



**HAL**  
open science

# Recherche de biomarqueurs pronostiques dans le cancer de la vessie dans la population Tunisienne

Islem Ben Bahria-Sediki

## ► To cite this version:

Islem Ben Bahria-Sediki. Recherche de biomarqueurs pronostiques dans le cancer de la vessie dans la population Tunisienne. Cancer. École pratique des hautes études - EPHE PARIS; Université de Tunis El Manar, 2016. Français. NNT : 2016EPHE3032 . tel-02101638

**HAL Id: tel-02101638**

**<https://theses.hal.science/tel-02101638>**

Submitted on 17 Apr 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique  
des Hautes Études



Université de  
Tunis El Manar

École Pratique des Hautes Études  
Mention « Systèmes intégrés, environnement et biodiversité »

École doctorale de l'École Pratique des Hautes Études  
*Immunologie et Immunothérapie des cancers / EPHE : EA7269*

Et  
Université en cotutelle

École doctorale de l'Université Tunis EL Manar  
*Génétique, Immunologie et pathologies Humaines*

## **Recherche de biomarqueurs pronostiques dans le cancer de la vessie dans la population Tunisienne**

Par ISLEM BEN BAHRIA-SEDIKI

Thèse de doctorat de [Biologie Cellulaire et Moléculaire et Sciences de la Santé]

Sous la direction de :

M. Ali BETTAIEB, Pr, Ecole pratique des hautes études  
et de Mme Amel BEN AMMAR EL GAAIED, Pr, Faculté des sciences de Tunis

Soutenue le 26/05/2016

Devant un jury composé de :

M. Olivier MICHEAU, Directeur d'étude, Université de bourgogne  
M. Kamel HAMZAOUI, Professeur, Faculté des sciences de médecine de Tunis  
M. Bernard MIGNOTTE, Professeur, Ecole pratique des hautes études  
M. Ali BETTAIEB, Professeur, Ecole pratique des hautes études  
Mme. Amel BEN AMMAR EL GAAIED, Professeur, Faculté des sciences de Tunis

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire d'Immunologie, Immunothérapie des cancers à la faculté de Médecine de Dijon, (France) sous la direction du Pr. Ali BETTAIEB et au sein du Laboratoire de Génétique, Immunologie et Pathologies Humaines à la faculté des Sciences de Tunis, (Tunisie) sous la direction du Pr. Amel BENAMMAR ELGAAÏED, en collaboration avec le Service d'Urologie de l'Hôpital Charles Nicolle de Tunis, (Tunisie).*

# DÉDICACES

Je commence par remercier DIEU le tout puissant, pour tout ce qu'il m'a apporté...

*D'avoir eu la bonté de m'entourer de personnes formidables qui ont, chacune à leur façon, et ce, à différentes étapes de mon cheminement, contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de cette thèse de doctorat.*

Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

**À mes parents, À ma très chère mère Khira et à mon très cher père Hamadi,**

*Même si les kilomètres nous séparent, je pense toujours bien à vous. Votre amour, votre éducation et votre soutien m'ont aidé à grandir et m'ont construite. Je vous en suis reconnaissante et j'espère suivre vos pas dans l'éducation de mes enfants incha'Allah.*

**À Mon époux, Mourad & À Ma fille, Lyna,** les amours de ma vie.

*Les mots me manquent pour remercier, à sa juste valeur, mon époux, pour son soutien moral et psychologique indispensables pour maintenir ce projet, et surtout à sa patiente à toute épreuve.*

*Un remerciement spécial adressé à ma fille Lyna qui a pimenté ma thèse pour toutes les nuits blanches passées avec elle. Et désolé de n'avoir pas pu consacrer plus de temps à toi chère fille.*

*Une autre pensée pour ma future deuxième fille incha'Allah pour toi qui ne pourra pas assister en tant que spectateur mais en tant qu'acteur et pour laquelle, tu seras fière de ta maman.*

**À Mes deux sœurs, Arwa & Ibtihel,**

*Qui n'ont cessé de me combler par leur amour et leur tendresse. Vous êtes dans mon cœur, Merci de me soutenir, de près ou de loin durant mes études.*

**À Ma belle-famille,**

*Vous êtes devenue ma deuxième famille et je vous remercie pour m'avoir acceptée et toujours soutenue et aidée quel que soit les conditions.*

**Merci à toute ma famille de loin ou de près sans aucune exception.**

*À tous mes amis, Haifa, Hajer, Nejla, Khouloud, Ibtihel...*

*Je ne vous oublierai jamais et j'espère que la vie, nous permettra de nous revoir plus souvent.*

*Un grand merci aussi pour mes amis de Dijon : Carla, Sarah, Cindy, Myriam, Nathir, pour leur aide et leur soutien avec mes sincères vœux de réussite.*

## **Remerciements**

*Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse.*

*Je voudrais tout d'abord remercier le Pr..... d'avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse.*

*Je voudrais remercier également mes deux rapporteurs : Pr. Kamel Hamzaoui et Pr. Olivier Micheau, d'avoir accepté de juger de mon travail, et participer au jury de ma soutenance.*

*Je remercie bien entendu les autres membres de ce jury Pr. Bernard Mignotte d'avoir accepté d'examiner mon travail et de participer à la soutenance.*

*Enfin, je voudrais remercier mes deux directeurs de thèse :*

*Je remercie Pr. Ali Bettaieb pour son accueil au sein du laboratoire et m'a permis de mettre un pied dans la recherche internationale ; Pour m'avoir accordé toute sa confiance et laissée entière liberté afin de mener à bien ce projet de thèse. Et pour m'avoir appris la patience, et l'attache au destin.*

*Je tiens à remercier Pr. Amel Ben Ammar El Gaaïed, qui m'a accueilli en thèse et m'a ainsi permis de mettre un pied dans le monde de la recherche, et qui a toujours été présent tout au long de ma thèse jusqu'à sa concrétisation.*

*Je voudrais remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Génétique, Immunologie et Pathologies Humaines.*

*Merci à l'ensemble des personnes du laboratoire Immunologie, Immunothérapie des cancers qui m'ont témoigné leur soutien et encouragée dans cette entreprise. Merci les Filles pour vos encouragements et votre aide.*

*Je tenais à remercier tout particulièrement Catherine Paul pour ses précieux et judicieux conseils et pour son soutien sans faille. Merci pour le temps passé à la relecture de ce manuscrit ....*

*Je remercie également tous les médecins, les infirmières et les techniciens du service d'Urologie de l'Hôpital de Charles Nicolle de Tunis, ainsi que les membres du labo d'anapath qui m'ont aidé à collecter mes échantillons et pour leurs encouragements jusqu'au bout du bout.*

*Les personnels de l'archive du service d'urologie de l'hôpital de Charles Nicolle de Tunis qui m'ont permis d'étudier les dossiers des malades.*

# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>1</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>A- LE CANCER DE LA VESSIE : CARACTERISTIQUES CLINIQUES .....</b>	<b>1</b>
I. Structure, fonction et histologie de la vessie.....	1
II. Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des tumeurs vésicales.....	2
II.1 Les tumeurs vésicales : Définitions pathologiques et diagnostic.....	2
II.2 Les symptômes associés aux tumeurs vésicales .....	3
II.3 Diagnostic des tumeurs vésicales.....	3
II.4 Classification Clinicopathologique des tumeurs vésicales.....	4
II.4.1 Le stade tumoral .....	4
II.4.2 Le grade tumoral.....	7
II.5 Le traitement des tumeurs vésicales .....	8
II.5.1 La chirurgie : la résection transurothéliale (RTU).....	10
II.5.2 La chimiothérapie intravésicale .....	10
II.5.3 La radiothérapie .....	11
II.5.4 L'immunothérapie intravésicale au BCG .....	11
II.6 Evolution et récurrence : Aspects pronostiques.....	11
<b>B- CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE DES TUMEURS VESICALES.....</b>	<b>14</b>
I. Le tabagisme .....	15
II. L'exposition professionnelle .....	16
III. Les facteurs infectieux : Irritation et inflammation chronique de la vessie.....	17
IV. Autres facteurs .....	17
IV.1 Arsenic.....	17
IV.2 Les prédispositions génétiques .....	18
<b>C- LES VOIES DE CARCINOGENESE DE CANCER DE LA VESSIE.....</b>	<b>19</b>
<b>D- LES BIOMARQUEURS TUMORAUX DANS LE CANCER DE LA VESSIE.....</b>	<b>21</b>
I. Définition des biomarqueurs tumoraux.....	21
II. Les biomarqueurs tumoraux dans le cancer de la vessie .....	21

<b>E- LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE</b> .....	<b>23</b>
I. Le concept d'immunosurveillance anti-tumorale .....	23
II. Les effecteurs de la réponse anti-tumorale .....	27
II.1 L'immunité innée .....	27
II.2 L'immunité adaptative .....	27
II.2.1 Les lymphocytes B (LB) .....	29
II.2.2 Les lymphocytes T (LT).....	29
II.2.2.1 Les cellules TCD4+.....	29
a. Les lymphocytes Th1.....	30
b. Les lymphocytes Th2 .....	30
c. Les lymphocytes Th17 .....	31
d. Les lymphocytes Treg. ....	31
e. Les lymphocytes T helper folliculaires (Thf) .....	32
f. Autres profils des lymphocytes TCD4+ .....	32
II.2.2.2 Les cellules TCD8+.....	32
II.3 Le microenvironnement tumoral.....	33
III. Mécanismes de cytotoxicité des cellules immunitaires .....	36
III.1 La voie intrinsèque.....	36
III.2 La voie extrinsèque.....	37
III.2.1 La voie des récepteurs à domaine de mort .....	37
III.2.1.1 La voie TNF/TNF-R .....	38
III.2.1.2 La voie de Fas / FasL.....	39
a. Structure de Fas et FasL .....	39
b. Expression des protéines Fas et FasL.....	41
c. La voie de signalisation d'apoptose par Fas/FasL .....	43
d. Fas/FasL et cancer. ....	45
III.2.1.3 La voie TRAIL/TRAIL-Rs .....	45
a. Structure de TRAIL/TRAIL-Rs. ....	45
b. Expression des protéines TRAIL/TRAIL-Rs. ....	47
c. La voie de signalisation d'apoptose par TRAIL/TRAIL-Rs. ....	47
d. Rôles physiologique de la signalisation de la voie TRAIL/TRAIL-Rs...	48
e. TRAIL/TRAIL-Rs et cancer .....	49
<b>F- MECANISME DE RESISTANCE A L'APOPTOSE (VOIE PI3K/Akt).....</b>	<b>50</b>
I. La voie de signalisation de PI3K/Akt .....	50
I.1 Structure de la kinase Akt. ....	51
I.2 Expression de la kinase Akt. ....	51
I.3 La voie de signalisation PI3K/Akt. ....	52
I.4 Rôles physiologique de la signalisation de la voie PI3K/Akt .....	53
I.5 PI3K/Akt et cancer.....	54
<b>Objectifs et stratégies de l'étude.....</b>	<b>58</b>
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>60</b>

<b>Résultats</b> .....	<b>71</b>
<b>A-Etude épidémiologique et clinique du cancer de la vessie au sein de notre cohorte</b> .....	<b>71</b>
I-Données épidémiologiques : (Age, sexe, origines géographiques et tabac) .....	71
II-Données cliniques (stade, grade, récurrence et progression de la maladie) .....	72
<b>B-Signification clinique de l'expression des facteurs de transcription T-bet, GATA-3 et de bcl-6 dans le carcinome de la vessie</b> .....	<b>74</b>
I. Introduction .....	74
II. Résultats.....	75
III. Conclusion.....	77
<b><u>ARTICLE 1 : CLINICAL SIGNIFICANCE OF T-BET, GATA-3, AND BCL-6 TRANSCRIPTION FACTORS EXPRESSION IN BLADDER CARCINOMA</u></b> .....	<b>78</b>
<b>C-Valeur pronostique de FasL et TRAIL solubles et chez les patients atteints de cancer de la vessie</b> .....	<b>104</b>
I. Introduction .....	104
II. Résultats.....	105
III. Conclusion.....	106
<b><u>ARTICLE 2 : PROGNOSTIC VALUE OF SOLUBLE FASL AND TRAIL IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER</u></b> .....	<b>108</b>
<b>D-L'activation d'Akt est corrélée avec l'agressivité de la tumeur chez des patients tunisiens avec cancer de la vessie</b> .....	<b>131</b>
I. Introduction .....	131
II. Résultats.....	132
III. Conclusion.....	133
<b><u>ARTICLE 3 : AKT ACTIVATION CORRELATES WITH TUMOR AGGRESSIVENESS IN TUNISIAN PATIENTS WITH BLADDER CANCER</u></b> .....	<b>135</b>
<b>Discussion générale</b> .....	<b>142</b>
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>157</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>160</b>

