3 mois pendant un an, puis tous les 6 mois. La récurrence biologique après prostatectomie radicale était définie par une ascension post-opératoire du PSA $\geq 0,2$ ng/ml, confirmée par un deuxième dosage.

Immunohistochimie

Les microarrays tissulaires ont été repris pour mesurer l'expression du VEGFR-1. La méthode utilisée était la même que pour le VEGF-A. L'anticorps utilisé pour le VEGFR-1 était l'anti-Flt-1 AF321 (R&D, Minneapolis, USA), à la dilution de 1/20 pendant trois heures.

Évaluation de l'immunomarquage

Deux anatomo-pathologistes non informés des données cliniques ont lu séparément les lames. Le score d'intensité du marquage était classé en 0 (marquage nul), 1 (marquage faible), 2 (marquage modéré), ou 3 (marquage fort). Comme pour l'expression du VEGF-A, deux valeurs étaient obtenues pour chaque patient. La plus forte valeur était retenue pour l'analyse. Des contrôles négatifs ont été obtenus à partir de tissu prostatique bénin, et des témoins positifs étaient issus de cancers mammaires.

Analyses statistiques

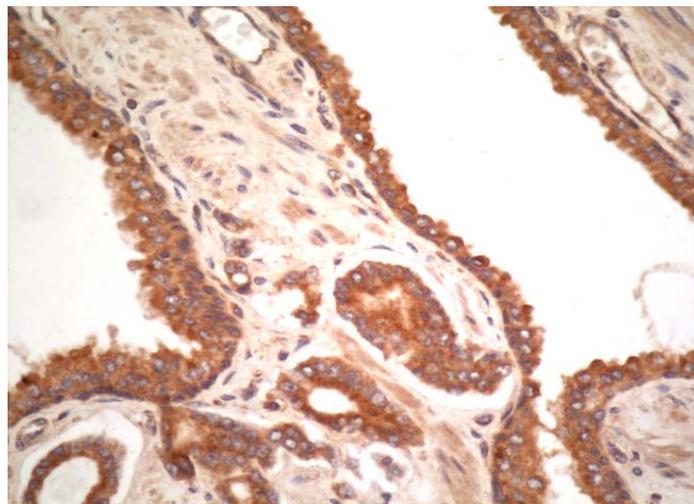
Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les scores d'intensité du VEGF-A et du VEGFR-1 entre les patients ayant récidivé et ceux n'ayant pas récidivé.

3.2.b. Résultats

Aucun patient n'a été perdu de vue. Après un suivi médian de 22 mois suivant la prostatectomie radicale, 14 patients ont eu une récurrence biologique du cancer prostatique. Parmi eux, 10 ont eu une radiothérapie complémentaire, et 4 ont été surveillés en raison d'un temps de doublement du PSA élevé. À la fin du suivi, aucun patient n'avait de signe clinique de progression métastatique.

Exemple de marquage fort au VEGFR-1 (score d'intensité 3)

grossissement X 400



Les taux plasmatiques de VEGF-A n'étaient pas significativement différents entre les patients ayant récidivé et ceux n'ayant pas récidivé.

De même, les scores d'intensité de marquage tissulaire du VEGF-A, et les scores d'intensité de marquage tissulaire du VEGFR-1 étaient similaires entre les deux groupes de patients.

Analyse de corrélation entre VEGF-A plasmatique, expression du VEGF-A, expression du VEGFR-1 et risque de récurrence biologique.

| | Récidive | Pas de récurrence | Mann-Whitney (z) | p |
|---|-----------------|--------------------------|---------------------|------|
| VEGF-A plasmatique (taux médian) | 160 [0-4100] | 140 [0-4005] | 0,51 | 0,25 |
| Expression du VEGF-A (score médian) | 4 [0-5] | 4 [0-6] | 0,39 | 0,38 |
| Expression du VEGFR-1 (score médian) | 2 [1-3] | 2 [1-3] | 0,67 | 0,34 |

3.2.c. Commentaires

Cette étude, qui poursuit la première en incorporant l'expression tissulaire du VEGFR-1 et le devenir clinique des patients, suggère que ni le VEGF-A plasmatique, ni le VEGF-A tissulaire, ni le VEGFR-1 ne sont associés au risque de récurrence biologique après prostatectomie radicale. Aucun de ces trois facteurs n'aurait de valeur pronostique dans le cancer prostatique localisé, contrairement à l'hypothèse soulevée dans la première partie du

travail. Cependant, les défauts méthodologiques de cette étude, qui seront discutés plus bas, sont importants. Pour poursuivre l'analyse de la valeur pronostique du VEGF-A et de son récepteur VEGFR-1, une nouvelle étude a donc été menée en choisissant une autre population de patients.

3.3. Deuxième étude

3.3.a. Rationnel

La deuxième partie de la première étude a suggéré que le VEGF-A (dans le sang ou dans le tissu prostatique) et le VEGFR-1 n'étaient pas des facteurs pronostiques du cancer prostatiques localisé. Cependant, ces données sont peu contributives en raison du faible nombre de patients ayant récidivé. Sur 100 patients opérés, 14 ont eu une récurrence biologique, ce qui correspond aux taux habituellement rapportés dans la littérature de récurrence après prostatectomie radicale. Les résultats de notre étude ont pu être biaisés par le faible nombre de récurrences. Pour confirmer ou infirmer ces résultats, une autre étude incluant plus de patients ayant récidivé était nécessaire. Une deuxième étude a donc été menée en incluant une population de patients différente.

3.3.b. Matériels et méthodes

Sélection des patients

Quarante patients ayant eu une prostatectomie radicale pour un cancer prostatique cliniquement localisé ont été rétrospectivement étudiés. Tous ces patients ont été opérés entre 1994 et 2004, puis suivis dans le service d'Urologie de l'hôpital du Val de Grâce. Dans tous

les cas, une scintigraphie osseuse et un scanner abdomino-pelvien ont été réalisés avant la prostatectomie radicale. Au moment de l'intervention, aucun patient ne présentait de signe clinique ou radiologique d'envahissement ganglionnaire ou de métastase à distance. Aucun patient n'a reçu d'hormonothérapie ou de radiothérapie pelvienne avant l'intervention. Tous les patients ont eu un curage ilio-obturateur standard au début de l'intervention, et ce curage était négatif dans tous les cas. Après la prostatectomie radicale, 17 patients (groupe 1) ont eu une récurrence biologique puis ont développé des métastases osseuses. Parmi eux, 10 ont eu une radiothérapie de sauvetage et 7 ont eu d'emblée une hormonothérapie au moment de la récurrence biologique. Dans tous les cas, les métastases osseuses ont été identifiées par au moins une scintigraphie osseuse. Le délai médian entre la prostatectomie radicale et la survenue des métastases osseuses était de 48 mois (16-73). Les 23 patients restants (groupe 2) n'ont pas eu de récurrence biologique après l'intervention. Aucun d'entre eux n'a eu de traitement adjuvant après la chirurgie. Tous les patients du groupe 2 avaient un PSA indétectable au moment de l'analyse des données, après un suivi médian de 106 mois (80-131).

Microarrays tissulaires

La technique utilisée pour la réalisation des microarrays était la même que pour l'étude précédente, faisant appel à un microarrayer manuel (Beecher Instruments, Alphelys). Pour chaque patient, quatre prélèvements de 0,6 mm de tissu cancéreux prostatique avec le score de Gleason le plus élevé ont été étudiés. Au total, trois blocs ont été réalisés.

Immunohistochimie

La méthode d'immunohistochimie était la même que pour l'étude précédente. Les mêmes anticorps anti-VEGF-A (clone sc-152; Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA)

et anti-Flt-1 AF321 (R&D, Minneapolis, USA) ont été utilisés, et traités selon la même technique.

Évaluation de l'immunomarquage

La méthode d'analyse de l'immunomarquage était la même que dans la deuxième partie de l'étude précédente. Les deux mêmes anatomo-pathologistes, qui n'étaient pas informés des données cliniques des patients, ont lu séparément les lames. Le score d'intensité du marquage était classé en 0 (marquage nul), 1 (marquage faible), 2 (marquage modéré), ou 3 (marquage fort). Le pourcentage des cellules marquées n'était pas pris en compte. Pour chaque patient, quatre valeurs étaient obtenues, correspondant aux quatre prélèvements des microarrays. L'index final de marquage était obtenu en additionnant les quatre scores d'intensité. Les contrôles négatifs ont été obtenus à partir de tissu prostatique bénin, et les contrôles positifs à partir de tissu hépatique.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel SAS, version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). L'intensité de marquage du VEGF-A et du VEGFR-1 a été considérée comme une variable quantitative non continue. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer l'intensité de marquage du VEGF-A et du VEGFR-1 entre les deux groupes. Le test de Student a été utilisé pour comparer les variables quantitatives (âge et PSA sérique) entre les deux groupes, et le test de Chi-deux pour comparer les variables qualitatives (score de Gleason et stade pathologique du cancer). Une analyse de régression logistique a été réalisée pour déterminer les facteurs prédictifs de survenue de métastases osseuses après la prostatectomie radicale. La signification statistique a été définie par une valeur de $p < 0,05$.

3.3.c. Résultats

L'âge des patients, le PSA sérique avant l'intervention, le score de Gleason définitif, le stade pathologique des tumeurs, et le taux de marges positives se répartissaient de façon similaire entre le groupe 1 et le groupe 2.

Caractéristiques pré-opératoires et post-opératoires des patients de chaque groupe.

| | Groupe 1 n=17 | Groupe 2 n=23 | p |
|---|-------------------------|-------------------------|-----|
| Âge* (années) | 66,3 / 6,4 | 64,5 / 5,7 | 0,4 |
| PSA sérique* (ng/ml) | 18,3 / 18,9 | 13,3 / 6,9 | 0,2 |
| Score de Gleason : < 7 7 >7 | 8 4 5 | 9 10 4 | 0,5 |
| Stade pathologique : pT2 pT3 | 9 8 | 13 10 | 0,8 |

* Valeur moyenne / écart type

L'expression tissulaire du VEGF-A était significativement plus importante dans le groupe 1 que dans le groupe 2 (p=0,046). À titre d'exemple, le pourcentage de patients avec un score d'intensité de marquage du VEGF-A > 8 était de 47% (8/17) dans le groupe 1, versus 17% (4/23) dans le groupe 2 (p=0,047).

Répartition des scores d'intensité du VEGF-A tissulaire dans les deux groupes de patients.

| Score d'intensité | Groupe 1 : N (%) | Groupe 2 : N (%) |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 4-5 : | 2 (11,8%) | 7 (30,4%) |
| 6-7 : | 2 (11,8%) | 3 (13,1%) |
| 8 : | 5 (29,4%) | 9 (39,1%) |
| 9-10 : | 5 (29,4%) | 3 (13,1%) |
| 11-12 : | 3 (17,6%) | 1 (4,3%) |
| Total : | 17 (100%) | 23 (100%) |

En revanche, l'expression tissulaire du VEGFR-1 était similaire dans le groupe 1 et dans le groupe 2. Le score médian d'intensité du VEGFR-1 était égal à 2 dans chaque groupe.

Il n'y avait aucune corrélation entre l'expression du VEGFR-1 et le score de Gleason (p=0,97). Néanmoins, l'expression du VEGFR-1 était significativement plus importante en

cas d'extension extra-capsulaire (stade pT3) qu'en cas de tumeur localisée (stade pT2) ($p < 0,025$).

Répartition de l'expression du VEGFR-1 en fonction du stade pathologique des tumeurs.

| Score d'intensité du VEGFR-1 | Stade pT2 N (%) | Stade pT3 N (%) |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 1 (4,5%) | 0 (0%) |
| 1 | 12 (54,6%) | 2 (11,1%) |
| 2 | 9 (40,9%) | 15 (83,3%) |
| 3 | 0 (0%) | 1 (5,6%) |
| Total | 22 (100%) | 18 (100%) |

En analyse de régression logistique incluant l'expression du VEGF-A, le PSA sérique avant prostatectomie radicale, le score de Gleason, et le stade pathologique du cancer prostatique, **l'expression du VEGF-A était le facteur prédictif de survenue de métastases osseuses le plus significatif.**

Analyse logistique pour la prédiction de la survenue de métastases osseuses après prostatectomie radicale.

| | Odds Ratio (IC* 95%) | p |
|-----------------------------|-------------------------|-------|
| Expression du VEGF-A | 1,383 (0,99-1,94) | 0,061 |
| PSA sérique | 1,035 (0,97-1,10) | 0,280 |
| Score de Gleason | 0,912 (0,45-1,85) | 0,798 |
| Stade pathologique | 0,997 (0,21-4,7) | 0,997 |

* Intervalle de confiance

3.3.d. Commentaires

Nous avons trouvé que le score d'intensité de marquage du VEGF-A était plus élevé chez les patients qui ont eu des métastases osseuses après la prostatectomie radicale que chez les patients qui n'ont pas eu de récurrence après l'intervention. Ce résultat suggère qu'une surexpression du VEGF-A sur la pièce de prostatectomie radicale est associée à un risque accru de progression tumorale après traitement du cancer prostatique cliniquement localisé. Cette étude semble donc confirmer l'hypothèse de la première partie de notre travail, selon laquelle l'expression tissulaire du VEGF-A aurait un impact pronostique dans le cancer prostatique localisé.

Nous avons également trouvé que l'expression du VEGFR-1 n'est pas corrélée à la progression après prostatectomie radicale. Bien que le score d'intensité de marquage du

VEGFR-1 soit plus élevé dans les tumeurs extra-capsulaires que dans les tumeurs pT2, ce marqueur n'est pas associé à la récurrence après traitement. L'expression tissulaire du VEGFR-1 n'aurait donc pas d'impact pronostique dans le cancer prostatique localisé.

Limites de l'étude

La première limite de notre étude est son nombre limité de patients. Cela s'explique par nos critères d'inclusion. En effet, nous avons choisi d'inclure dans le groupe 1 uniquement des patients qui ont développé des métastases osseuses après l'intervention, et non pas tous ceux qui ont eu une récurrence biologique. D'après les séries qui ont un long suivi, environ 25% des patients développent une récurrence biologique après prostatectomie radicale [Carroll, 2001]. Or, la plupart de ces patients reçoivent un traitement complémentaire, en général une radiothérapie externe ou une hormonothérapie. Après ce traitement de rattrapage, certains patients restent indemnes de récurrence et de progression métastatique. Brooks et al ont récemment analysé une série de 114 patients traités par radiothérapie de sauvetage pour une récurrence biologique après prostatectomie radicale [Brooks, 2005]. Dans cette série, le risque de développer des métastases 6 ans après la radiothérapie de rattrapage était seulement de 14%. En réalité, la majorité des patients qui ont une récurrence biologique après prostatectomie radicale gardent un bon pronostic, alors que tous ceux qui développent des métastases osseuses meurent dans les années qui suivent. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'inclure seulement des patients qui développaient des métastases osseuses, cet événement étant toujours associé à un mauvais pronostic.

Notre étude a inclus des patients opérés au début des années 1990, ce qui pourrait représenter une deuxième limite. Les résultats de la prostatectomie radicale ont beaucoup changé ces dix dernières années. Il semble donc difficile de tirer des conclusions à partir

d'une série de patients opérés il y a plus de dix ans. Le taux de récurrences après prostatectomie radicale a beaucoup diminué depuis, grâce notamment à une meilleure sélection des patients. Cependant, il faut noter que la population que nous avons étudiée est semblable à celles des séries contemporaines. En effet, tous les patients inclus dans notre étude avaient eu une scintigraphie osseuse et un scanner abdomino-pelvien avant l'intervention, et aucun ne présentait de signe d'atteinte ganglionnaire ou de métastases au moment de la prostatectomie radicale. Par ailleurs, aucun des patients inclus n'avait d'atteinte ganglionnaire sur le curage réalisé durant l'intervention. Les critères de sélection des patients dans notre étude reflètent donc assez bien les critères actuels. En dehors de l'impact éventuel du changement de technique opératoire, le fait que des patients ont été inclus il y a plus de dix ans ne semble donc pas représenter une vraie limite. De plus, il était nécessaire dans notre étude d'inclure des patients opérés à cette époque. En effet, la récurrence biologique et la progression tumorale après prostatectomie radicale surviennent souvent plusieurs années après l'intervention. Dans l'étude de Swanson et al, le délai médian de récurrence biologique après la prostatectomie radicale était de 7 ans [Swanson, 2002]. Dans notre étude, le délai médian de survenue des métastases osseuses était de 4 ans. Un long suivi est donc nécessaire si l'on veut étudier le devenir carcinologique des patients après prostatectomie radicale.

Une autre limite de notre étude est son manque de puissance statistique. En effet, même si la différence d'expression tissulaire du VEGF-A entre les patients du groupe 1 et ceux du groupe 2 était statistiquement significative ($p < 0,05$), la puissance statistique de cette différence était assez faible. En effet, en utilisant le test de Mann-Whitney, la valeur de p était de 0,046. Cette valeur est proche du seuil de significativité. Compte tenu de l'effectif de patients, en particulier de ceux qui ont développé des métastases, il n'était pas possible

d'utiliser un autre test statistique. La différence d'expression tissulaire du VEGF-A aurait probablement été plus significative avec un nombre plus important de patients.

Enfin et surtout, la méthodologie de notre étude est critiquable. Il s'agit d'une étude cas-témoin, menée de manière rétrospective. Alors que tous les patients ayant développé des métastases osseuses dans la période étudiée ont été inclus dans le groupe 1, seule une faible proportion des patients n'ayant pas récidivé ont été inclus dans le groupe contrôle. Compte tenu du nombre important de patients n'ayant pas récidivé, nous avons dû en sélectionner une partie. Nous avons choisi d'en inclure 23, pour deux raisons. Tout d'abord, nous voulions des effectifs comparables entre les deux groupes. D'autre part, nous ne disposions des anticorps et du matériel nécessaires à l'étude que pour 40 cas à analyser. Les 23 patients du groupe contrôle ont été sélectionnés de manière aléatoire, en n'incluant que des patients répondant à tous les critères de sélection de l'étude. Les deux groupes étaient similaires en termes d'âge des patients, de PSA pré-opératoire, de score de Gleason, et de stade pathologique des tumeurs. Malgré le faible nombre de patients inclus, nous avons montré une différence significative d'expression tissulaire du VEGF-A. Cependant, on peut se demander si les résultats de l'étude auraient été les mêmes en incluant la totalité des patients n'ayant pas récidivé dans le groupe contrôle. Pour déterminer l'impact pronostique de l'expression tissulaire du VEGF-A, une étude longitudinale qui analyse de manière prospective et à large échelle le devenir clinique des patients opérés aurait été plus appropriée.

Comparaison avec la littérature

Dans la littérature, seulement trois études ont analysé l'impact du VEGF sur le devenir carcinologique des patients après prostatectomie radicale. Parmi ces études, une a analysé

l'impact du VEGF-A plasmatique, et les deux autres ont analysé l'impact du VEGF-A tissulaire.

Dans l'étude de Shariat et al, qui a inclus 215 patients soumis à une prostatectomie radicale, le taux plasmatique pré-opératoire de VEGF-A était associé à la fois au stade pathologique du cancer et au risque de récurrence biologique après prostatectomie radicale [Shariat, 2004]. Dans cette étude, le taux de récurrence était de 21%. Les patients qui avaient un VEGF plasmatique au dessus de la médiane (9,9 pg/ml) avaient un risque de récurrence biologique plus élevé que ceux qui avaient un VEGF plasmatique en dessous de cette valeur ($p=0.005$). En analyse multivariée, le VEGF pré-opératoire était significativement associé au risque de récurrence biologique ($p=0,014$) après ajustement sur les autres paramètres, de même que le PSA pré-opératoire ($p<0,001$) et le score de Gleason ($p<0,001$). Encore une fois, ces résultats sont à interpréter avec prudence compte tenu du caractère hétérogène de la population étudiée. Cette série a probablement inclus une proportion importante de tumeurs localement avancées. Il est donc difficile de conclure sur l'impact du VEGF plasmatique dans le cancer prostatique localisé.

Seules deux études publiées ont analysé l'association entre l'expression tissulaire du VEGF-A et le devenir des patients opérés [Strohmeyer, 2000; West, 2001]. Ces deux études ont des résultats similaires à la nôtre. L'étude de Strohmeyer et al portait sur 55 patients, avec un suivi médian de 31,9 mois [Strohmeyer, 2000]. Parmi les 55 patients, 9 ont eu une progression tumorale après le traitement. Dans cette étude, il y avait une corrélation entre l'expression tissulaire du VEGF-A, le stade, le grade de la tumeur, et la progression tumorale durant le suivi ($p=0,0004$). L'étude de West et al portait sur 67 patients [West, 2001]. Une corrélation a été trouvée entre l'expression du VEGF-A dans le stroma prostatique et la

survie: les patients dont la tumeur exprimait le VEGF-A avaient une survie spécifique réduite par rapport à ceux dont la tumeur n'exprimait pas le VEGF-A ($p=0,037$). Ces deux études suggéraient donc une corrélation entre l'expression tissulaire du VEGF-A et l'agressivité du cancer prostatique. Cependant, elles portaient sur de faibles effectifs, et elles étaient menées de façon rétrospective. Surtout, leurs critères d'inclusion étaient très hétérogènes. En effet, elles incluaient des tumeurs de stades très variés, et les patients ne recevaient pas tous le même traitement. Certains étaient traités par prostatectomie radicale pour un cancer cliniquement localisé, et d'autres recevaient une hormonothérapie pour un cancer localement avancé ou métastatique. Il est donc impossible, d'après ces études, d'évaluer l'impact exact de l'expression tissulaire du VEGF-A sur le devenir carcinologique des patients traités. À notre connaissance, notre étude est la seule à avoir analysé la valeur pronostique du VEGF-A tissulaire en incluant uniquement des patients traités par prostatectomie radicale pour un cancer prostatique cliniquement localisé.

Concernant le VEGFR-1, cette étude est à notre connaissance la seule à avoir étudié la valeur pronostique de ce récepteur dans le cancer prostatique. En effet, aucune donnée clinique n'est disponible dans la littérature concernant l'impact du VEGFR-1 chez des patients traités pour un cancer prostatique. Seules sont disponibles quelques données concernant le VEGFR-3, qui est le récepteur du VEGF-C. Le VEGF-C induit la prolifération de cellules endothéliales lymphatiques, jouant un rôle majeur dans la lymphangiogenèse du cancer prostatique [Trojan, 2006]. Deux études ont récemment montré une corrélation entre l'expression tissulaire du VEGFR-3 et la présence de métastases ganglionnaires du cancer prostatique, suggérant un impact pronostique important de ce récepteur [Li, 2004; Jennbacken, 2005].

3.3.e. Conclusion

Nous avons trouvé que l'expression tissulaire du VEGF-A est plus importante chez les patients qui ont une progression métastatique après prostatectomie radicale que chez ceux qui ne récidivent pas après l'intervention. Ces résultats confortent l'hypothèse soulevée dans la première partie de notre travail, selon laquelle l'expression du VEGF-A sur la pièce de prostatectomie radicale aurait une valeur pronostique puisqu'elle est associée au score de Gleason. L'expression tissulaire du VEGF-A pourrait donc, en pratique courante, être utile pour prédire le risque de récurrence ou de progression tumorale après l'intervention. Elle pourrait représenter un nouveau critère, au même titre que le score de Gleason, le stade pathologique et les marges chirurgicales, pour identifier les patients à haut risque de récurrence et indiquer un éventuel traitement adjuvant.

En revanche, l'expression tissulaire du VEGFR-1, qui est pourtant plus importante en cas d'extension extra-capsulaire, n'est pas corrélée à la progression métastatique après prostatectomie radicale. Le VEGFR-1 ne semble donc pas avoir de valeur pronostique dans le cancer prostatique cliniquement localisé.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Peu d'études ont analysé le rôle du VEGF dans le cancer prostatique localisé. Certains auteurs ont suggéré que le taux plasmatique de VEGF et que son expression tissulaire étaient corrélés au diagnostic de cancer prostatique, à son extension, et au risque de récurrence après prostatectomie radicale. En raison du manque de données publiées, l'impact du VEGF dans le cancer prostatique localisé reste à déterminer.

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle d'une forme de VEGF, le VEGF-A, dans le cancer prostatique cliniquement localisé. Nous n'avons trouvé aucune association entre le taux plasmatique de VEGF-A et les facteurs pronostiques classiques du cancer prostatique. En revanche, nous avons trouvé que l'expression tissulaire du VEGF-A est corrélée au score de Gleason sur pièce de prostatectomie radicale. De plus, nous avons montré une association entre l'expression tissulaire du VEGF-A et la survenue de métastases osseuses après prostatectomie radicale.

Ces résultats suggèrent que le VEGF-A circulant n'a pas de valeur pronostique dans le cancer cliniquement localisé. En revanche, le VEGF-A tissulaire semble avoir une valeur pronostique puisqu'il serait corrélé au score de Gleason et au risque de progression tumorale après prostatectomie radicale.

Notre hypothèse est que l'expression du VEGF-A évolue en deux étapes qui suivent la progression du cancer prostatique. Au stade métastatique, le VEGF-A est élevé à la fois dans

le tissu prostatique et dans la circulation sanguine. Au stade localisé, le VEGF-A serait déjà détectable en quantité importante dans le tissu prostatique, mais pas encore dans la circulation sanguine. Son expression tissulaire pourrait alors refléter l'agressivité potentielle du cancer. En se basant sur cette hypothèse, l'expression tissulaire du VEGF-A dans le cancer prostatique localisé pourrait dès ce stade être utilisée comme un marqueur pronostique.

Dans ce cas, la mesure du VEGF-A tissulaire serait utile dans deux situations. Premièrement, elle pourrait être prise en compte dans le choix du traitement, au moment du bilan pré-thérapeutique. Mesurée sur les biopsies prostatiques, l'expression du VEGF-A permettrait d'identifier les meilleurs candidats à un traitement local et d'écartier les patients à risque élevé de cancer localement avancé. Deuxièmement, elle pourrait intervenir dans la prise en charge post-opératoire des patients ayant eu une prostatectomie radicale. Mesurée sur la pièce de prostatectomie radicale, l'expression du VEGF-A permettrait alors d'identifier les patients à haut risque de récurrence et candidats à un traitement adjuvant.