# Liste des Figures

- Figure 1 :** Schéma montrant l'anatomie de l'appareil uro-génital chez l'Homme et la localisation de la vessie chez les deux sexes.
- Figure 2 :** Schéma montrant les différentes couches de la paroi vésicale.
- Figure 3 :** Schéma montrant les différentes couches de la paroi de la vessie ainsi que les différents stades anatomopathologiques selon la classification TNM.
- Figure 4 :** Photos montrant les différents grades des tumeurs vésicales.
- Figure 5 :** Schéma montrant l'algorithme thérapeutique pour les tumeurs vésicales.
- Figure 6 :** Représentation schématique des mécanismes d'action du BCG.
- Figure 7 :** Répartition des différents types des tumeurs vésicales.
- Figure 8 :** Incidence mondiale du cancer de la vessie chez les deux sexes.
- Figure 9 :** Schéma représentant les voies la carcinogenèse urothéliale.
- Figure 10 :** Schéma présentant les trois phases d'immuno-editing.
- Figure 11 :** Les différents effecteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.
- Figure 12 :** Méta-analyse de l'impact de différentes populations lymphocytaires T sur le pronostic de différents cancers rapporté dans les publications.
- Figure 13 :** Schéma montrant les deux voies d'apoptose : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.
- Figure 14 :** Structure du Fas et FasL et ses différents domaines.
- Figure 15 :** Clivage de FasL par des métallo-protéases ou par des protéases.
- Figure 16 :** Les événements membranaires proximaux de la voie de signalisation Fas.
- Figure 17 :** TRAIL et ses différents domaines.
- Figure 18 :** Les différents récepteurs de TRAIL chez l'Homme.
- Figure 19 :** Structure de la protéine Kinase Akt.
- Figure 20 :** La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.
- Figure 21 :** Les altérations de la voie PI3K/Akt/mTOR dans différents types de cancer.
- Figure 22 :** Corrélation l'expression de p-Akt et la réponse au BCG.
- Figure 23 :** Schémas présentant la dérégulation de certaines voies de signalisation suite à l'activation des récepteurs de la nicotine.

# Liste des Tableaux

**Tableau 1 :** Classification TNM 2009 des tumeurs vésicales

**Tableau 2 :** Les différents profils des lymphocytes TCD4+

**Tableau 3 :** Paramètres cliniques et épidémiologiques des patients atteints du cancer de la vessie

**Tableau 4 :** Liste des anticorps utilisés en western blot

**Tableau 5 :** Distribution des fréquences du tabac selon la récurrence de la maladie

# Liste des Abréviations

## A

AA : Acide Aminé  
ADAM: A Disintegrin and Metalloprotease  
ADN: Acide DésoxyriboNucléique  
AICD: Activation-Induced Cell Death  
Apaf 1: Apoptotic peptidase activating factor 1  
ARNm : Acide Ribonucléique messenger

## B

Bad: Bcl-2-associated Death promoter  
Bax: Bcl-2-associated X protein  
Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer  
BCG : Bacille de Calmette Guérin  
Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large  
Bcl2: B-cell lymphoma 2  
Bcl6: B-cell lymphoma 6  
Bid: BH3 Interacting-domain Death agonist  
BRCA: Breast cancer gene  
BSA: Bovin Serum Albumin

## C

Caspase: Cystein aspartate-specific protease  
C-FLIP: Cellular FLICE-like inhibitory protein  
CIS : Carcinome in situ  
CIRC : Centre international de recherche sur le cancer  
CKI : Casein Kinase I  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CTL: Cytotoxic T lymphocytes  
CXCR: chemokine (C-X-C motif) receptor

## D

DC: Dendritic Cell  
DD: Death Domain  
DcR: decoy receptors  
DR: Death receptor  
DED: Death Effector Domain  
DISC: Death Inducing Signaling Complex

## E

EBV : Epstein-Barr Virus  
ECBU : Examen Cyto-Bactériologique des Urines  
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique  
EDA-R: Ectodysplasin A receptor  
EGF: Epidermal Growth Factor  
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
Erb-2: Receptor tyrosine-protein kinase  
ERK: Extracellular Signal-Regulated kinases

## F

FADD: Fas Associated Death Domain  
Fas: Fas Receptor (Fatty Acide Synthase)  
FasL: Fas Ligand  
FGFR3: Fibroblast Growth Factor Receptor 3  
FoxP3: Forkhead box Protein 3

## G

GADPH: GlycerAldéhyde-3-Phosphate  
DesHydrogénase  
GATA-3: Trans-Acting T-cell-specific  
transcription factor 3  
GSK: Glykogensynthase-Kinase

## H

HAP: Hydrocarbures aromatique polycyclique  
HER: Human Epidermal growth factor Receptor  
HER2/neu2: Receptor tyrosine-protein kinase  
HIV-1: Human Immunodeficiency Virus  
HLA: Human Leucocyte Antigen  
HTLV-1 : Virus T Lymphotrope humain de type 1

## I

IGF: Insulin-like growth factor 1  
IGFR: Insulin-like growth factor 1 receptor  
IFN- : Interféron  
IL- : Interleukine  
ISUP : Société internationale de pathologistes  
spécialises en urologie

## J

JNK: c-Jun N-terminal kinases

## K

KDa: Kilo Dalton

## L

LB: Lymphocyte B  
LT: Lymphocyte T

## M

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases  
mFasL: Fas Ligand membranaire  
MO: Macrophage  
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

## N

NAT-2 : N-acetyltransferase-2  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor- $\kappa$ B  
NGF: Nerve Growth Factor  
NK: Natural Killer  
NKT: Natural killer lymphocyte T  
NNK: Nicotine-derived nitrosamine ketone

## O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OPG: Osteoprotegerin

## P

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns  
PDK: 3-phosphoinositide Dependent Protein Kinase  
PDGF: Platelet-derived growth factor  
PDGFR: Platelet-derived growth factor receptors  
PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3-kinase  
PI (3) P: Phosphatidyl-Inositol 3-phosphate  
PIP2: Phosphatidyl-Inositol 3, 4-diphosphate  
PIP3: Phosphatidyl-Inositol 3, 4, 5-triphosphate  
PKA: Protéine kinase A  
PKB: Protéine kinase B  
PRD: Prominant Proline Rich Domain  
PRR: Pattern Recognition Receptor  
PSA: Prostate Specific Antigen  
PD1: Programmed cell death 1  
PD-L1: Programmed death-ligand 1  
PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

## Q

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

## R

Rb: retinoblastoma  
REGF: Recombinant Rat Epidermal Growth Factor  
RIP: Receptor-interacting protein  
ROR $\gamma$ t: Orphan nuclear Receptor

RTU: Résection TransUrétrale  
RTK: Receptor tyrosine kinase

## S

sFasL: soluble Fas Ligand  
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

## T

TACE: TNF Alpha Converting Enzyme  
T-bet: T-box transcription factor TBX21  
TCR: T Cell Receptor  
TFH : Lymphocyte T "helper" /auxiliaire Folliculaire  
TGF $\beta$ : Tumor Growth Factor  $\beta$   
Th: Lymphocyte T "helper" /auxiliaire  
TIL: Tumor infiltrating lymphocytes  
TIS: Tumor in situ  
TMD: Domaine Trans-Membranaire  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor  
TNM: Tumor Node Metastasis  
TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
Treg: Lymphocyte T régulateur  
TRAIL: Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand  
TRAF: TNF Receptor-Associated Factor  
TPA: Antigène Tissulaire Polypeptidique

## U

UICC: American Joint Committee on Cancer  
uPAR: Urokinase receptor

## V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

## W

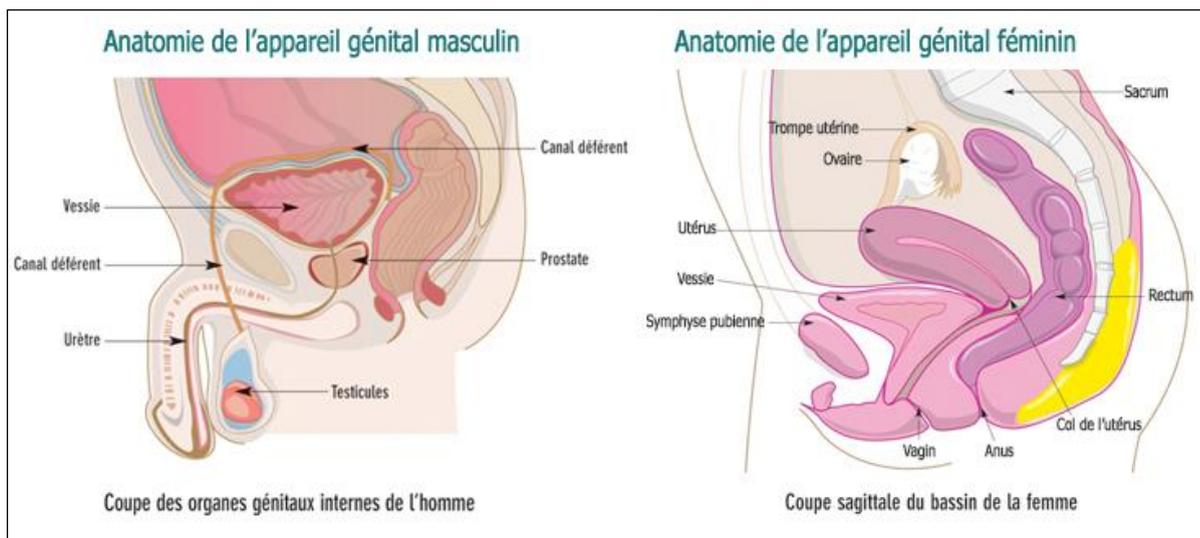
Who: World Health Organization

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

# A. LE CANCER DE LA VESSIE : CARACTERISTIQUES CLINIQUES

## I. Structure, fonction et histologie de la vessie

La vessie est un organe musculaire creux servant à stocker l'urine produite par les deux reins via les deux uretères. En bas de la vessie, on trouve l'urètre, par lequel l'urine va s'écouler à chaque miction. Cet organe très extensible est fermé en bas par deux sphincters assurant la continence urinaire. Lorsque la vessie est pleine, un stimulus est envoyé au cerveau pour communiquer l'envie d'uriner permettant l'ouverture de deux sphincters et l'évacuation de l'urine. La vessie se situe tout en bas de l'abdomen, dans le bassin. Chez l'homme, la vessie se situe devant le rectum, avec en dessous la prostate, une glande qui entoure l'urètre. Chez la femme, la vessie est devant le vagin et l'utérus (Figure 1).