D'autre part, dans la deuxième partie de notre travail nous avons analysé l'expression tissulaire du VEGFR-1, récepteur majoritaire du VEGF-A. Nous n'avons pas trouvé d'association entre l'expression tissulaire du VEGFR-1 et la survenue de métastases osseuses après prostatectomie radicale. Ce récepteur ne semble donc pas avoir de valeur pronostique dans le cancer prostatique cliniquement localisé.

Le travail que nous avons réalisé est préliminaire; il ne permet pas de conclure sur l'impact pronostique du VEGF-A et du VEGFR-1 dans le cancer prostatique localisé. En effet, il porte sur des effectifs réduits et comporte certains biais méthodologiques. Pour confirmer ces premiers résultats, un travail plus important est en préparation. Dans ce

nouveau travail, le taux plasmatique du VEGF-A, l'expression tissulaire du VEGF-A et du VEGFR-1, ainsi que le devenir clinique des patients seront analysés à plus grande échelle et de manière prospective.

5. BIBLIOGRAPHIE

Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 77: 956-64, 1998.

Barry Delongchamps N, Peyromaure M, Dinh-Xuan AT. Role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Urology* 68: 244-8, 2006.

Blute ML, Bergstralh EJ, Iocca A, et al. Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. *J Urol* 165: 119-25, 2001.

Bolla M, Collette L, Blank L, et al. Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. *Lancet* 360: 103-6, 2002.

Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer* 73: 678-87, 1994.

Brooks JP, Albert PS, Wilder RB, et al. Long-term salvage radiotherapy outcome after radical prostatectomy and relapse predictors. *J Urol* 174: 2204-8, 2005.

Carroll P. Rising PSA after a radical treatment. *Eur Urol* 40 (Suppl 2): 9-16, 2001.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, et al. Measurement of prostate-specific antigen as a screening test for prostate cancer. *N Engl J med* 325: 963-5, 1991.

Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA* 277:1452-5, 1997.

Cornud F, Bellin MF, Portalez D. MRI and staging evaluation of prostate cancer. *J Radiol* 87: 228-43, 2006.

Dai J, Kitagawa Y, Zhang J, et al. Vascular endothelial growth factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein. *Cancer Res* 64: 994-9, 2004.

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* 154:131-8, 1995.

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Prostate specific antigen outcome based on the extent of extracapsular extension and margin status in patients with seminal vesicle negative prostate carcinoma of Gleason score ≤ 7 . *Cancer* 88: 2110-5, 2000.

Denis L, Murphy GP. Overview of phase III trials on combined androgen treatment in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer* 72: 3888-95, 1993.

Dirix LY, Vermeulen PB, Pawinski A, et al. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *Br J Cancer* 76: 238-43, 1997.

Doll JA, Reihel FK, Crawford SE, Pins MR, Campbell SC, Bouck NP. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate* 49:293-305, 2001.

Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D, Freeman MR. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 54: 523-7, 1999.

English HF, Drago JR, Santen RJ. Cellular response to androgen depletion in the rat ventral prostate: autoradiography and morphometric analysis. *Prostate* 7: 41-51, 1985.

Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, et al. Expression of vascular endothelial growth factors in human prostate cancer. *Urology* 54: 567-72, 1999.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70, 1995.

Guillonneau B, El-Fettouh H, Baumert X, et al. Laparoscopic radical prostatectomy : oncological evaluation after 1,000 cases at the Montsouris institute. *J Urol* 169: 1261-6, 2003.

Gustavsson H, Welen K, Damber JE. Transition of an androgen-dependent human prostate cancer cell line into an androgen-independent subline is associated with increased angiogenesis. *Prostate* 62: 364-73, 2005.

Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol* 169: 517-23, 2003.

Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF, et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med* 348: 2491-9, 2003.

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23: 1011-27, 2005.

Horiguchi A, Nakashima J, Horiguchi Y, et al. Prediction of extraprostatic cancer by prostate specific antigen density, endorectal MRI, and biopsy Gleason score in clinically localized prostate cancer. *Prostate* 56: 23-9, 2003.

Huggins CB, Hodges CV. Studies on prostate cancer: the effects of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1: 203, 1941.

Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT. Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol* 167: 528-34, 2002.

Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber JE. Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF Receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate* 65: 110-6, 2005.

Karakiewicz PI, Eastham JA, Graefen M, et al. Prognostic impact of positive surgical margins in surgically treated prostate cancer: multi-institutional assessment of 5831 patients. *Urology* 66:1245-50, 2005.

Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 17: 1499-507, 1999.

Khan MA, Partin AW, Mangold LA, et al. Probability of biochemical recurrence by analysis of pathologic stage, Gleason score, and margin status for localized prostate cancer. *Urology* 62: 866-71, 2003.

Kollerman J, Helpap B. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flk-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *Am J Clin Pathol* 116: 115-21, 2001.

LeCouter J, Moritz DR, Li B, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299: 890-3, 2003.

Li R, Younes M, Wheeler TM, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate* 58: 193-9, 2004.

Lin CC, Wu HC, Tsai FJ, Chen HY, Chen WC. Vascular endothelial growth factor gene – 460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. *Urology* 62: 374-7, 2003.

Mc Leod DG. Hormonal therapy: historical perspective to future directions. *Urology* 61: 3-7, 2003.

Mc Leod DG, Iversen P, See WA, et al. Bicalutamide 150 mg plus standard care vs standard care alone for early prostate cancer. *BJU Int* 97: 247-54, 2006.

Mariotto AB, Wesley MN, Cronin KA, et al. Estimates of long-term survival for newly diagnosed cancer patients: a projection approach. *Cancer* 106: 2039-50, 2006.

Melnyk O, Zimmerman M, Kim KJ, Shuman M. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model. *J Urol* 161: 960-3, 1999.

Mukherjee P, Sotnikov AV, Mangian HJ, Zhou JR, Visek WJ, Clinton SK. Energy intake and prostate tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst* 91: 512-23, 1999.

Nakashima J, Tanimoto A, Imai Y, et al. Endorectal MRI for prediction of tumor site, tumor size, and local extension of prostate cancer. *Urology* 64: 101-5, 2004.

Ozgur A, Onol FF, Turkeri LN. Important preoperative prognostic factors for extracapsular extension, seminal vesicle invasion and lymph node involvement in cases with radical retropubic prostatectomy. *Int Urol Nephrol* 36: 369-73, 2004.

Partin AW, Mangold LA, Lamm DL, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology* 58: 843-8, 2001.

Peyromaure M, Füllä Y, Debré B, Dinh-Xuan AT. Pro PSA : a "pro cancer" form of PSA? *Med Hypotheses* 64: 92-5, 2005.

Picus J, Halabi S, Rini B, et al. The use of bevacizumab (B) with docetaxel (D) and estramustine (E) in hormone refractory prostate cancer (HRPC): Initial results of CALGB 90006. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 393 (abstract 1578), 2003.

Raaijmakers R, Blijenberg BG, Finlay JA, et al. Prostate cancer detection in the prostate specific antigen range of 2.0 to 3.9 ng/ml: value of percent free prostate specific antigen on tumor detection and tumor aggressiveness. *J Urol* 171: 2245-9, 2004.

Rassweiler J, Schulze M, Teber D, et al. Laparoscopic radical prostatectomy with the Heilbronn technique: oncological results in the first 500 patients. *J Urol* 173: 761-4, 2005.

Rassweiler J, Stolzenburg J, Sulser T, et al. Laparoscopic radical prostatectomy-the experience of the German Laparoscopic Working Group. *Eur Urol* 49: 113-9, 2006.

Roehl KA, Han M, Ramos CG, Antenor JA, Catalona WJ. Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. *J Urol* 172: 910-4, 2004.

Sala E, Akin O, Moskowitz CS, et al. Endorectal MR imaging in the evaluation of seminal vesicle invasion: diagnostic accuracy and multivariate feature analysis. *Radiology* 238: 929-37, 2006.

Shariat SF, Anwuri VA, Lamb DJ, Shah NV, Wheeler TM, Slawin KM. Association of preoperative plasma levels of vascular endothelial growth factor and soluble cell adhesion molecule-1 with lymph node status and biochemical progression after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 22: 1655-63, 2004.

Stefanou D, Batistatou A, Kamina S, Arkoumani E, Papachristou DJ, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *In vivo* 18: 155-60, 2004.

Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, et al. Preoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst* 98: 715-7, 2006.

Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E, Folkman J. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J Urol* 165: 688-93, 2001.

Strohmeyer D, Rossing C, Bauerfeind A, et al. Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and P53 expression in prostate cancer. *Prostate* 45: 216-24, 2000.

Swanson GP, Riggs MW, Earle JD, et al. Long-term follow-up of radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. *Eur Urol* 42: 212-6, 2002.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351: 1502-12, 2004.

Teh BS, Bastasch MD, Mai MY, et al. Long-term benefits of elective radiotherapy after prostatectomy for patients with positive surgical margins. *J Urol* 175: 2097-101, 2006.

Trinkler FB, Schmid DM, Hauri D, et al. Free/total prostate-specific antigen ratio can prevent unnecessary prostate biopsies. *Urology* 52: 479-86, 1998.

Trojan L, Rensch F, Voss M, et al. The role of the lymphatic system and its specific growth factor, vascular endothelial growth factor C, for lymphogenic metastasis in prostate cancer. *BJU Int* 98: 903-6, 2006.

Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Cancer* 80: 309-13, 1999.

Tsuzuki T, Hernandez DJ, Aydin H, et al. Prediction of extraprostatic extension in the neurovascular bundle based on prostate needle biopsy pathology, serum prostate specific antigen and digital rectal examination. *J Urol* 173: 450-3, 2005.

Wakui S, Furusato M, Itoh T, et al. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 168: 257-62, 1992.

Walsh K, Sherwood RA, Dew TK, Mulvin D. Angiogenic peptides in prostatic disease. *BJU Int* 84:1081-3, 1999.

West AF, O'Donnell M, Charlton RG, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression with fibroblast growth factor-8 expression and clinico-pathologic parameters in human prostate cancer. *Br J Cancer* 85: 576-83, 2001.

Yamada Y, Watanabe M, Yamanaka M, et al. Aberrant methylation of the vascular endothelial growth factor receptor-1 gene in prostate cancer. *Cancer Sci* 94: 536-9, 2003.

6. PUBLICATIONS

1er article

Plasma levels and expression of vascular endothelial growth factor-A in localized prostate cancer. Peyromaure M, Badoual C, Camparo P, Grabar S, Goulvestre C, Fulla Y, **Mao K**, Dinh-Xuan AT. *Oncol Rep* 18: 145-9, 2007.

Plasma levels and expression of vascular endothelial growth factor-A in human localized prostate cancer

MICHAËL PEYROMAURE¹, CÉCILE BADOUAL⁷, PHILIPPE CAMPARO⁸, SOPHIE GRABAR²,
CLAIRE GOULVESTRE³, YVONNE FULLA⁴, ANNICK VIEILLEFOND⁵,
KAILI MAO¹ and ANH-TUAN DINH-XUAN⁶

Departments of ¹Urology, ²Biostatistics, ³Biological Immunology, ⁴Nuclear Medicine, ⁵Pathology,
⁶Physiology, Cochin Hospital; ⁷Department of Pathology, European-Georges Pompidou Hospital;
⁸Department of Pathology, Val de Grâce Hospital, 75014 Paris, France

Received March 11, 2007; Accepted April 23, 2007

Abstract. Although the impact of vascular endothelial growth factor (VEGF) is clearly established in advanced prostate cancer (PCa), its role in localized PCa remains to be determined. The aim of our study was to analyse the plasma levels of VEGF-A and the expression of VEGF-A in prostatic tissue in a population of patients with localized PCa. We measured the preoperative plasma levels of VEGF-A in 100 patients undergoing radical prostatectomy (RP) for clinically-localized PCa. After intervention, we determined the expression of VEGF-A in all RP specimens using immunohistochemistry. We found no association between plasma levels of VEGF-A and the established prognostic factors of PCa. Moreover, there was no association between plasma levels of VEGF-A and the expression of VEGF-A in prostatic tissue. On the contrary, there was a strong correlation between the expression of VEGF-A in PCa tissue and the Gleason score of cancer: the expression of VEGF-A was significantly higher in patients with a high Gleason score on RP specimen ($p=0.01$). Our results suggest that the expression of VEGF may have a prognostic impact in clinically-localized PCa.

Introduction

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a glycoprotein acting as a specific endothelial mitogen. The VEGF gene family encodes five polypeptide growth factors: VEGF-A, -B, -C, -D and -E (1). VEGF-A can induce vascularization around growing tumor cells, and is overexpressed in prostatic tumors

such as benign prostatic hyperplasia and prostate cancer (PCa) (2). It has been suggested that VEGF expression may be regulated by some tumor suppressor genes, including the PTEN (phosphatase, tensin homologue) gene on chromosome 10q23 (3). Several investigators found a correlation between circulating levels of VEGF-A and the aggressiveness of PCa, but others reached opposite conclusions (4-6). Moreover, most published studies have analysed the impact of VEGF-A in advanced PCa. The impact of VEGF-A in localized PCa remains therefore to be determined.