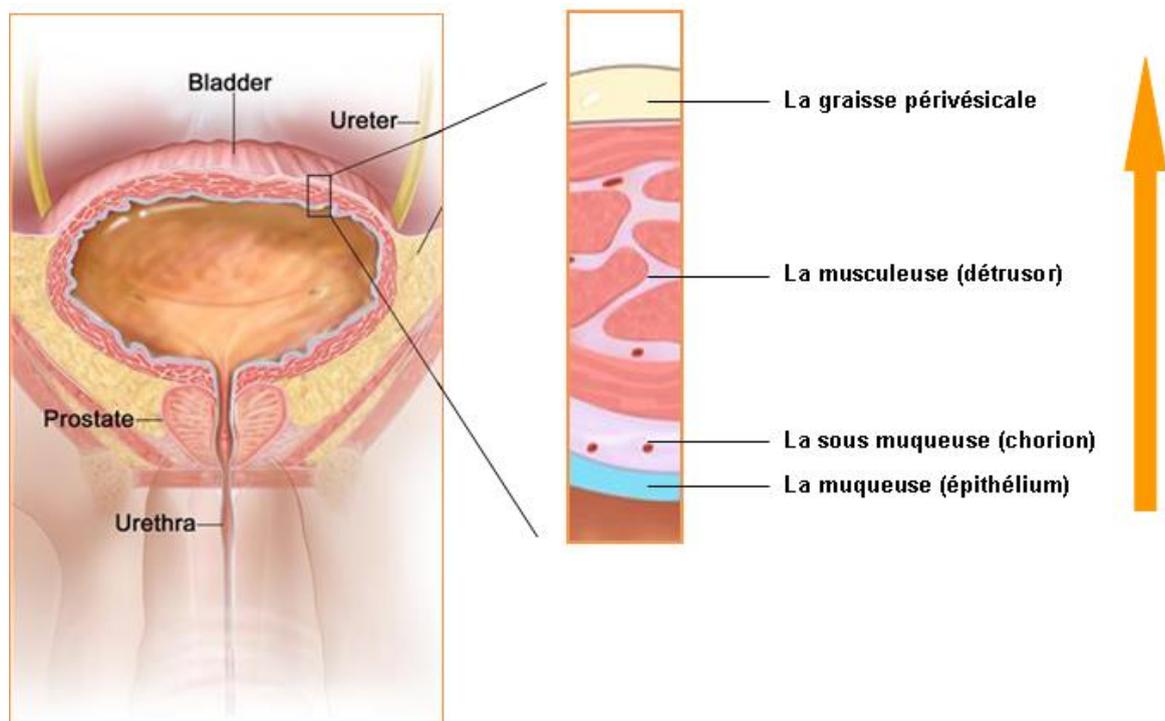


**Figure 1** : Schéma montrant l'anatomie de l'appareil uro-génital chez l'Homme et la localisation de la vessie chez les deux sexes (<http://www.urologiefiatte.com>).

De l'intérieur de la vessie vers l'extérieur, quatre couches constituent la paroi vésicale (Figure 2) :

- La muqueuse (urothélium ou épithélium transitionnel ou épithélium urothélial...), est un tissu qui tapisse tout l'intérieur de la vessie, et qui est donc au contact des urines.

- La sous-muqueuse, appelée aussi chorion, contient des vaisseaux sanguins, des nerfs et des glandes.
- La musculuse est une couche de muscle, appelée aussi détrusor, qui permet à la vessie de se distendre et de se contracter.
- La graisse périvésicale est une couche de graisse qui entoure l'ensemble de la vessie.



**Figure 2 :** Schéma montrant les différentes couches de la paroi vésicale.

## II. Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des tumeurs vésicales

### II.1 Les tumeurs vésicales : Définitions pathologiques et diagnostic

Le cancer de la vessie a comme origine principale (90%) le dérèglement de cellules urothéliales (cellules de la muqueuse), induisant la multiplication excessive de ces cellules et l'apparition de

tumeurs vésicales pouvant être bénignes ou malignes. Ce cancer se présente sous deux formes différentes ; les tumeurs d'origine épithéliales qui représentent plus de 90% des cas et les tumeurs non-épithéliales représentant moins de 10% des cas. Les tumeurs d'origine épithéliales regroupent les tumeurs à cellules transitionnelles, également appelées carcinomes urothéliaux ou par-malpighiens (environ 75 à 90% de tous les cancers vésicaux), les carcinomes pavimenteux également appelés carcinomes épidermoïdes (environ 5%), les adénocarcinomes et plus rarement les carcinomes non différenciés, les carcinomes mixtes et les cancers de type rare. Les tumeurs non-épithéliales sont rares et regroupent les tumeurs conjonctives bénignes et les tumeurs malignes (sarcomes, lymphomes). Les tumeurs secondaires sont à localisation secondaire de cancers du rectum, de l'ovaire ou encore de la prostate notamment.

## II.2 Les symptômes associés aux tumeurs vésicales

Le symptôme le plus évocateur et le plus fréquent permettant d'envisager la présence de l'hématurie vésicale, provient de l'émission de sang dans les urines le plus souvent en fin de miction (Adrian et al, 1998, Van der Meijden et al, 1998). Peuvent également s'associer à cette hématurie des signes d'irritation vésicale associés à des douleurs pelviennes évoquant une cystite, des mictions fréquentes et parfois des sensations de brûlures et de douleurs en bas du dos. Dans les cas de cancer de la vessie plus avancé, avec présence de métastases osseuses, le patient peut ressentir des douleurs osseuses.

## II.3 Diagnostic des tumeurs vésicales

Une analyse d'urine est réalisée afin de confirmer lors de la suspicion d'une tumeur vésicale, la présence d'une hématurie, associée à une culture d'urine (ECBU) pour éliminer la possibilité d'infection urinaire. La cytologie urinaire permet ensuite de déterminer la présence ou l'absence des cellules malignes, et permet également de repérer les tumeurs de haut grade ; cependant, elle n'est pas toujours adaptée à la détection des tumeurs de bas grade.

La cystoscopie est également un examen très efficace pour le diagnostic des tumeurs de la vessie. Elle consiste à introduire un système optique à l'intérieur de la vessie pour repérer et observer des anomalies cancéreuses : nombre, la localisation, taille et aspect de la/les tumeurs. Au cours de cet examen le médecin pratique une biopsie du tissu qui sera alors soumise à un examen anatomopathologique afin de confirmer la malignité de la structure et déterminer le stade et le grade de la tumeur (Van der Meijden et al, 1998).

## II.4 Classification clinicopathologique des tumeurs vésicales

La classification clinicopathologique des tumeurs de la vessie prend en compte deux facteurs histologiques, qui sont le stade tumoral qui décrit le degré d'infiltration de la tumeur dans la paroi vésicale, et le grade tumoral, qui décrit le degré de différenciation des cellules tumorales. C'est l'étude histologique des copeaux de résection de la tumeur primitive qui permet la détermination de ces deux paramètres qui eux-mêmes guident ensuite le choix de la thérapie. De ces deux facteurs vont découler différents types de classifications clinicopathologiques.

### II.4.1 Le stade tumoral

Le stade tumoral est déterminé par le degré d'infiltration de la tumeur dans la paroi vésicale, l'extension de la tumeur en dehors de la vessie et l'envahissement éventuel des ganglions ou d'autres organes à distances ou métastase (Adrian et al, 1998, Van der Meijden et al, 1998).

Il faut noter que 70% à 80% des tumeurs primitives sont des tumeurs superficielles et 20% à 30% sont des tumeurs invasives. Le stade du cancer de la vessie est un facteur pronostique important ; en effet, le stade superficiel a un pronostic plus favorable que le stade invasif. De plus, le stade de la tumeur est étroitement corrélé à la récurrence et à la progression de la maladie donc à la survie des patients.

La classification qui décrit le stade tumoral est la classification « TNM-UICC » de *l'American Joint Committee on Cancer* :

- La lettre « T » (Tumeur) suivie d'un chiffre allant de 0 à 4 décrit l'extension de la lésion dans la paroi de la vessie. Par exemple, les tumeurs classifiées T4 sont les plus invasives et s'étendent aux organes adjacents.
- La lettre « N » (ganglion ou Node *en anglais*) suivie d'un chiffre allant de 0 à 3 détermine la taille et le nombre de ganglions lymphatiques atteints.
- La lettre « M » (Métastase) suivie d'un 0 ou d'un 1 indique si le cancer s'est étendu ou non à des organes distants ou aux ganglions lymphatiques qui sont loin de la vessie.

La classification TNM 2009 de l'UICC des tumeurs vésicales est résumée dans **le tableau 1**.

**Tableau 1 :** Classification TNM 2009 des tumeurs vésicales

TUMEUR (T)	GANGLION (N)	MÉTASTASE (M)
<p>- Tx : tumeur primitive ne pouvant être classée</p> <p>- T0 : pas de tumeur primitive décelable</p> <p><b>TvNIM</b></p> <p>- pTa : tumeur papillaire non invasive</p> <p>- pTis : carcinome in situ : tumeur plane</p> <p>- pT1 : tumeur envahissant le chorion</p> <p><b>TvM</b></p> <p>- pT2 : tumeur envahissant la musculuse</p> <p>– pT2a : tumeur envahissant le muscle superficiel (moitié interne)</p> <p>– pT2b : tumeur envahissant le muscle profond (moitié externe)</p> <p>- pT3 : tumeur envahissant le tissu périvésical</p> <p>– pT3a : envahissement microscopique,</p> <p>– pT3b : envahissement macroscopique (masse extravésicale)</p> <p>- pT4 : envahissement d'un organe périvésical ou de la paroi</p> <p>– pT4a : prostate, utérus ou vagin</p> <p>– pT4b : paroi pelvienne ou paroi abdominale</p>	<p>- Nx : ganglions non évaluables</p> <p>- N0 : pas de métastase ganglionnaire</p> <p>- Atteinte des ganglions hypogastriques, obturateurs, iliaques externes ou pré-sacrés :</p> <p>– N1 : un seul ganglion atteint</p> <p>– N2 : plusieurs ganglions atteints</p> <p>- Atteinte des ganglions de l'iliaque commune :</p> <p>– N3 : un ou plusieurs ganglions</p>	<p>- Mx : la présence de métastases à distance ne peut être évaluée</p> <p>- M0 : Pas de métastases à distance</p> <p>- M1 : Une ou plusieurs métastases à distance</p>

❖ Les tumeurs superficielles (non invasives)

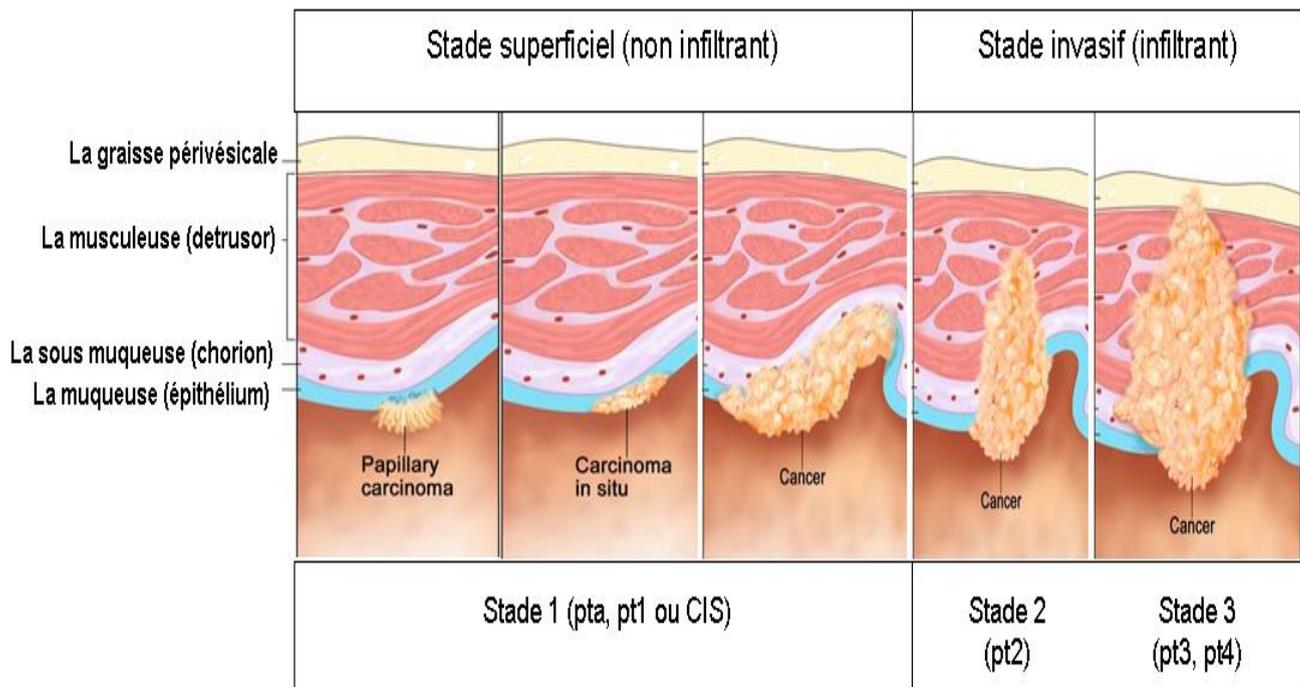
Les tumeurs superficielles sont des tumeurs qui n'infiltrent pas le muscle de la paroi vésicale. On distingue :

- Le polype superficiel, ou papillome qui constitue une tumeur papillaires superficielle envahissant seulement la muqueuse et classé dans le stade pTa.
- Le carcinome in situ noté CIS ou TIS correspondant à une tumeur superficielle, de haut grade, qui a une forme plate souvent diffuse et qui envahit seulement la muqueuse.
- Les tumeurs qui montrent l'invasion de la sous-muqueuse et classées dans le stade pT1 (Figure 3).

Il est important de noter que le groupe des tumeurs superficielles constituent un groupe très hétérogène. Les principaux risques évolutifs de ces tumeurs vésicales superficielles sont la récurrence et la progression.

❖ Les tumeurs infiltrantes (invasives)

Les tumeurs infiltrantes sont des tumeurs qui infiltrent le muscle de la paroi vésicale. Ces tumeurs vésicales envahissantes, ne présentent que 25 à 30% de toutes les tumeurs vésicales, se définissent par l'infiltration de la musculature de la paroi vésicale et peuvent même envahir les structures pelviennes avoisinantes (stade T2 et T3) (Figure 3).



**Figure 3 :** Schéma montrant les différentes couches de la paroi de la vessie ainsi que les différents stades anatomopathologiques selon la classification **TNM**.

## II.4.2 Le grade tumoral

Le grade est déterminé par le degré de la différenciation des cellules cancéreuses et par l'importance des anomalies cellulaires présentes dans la tumeur. Le degré de différenciation est estimé par étude de la morphologie et du comportement des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales.

Deux classifications décrivent le grade tumoral : la classification WHO (*World Health Organization*) en 1973 et celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et de la société internationale de pathologistes spécialisés en urologie (ISUP) datant de 2004 (MacLennan et al, 2007).

Suivant la classification WHO (*World Health Organization*) de 1973, les tumeurs vésicales peuvent être classées en 3 grades :

GI : tumeurs bien différenciées

GII : tumeurs moyennement différenciées

GIII : tumeurs faiblement différenciées

En 2004, l'OMS et l'ISUP ont publié une nouvelle classification du grade tumoral basée sur des critères morphologiques et cytologiques (Sauter and Amin, 2004), distinguant 4 groupes ;

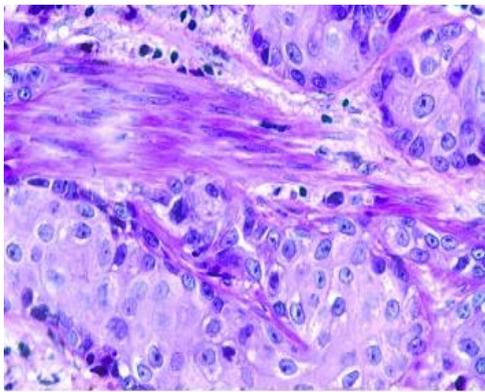
- LMP (Low Malignant Potential), Tumeur urothéliale papillaire de faible potentiel de malignité
- G1 : Carcinome de bas grade (20 à 30 %)
- G2 : Carcinome de moyen grade (50 %)
- G3 : Carcinome de haut grade (30 %)

En effet, les tumeurs présentant de cellules cancéreuses bien différenciées avec une morphologie et un comportement proche de ceux des cellules normales, ont tendance à se développer lentement et risquent moins de se propager. Elles sont alors classées comme des tumeurs **de bas grade**.

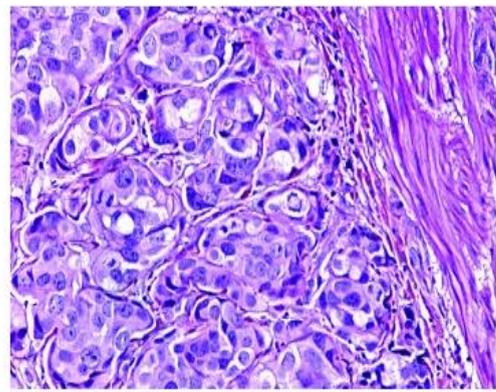
Les tumeurs contenant des cellules cancéreuses moyennement différenciées, avec une morphologie et un comportement plus éloignés de ceux des cellules normales, ont tendance à se développer

modérément et risquent plus de se propager que les cellules bien différenciées. Elles sont alors classées comme des tumeurs **de grade moyen**.

Enfin les tumeurs contenant des cellules cancéreuses peu différenciées ou indifférenciées, avec une morphologie et un comportement très loin des cellules normales, ont tendance à se développer plus rapidement et sont plus susceptibles de se propager. Elles sont alors classées comme des tumeurs **de haut grade (Figure 4)**.



A-Tumeur vésicale à bas grade



B-Tumeur vésicale à haut grade

**Figure 4 :** Photos montrant les différents grades des tumeurs vésicales (grandissement x400)  
d'après (Billerey et al, 2001)

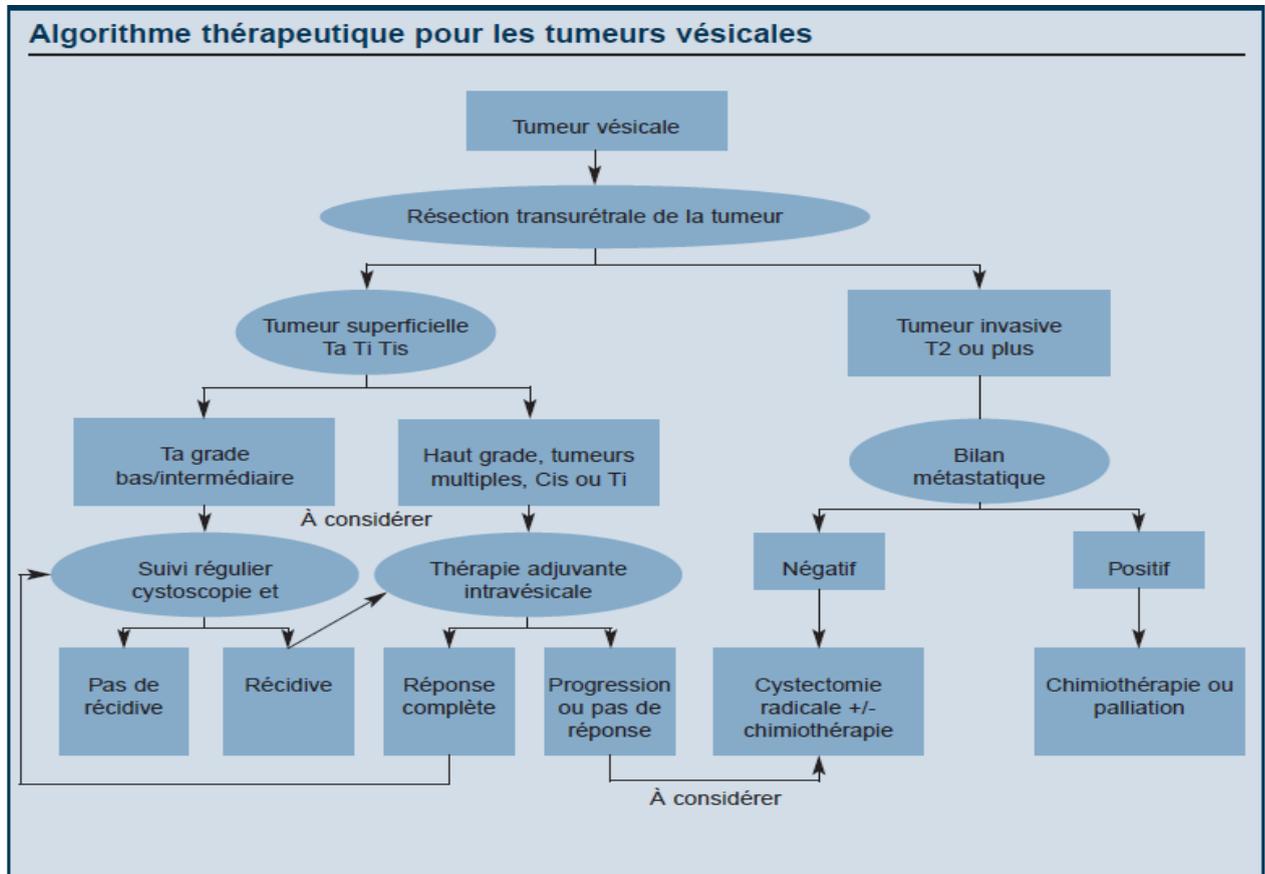
*A- Carcinome urothélial de bas grade, infiltrant la musculature sous forme de lobules. L'anisocaryose est modérée ; les cellules carcinomateuses ont un noyau hyperchromique, finement nucléolé ; les mitoses sont peu nombreuses (< 3 / champs au grossissement x400).*

*B- Carcinome urothélial de haut grade, infiltrant la musculature sous forme de lobules. Les cellules carcinomateuses ont un noyau volumineux, hyperchromique et irrégulier de contours avec un nucléole proéminent. Les mitoses sont nombreuses (3 sur ces champs au grossissement x400).*

## II.5 Traitements des tumeurs vésicales

Le choix du traitement va dépendre de la taille et de la localisation de la tumeur dans la vessie, du stade et du grade de la maladie, de l'âge et de l'état de santé général du patient mais également des souhaits personnels et de l'état d'esprit du patient (Sylvester et al, 2006 et Babjuk et al, 2011, Babjuk et al, 2013).

Les principaux traitements sont la résection transurétrale (RTU), la radiothérapie et les traitements médicamenteux (chimiothérapie et immunothérapie) (Figure 5).



**Figure 5 :** Schéma montrant l’algorithme thérapeutique pour les tumeurs vésicales.

*Le premier temps du traitement consiste en la résection transurétrale de la tumeur. Suite à cette résection l’étude histologique des biopsies permet une classification plus précise de la tumeur qui oriente alors le traitement selon le stade et le grade de la maladie.*

*Les tumeurs superficielles de bas grade ou de grade intermédiaire, sont suivies régulièrement par cystoscopies. En cas de récurrence ou de risques de récurrence, un traitement par instillations intravésicales est nécessaire, soit par chimiothérapie (mitomycine C – MMC), soit par immunothérapie (Bacille Calmette Guérin – BCG).*

*Les tumeurs superficielles de haut grade ou in situ (CIS), sont traitées par thérapie adjuvante. Lorsque le traitement est inefficace et la tumeur progresse, la cystectomie de la vessie +/- la chimiothérapie est alors envisagée.*

*Concernant les tumeurs invasives, si le bilan métastatique est négatif, on se limite à la cystectomie +/- la chimiothérapie, mais si le bilan métastatique est positif le traitement consiste en de la chimiothérapie ou à des soins palliatifs.*

### II.5.1 La chirurgie : la résection transurothéliale (RTU)

La chirurgie est le principal traitement du cancer de la vessie. Son objectif est de retirer la ou les tumeurs, afin de limiter la progression de la maladie et de réduire les risques de récurrence. Elle est aussi utilisée pour mieux évaluer la nature des tumeurs (stade et grade) et décider du traitement à proposer par la suite.

L'étendue de l'opération dépend du degré d'extension de la maladie : lorsque le cancer a un faible risque de récurrence, l'ablation de la tumeur est suffisante. Lorsque le risque de métastases est élevé, l'ablation totale de la vessie est nécessaire, ceci peut être remplacé par une vessie artificielle (néo-vessie) à partir d'un segment d'intestin, qui est connecté aux uretères en amont et à l'urètre en aval.