In the current study we measured the preoperative plasma levels of VEGF-A in 100 consecutive patients undergoing RP for localized PCa. We also examined the VEGF-A expression in the RP specimens, and analysed the associations between pre-RP VEGF plasma levels, VEGF expression in PCa tissue and established prognostic factors of PCa.

Materials and methods

Patient selection. One hundred consecutive patients undergoing RP for clinically-localized PCa at our institution were prospectively enrolled between June and November 2005. None had received hormone therapy, radiation therapy or chemotherapy before intervention. All patients had undergone pelvic CT scan, endorectal magnetic resonance imaging (MRI) and bone scintigraphy before RP. None had clinical or radiological evidence of lymph node or bone metastases. A bilateral pelvic lymphadenectomy was performed at the time of RP. Clinical and pathological stages of PCa were established according to the 2002 TNM classification.

Assessment of biomarkers (serum PSA and VEGF). Blood was taken from all patients the day before RP and was collected into two 7-ml glass tubes. One tube was used to measure the different forms of PSA. Total PSA, free PSA and complexed PSA were measured in serum using the Bayer Immuno 1 PSA assay. The other tube was used to measure plasma levels of VEGF-A. VEGF-A was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Blood was spun at 2500 g for 10 min; then, the platelet-poor plasma was removed and placed in a 5-ml tube, stored at -80°C and thawed

Correspondence to: Dr Michaël Peyromaure, Service d'Urologie, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France
E-mail: michael.peyromaure@cch.aphp.fr

Key words: prostate cancer, angiogenesis, vascular endothelial growth factor

immediately before testing. VEGF-A levels were determined in duplicate with 100 μ l of each sample. According to their amino acid content, 5 isoforms of VEGF-A have been identified, namely VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 and VEGF 206. The immunoassay that we used (Bender MedSystems, Vienna, Austria) is designed to measure all these isoforms.

Tissue microarrays. Slides from the 100 RP specimens were reviewed and mapped. Tissue microarrays were built using a manual tissue arrayer (Beecher Instruments, Alphelys). Areas representative of the tumor with the highest Gleason score were circled. Duplicate 0.6 mm cores were obtained from the circled areas of tumor and transferred to a recipient paraffin block. Controls were obtained from non-malignant prostatic tissue. The tissue array set consisted of 8 blocks, and included the coordinates of each core and case of origin.

Immunohistochemistry. Immunohistochemical staining was performed on the section mounted on poly-L-Lysine coated glass slides. Before incubation with primary antibodies, deparaffinized and rehydrated sections were incubated with avidin/biotin blocker (Vector Laboratories, Burlingame, USA) and Fc receptor blocked by human serum (5%). Antigen retrieval was accomplished by heating the slides at 97°C in a 0.01-M citrate buffer (pH 6.0) for 15 min. An anti-VEGF A-20 Mab (clone sc-152; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) was used at the dilution of 1:200 for 1 h. After rinsing in PBS, the biotinylated secondary antibody was applied for 30 min. To visualize the reaction, sections were incubated with an AEC substrate chromogen (Dakocytomation, Copenhagen, Denmark) for 15 to 20 min at room temperature. Slides were mounted with Glycergel (Dakocytomation) mounting medium and evaluated under a conventional light microscope. Breast carcinoma tissues were used as positive controls.

Evaluation of immunostaining. A semi-quantitative scoring system was used for the evaluation of immunostaining. Two pathologists (CB, PC) blinded to clinical data independently scored the slides. The intensity of staining was scored as 0, no detectable signal; 1, weak staining; 2, moderate staining; and 3, strong staining. The percentage of positive cells was scored as 0, no positive cells; 1, <1/3 positive cells; 2, 1/3-2/3 positive cells; and 3, >2/3 positive cells. Because of the duplicate nature of the arrays, two values were obtained for each patient. The highest intensity value was considered for analysis. The sum index was obtained by totaling the score of intensity and the percentage of positive cells. VEGF expression was defined as low (sum index \leq 3) or high (sum index >3).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the Statistical Analysis System, version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Quantitative data were expressed in median values and interquartile range (IQR). The Kruskal Wallis and the Wilcoxon tests were used to test for differences in plasma VEGF-A and PSA levels between preoperative (clinical stage, pathological stage, Gleason score and surgical margins status), postoperative features (Gleason score, pathological stage and surgical margin status) and VEGF-A

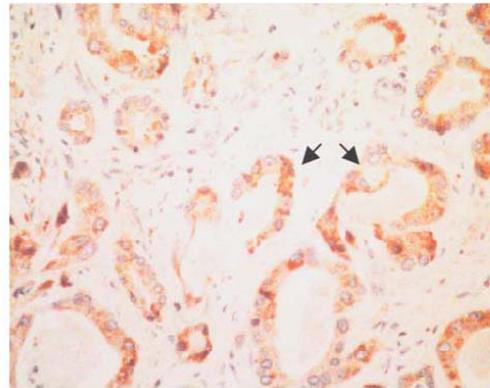


Figure 1. Case of PCa with high VEGF-A expression (intensity score 3) x400.

expression (low or high) in PCa tissue. The Spearman correlation coefficient was used to study the associations between quantitative variables. Associations between VEGF-A expression in PCa tissue and qualitative variables (clinical stage, pathological stage, Gleason score and surgical margins status) were determined using the Fisher's exact test. The Fisher's exact test was used to study the associations between preoperative Gleason score, PSA, MRI findings, postoperative Gleason score, pathological stage and surgical margin status.

Results

The median plasma level of VEGF-A was 145.5 pg/ml (IQR 55.5-230; range 0-4,100). VEGF-A expression in PCa tissue could be determined in 89 cases. VEGF-A expression in PCa tissue was low in 53 patients, and high in the remaining 36. In patients with a positive staining, VEGF-A was detectable in stromal and in epithelial cells (Fig. 1).

There was no association between plasma VEGF-A values and patient age ($p=0.22$), prostate weight ($p=0.46$), total PSA ($p=0.48$), free/total PSA ($p=0.9$) or complexed PSA ($p=0.51$). Moreover, there was no association between VEGF-A expression in PCa tissue and patient age, prostate weight, different forms of PSA, or plasma VEGF-A (Table I).

Table II shows the plasma levels of VEGF-A according to preoperative and postoperative prognostic factors of PCa. There was no association between the plasma levels of VEGF-A and preoperative tumor characteristics. The plasma levels of VEGF-A were lower in patients with a high Gleason score on RP specimen ($p=0.04$). However, there was no association between the plasma levels of VEGF-A and pathological stage of PCa ($p=0.57$) or surgical margin status ($p=0.48$).

Table III shows the expression of VEGF-A in PCa tissue according to preoperative and postoperative tumor characteristics. There was no association between the expression of VEGF-A in PCa tissue and preoperative tumor characteristics. The expression of VEGF-A in PCa tissue was significantly higher in patients with a high Gleason score on RP specimen ($p=0.01$).

Table I. Association between VEGF-A expression in cancer tissue and quantitative parameters.

| | Low VEGF-A expression | High VEGF-A expression | P-value ^b |
|---|-----------------------|------------------------|----------------------|
| Age median/IQR ^a (years) | 62/57-66 | 63/59-68 | 0.42 |
| Prostate weight median/IQR ^a (gr) | 44/38-54 | 46/33.5-56.5 | 0.42 |
| Total PSA median/IQR ^a (ng/ml) | 5.5/3.7-7.6 | 5.6/4-10.9 | 0.28 |
| Free/total PSA median/IQR ^a (%) | 14/11-19 | 11.5/8.5-19 | 0.19 |
| Complexed PSA median/IQR ^a (ng/ml) | 4.8/3.2-7 | 4.8/3.7-10.3 | 0.29 |
| Plasma VEGF median/IQR ^a (pg/ml) | 151/57-273 | 139/61-218 | 0.70 |

^aInterquartile range. ^bWilcoxon test.

Two factors were found to be associated with the pathological stage of PCa: the free/total PSA ratio and the post-operative Gleason score. The median free/total PSA ratio was 14% in patients with a pT2 tumor versus 11.5% in those with a pT3 tumor (p=0.04). The rates of extracapsular disease were 19.2, 50, 56.3 and 83.3% in patients with a Gleason score ≤ 6 or of 3+4, 4+3 and >7 , respectively (p=0.002). Finally, the sole factor associated with surgical margin status was the pathological stage of PCa. Of the patients with positive surgical margins, 26.3% had a pT2 tumor and 73.7% had a pT3 tumor (p=0.001).

Discussion

The clinical impact of VEGF in metastatic PCa has been documented by several studies. Duque *et al* compared the plasma levels of VEGF-A in 54 patients with localized PCa, 26 patients with metastatic PCa, and 26 controls (4). They found a significant increase in VEGF-A in patients with metastases compared with patients with localized disease and controls. The role of VEGF in metastatic PCa was also suggested by George *et al*, who found in a series of 197 patients with hormone-refractory PCa that the plasma levels of VEGF-A were independently associated with overall survival (7). The evidence that VEGF plays a significant role in advanced PCa has led to the development of anti-angiogenic therapies. These targeted therapies include bevacizumab, a humanized VEGF-specific monoclonal antibody (8). Anti-

Table II. Plasma levels of VEGF-A according to preoperative and postoperative tumor characteristics.

| Tumor characteristics | N (%) | VEGF-A median/IQR ^a (pg/ml) |
|-------------------------------------|---------|--|
| Gleason score on biopsy | | |
| ≤ 6 | 59 (59) | 182/75-232 |
| 3+4 | 24 (24) | 80.5/5.5-218 |
| 4+3 | 11 (11) | 71/28-110 |
| >7 | 6 (6) | 64/58-208 |
| P-value ^b | | 0.13 |
| Clinical stage of PCa | | |
| T1c | 71 (71) | 163/36-250 |
| T2a | 23 (23) | 89/57-159 |
| T2b | 6 (6) | 460/0-511 |
| P-value ^b | | 0.11 |
| Percentage of positive biopsy cores | | |
| <25 | 34 (34) | 152/34-233 |
| 25-49 | 34 (34) | 137.5/36-215 |
| 50-74 | 25 (25) | 134/63-250 |
| ≥ 75 | 7 (7) | 182/0-192 |
| P-value ^b | | 0.96 |
| Endorectal MRI findings | | |
| No extracapsular extension | 88 (88) | 139/55.5-230.5 |
| Suspected extracapsular extension | 7 (7) | 163/58-437 |
| Extracapsular extension | 5 (5) | 154/0-208 |
| P-value ^b | | 0.75 |
| Gleason score on RP specimen | | |
| ≤ 6 | 52 (52) | 189/89-233 |
| 3+4 | 24 (24) | 139/45.5-373 |
| 4+3 | 16 (16) | 62.5/19.5-123 |
| >7 | 6 (6) | 112.5/3-159 |
| P-value ^b | | 0.04 |
| Pathological stage of PCa | | |
| pT0 | 2 (2) | 122.5/36-209 |
| pT2a | 6 (6) | 264.5/224-486 |
| pT2b | 22 (22) | 139/58-328 |
| pT2c | 34 (34) | 125/57-214 |
| pT3a | 34 (34) | 152.5/54-215 |
| pT3b | 2 (2) | 218.5/0-437 |
| P-value ^b | | 0.57 |
| Surgical margin status | | |
| Positive | 19 (19) | 135/3-224 |
| Negative | 81 (81) | 154/58-232 |
| P-value ^b | | 0.48 |

^aInterquartile range. ^bKruskal-Wallis test.

angiogenic agents are still under investigation in clinical trials, but *in vivo* studies have reached promising conclusions (9).

Table III. Expression of VEGF-A in PCa tissue according to preoperative and postoperative tumor characteristics.

| Tumor characteristics | Low VEGF-A expression N (%) | High VEGF-A expression N (%) |
|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Gleason score on biopsy | | |
| ≤6 | 36 (67.9) | 16 (44.4) |
| 3+4 | 10 (18.9) | 11 (30.5) |
| 4+3 | 4 (7.5) | 6 (16.7) |
| >7 | 3 (5.7) | 3 (8.4) |
| P-value ^a | | 0.87 |
| Clinical stage of PCa | | |
| T1c | 40 (75.4) | 23 (63.9) |
| T2a | 10 (18.9) | 10 (27.8) |
| T2b | 3 (5.7) | 3 (8.3) |
| P-value ^a | | 0.47 |
| Percentage of positive biopsy cores | | |
| <25 | 17 (32.2) | 10 (27.8) |
| 25-49 | 19 (35.8) | 11 (30.6) |
| 50-74 | 13 (24.5) | 12 (33.3) |
| ≥75 | 4 (7.5) | 3 (8.3) |
| P-value ^a | | 0.84 |
| Endorectal MRI findings | | |
| No extracapsular extension | 48 (90.6) | 29 (80.6) |
| Suspected extracapsular extension | 5 (9.4) | 7 (19.4) |
| P-value ^a | | 0.21 |
| Gleason score on RP specimen | | |
| ≤6 | 34 (64.2) | 12 (33.3) |
| 3+4 | 12 (22.6) | 12 (33.3) |
| 4+3 | 7 (13.2) | 7 (19.5) |
| >7 | | 5 (13.9) |
| P-value ^a | | 0.01 |
| Pathological stage of PCa | | |
| pT2a | 3 (5.7) | 1 (2.8) |
| pT2b | 12 (22.6) | 7 (19.4) |
| pT2c | 22 (41.5) | 12 (33.3) |
| pT3a | 15 (28.3) | 15 (41.7) |
| pT3b | 1 (1.9) | 1 (2.8) |
| P-value ^a | | 0.38 |
| Surgical margin status | | |
| Positive | 10 (18.9) | 7 (19.4) |
| Negative | 43 (81.1) | 29 (80.6) |
| P-value ^a | | 1 |

^aFisher's exact test.