Les récurrences de tumeur présentent 10 à 15% des cas avec un risque de progression vers un cancer infiltrant beaucoup plus dangereux. Si la tumeur s'étend dans les couches profondes de la paroi vésicale, le risque de dissémination des cellules tumorales dans l'organisme par l'intermédiaire de la lymphe et/ou du sang augmente. Les tumeurs de la vessie infiltrant le muscle ne bénéficient jusqu'ici d'aucun traitement ciblé et seule la chirurgie associée à une radiothérapie ou /et à une chimiothérapie est utilisée (Scarpato et al, 2015).

### II.5.2 La chimiothérapie intravésicale

La chimiothérapie est le traitement de référence des tumeurs vésicales qui ont métastasé. Elle peut être néoadjuvante ou adjuvante (Van der Meijden et al, 1998, Wallerand et al, 2009).

On utilise souvent le protocole « MVAC » qui associe quatre médicaments : le méthotrexate, la vinblastine, l'adriamycine et le cisplatine (Porten et al, 2015), mais d'autres combinaisons peuvent être utilisées comme la bithérapie gemcitabine-cisplatine ou le VAC (vinblastine, adriamycine, cisplatine).

La chimiothérapie peut aussi être envisagée pour traiter des tumeurs infiltrantes non métastatiques, lorsque la cystectomie est contre-indiquée ou lorsque le patient refuse l'opération. Dans ce cas, la chimiothérapie est associée à la radiothérapie. On parle de radio-chimiothérapie concomitante.

### II.5.3 La radiothérapie

La radiothérapie utilise des radiations à haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses. Elle est utilisée seule lorsque la chimiothérapie et la cystectomie sont contre-indiquées ou lorsque le patient refuse la cystectomie. Elle peut être aussi effectuée en même temps qu'une chimiothérapie. On parle de radiochimiothérapie concomitante. Dans ce cas elle est envisagée pour traiter des tumeurs infiltrantes non métastatiques, avec une cystectomie contre-indiquée ou un patient qui refuse l'opération. La radiothérapie seule peut également être utilisée dans un but palliatif (Petrovich et al, 2001 et Byun et al, 2015).

### II.5.4 L'immunothérapie intravésicale au BCG

La résection transurétrale des tumeurs superficielles est souvent suivie d'une immunothérapie intravésicale par le BCG (Bacille-Calmette-Guérin). En effet, le bacille de Calmette-Guérin « BCG » est un vaccin vivant atténué de la bactérie « *Mycobacterium bovis* », il est utilisé habituellement pour la vaccination contre la tuberculose.

Depuis 1976, ce vaccin est utilisé dans le traitement des tumeurs superficielles de la vessie, à haut risque de récurrence et de progression (haut grade et carcinome in situ) (Morales et al, 1976). En effet, il a été montré que ce vaccin diminue la récurrence des tumeurs, l'évolution de la maladie et la mortalité liée au cancer superficiel de la vessie.

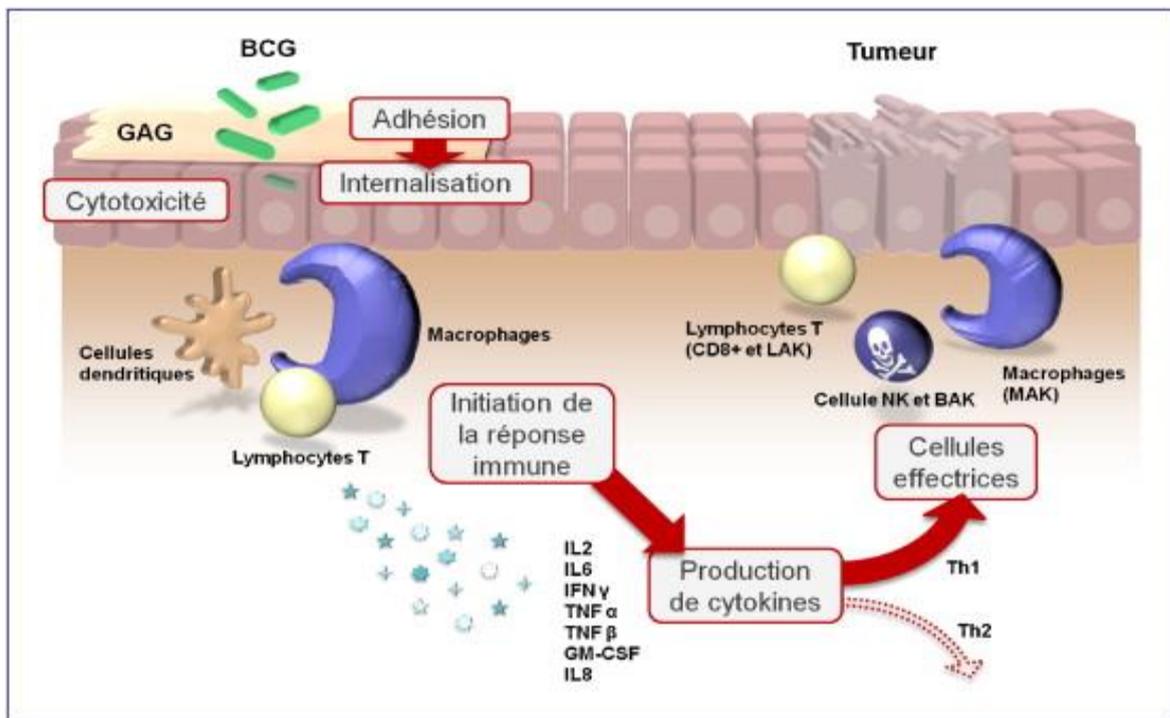
Ce vaccin stimule le système immunitaire, en favorisant une inflammation aiguë locale, suivie d'une infiltration par des macrophages et des leucocytes de l'urothélium et du chorion de la muqueuse vésicale (Chopin et al, 2001, Neuzillet et al, 2012 et Redelman-Sidi et al, 2014) (Figure 6).

## II.6 Evolution, récurrence et progression : Aspects pronostiques

Après traitement du cancer de la vessie, les risques de récurrence ou de progression vers un stade et/ou grade plus agressif sont très importants. La récurrence est par définition la réapparition de la maladie après un traitement. Le cancer de la vessie est caractérisé par l'importance des fréquences de récurrence (dans 50 à 70 % des cas de tumeur superficielles de la vessie) (Holmäng et al, 1999), ce qui nécessite le suivi clinique des malades à long terme, voir même à vie. La progression consiste en l'évolution du stade et/ou du grade de la tumeur vers un stade et/ou grade plus agressif par

rapport à la tumeur primitive. Dans le cancer en général, le stade et le grade sont fortement associés aux risques de progression.

En effet, les tumeurs superficielles peuvent progresser vers un stade superficiel plus évolué et plus grave, voir vers un stade invasif (20% des cas) (Holmäng et al, 1999), alors que les tumeurs invasives peuvent progresser vers un stade invasif plus agressif, permettant le développement de métastases induisant le décès du patient.



**Figure 6 :** Représentation schématique des mécanismes d'action du BCG d'après (Neuzillet et al, 2012).

*L'instillation endovésicale de BCG induit :*

**Une phase d'adhésion –internalisation :** c'est l'adhésion du BCG au mucus vésical puis à l'urothélium.

**Une phase de présentation antigénique :** le BCG active les cellules de l'immunité innée, il est phagocyté par des cellules présentatrices d'antigène (Macrophages et cellules dendritiques...).

**Une phase cytotoxique :** activation des Thelper au contact des cellules présentatrices d'antigène, induisant la production de cytokines (IL2, IL6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , GM-CSF et IL8), qui entraînent l'amplification, la migration et l'activation de cellules cytotoxiques (CD8, lymphocyte NK, LAK, BAK, T gamma-delta et macrophages).

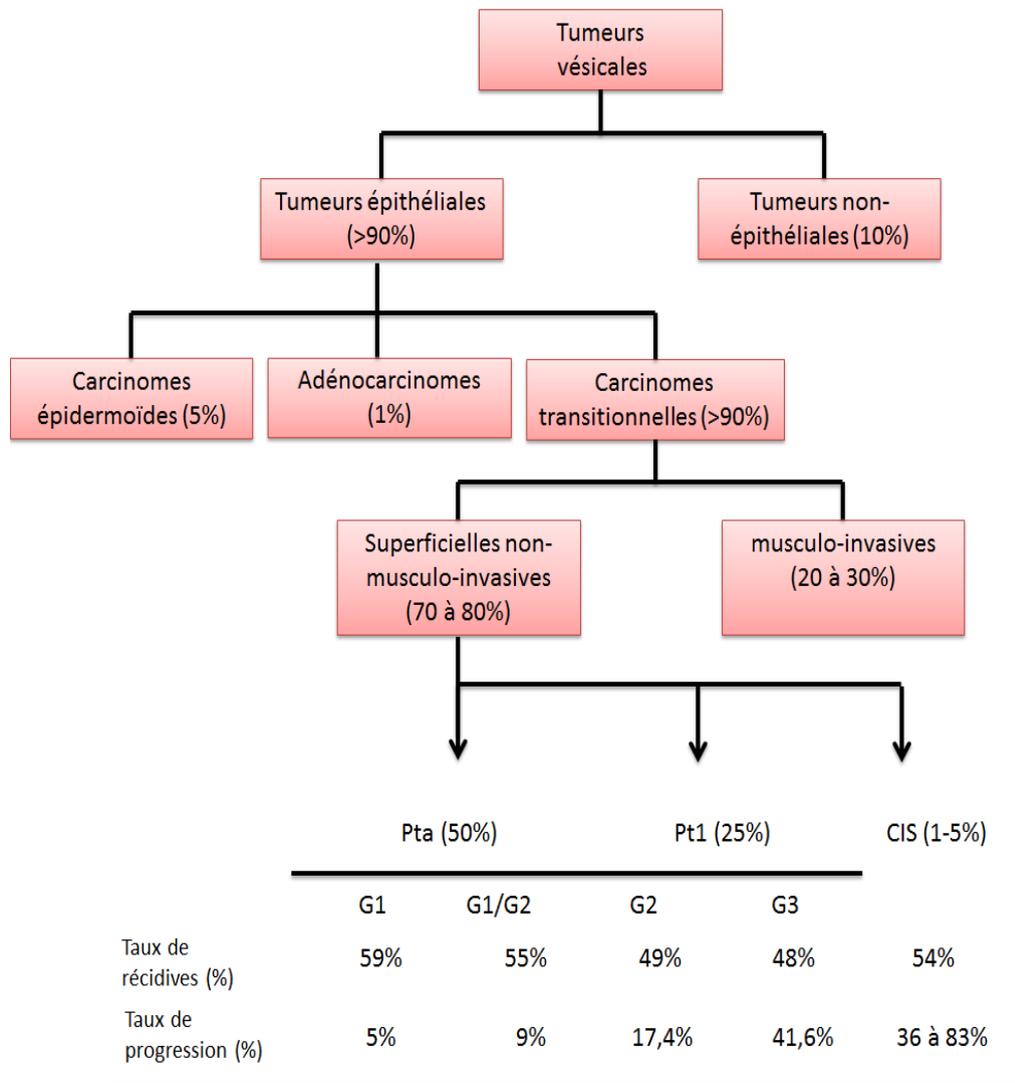
Cependant, les tumeurs de faible grade auront tendance à récidiver alors que celles de haut grade risquent plus de progresser. Plusieurs facteurs de risque de récurrence et de progression ont été identifiés, incluant le grade cytologique, la taille tumorale et l'existence de carcinomes in situ (CIS). Ainsi le groupe des tumeurs superficielles « pTa » présente un risque le plus élevé de récurrence et de progression vers un stade plus agressif (Martinache et al, 2008).

Les tumeurs de stade pTa sont des tumeurs papillaires qui se limitent à l'urothélium, le groupe pTa de bas grade (pTa GI-GII) récidive dans environ 55 à 59% des cas avec un faible risque de progression d'environ 5 à 9% (Herr et al, 1990).

Les tumeurs de stade pT1 sont des tumeurs papillaires qui envahissent la sous-muqueuse, le groupe pT1 de haut grade (pT1 GIII) récidive dans environ (48 % des cas) et possède un profil particulièrement plus agressif et progresse vers un stade infiltrant dans 40 à 60% des cas (Kurth et al, 1992).

Les tumeurs de stade CIS sont des tumeurs planes qui se limitent à l'urothélium, elles se caractérisent par des dysplasies de haut grade (Utz al, 1970), ce qui leur confère un fort potentiel invasif (Althausen et al, 1976 et Kiemeney et al, 1994). Le pourcentage de progression de CIS varie entre 36% et 83% (Figure 7).

Le suivi des patients est donc essentiel pour dépister au plus tôt une éventuelle rechute, afin d'éviter la progression de la maladie vers un stade et/ou un grade plus agressif et intraitable.



**Figure 7** : Répartition des différents types des tumeurs vésicales d’après (Kurth et al, 1992).

## **B- CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES ET FACTEURS DE RISQUE DES TUMEURS VESICALES**

Le cancer de la vessie est le neuvième cancer en importance à l’échelle mondiale (Mahdavifar et al, 2016), représentant une incidence mondiale de 10.1% chez l’homme et de 2.5% chez la femme, cette incidence varie en fonction de la localisation géographique et des différents pays du monde

(Ploeg et al, 2009) (Figure 8). Ce cancer occupe la deuxième place sur l'ensemble des cancers urogénitaux, après le cancer de la prostate. En 2012, 429.800 nouveaux cas ont été diagnostiqués dans le monde avec 165.100 morts et un sex-ratio de 3/1 (Torre et al, 2015).

Durant ces dernières années, son incidence a été plus élevée dans les pays développés et certains pays de l'Afrique, avec une augmentation du taux de mortalité dans les pays de l'Afrique du Nord et les pays du Moyen Orient (Malats et al, 2015, Mahdavi et al, 2016).

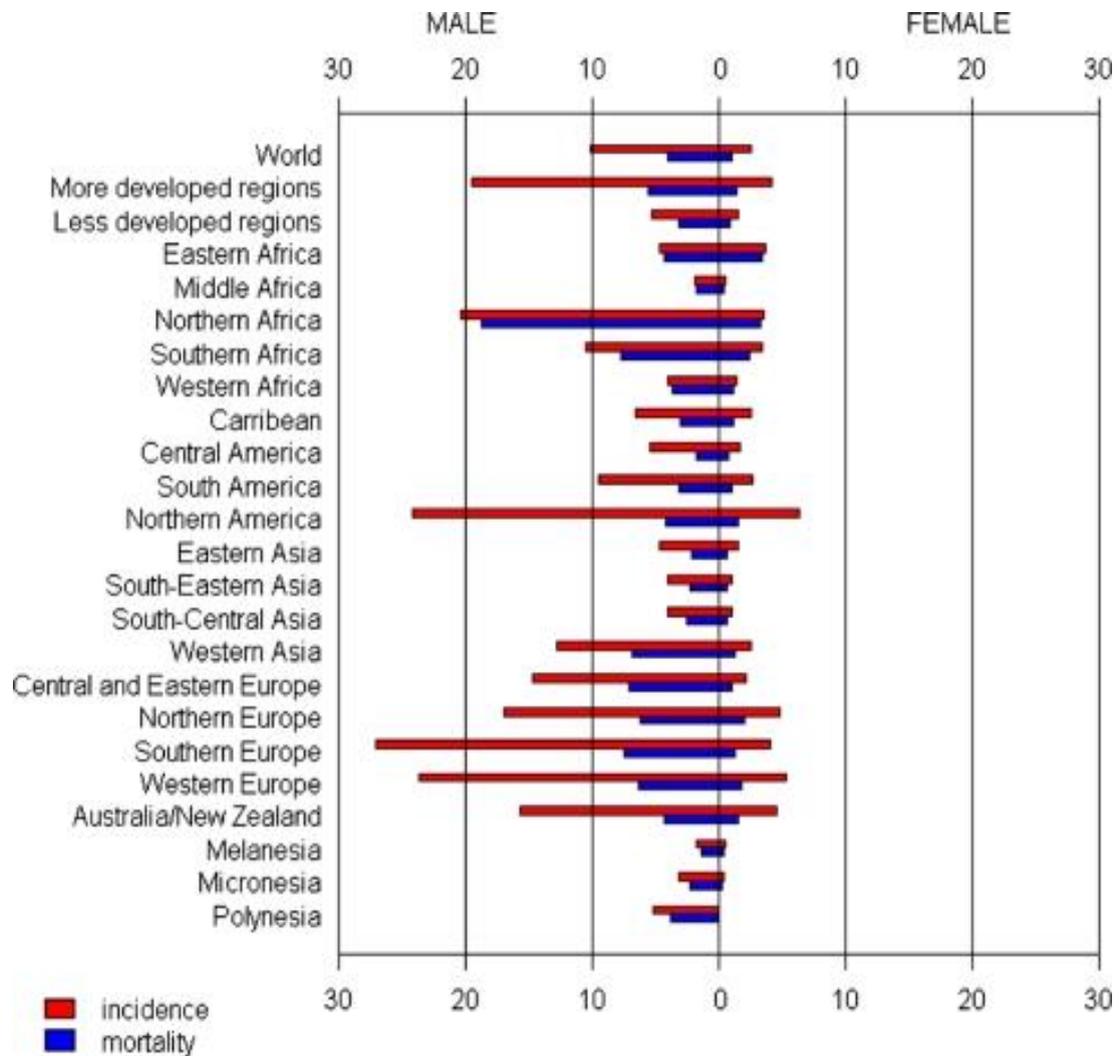
D'après le Registre des Cancers du Nord de la Tunisie (1999-2003), le cancer de la vessie occupe en Tunisie la première place des cancers urologiques chez l'homme et la deuxième place sur l'ensemble des tumeurs malignes chez l'homme avec une incidence de 11.6% chez l'homme et de 1.3% chez les femmes. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 65.9 ans, sans différence significative entre les deux sexes. Ce cancer touche 10 fois plus les hommes que les femmes, avec un sex-ratio de 1/10, ce rapport est entrain de diminuer avec l'augmentation du tabagisme féminin.

En France, ce cancer représente environ 4.8% des cas de cancers chez l'homme et 1,9% chez la femme. L'âge moyen au diagnostic est de 70 ans. C'est le deuxième cancer urologique par sa fréquence, après celui de la prostate. Il est responsable de 3% des décès par cancer, avec une augmentation de son incidence d'environ 1% par an (Ferlay et al, 2010).

## I.Le tabagisme

Le principal facteur de risque du cancer de la vessie est le tabagisme qui est responsable de 50 à 65% des cas diagnostiqués (Kuper et al, 2002, Zeegers et al, 2004 et Volanis et al, 2010). Les carcinogènes qui se trouvent dans la fumée du tabac (les amines aromatiques-alpha-naphthylamine et bêta-naphthylamine; certaines N-nitrosamines cycliques; l'arsenic...) sont aussi présents dans l'urine des fumeurs (Zeegers et al, 2004). Ces substances chimiques causent des dommages aux cellules qui tapissent l'intérieur de la vessie (les cellules urothéliales). Cette exposition augmente le risque de l'accumulation d'altérations génétiques causant la transformation maligne et la carcinogénèse.

Ce risque est lié au nombre de cigarettes fumées par jour, au nombre d'années pendant lesquelles une personne a fumé et à l'âge auquel une personne a commencé à fumer. En effet, les ex-fumeurs risquent deux fois plus que les personnes qui n'ont jamais fumé de développer un cancer de la vessie. En plus, l'arrêt de la consommation du tabac réduit le risque de la récurrence de la maladie (Aveyard et al, 2002).



**Figure 8 :** Incidence mondiale du cancer de la vessie chez les deux sexes d’après (Ploeg et al, 2009).

## II. L’exposition professionnelle

Le deuxième facteur de risque du cancer de la vessie concerne l’exposition professionnelle régulière et prolongée à certaines substances chimiques, comme par exemple celles utilisées par l’industrie du pétrole, du plastique et des colorants, les produits de la combustion du gaz naturel, goudron et huile de houille, les produits utilisés dans la fabrication de polyéthylènes et d’acryliques, des produits liés à la fabrication et au développement des pellicules photographiques, sels de cadmium, dérivés chlorés présents dans l’eau des piscines, etc ([Malats et al, 2015](#)).

On a constaté que l'exposition aux amines aromatiques, en particulier la bêta-naphthylamine, la benzidine, le 4-aminobiphényle et la 4-o-toluidine (Ward et al, 1991, Ward et al, 1996), aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et au gaz d'échappement des moteurs diesel font le plus souvent augmenter ce risque (Ward et al, 1996, Pira et al, 2010 et [Carreón et al, 2013](#)).

### **III. Les facteurs infectieux : Irritation et inflammation chronique de la vessie**

L'irritation chronique de la vessie accroît le risque de cancer de la vessie. Elle peut être causée par une inflammation ou un traumatisme de la vessie. L'inflammation peut être provoquée par une infection chronique des voies urinaires ou des calculs vésicaux. Elle peut aussi être causée par une schistosomiase (bilharziose), une infection engendrée par un ver parasite (*Schistosoma haematobium*) qui apparaît habituellement dans les pays du Moyen Orient et en Afrique (Nesi et al, 2015). Cette infection est à l'origine de 75% des tumeurs vésicales de type épidermoïde (Kantor et al, 1988). L'Egypte est le pays le plus épidémique de ce parasite, en effet, la majorité des tumeurs vésicales sont de nature épidermoïde et sont dues à cette infection parasitaire, ce qui explique le taux d'incidence de tumeur vésicale en Egypte (37% chez l'homme) qui est parmi les plus élevés dans le monde (Felix et al, 2008).

Egalement, le traumatisme peut être causé par une sonde à demeure en place depuis longtemps ou des calculs vésicaux.

### **IV. Autres facteurs**

#### **IV.1 Arsenic**

Selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (groupe 1), l'arsenic sous sa forme inorganique est classé depuis 1980 cancérigène pour l'homme . Le caractère cancérigène de l'arsenic est dû à la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui favorisent la mutagénèse, à des modifications des processus de réparation et de méthylation de l'ADN, à des modifications de la prolifération cellulaire (Schuhmacher-Wolz, 2009). Il augmente le risque du cancer de la vessie chez les personnes qui y sont exposées au travail. L'eau potable qui contient de fortes concentrations d'arsenic accroît également le risque de cancer de la vessie (Meliker et al, 2007).

Le mécanisme d'induction des tumeurs vésicales par l'arsenic n'est pas connu, cependant des études ont montré que l'arsenic inhibe indirectement les groupes sulfhydryles des enzymes et interfère avec certains métabolismes cellulaires tels que la cytotoxicité et génotoxicité et l'inhibition des enzymes à l'aide des antioxydants (Anetor et al, 2007).

#### IV.2 La prédisposition génétique

Aucune étude n'a permis de prouver que le cancer de la vessie peut être causé par un facteur héréditaire de déterminisme monogénique. Cependant plusieurs études ont montré que le cancer de la vessie est une maladie multifactorielle due à l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. Ainsi certains gènes sont associés à l'augmentation du risque de cancer de la vessie.

Pour chacun entre nous, l'expression des enzymes de certains métabolismes tels que le métabolisme des xénobiotiques, la réparation de l'ADN, le métabolisme du folate...) est très variable en fonction de facteurs environnementaux, physiopathologiques et notamment génétiques (polymorphisme génétique). Ainsi, des études ont montré une association entre le polymorphisme affectant les gènes codant les enzymes du métabolisme xénobiotique et la survenue du cancer de la vessie, en effet, la délétion du gène de métabolisme des xénobiotiques « GSTM1 et/ou GSTT1 » est décrite chez les malades atteints du cancer de la vessie dans plusieurs populations (Rouissi et al, 2011a, Savic-Radojevic et al, 2013, Chirilă et al, 2015).