Although VEGF plays an important role in metastatic PCa, its impact in localized disease remains to be clarified. Our team has previously analysed the diagnostic value of

VEGF for the early detection of PCa (10). We measured VEGF-A in 47 patients who underwent prostate biopsies on clinical and/or biological suspicion of PCa, and found that VEGF was not predictive of cancer on biopsies. This study relied on serum samples. Because VEGF measured in serum may be released from platelets on activation after venipuncture (11), we decided, in the current study, to measure VEGF in plasma.

Shariat *et al* analysed the plasma levels of VEGF-A in 215 patients who underwent RP for clinically-localized PCa, in 9 patients with untreated metastatic PCa, and in 40 controls (5). In this study, preoperative levels of VEGF-A were significantly elevated in patients with Gleason score ≥7, in patients with extraprostatic stage, and in those with lymph node involvement. Moreover, patients with plasma levels of VEGF-A above the median had an increased risk of biochemical progression after RP. The authors concluded that preoperative levels of VEGF-A could help to predict the tumoral stage and the clinical outcome of patients. The results of our current study gave rise to different conclusions. Such discrepancy may be due to differing methods of VEGF measurement: we used a polyclonal antibody that is designed to measure all the isoforms of VEGF-A, whereas Shariat *et al* used an immunoassay technique that measures only two isoforms of VEGF-A (VEGF 121 and VEGF 165) (5).

A surprising finding in our study is that VEGF-A levels were lower in patients with a high Gleason score. However, this result should be considered with caution, owing to the small sample of patients with a high Gleason score. In fact, the vast majority of patients had a Gleason score of 6, and only 6 patients had a Gleason score >7; it is therefore difficult to analyse this parameter.

George *et al* measured plasma levels of VEGF-A before and after RP in 86 patients with clinically localized PCa (12). The median reduction in VEGF from before RP to after RP was only 20%. These results suggested that the changes in the post-RP VEGF values could be consistent with a non-cancerous source. As was the case in our study, there was no association between plasma levels of VEGF and pre-RP PSA, Gleason score on biopsy, or clinical stage of PCa.

We found that VEGF-A expression was strongly associated with the Gleason score of PCa. This marker could therefore play a prognostic role in localized PCa. To our knowledge, our current study is the first to analyse the prognostic value of VEGF-A expression in PCa. Some previous studies analysed the prognostic value of VEGF-C expression. VEGF-C causes proliferation of lymphatic endothelial cells and plays a role in tumor lymphangiogenesis (1). Li *et al* compared the expression of VEGF-C receptor (VEGFR-3) in benign prostate hyperplasia and in PCa (13). These authors found that VEGFR-3 was up-regulated in PCa. Moreover, they found a correlation between VEGFR-3 expression and preoperative PSA, Gleason score and lymph node metastases. Jennbacken *et al* found a higher expression of VEGF-C in patients with lymph node metastases than in those with localized PCa (14). Since our current report is the first to analyse the prognostic value of VEGF-A expression in PCa, our results need to be confirmed by further studies.

In our study the clinical outcome of patients was not analysed. Over the last decade, the oncological results of RP

have improved markedly, owing to better patient selection and enhanced technique (15). Furthermore, the interval between treatment and disease recurrence is often longer than two years. To determine whether VEGF-A has an effect on the risk of PCa recurrence and progression, a large cohort of patients with long-term follow-up is mandatory. A major prospective study that will analyse plasma levels of VEGF-A, VEGF-A expression in prostatic tissue, and patient outcome is currently under way in our department.

In summary, we found that plasma levels of VEGF-A were not associated with the established prognostic factors of localized PCa. On the contrary, the expression of VEGF-A in PCa tissue was strongly associated with the Gleason score of cancer. These findings suggest that the expression of VEGF-A in prostate tissue could have a prognostic impact in localized PCa. Because only sparse data are available in the literature, further evaluation of clinical outcome is mandatory to determine the prognostic value of VEGF expression in localized PCa.

References

- Hicklin DJ and Ellis LM: Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23: 1001-1027, 2005.
- Soulitzis N, Karyotis I, Delakas D and Spandidos DA: Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF β 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol* 29: 305-314, 2006.
- Koul D, Shen R, Garyali A, Ke LD, Liu TJ and Yung WK: MMAC/PTEN suppressor gene regulates vascular endothelial growth-factor mediated angiogenesis in prostate cancer. *Int J Oncol* 31: 469-475, 2002.
- Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D and Freeman MR: Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 54: 523-527, 1999.
- Shariat SF, Anwuri VA, Lamb DJ, Shah NV, Wheeler TM and Slawin KM: Association of preoperative plasma levels of vascular endothelial growth factor and soluble vascular cell adhesion molecule-1 with lymph node status and biochemical progression after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 22: 1655-1663, 2004.
- Walsh K, Sherwood RA, Dew TK and Mulvin D: Angiogenic peptides in prostatic disease. *BJU Int* 84: 1081-1083, 1999.
- George DJ, Halabi S, Shepard TF, Vogelzang NJ, Hayes DF, Small EJ and Kantoff PW: Cancer and Leukemia Group B 9480: Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. *Clin Cancer Res* 7: 1932-1936, 2001.
- Kanda S, Miyata Y and Kanetake H: Current status and perspective of antoangiogenic therapy for cancer: urinary cancer. *Int J Oncol* 11: 90-107, 2006.
- Ma ZS, Huynh TH, Ng CP, Do PT, Nguyen TH and Huynh H: Reduction of CWR22 prostate tumor xenograft growth by combined tamoxifen-quercetin treatment is associated with inhibition of angiogenesis and cellular proliferation. *Int J Oncol* 24: 1297-1304, 2004.
- Peyromaure M, Goulvestre C, Fulla Y, Grabar S, Debre B and Dinh-Xuan AT: Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients undergoing prostate biopsies for suspicion of prostate cancer. *Urology* 66: 687-691, 2005.
- Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C and Selby PJ: Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 77: 956-964, 1998.
- George DJ, Regan MM, Oh WK, Tay MH, Manola J, Decalo N, Duggan S, Dewolf WC, Kantoff PW and Bubley GJ: Radical prostatectomy lowers plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with prostate cancer. *Urology* 63: 327-332, 2004.
- Li R, Younes M, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, Frolov A and Ayala G: Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate* 58: 193-199, 2004.
- Jennbacken K, Vallbo C, Wang W and Damber JE: Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF Receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate* 65: 110-116, 2005.
- Galper SL, Chen MH, Catalona WJ, Roehl KA, Richie JP and D'Amico AV: Evidence to support a continued stage migration and decrease in prostate cancer specific mortality. *J Urol* 175: 907-912, 2006.

2ème article

The association of vascular endothelial growth factor receptor-1 with the risk of cancer progression following radical prostatectomy. **Mao K**, Camparo P, Badoual C, Peyromaure M, Barry Delongchamps N, Vieillefond A, Dinh-Xuan AT. *Oncol Rep* 19: 171-5, 2008.

The association of vascular endothelial growth factor receptor-1 with the risk of cancer progression following radical prostatectomy

KAILI MAO¹, PHILIPPE CAMPARO², CECILE BADOUAL³, MICHAËL PEYROMAURE¹,
NICOLAS BARRY DELONGCHAMPS¹, ANNICK VIEILLEFOND⁴ and ANH-TUAN DINH-XUAN⁵

¹Department of Urology, Cochin hospital, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014; ²Department of Pathology, Val de Grâce hospital, 74 Boulevard Port Royal, 75005; ³Department of Pathology, European-Georges Pompidou hospital, 20 rue Leblanc, 75015; Departments of ⁴Pathology and ⁵Physiology, Cochin hospital, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Received July 6, 2007; Accepted September 26, 2007

Abstract. In the current study, we analysed the prognostic value of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) in clinically-localized prostate cancer (PCa). Forty patients who had undergone radical prostatectomy (RP) for clinically-localized PCa were included. Two groups were compared: 17 patients who experienced cancer progression following RP (group 1) and 23 patients who remained free of recurrence after intervention (group 2). Paraffin-embedded sections obtained from the RP specimens of the 40 patients were used to build tissue microarrays. The expression of VEGFR-1 was examined in the RP specimens using immunohistochemistry and was compared between the groups of patients. The two groups had similar tumor characteristics in terms of PSA, Gleason score and pathological stage of cancer. The median intensity score of VEGFR-1 expression was significantly higher in pT3 tumors than in pT2 tumors. Nevertheless, the intensity scores of VEGFR-1 expression were similar in the two groups of patients. Our results suggest that VEGFR-1 expression is not associated with the risk of cancer progression following RP. Therefore, VEGFR-1 may not be of prognostic value in clinically-localized PCa.

Introduction

Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a significant role in angiogenesis. To date, five forms of VEGF have been

identified: VEGF-A, -B, -C, -D and -E. VEGF-A induces differentiation and proliferation of the endothelial cells of blood vessels. It is involved in the growth of many types of tumors, including prostate cancer (PCa) (1). The expression of VEGF-A in prostatic tissue is associated with the presence of cancer and is higher in metastatic PCa than in localized PCa (2). Some studies have shown that the expression of VEGF-A in PCa tissue is associated with the outcome of patients. Furthermore, there is a correlation between circulating levels of VEGF-A and the stage of PCa. For example, Jones *et al* found, in a series of 78 men (16 with localized PCa, 32 with metastatic PCa, 9 with benign prostatic hyperplasia and 21 healthy controls), that serum VEGF-A levels were significantly higher in patients with hormone-refractory PCa than in other groups (3). These findings give strong evidence that VEGF-A in prostatic tissue, and in blood, has a prognostic value in PCa.

VEGFR-1 is one of the receptors for VEGF-A. The functions of VEGFR-1 remain unclear. Preliminary *in vivo* studies suggested that VEGFR-1 was a negative regulator of VEGF activity, however, further investigations reached opposite conclusions (1). Clinical data regarding the expression of VEGFR-1 in PCa are lacking. Therefore, the role of this receptor in PCa is unknown. In the current study, we tried to determine the prognostic value of VEGFR-1 in patients treated for clinically-localized PCa. We compared VEGFR-1 expression in the radical prostatectomy (RP) specimens of two groups of patients: one group of patients who experienced cancer progression following RP and another group of patients who remained free of recurrence after intervention.

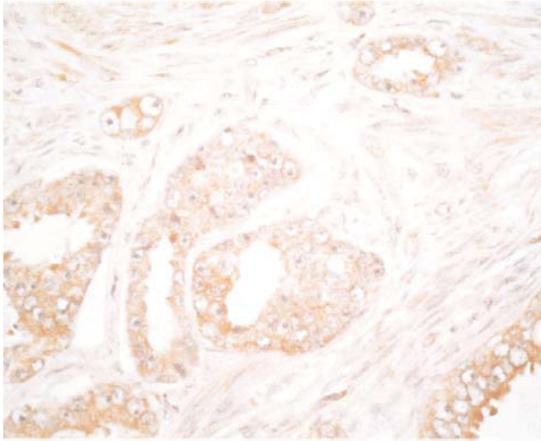
Materials and methods

Study population. Forty patients were included. All the patients underwent RP for PCa between 1994 and 2004. Before RP, a bone scintigraphy and a pelvic CT scan were performed in all cases and no patient had clinical or radiological evidence of lymph node involvement or bone metastases at the time of surgery. A standard lymphadenectomy was performed at the

Correspondence to: Dr Michaël Peyromaure, Service d'Urologie, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France
E-mail: michael.peyromaure@nck.aphp.fr

Key words: prostate cancer, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, receptor, radical prostatectomy

A



B

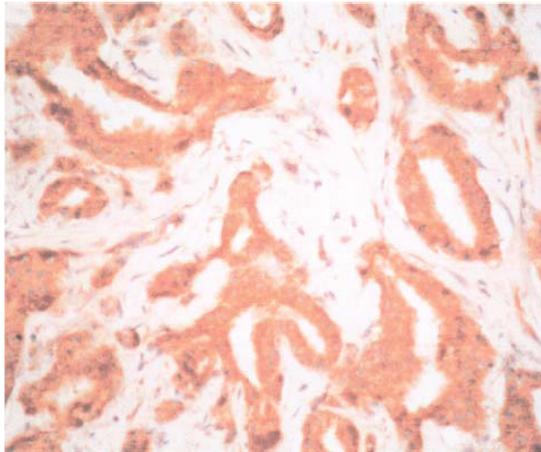


Figure 1. (A) Case of PCa with low VEGFR-1 expression (intensity score) x400. (B) Case of PCa with high VEGFR-1 expression (intensity score) x400.

time of RP, and no patient had lymph node involvement. After RP, 17 patients (group 1) experienced biological recurrence and developed bone metastases. Of these patients, 10 received salvage radiotherapy while 7 received hormone therapy at the time of biological recurrence. Bone metastases were diagnosed by scintigraphy in all cases. The median interval between RP and the occurrence of bone metastases was 48 months (range from 16 to 73). The remaining 23 patients (group 2) did not experience biological recurrence following intervention. None of them received adjuvant therapy. All the patients in group 2 had an undetectable PSA at the time of analysis, with a median follow-up of 112 months (range from 80 to 137) following RP.