Aussi bien, N-acetyltransferase-2 « NAT-2 » est une enzyme impliquée dans le métabolisme xénobiotique, elle existe sous deux formes : la forme "rapide", qui métabolise rapidement les molécules carcinogènes, et la forme "lente" dont l'action moins rapide conduit à une persistance des molécules carcinogènes dans l'organisme. Une baisse de l'activité enzymatique de (NAT-2) a été corrélée à une augmentation de risque de cancer de la vessie (Risch et al, 1995, Zhu et al, 2015, et An et al, 2015). Ainsi, dans la population tunisienne les malades porteurs de génotype acétylateurs lents « NAT2\*5/\*7 » ont sept fois plus de risque de cancer de la vessie que les acétylateurs rapides (Rouissi et al, 2009).

Des études sur le polymorphisme génétique du métabolisme de gène de réparation de l'ADN, ont montré aussi que le polymorphisme du gène de réparation XPC est associé avec la survenue du cancer de la vessie (Dai et al, 2014). Ainsi, dans la population tunisienne, les malades porteurs le génotype homozygote de XPC ont deux fois plus de risque d'avoir le cancer de la vessie que les

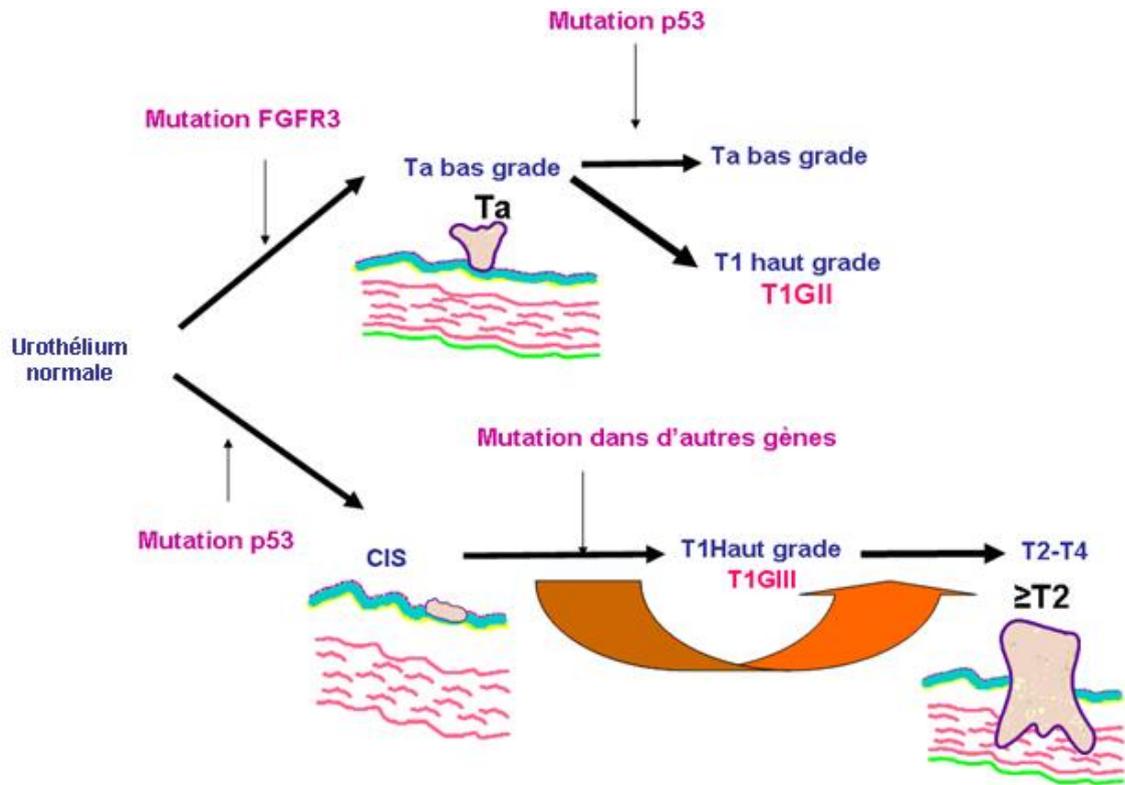
non-porteurs. (Rouissi et al 2011b). Egalement, le génotype homozygote du gène XRCC7 présente deux fois le risque de la survenue du cancer de la vessie et les malades porteurs de deux génotypes homozygotes de XPC et XRCC7 ont quatre fois plus de risque d'atteinte par la maladie (Zhi et al, 2012).

## **C-LES VOIES DE CARCINOGENESE DE CANCER DE LA VESSIE**

L'étude des altérations somatiques présentes au niveau des tumeurs vésicales permet de comprendre les différents processus du développement et de progression tumorale, ce qui peut avoir des retombées thérapeutiques et/ou pronostiques. Ainsi dans la littérature, plusieurs modèles ont décrit les voies de carcinogénèse vésicale, ces modèles se basant principalement sur les altérations des gènes FGFR3 et P53.

FGFR3 est le principal proto-oncogène impliqué dans la carcinogénèse urothéliale. Il code pour le récepteur des facteurs de croissance fibroblastique. En 2006, FGFR3 est reconnu comme un oncogène impliqué dans le cancer de vessie. Il s'agit d'une mutation précoce de la carcinogénèse vésicale, très fortement associée aux tumeurs papillaires Ta (74 % des cas) alors qu'elle est absente dans le CIS et présente beaucoup plus rarement aux stades T1 (21 %) et T2 à T4 (16 %). Elle a été observée dans 70 % des tumeurs de bas grade et 30 % des tumeurs de haut grade.

Concernant le gène P53, c'est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans de nombreuses voies de carcinogénèses dont l'urothéliale. Entre autre, il code pour une protéine jouant un rôle majeur dans la réparation des altérations de l'ADN, l'induction de l'apoptose et l'inhibition du cycle cellulaire. Ce gène est souvent altéré dans le groupe des tumeurs invasives, (50% des cas) (Soussi et al 2001), mais également dans les CIS, (50% des cas) et dans les des tumeurs T1G3 (58% des cas). A l'inverse, cette mutation est absente ou présente avec une fréquence très faible dans les tumeurs superficielles à bas grade (Hernandez et al, 2005). Ainsi le cancer de la vessie à stade avancé et/ou métastatique est caractérisé par des mutations des gènes p53 et Rb1 (la mutation du gène Rb1 est responsable du rétinoblastome) (Açikbas et al, 2002, Ouerhani et al, 2009a, Neuzillet, et al, 2012).



**Figure 9 :** Schéma représentant les voies la carcinogenèse urothéliale.

Deux voies de progression dans les carcinomes de la vessie sont décrites, l'une passant par les tumeurs **Ta** et l'autre par les carcinomes in situ (**CIS**) avec deux évolutions différentes ;

**La voie des tumeurs Ta :** ces sont des tumeurs mutées dans **FGFR3**, qui récidivent fréquemment mais progressent très rarement vers des tumeurs plus agressives **T1** puis **T2-T4**. La tumeur **Ta** est caractérisée par une fréquence élevée de mutations de **FGFR3**.

**La voie des tumeurs CIS :** ces sont des tumeurs non mutées dans **FGFR3** mais mutées dans **P53**, qui progressent fréquemment vers des tumeurs **T1** puis vers des tumeurs **T2-T4**. Les **CIS** et les tumeurs **T2-T4** sont caractérisées par une fréquence élevée de mutations de **P53**.

Un autre proto-oncogène impliqué dans la carcinogenèse urothéliale est le gène **PIK3C** qui code pour la sous-unité alpha de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase. Des travaux ont montré que l'inhibition de la voie **PI3K** réduit la capacité invasive des lignées cellulaires de la vessie (Wu et al, 2004). La voie **PI3K/Akt** pourrait donc être impliquée à la fois dans la tumorigenèse et la progression tumorale vésicale. En effet, les facteurs de croissance comme **EGFR**, voir **FGFR3** ont la possibilité d'activer la voie **Akt**, qui est impliquée dans la carcinogenèse urothéliale ; ainsi une dérégulation de la voie de signalisation **PI3K/Akt** pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse des tumeurs vésicales (Qian et al, 2009).

Le gène PTEN est un gène suppresseur de tumeur également impliqué dans la carcinogenèse urothéliale. Il code pour une phosphatase membranaire dont le substrat est le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). L'inactivation de PTEN augmente la concentration de PI3P ce qui entraîne l'inhibition de P27, elle-même inhibitrice du cycle cellulaire et dont l'expression est parfois altérée. En effet PTEN est mutée dans 14 à 23 % des tumeurs de la vessie (Wallerand et al, 2008). Ces différentes altérations génétiques impliquées dans la carcinogenèse urothéliale ont permis d'évaluer l'expression de ces protéines impliquées dans différentes voies de signalisation afin d'identifier des biomarqueurs utilisables pour le pronostic et la recherche des nouvelles thérapies de cancer de la vessie.

## **D-LES BIOMARQUEURS TUMORAUX DANS LE CANCER DE LA VESSIE**

### **I. Définition des biomarqueurs tumoraux**

Un biomarqueur tumoral, est une substance biologique présente naturellement dans le corps humain. Le changement de sa quantité suite à un dérèglement peut signifier la présence d'un cancer, ces marqueurs sont présents dans les urines, la salive, le sérum ou le plasma, et dans les tissus tumoraux. Ils peuvent aider les cliniciens à mieux diagnostiquer la maladie et à mieux cibler des voies de signalisations associées au cancer permettant une meilleure prise en charge du patient.

### **II. Les biomarqueurs tumoraux dans le cancer de la vessie**

Des marqueurs solubles sécrétés dans les urines peuvent servir de biomarqueurs de pronostic dans le cancer de la vessie ; ils permettent une détection précoce des cancers, une meilleure réponse aux traitements ainsi qu'une meilleure prévention de la récurrence de la maladie.

Ainsi, des études ont montré que l'augmentation de l'expression de la survivine est associée à l'augmentation de potentiel de malignité de cancer de la vessie et à la récurrence de la maladie, son expression dans le cancer de la vessie est considérée comme un marqueur prédictif de la récurrence chez les malades à stade superficiel (Karam et al, 2007 et Shariat et al, 2007). D'autres études plus récentes ont montré que l'ARNm de survivine est beaucoup plus exprimé dans les urines des

tumeurs vésicales agressives que des tumeurs non agressives (76.1% vs 10%) et que cet ARNm n'est pas détecté chez des sujets sains (Eissa et al, 2012).

Dernièrement, les chercheurs ont réussi à détecter des microRNA, dans le sérum et dans les urines des malades atteints du cancer de la vessie. Le mir-125b s'est révélé être 10.42 fois moins élevé chez les malades que les sujets sains et le mir-126 est 2.70 fois plus élevé chez les malades que les sujets sains (Snowdon et al, 2013).

Ecke et al en 2005, ont montré qu'il existe quatre marqueurs biologiques dans le cancer de la vessie qui sont principalement, l'antigène tissulaire polypeptidique (TPA), le Récepteur des protéines tyrosine-kinase erbB-2 (proto-oncogène Neu) (Her-2/neu), le récepteur d'urokinase (uPAR) et la mutation de TP53. Ces quatre marqueurs existent dans le sérum et dans les urines des malades atteints du cancer de la vessie, les taux sériques de TPA et Her-2/neu sont plus élevés chez les malades que les sujets sains (P= 0.001), la mutation TP53 est plus fréquente chez les malades à stade invasif que chez les malades à stade superficiel (P= 0.001) (Ecke et al, 2005). Egalement, des études plus récentes ont montré l'augmentation du taux de (Her-2/neu) soluble dans les urines des malades à stade superficiel par rapport aux sujets sains d'où son intérêt dans le pronostic de la maladie (Arikan et al, 2015).

Récemment des méta-analyses sur la population asiatique ont démontré que la surexpression de TP53 est associée à la récurrence du cancer de la vessie chez les malades à stade superficiel après un traitement au BCG (Zhou et al, 2015). Certaines études suggèrent un rôle pro-tumoral de deux molécules clés de la voie d'apoptose : Bax et bcl-2. Ces deux molécules sont impliquées dans l'agressivité du cancer vésical. Ainsi, il a été montré que l'augmentation de l'expression de Bax est associée à la récurrence après BCG thérapie, Bax et bcl-2 semblent être des bons marqueurs prédictifs dans la récurrence du cancer de la vessie après traitement (Ajili et al, 2012).