Tissue microarrays. Paraffin-embedded sections obtained from the RP specimens were reviewed and mapped. Tissue microarrays were built using a manual tissue arrayer (Beecher Instruments, Alphelys). Areas representative of the tumor with the highest Gleason score were circled. For each patient, four

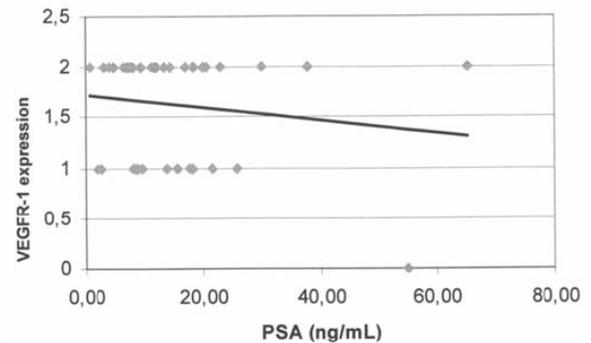


Figure 2. Intensity of VEGFR-1 expression according to PSA values.

cores of 0.6 mm were obtained from the circled areas of the tumor and transferred to a recipient paraffin block. Controls were obtained from non-malignant prostatic tissue.

Immunohistochemistry. Immunohistochemical staining was performed on the section mounted on poly-L-Lysine coated glass slides. Before incubation with primary antibodies, deparaffinised and rehydrated sections were incubated with avidin/biotin blocker (Vector Laboratories, Burlingame, USA) and the Fc receptor was blocked by human serum (5%). A pre-treatment was performed in EDTA solution (pH 6.0) in a microwave. An anti-VEGFR-1 (anti-Flt-1, AF321) (R&D, Minneapolis, USA) was used at the dilution of 1:20 during 3 h. After rinsing in PBS, the horse anti-goat biotinylated, secondary antibody (BA9005) (Abcys, Paris, France) was applied for 30 min. A peroxidase complex was used (PK-6100). To visualise the reaction, sections were incubated with DAB substrate chromogen. Slides were mounted with Glycergel (Dakocytomation) mounting medium and evaluated under a conventional light microscopy. Tissues from breast ductal carcinoma were used as positive controls.

Evaluation of immunostaining. Two pathologists (P.C., C.B.) blinded to clinical data independently scored the slides. The intensity of staining was scored as 0, no detectable signal, 1, weak staining, 2, moderate staining and 3, strong staining (Fig. 1). For each patient, four cores of PCa were obtained. When the four cores showed different intensity scores, the most present score was chosen to define the final intensity score. When the two pathologists found two different final intensity scores for one patient, the highest score was considered for analysis.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the Statistical Analysis System, version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The intensity of VEGFR-1 expression was considered as a non-continuous quantitative variable. The Student's t-test was used to compare the quantitative variables (patient age and PSA values) and the Chi-square test was used to compare the qualitative variables (Gleason score, pathological stage and surgical margins) between the two groups of patients. The Spearman correlation coefficient was used to study the association between the VEGFR-1 expression and PSA values. A Chi-square test was performed

Table I. Preoperative and postoperative characteristics of patients in the two groups.

| | Group 1 (N=17) | Group 2 (N=23) | p-value |
|------------------------------------|----------------|----------------|---------|
| Patient age | | | |
| mean value/SD ^a (years) | 66.3/6.4 | 64.5/5.7 | 0.4 |
| Pre-RP PSA | | | |
| mean value/SD ^a (ng/ml) | 18.3/18.9 | 13.3/6.9 | 0.2 |
| Gleason score | | | |
| <7 | 8 | 9 | |
| 7 | 4 | 10 | |
| >7 | 5 | 4 | 0.5 |
| Pathological stage | | | |
| pT2 | 9 | 13 | |
| pT3 | 8 | 10 | 0.8 |
| Rate of PSM ^b | 17.6% | 13% | 0.7 |

^aStandard deviation. ^bPositive surgical margins.

Table II. Repartition of VEGFR-1 expression according to the pathological stage of PCa.

| Intensity score of VEGFR-1 expression | pT2 stage N (%) | pT3 stage N (%) |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 1 (4.5%) | 0 (0%) |
| 1 | 12 (54.6%) | 2 (11.1%) |
| 2 | 9 (40.9%) | 15 (83.3%) |
| 3 | 0 (0%) | 1 (5.6%) |
| Total | 22 (100%) | 18 (100%) |

to study the associations between the VEGFR-1 expression and other qualitative variables (Gleason score and pathological stage). Then the Chi-square test was used to compare the VEGFR-1 expression between the two groups of patients.

Results

Table I shows the preoperative and postoperative characteristics of patients in group 1 and in group 2. The age of patients, the pre-RP PSA values, the Gleason score, the pathological stages and the rates of positive surgical margins were similar in the two groups.

The intensity of VEGFR-1 expression according to pre-RP PSA values is shown in Fig. 2. There was no correlation between VEGFR-1 expression and PSA values ($r=-0.15$). Moreover, there was no correlation between VEGFR-1 expression and the Gleason score of PCa. VEGFR-1 expression was similar in patients with low grade tumors (Gleason score ≤ 6) and in those with high grade tumors (Gleason score >7) ($p=0.97$).

Table II shows the repartition of VEGFR-1 expression according to the pathological stage of PCa. VEGFR-1 expression was significantly higher in pT3 tumors than in pT2 tumors ($p<0.025$).

The median intensity score of VEGFR-1 expression in the RP specimens was 2 in group 1 and 2 in group 2. The patients who experienced cancer progression and those who remained free of recurrence following RP had the same expression of VEGFR-1.

Discussion

In our experience, the expression of VEGFR-1 in PCa did not differ between patients who experienced cancer progression and those who remained free of recurrence after RP. Our findings suggest that VEGFR-1 expression is not associated with the risk of cancer progression in patients treated for clinically-localized PCa.

Several studies have analysed the clinical impact of VEGF-A expression in PCa. Strohmeier *et al* measured the expression of VEGF-A in 55 PCas and found a correlation between VEGF-A expression and tumor stage and grade (4). Furthermore, they found that the VEGF-A expression was associated with the risk of cancer progression during follow-up. West *et al* studied the expression of VEGF-A in 67 PCas, and found that the cases showing VEGF immunoreactivity in the stroma were associated with reduced survival (5). Our team previously studied the expression of VEGF-A in 100 RP specimens (6). There was a correlation between the VEGF-A expression and the Gleason score. Another recent study, which was based on the same cohort of patients as the current work, found that the VEGF-A expression was significantly higher in patients who experienced cancer progression than in those who remained free of disease after RP (7). Therefore, there is strong evidence that suggests that VEGF-A has a prognostic value in PCa.

To date, three VEGF receptors have been described: VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3. VEGF-A binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 (1). It has been established that these receptors have the ability to stimulate angiogenesis. Nevertheless, their precise functions, and their interactions, remain to be determined. The activation and signaling of VEGFR-2 may be positively or negatively influenced by co-expression and activation of VEGFR-1.

The properties of VEGFR-1 are better known than those of VEGFR-2. VEGFR-1 participates in the recruitment of endothelial cell progenitors and activates growth factors from liver endothelial cells (8). Pathological studies show that VEGFR-1 is overexpressed in malignant prostatic tissue (9,10). The expression of VEGFR-1 on the tumor cells themselves suggests a potential autocrine function for VEGF. Moreover, an aberrant methylation of the VEGFR-1 gene is often present in PCa (11).

Although *in vivo* studies suggest a role for VEGFR-1 in prostatic carcinogenesis, clinical studies regarding the impact of VEGFR-1 in patients with PCa are lacking. To our knowledge, the current study is the first to analyse the prognostic value of VEGFR-1 in patients treated for PCa. We found that VEGFR-1 expression in PCa was not associated with the risk of cancer progression after RP.

Two major limitations of our study must be recognised. Our study included a small number of patients. In group 1, we decided to include only patients who developed bone metastases after RP, which is relatively rare. Since the material available for the determination of VEGFR-1 expression was limited, we included 23 patients in the control group who did not have recurrence following intervention. Our study included only 40 patients, which may represent a limitation. On the other hand, our findings would have been probably similar with a larger study population. Indeed, the median intensity score of VEGFR-1 expression was exactly the same in the two groups. The second limitation of our study is that tissue microarrays and immunochemistry were performed retrospectively, after a long interval (more than 2 years) following RP. Our methods for the determination of VEGFR-1 expression were, therefore, not optimal. Nevertheless, a prospective evaluation seems difficult to perform. Since the wide use of PSA testing, more and more PCas are localized at the time of diagnosis (12). The stage migration of PCa and the improvements in surgical technique result in low rates of biological recurrence following RP. In the most recent series, recurrence-free survival rates are higher than 90% after several years of follow-up. A prospective study of the prognostic value of VEGFR-1 expression after RP would therefore require a very large cohort of patients.

Several studies have analysed the prognostic value of the expression of VEGF-C and its receptor, VEGFR-3, in patients with PCa. VEGF-C causes proliferation of lymphatic endothelial cells and plays a role in tumor lymphangiogenesis (13). Jennbacken *et al* found a higher expression of VEGF-C and VEGFR-3 in patients with lymph node metastases than in those with localized PCa (14). Li *et al* compared the expression of VEGFR-3 in benign prostate hyperplasia and in PCa (15). These authors found that VEGFR-3 was up-regulated in cancer. Moreover, they found a correlation

between VEGFR-3 expression and PSA, Gleason score and lymph node metastases.

The critical issue that remains is the therapeutic impact of VEGF and its receptors. Anti-angiogenic agents include humanised neutralising anti-VEGF monoclonal antibodies, receptor antagonists, soluble receptors, antagonistic VEGF mutants and inhibitors of VEGF receptor function (16). Anti-angiogenic therapy has been shown to be effective in some variants of tumors, although its effectiveness in PCa remains to be clarified. In a recent study, human CaP cells were implanted into nude mouse prostates. Inhibition of the VEGF receptor induced apoptosis of tumor-associated endothelial cells, causing a second apoptotic wave of surrounding tumor cells (17). Several clinical trials investigating anti-VEGF therapy in advanced PCa are ongoing, however their results have not been published yet.

In conclusion, we found that the expression of VEGFR-1 in PCa did not differ between patients who progressed after RP and those who remained free of recurrence. These results suggest that VEGFR-1 expression in tumor tissue has no prognostic value in clinically-localized PCa. Our findings must be confirmed by larger longitudinal studies. Furthermore, the prognostic value of VEGFR-1 in advanced PCa remains to be analysed.

References

- Hicklin DJ and Ellis LM: Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23: 1011-1027, 2005.
- Kwak C, Jin RJ, Lee C, Park MS and Lee SE: Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 89: 303-309, 2002.
- Jones A, Fujiyama C, Turner K, Fuggle S, Cranston D, Bicknell R and Harris AL: Elevated serum vascular endothelial growth factor in patients with hormone-escaped prostate cancer. *BJU Int* 85: 276-280, 2000.
- Strohmeier D, Rossing C, Bauerfeind A, Kaufmann O, Schlechte H, Bartsch G and Loening S: Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. *Prostate* 45: 216-224, 2000.
- West AF, O'Donnell M, Charlton RG, Neal DE and Leung HY: Correlation of vascular endothelial growth factor expression with fibroblast growth factor-8 expression and clinicopathologic parameters in human prostate cancer. *Br J Cancer* 85: 576-583, 2001.
- Peyromaure M, Badoual C, Camparo P, Grabar S, Goulvestre C, Fulla Y, Vieillefond A, Mao K and Dinh-Xuan AT: Plasma levels and expression of vascular endothelial growth factor-A in human localized prostate cancer. *Oncol Rep* 18: 145-149, 2007.
- Peyromaure M, Camparo P, Badoual C, Descazeaud A and Dinh-Xuan AT: The expression of vascular endothelial growth factor is associated with the risk of cancer progression after radical prostatectomy. *BJU Int* 99: 1150-1153, 2007.
- LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ and Ferrara N: Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299: 890-893, 2003.
- Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, Kowalczyk P, Laudone VP, Albertsen PC and Kreutzer DL: Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 54: 567-572, 1999.
- Kollerman J and Helpap B: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flk-1 in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *Am J Clin Pathol* 116: 115-121, 2001.
- Yamada Y, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y, Suzuki H, Takagi A, Matsuzaki T, Sugimura Y, Yatani R and Shiraiishi T: Aberrant methylation of the vascular endothelial growth factor receptor-1 gene in prostate cancer. *Cancer Sci* 94: 536-539, 2003.

12. Aus G, Bergdahl S, Lodding P, Lilja H and Hugosson J: Prostate cancer screening decreases the absolute risk of being diagnosed with advanced prostate cancer-results from a prospective, population-based randomized controlled trial. *Eur Urol* 51: 659-664, 2007.
13. Trojan L, Rensch F, Voss M, Grobholz R, Weiss C, Jackson DG, Alken P and Michel MS: The role of the lymphatic system and its specific growth factor, vascular endothelial growth factor C, for lymphogenic metastasis in prostate cancer. *BJU Int* 98: 903-906, 2006.
14. Jennbacken K, Vallbo C, Wang W and Damber JE: Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF Receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate* 65: 110-116, 2005.
15. Li R, Younes M, Wheeler TM, Scardino P, Ohori M, Frolov A and Ayala L: Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate* 58: 193-199, 2004.
16. Kanda S, Miyata Y and Kanetake H: Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: urinary cancer. *Int J Oncol* 11: 90-107, 2006.
17. Busby JE, Kim SJ, Yazici S, Nakamura T, Kim JS, He J, Maya M, Wang X, Do KA, Fan D and Fidler IJ: Therapy of multidrug resistant human prostate tumors in the prostate of nude mice by simultaneous targeting of the epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor on tumor-associated endothelial cells. *Prostate* 66: 1788-1798, 2006.

3ème article

The prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and its receptor in clinically-localized prostate cancer: a prospective evaluation in 100 patients undergoing radical prostatectomy. **Mao K**, Badoual C, Camparo P, Barry Delongchamps N, Vieillefond A, Dinh-Xuan AT, Peyromaure M. *Can J Urol* 15: 3703-8, 2008.

The prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and its receptor in clinically localized prostate cancer: a prospective evaluation in 100 patients undergoing radical prostatectomy

Kaili Mao, MD,¹ Cécile Badoual, MD,² Philippe Camparo, MD,³
Nicolas Barry Delongchamps, MD,¹ Annick Vieillefond, MD,⁴
Anh-Tuan Dinh-Xuan, MD,⁵ Michaël Peyromaure, MD¹

¹Department of Urology, Cochin Hospital, Paris, France

²Department of Pathology, European-Georges Pompidou Hospital, Paris, France

³Department of Pathology, Val de Grace Hospital, Paris, France

⁴Department of Pathology, Cochin Hospital, Paris, France

⁵Department of Physiology, Cochin Hospital, Paris, France

MAO K, BADOUAL C, CAMPARO P, DELONGCHAMPS NB, VIEILLEFOND A, DINH-XUAN A-T, PEYROMAURE M. The prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and its receptor in clinically localized prostate cancer: a prospective evaluation in 100 patients undergoing radical prostatectomy. *The Canadian Journal of Urology*. 2008;15(5):0000-0000.

Objectives: To study the prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and its receptor VEGFR-1 in localized prostate cancer.

Methods: One hundred patients undergoing radical prostatectomy (RP) for clinically localized prostate cancer were prospectively included. Plasma levels of VEGF-A were measured preoperatively. After intervention, tissue microarrays were built from the RP specimens. VEGF-A and VEGFR-1 expressions in prostate cancer tissue were determined using immunochemistry. Then the associations

between plasma levels of VEGF-A, VEGF-A and VEGFR-1 expressions in prostate cancer tissue, and the outcome of patients were analyzed.

Results: After a median follow-up of 22 months, 14 patients experienced biological recurrence of prostate cancer. There was no correlation between plasma VEGF-A and the risk of recurrence following RP. Moreover, there was no correlation between VEGF-A expression or VEGFR-1 expression in prostate cancer tissue and the risk of recurrence after RP.

Conclusions: Plasma levels of VEGF-A, the expression of VEGF-A and that of VEGFR-1 in prostate cancer tissue did not affect patients outcome following RP. VEGF-A and its receptor VEGFR-1 may have no prognostic value in localized prostate cancer. Further studies with longer follow-up are mandatory to confirm these findings.

Key Words:

Introduction

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important regulator of angiogenesis.

Accepted for publication August 2008

Address correspondence to Dr.1 Michaël Peyromaure, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Five forms of VEGF have been identified: VEGF-A, -B, -C, -D and -E.¹ VEGF-A plays a role in differentiation and proliferation of the endothelial cells of blood vessels. It is involved in the growth of many variants of tumors, including prostate cancer.² VEGF-A expression in prostatic tissue is associated with the presence of cancer, and it is higher in metastatic prostate cancer than in localized prostate cancer.² Moreover, some studies have shown a correlation between circulating levels of VEGF-A and the stage of prostate cancer. For example, Jones et

The prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and its receptor in clinically localized prostate cancer: a prospective evaluation in 100 patients undergoing radical prostatectomy

al noted, in a series of 78 men, that serum VEGF-A levels were significantly higher in patients with metastatic prostate cancer than in those with localized prostate cancer or controls.³ These findings suggest that VEGF-A in prostatic tissue, as well as in blood, could have a prognostic impact in prostate cancer.

VEGFR-1 is one of the receptors for VEGF-A. The functions of VEGFR-1 have not been clearly determined. It participates in recruitment of endothelial cell progenitors, and activates growth factors from liver endothelial cells.⁴ Preliminary *in vivo* studies have suggested that VEGFR-1 was a negative regulator of VEGF activity, but these studies were not confirmed by further investigations.⁴ Although pathological studies show that VEGFR-1 is over-expressed in prostate cancer tissue,⁵ clinical data regarding its prognostic impact are lacking.

Since only few studies have analyzed the clinical utility of VEGF-A and its receptor VEGFR-1 in patients with prostate cancer, we tried to determine their prognostic value in patients treated for localized prostate cancer. We measured the plasma levels of VEGF-A and we determined the tissue expressions of VEGF-A and VEGFR-1 in a cohort of patients undergoing radical prostatectomy (RP). Then we analyzed the associations between the plasma and tissue biomarkers and PSA recurrence.

Material and methods

Patient selection

One hundred consecutive patients (mean age 65.2 years; range 44 to 74) undergoing RP for clinically localized prostate cancer were prospectively enrolled in the study between June and November 2005. No patients had received hormone therapy or radiation therapy prior to surgical intervention. All patients had undergone pelvic CT scan, endorectal magnetic resonance imaging (MRI) and bone scintigraphy before RP. No patients had clinical or radiological evidence of lymph node or bone metastases. A standard bilateral pelvic lymphadenectomy was performed at the time of RP.

After RP, all patients had a PSA determination every 3 months during 1 year, then every 6 months in the absence of recurrence. Biological recurrence following RP was defined as postoperative PSA elevation ≥ 0.2 ng/ml, with a second confirmatory level of PSA of ≥ 0.2 ng/ml.

Assessment of plasma VEGF-A

Blood was taken from all patients the day before RP. VEGF-A was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Blood was spun at 2500 g for 10 minutes; then, the platelet-poor-plasma

was removed and placed in a 5 ml tube, stored at -80°C and thawed just before testing. VEGF-A levels were determined in duplicate with 100 μl of each sample. For each patient, two measurements were therefore available. The mean value of both plasma VEGF-A levels was considered for analysis. According to their amino acid content, five isoforms of VEGF-A have been identified, namely VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189, and VEGF 206. The immunoassay that we used (Bender MedSystems, Vienna, Austria) is designed to measure all isoforms. Sex steroid hormones were not measured in this study.

Tissue microarrays

Slides from the RP specimens were reviewed and mapped. Tissue microarrays were built using a manual tissue arrayer (Beecher Instruments, Alphelys). Areas representative of the tumor with the highest Gleason score were circled. Duplicate 0.6 mm cores were obtained from the circled areas of tumor and transferred to a recipient paraffin block. Controls were obtained from benign prostatic tissue.

Immunohistochemistry (VEGF-A and VEGFR-1)

Immunochemical staining was performed on the section mounted on poly-L-Lysine coated glass slides. Before incubation with primary antibodies, deparaffinized and rehydrated sections were incubated with avidin/biotin blocker (Vector Laboratories, Burlingame, USA) and Fc receptor blocked by human serum (5%). Antigen retrieval was accomplished by heating the slides at 97° in a 0.01 M citrate buffer (PH6) for 15 minutes. An anti-VEGFA-20Mab (clone sc-152; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) was used at the dilution of 1:200 during 1 hour. An anti-VEGFR-1 (anti-Flt-1, AF321) (R&D, Minneapolis, USA) was used at the dilution of 1:20 during 3 hours. After rinsing in PBS, the horse anti goat biotinylated, secondary antibody (BA9005) (Abcys, Paris, France) was applied for 30 minutes. A peroxidase complex was used (PK-6100). To visualize the reaction, sections were incubated with an AEC substrate chromogen (Dakocytomation, Copenhagen, Denmark) for 15 to 20 minutes at room temperature. Slides were mounted with Glycergel (Dakocytomation) mounting medium and evaluated under a conventional light microscope. Breast carcinoma tissues were used as positive controls.

Evaluation of immunostaining

Two pathologists blinded for clinical data independently scored the slides. The intensity of staining was scored as 0 = no detectable signal, 1 = weak staining, 2 = moderate staining, and 3 = strong staining, Figure 1. Because

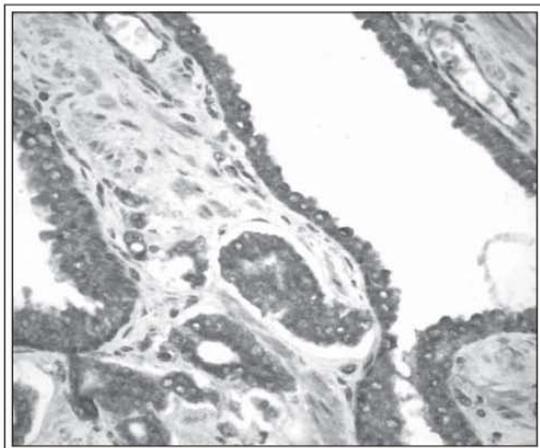


Figure 1a. Case of prostate cancer with moderate VEGF-A expression (intensity score 2) X 400.

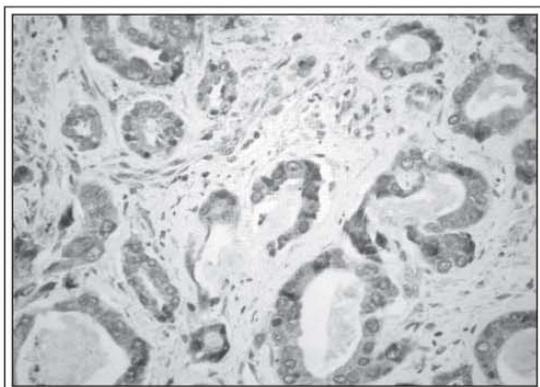


Figure 1b. Case of prostate cancer with high VEGFR-1 expression (intensity score 3) X 400.

of the duplicate nature of the arrays, two values were obtained for each patient. The highest intensity value was considered for analysis. When both pathologists found two different intensity scores for one patient, the highest score was considered for analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Analysis System, version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The Mann-Whitney test was used to compare plasma VEGF values, and VEGF-A and VEGFR-1 expressions between patients who experienced recurrence following RP and those who remained free of recurrence.

TABLE 1. Characteristics of tumors

| | n (%) |
|-------------------------------------|------------|
| Gleason score on RP specimen | |
| < 6 | 1 (1%) |
| 6 | 51 (52%) |
| 3 + 4 | 24 (24.5%) |
| 4 + 3 | 16 (16.3%) |
| > 7 | 6 (6.2%) |
| Pathological stage | |
| pT0 | 2 (2%) |
| pT2 | 62 (62%) |
| pT3 | 36 (36%) |
| Surgical margins | |
| Positive | 19 (19%) |
| Negative | 81 (81%) |

Results

Mean preoperative PSA was 7 ng/ml (range 1-32). Table 1 lists the characteristics of tumors on pathological examination. Two patients had a pT0 tumor. The rate of pT3 tumors was 36%, and that of positive surgical margins was 19%. None of the patients had lymph nodes involvement.

Plasma levels of VEGF-A could be measured in all patients. Median plasma level of VEGF-A was 145.5 pg/ml (IQR 55.5-230; range 0-4,100). For technical reasons, VEGF-A and VEGFR-1 expressions in prostate cancer tissue could not be determined in 11 patients. Table 2 shows the repartition of VEGF-A and VEGFR-1 expressions in the remaining 89 patients.

TABLE 2. Repartition of VEGF-A and VEGFR-1 expressions in 89 RP specimens

| Intensity score | n (%) |
|-----------------|------------|
| VEGF-A | |
| 0 | 9 (10.1%) |
| 1 | 1 (1.1%) |
| 2 | 4 (4.5%) |
| 3 | 17 (19.1%) |
| 4 | 22 (24.7%) |
| 5 | 32 (40%) |
| 6 | 4 (4.5%) |
| VEGFR-1 | |
| 1 | 10 (11.2%) |
| 2 | 73 (82%) |
| 3 | 6 (6.8%) |

the clinical impact of VEGF-A expression in prostate cancer. Strohmeier et al measured the expression of VEGF-A in 55 prostate cancers, and found a correlation between VEGF-A expression and tumor stage and grade.⁷ In addition, they found that VEGF-A expression was associated with the risk of cancer progression during follow-up. West et al measured the expression of VEGF-A in 67 prostate cancers, and reported that VEGF immunoreactivity in the prostatic stroma was associated with reduced survival.⁸ However, both these studies included tumors of all stages, most of them being locally-advanced or metastatic. Therefore, they could not determine the prognostic value of VEGF-A expression in localized disease. Our team has previously studied the prognostic value of VEGF-A expression in clinically localized prostate cancer.⁹ In this study, we compared VEGF-A expression in the RP specimens of 17 patients who experienced cancer progression following RP and in 23 patients who remained free of recurrence. We found that VEGF-A expression was higher in patients who experienced progression. However, our study had two major limitations: it was retrospective, and it included a small number of patients. In the current study, patients were prospectively included and highly selected. All had a clinically localized prostate cancer, without evidence of extraprostatic extension on pelvic CT scan, endorectal MRI or bone scintigraphy. To our knowledge, our current study is the first to investigate the prognostic value of VEGF-A expression exclusively in clinically localized prostate cancer. Surprisingly, we found that VEGF-A expression was correlated with the Gleason score of tumors, but not with the patient's outcome. One major limitation of our study is its short follow-up. With a higher number of patients included and with a longer follow-up, the results of our study could have been different.

We also found that the expression of VEGFR-1 had no prognostic impact on patients outcome. A genetic study has suggested that the methylation of the VEGFR-1 gene is involved in prostatic carcinogenesis.¹⁰ Moreover, a pathological study has shown an overexpression of VEGFR-1 in prostate cancer tissue.¹¹ These studies support the hypothesis that VEGFR-1 plays a role in prostate cancer development. However, the clinical impact of VEGFR-1 in patients treated for prostate cancer remains unknown. Further studies are therefore necessary to determine the prognostic utility of VEGFR-1 in prostate cancer.

In summary, the results of our current study suggest that plasma levels of VEGF-A, as well as VEGF-A and VEGFR-1 expressions in prostate cancer tissue, have no prognostic value in localized prostate cancer. However,

VEGF-A and its receptors may have a prognostic value in more advanced disease. Recently, Green et al found, in a series of 50 patients receiving radiation therapy for locally-advanced prostate cancer (T3N0M0 stage), that VEGF expression on pretreatment diagnostic tumor biopsies was the only significant factor associated with disease-specific survival.¹² Similarly, the role of VEGF has been highly suggested in advanced prostate cancer. Duque et al compared the plasma levels of VEGF-A in 54 patients with localized prostate cancer, 26 patients with metastatic prostate cancer, and 26 healthy controls.¹³ They found that patients with metastases had significantly higher plasma levels than those with localized tumors and controls. It is therefore likely that VEGF-A and its receptor VEGFR-1 have a prognostic impact in advanced prostate cancer, but not in localized disease.

Finally, the critical question remains whether VEGF can be used as a target to treat prostate cancer. Antiangiogenic therapies are currently under investigation in metastatic prostate cancer. In a preclinical model, Yazici et al showed that the blockade of the VEGFR-1 signaling pathways combined with chemotherapy could suppress the dissemination of metastases of human prostate cancer cells.¹⁴ Several clinical trials investigating the benefit of anti-VEGF therapy in prostate cancer are ongoing in the United States and in Europe.

Conclusions

Plasma levels of VEGF-A, and the expression of VEGF-A and VEGFR-1 in prostate cancer tissue, as assayed in this study, did not predict tumor recurrence following RP for clinically localized prostate cancer. Additional studies with longer follow-up are necessary to validate these initial findings, as well as further studies on patients with locally-advanced and metastatic disease. □

References

1. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-1027.
2. Delongchamps NB, Peyromaure M, Dinh-Xuan AT. Role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Urology* 2006;68:244-248.
3. Jones A, Fujiyama C, Turner K, Fuggle S, Cranston D, Bicknell R, Harris AL. Elevated serum vascular endothelial growth factor in patients with hormone-escaped prostate cancer. *BJU Int* 2000;85:276-280.
4. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.

The prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and its receptor in clinically localized prostate cancer: a prospective evaluation in 100 patients undergoing radical prostatectomy

TABLE 3. Correlation analysis between plasma VEGF, VEGF-A expression, VEGFR-1 expression and Gleason score on RP specimen

| | Gleason score < 7 | Gleason score ≥ 7 | Mann-Whitney (z) | p-value |
|---------------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------|
| Median plasma VEGF | 120 [0-4005] | 80 [0-4100] | 0.1 | 0.09 |
| Median VEGF-A expression | 4 [0-6] | 5 [0-6] | 0.01 | 0.005 |
| Median VEGFR-1 expression | 2 [1-3] | 2 [1-3] | 0.73 | 0.36 |

Plasma levels of VEGF-A, as well as VEGF-A and VEGFR-1 expressions in prostate cancer tissue, were not correlated with preoperative PSA (Pearson's correlation, $p > 0.1$). However, VEGF-A expression in prostate cancer tissue was significantly higher in patients with high-grade disease (Gleason score ≥ 7), Table 3.

After a median follow-up of 22 months following RP, 14 patients experienced biological recurrence of prostate cancer. Of them, 10 received radiation therapy, and the remaining 4 patients were managed with active monitoring. No patients had evidence of disease progression at the time of analysis. Plasma levels of VEGF-A, expression of VEGF-A and expression of VEGFR-1 in prostatic tissue were not significantly different in patients who recurred and in those who remained free of recurrence, Table 4.

Discussion

To date, the clinical impact of VEGF-A in localized prostate cancer has not been clarified. VEGF-A may be measured either in blood or in prostatic tissue. In the current study, we found that plasma levels of VEGF-A had no prognostic value in patients undergoing RP. In a previous study, Shariat et al analyzed the plasma levels of VEGF-A in 215 patients who underwent

RP, in 9 patients with untreated metastatic prostate cancer, and in 40 controls.⁶ Among the patients treated with RP, preoperative levels of VEGF-A were significantly higher in those with Gleason score ≥ 7, in those with pT3 stage, and in those with lymph nodes involvement. Moreover, there was a correlation between plasma VEGF-A and the risk of biochemical progression following RP. Our current study was not consistent with these findings. This discrepancy could be attributed to differing methods of VEGF measurement. Indeed, we used an antibody that is designed to measure all isoforms of VEGF-A, whereas Shariat et al used an immunoassay technique that measures only two isoforms (VEGF 121 and VEGF 165). Another explanation may be our strict inclusion criteria. Indeed, we included a vast majority of low grade tumors, while in the series of Shariat et al a significant proportion of patients had more aggressive tumors.

Another finding of our study is that the expression of VEGF-A in prostate cancer tissue had no prognostic value in localized prostate cancer. Although we found an association between VEGF-A expression in prostate cancer tissue and the Gleason score of tumors, there was no correlation with the risk of biological recurrence following intervention. Several studies have analyzed

TABLE 4. Correlation analysis between plasma VEGF, VEGF-A expression, VEGFR-1 expression and the risk of recurrence

| | Gleason score < 7 | Gleason score ≥ 7 | Mann-Whitney (z) | p-value |
|---------------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------|
| Median plasma VEGF | 120 [0-4005] | 80 [0-4100] | 0.1 | 0.09 |
| Median VEGF-A expression | 4 [0-6] | 5 [0-6] | 0.01 | 0.005 |
| Median VEGFR-1 expression | 2 [1-3] | 2 [1-3] | 0.73 | 0.36 |

The prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and its receptor in clinically localized prostate cancer: a prospective evaluation in 100 patients undergoing radical prostatectomy

5. Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, Kowalczyk P, Laudone VP, Albertsen PC, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 1999;54:567-572.
6. Shariat SF, Anwuri VA, Lamb DJ, Shah NV, Wheeler TM, Slawin KM. Association of preoperative plasma levels of vascular endothelial growth factor and soluble vascular cell adhesion molecule-1 with lymph node status and biochemical progression after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2004;22:1655-1663.
7. Strohmeyer D, Rossing C, Bauerfeind A, Kaufmann O, Schlechte H, Bartsch G, Loening S. Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. *Prostate* 2000;45:216-224.
8. West AF, O'Donnell M, Charlton RG et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression with fibroblast growth factor-8 expression and clinico-pathologic parameters in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2001;85:576-583.
9. Peyromaure M, Camparo P, Badoual C, Descazeaud A, Dinh-Xuan A-T. The expression of vascular endothelial growth factor is associated with the risk of cancer progression after radical prostatectomy. *BJU Int* 2007;99:1150-1153.
10. Yamada Y, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa S, Suzuki H, Takagi A, Matsuzaki T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T. Aberrant methylation of the vascular endothelial growth factor receptor-1 gene in prostate cancer. *Cancer Sci* 2003;94:536-539.
11. Pallares J, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans LI de Torres I. 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;21:857-865.
12. Green MM, Hiley CT, Shanks JH et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in locally invasive prostate cancer is prognostic for radiotherapy outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:84-90.
13. Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D, Freeman MR. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 1999;54:523-527.
14. Yacizi S, Kim SJ, Busby JE et al. Dual inhibition of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor phosphorylation for antivasular therapy of human prostate cancer in the prostate of nude mice. *Prostate* 2005;65:203-215.

RÉSUMÉ

Ce travail a analysé l'expression du facteur de croissance angiogénique, le VEGF-A, et de son récepteur VEGFR-1, dans le cancer prostatique localisé.

Dans la première partie, nous avons mesuré le taux plasmatique de VEGF-A chez 100 patients opérés d'un cancer prostatique localisé. Nous avons également mesuré l'expression tissulaire du VEGF-A sur les pièces opératoires. Il n'y avait pas d'association entre le VEGF-A plasmatique et les facteurs pronostiques du cancer prostatique. Cependant, l'expression du VEGF-A était corrélée au score de Gleason ($p=0,01$).

Dans la deuxième partie, la même cohorte de patients a été utilisée. L'expression tissulaire du VEGFR-1 a également été mesurée. Les patients ont été suivis avec des dosages réguliers du PSA. Durant le suivi, 14 patients ont eu une récurrence biologique. Ni le taux plasmatique de VEGF-A ($p=0,25$), ni l'expression tissulaire du VEGF-A ($p=0,38$), ni l'expression tissulaire du VEGFR-1 ($p=0,34$) n'étaient associés au risque de récurrence biologique.

Dans la troisième partie, nous avons mesuré l'expression tissulaire du VEGF-A et du VEGFR-1 sur les pièces opératoires de 40 patients opérés d'un cancer prostatique localisé. L'expression tissulaire du VEGF-A était significativement plus importante chez les patients ayant eu une progression tumorale après l'intervention que chez les patients n'ayant pas récidivé ($p=0,046$). En revanche, celle du VEGFR-1 était identique dans les deux groupes. L'expression tissulaire du VEGF-A était le facteur prédictif de progression tumorale le plus significatif.

Ces résultats suggèrent que l'expression tissulaire du VEGF-A a un impact pronostique dans le cancer prostatique cliniquement localisé.

Mots clés :

Cancer de prostate, facteur de croissance, VEGF, angiogénèse, prostatectomie radicale, pronostic, facteur pronostique, immunohistochimie

RESUMÉ DE LA THÈSE EN ANGLAIS

This study analysed the expression of angiogenic growth factor, VEGF-A and its receptor, VEGFR-1 in localized prostate cancer.

In the first part, we measured the plasma levels of VEGF-A in 100 patients operated with radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. We also measured the tissue expression of VEGF-A using ELISA on the surgical specimen. There were no associations between plasma levels of VEGF-A and the usual prognostic factors of prostate cancer. However, the tissue expression of VEGF-A correlated with Gleason score ($P = 0.01$).

In the second part, we used the same patients group. Patients were prospectively followed with regular PSA determinations. 14 patients had a biochemical recurrence. Neither plasma level of VEGF-A ($P = 0.25$) nor tissue expression of VEGF-A ($P = 0.38$) and its receptor VEGFR-1 ($p = 0.34$) were associated with the risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy.

Finally, we measured the tissue expression of VEGF-A and VEGFR-1 on the surgical specimens of 40 patients who underwent radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. The tissue expression of VEGF-A in patients who experienced progression was significantly higher than in those who remained free of recurrence ($P = 0.046$). However, the expression of VEGFR-1 was similar in both groups. In logistic analysis, the expression of VEGF-A was the most significant predictor of tumor progression.

These results suggest that the tissue expression of VEGF-A has a prognostic impact in clinically localized prostate cancer.