Les travaux récents ont montré que plusieurs marqueurs tumoraux, l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), l'antigène tumoral (CA 15-3, CA 19-9, CA 125...), l'antigène prostatique spécifique (PSA), et HER-2/neu participent directement à différentes interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement : stroma tumoral, matrice extracellulaire, vascularisation (angiogenèse), cellules du système immunitaire infiltrant les tumeurs (Pichon, 2004).

# E-LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE

## I. Le concept d'immunosurveillance anti-tumorale

Le concept d'immuno-surveillance (immuno-editing) a été émis pour la première fois par Paul Ehrlich dès 1900 et il fut officiellement défini en 1967 par Macfarlane Burnet et Lewis Thomas ([Burnet](#) et al, 1970). Cette théorie stipule que le système immunitaire (SI) reconnaît et élimine en permanence les cellules tumorales au cours de la vie de l'individu avant qu'elles ne deviennent cliniquement détectables.

Selon le concept de l'immuno-editing ou d'édition immunologique, il existe trois phases décrivant l'interaction entre le (SI) et la tumeur qui sont les suivantes (Figure 10) :

- **La phase d'élimination** : Le (SI) détecte, reconnaît et élimine les cellules tumorales ; il s'agit de la phase antitumorale de l'immunosurveillance. Cette phase de surveillance immunitaire est maintenue par l'immunité innée et adaptative (Mittal et al, 2014).

En effet, des études ont montré l'implication des cellules de l'immunité innée comme les NK et les macrophages dans l'élimination des tumeurs. Les NK sont efficaces pour lyser des cellules tumorales n'exprimant plus les molécules du CMH de classe I. La découverte de récepteurs « inhibiteurs » de type lectine dont l'interaction avec les molécules du CMH de classe I délivre un signal inhibiteur aux cellules NK, permet de mieux expliquer pourquoi, en l'absence de molécules du CMH de classe I sur les cellules tumorales, les cellules NK ont une cytotoxicité augmentée pour leur cible tumorale. Des récepteurs « activateurs » de la cytotoxicité comme NKG2D dont les ligands (H60, Rae, MICA...) sont exprimés par la cellule tumorale entraînent un rejet de ces tumeurs par un mécanisme dépendant des cellules NK (Gasser et al, 2005).

Les macrophages (MO) sont efficaces dans l'élimination des tumeurs par phagocytose. En effet les cellules tumorales expriment la molécule CD47 qui induit un signal « don't eat me » lorsqu'elle se fixe sur le récepteur inhibiteur (SIRP $\alpha$ ) exprimé par les macrophages. L'utilisation d'un Ac anti-CD47 permet le blocage de cette molécule et conduit les MO à l'élimination des tumeurs par phagocytose (Willingham et al, 2012).

De nombreux travaux ont montré la capacité cytotoxique des lymphocytes T CD8+, après reconnaissance d'un complexe CMH-I-peptide à la surface de la cellule tumorale. Cette cytotoxicité peut résulter de la libération de granules préformés contenant de nombreuses enzymes et cytotoxines dont la perforine et les granzymes. L'interaction de molécules membranaires exprimées à la surface du lymphocyte T CD8 (Fas-Ligand, TRAIL) avec leurs ligands (Fas, TRAIL Ligand) sur la cellule tumorale peut aussi déclencher l'apoptose de cette dernière. Le rôle des lymphocytes T CD4+ est plus complexe et indirect dans le rejet des tumeurs. Ainsi, il a été montré que les lymphocytes T CD4+ producteurs de cytokines Th1 (IL-2, IFN $\gamma$ ) jouent un rôle essentiel dans l'induction et la persistance des lymphocytes T CD8+ anti-tumoraux. Dans certains cas, à l'inverse, un rôle pro-tumoral a été assigné à des lymphocytes T CD4+ de type T régulateurs ou avec une polarisation cytokinique particulière (Th2, Th17...). D'autres effecteurs cellulaires (lymphocytes T $\gamma\delta$ , polynucléaires éosinophiles, polynucléaires neutrophiles) peuvent jouer un rôle anti-tumoral.

▪ **La phase d'équilibre :** Le (SI) contrôle la croissance de la tumeur mais sans l'éliminer totalement. Elle correspond à la phase de dormance tumorale, les cellules tumorales deviennent dormantes et restent dans cet état parfois des décennies, sans se manifester cliniquement et sans métastaser. Cette phase d'équilibre est maintenue par l'immunité adaptative selon les travaux de (Koebel et al, 2007).

Sur un modèle murin de sarcome induit par l'injection d'un puissant carcinogène la tumeur est installée mais son développement est bloqué par le système immunitaire. En cas de déficit immunitaire, induit par exemple par une déplétion des lymphocytes CD4 ou CD8, ou après l'administration d'anticorps bloquant l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-12 (deux cytokines impliquées dans l'immunité adaptative) la tumeur se développe. Cependant la déplétion des animaux en cellules NK (effecteurs de l'immunité innée) n'a aucun effet (Koebel et al, 2007).

D'autres études, montrent que la dormance tumorale est le résultat d'une balance entre l'effet anti-tumoral de l'IL-12 qui favorise l'élimination des tumeurs et l'effet pro-tumoral de l'IL-23 qui assure le maintien des tumeurs (Teng et al, 2007).

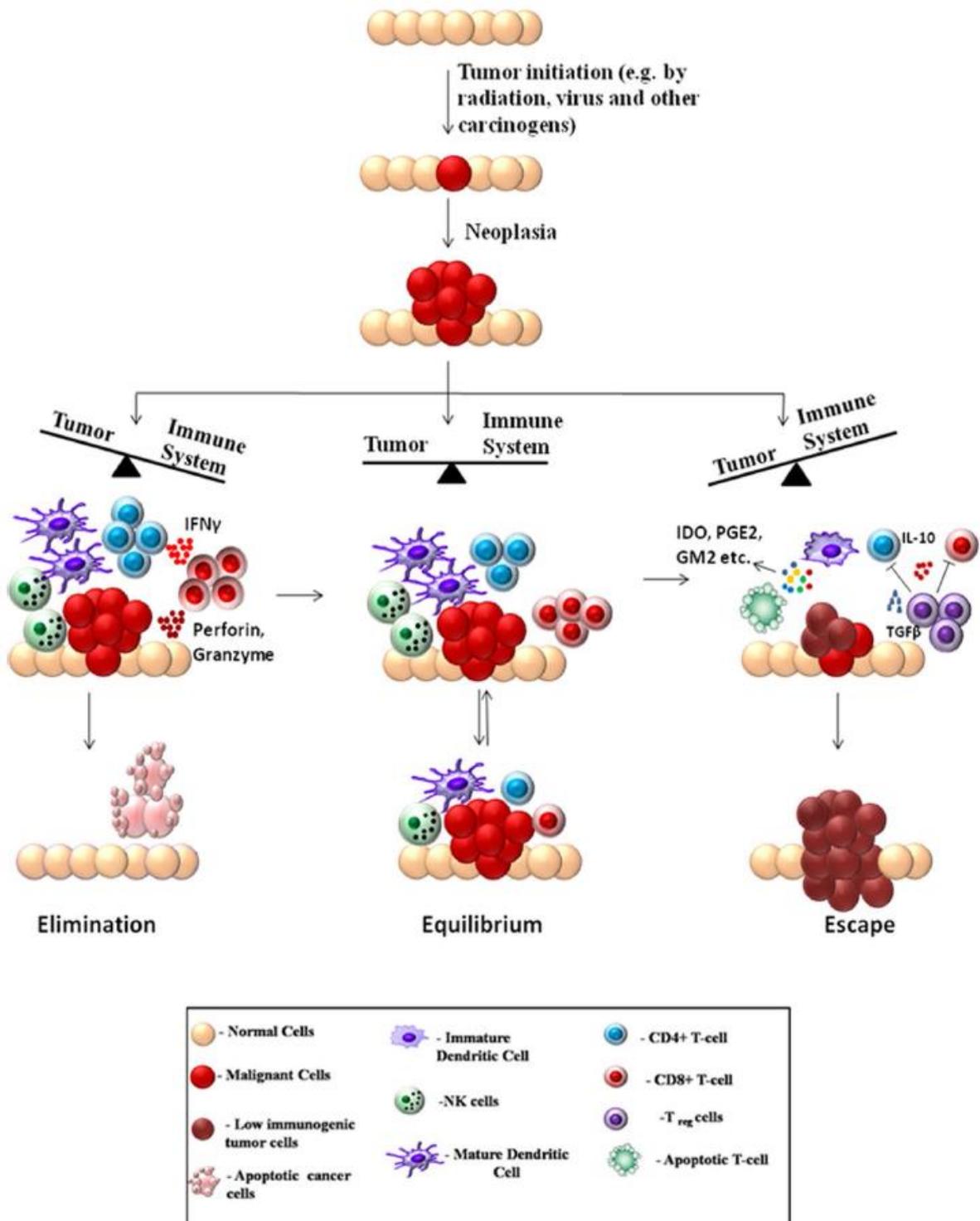
En effet, il existe un équilibre prolongé entre la réponse immunitaire adaptative et les populations de cellules tumorales dormantes ; la perte de l'immunogénicité des cellules tumorales ou la survenue d'un déficit immunitaire chez l'hôte, faisant basculer cet équilibre en faveur de la croissance tumorale.

▪ **La phase d'échappement** : La tumeur échappe à la surveillance du SI suite à l'échec de ce dernier à lyser ou contrôler les cellules transformées. Ceci va permettre la croissance tumorale et l'installation d'un cancer cliniquement détectable. Plusieurs mécanismes interviennent dans l'échappement tumoral dont certains sont associés aux cellules tumorales elles-mêmes et d'autres sont liés à un dysfonctionnement immunitaire.

En effet, la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules du SI comme les lymphocytes T (LT) peut être altérée suite à un défaut dans la présentation antigénique par les molécules CMH I à la surface des cellules cancéreuses (Teng et al, 2015). De plus, les cellules tumorales sont caractérisées par une instabilité génétique. Ainsi, des mutations peuvent engendrer la perte totale de l'expression de CMHI et/ou des variations au niveau des antigènes tumoraux. Les cellules tumorales peuvent résister à l'apoptose et à la lyse par les cellules du SI (Schreiber et al, 2011) :

- En altérant les récepteurs de mort Fas et DR4/DR5 par des mutations ce qui induit l'inactivation de la voie de l'apoptose,
- Ou par l'expression des molécules anti-apoptotiques Bcl-XL et FLIP,
- Ou par la résistance à la cytotoxicité induite par la voie granzyme B ou perforine, ceci par l'expression d'un inhibiteur de la voie granzyme B ou par la perte de la capacité à lier la perforine.

Les cellules tumorales peuvent aussi bloquer directement la fonction cytotoxique des LT et induire leur apoptose grâce aux ligands inhibiteurs à la surface des cellules tumorales PD-L1 (programmed death ligand 1) qui vont se fixer sur leurs récepteurs membranaires des LT (De Aquino et al, 2015). Enfin, les tumeurs secrètent des molécules comme le (TGF- $\beta$ , VEGF, IL-10...) qui vont induire un microenvironnement tumoral immunosuppresseur favorisant ainsi leur échappement à l'immuno-surveillance (Yang et al, 2015).



**Figure 10** : Schéma représentant les trois phases d'immuno-editing (3E) d'après (Bose et al, 2015).

Ce concept d'immuno-surveillance a conduit au développement d'une nouvelle approche thérapeutique, l'immunothérapie des cancers (BCG dans les cancers de la vessie, IL-2 dans les tumeurs du rein et les mélanomes, anti-PD1 et PDL1 dans le cancer de poumons...) qui a démontré son efficacité et son intérêt thérapeutique (Muenst et al, 2016).

L'immunothérapie repose sur les différents effecteurs de la réponse immunitaire.

## **II. Les effecteurs de la réponse anti-tumorale**

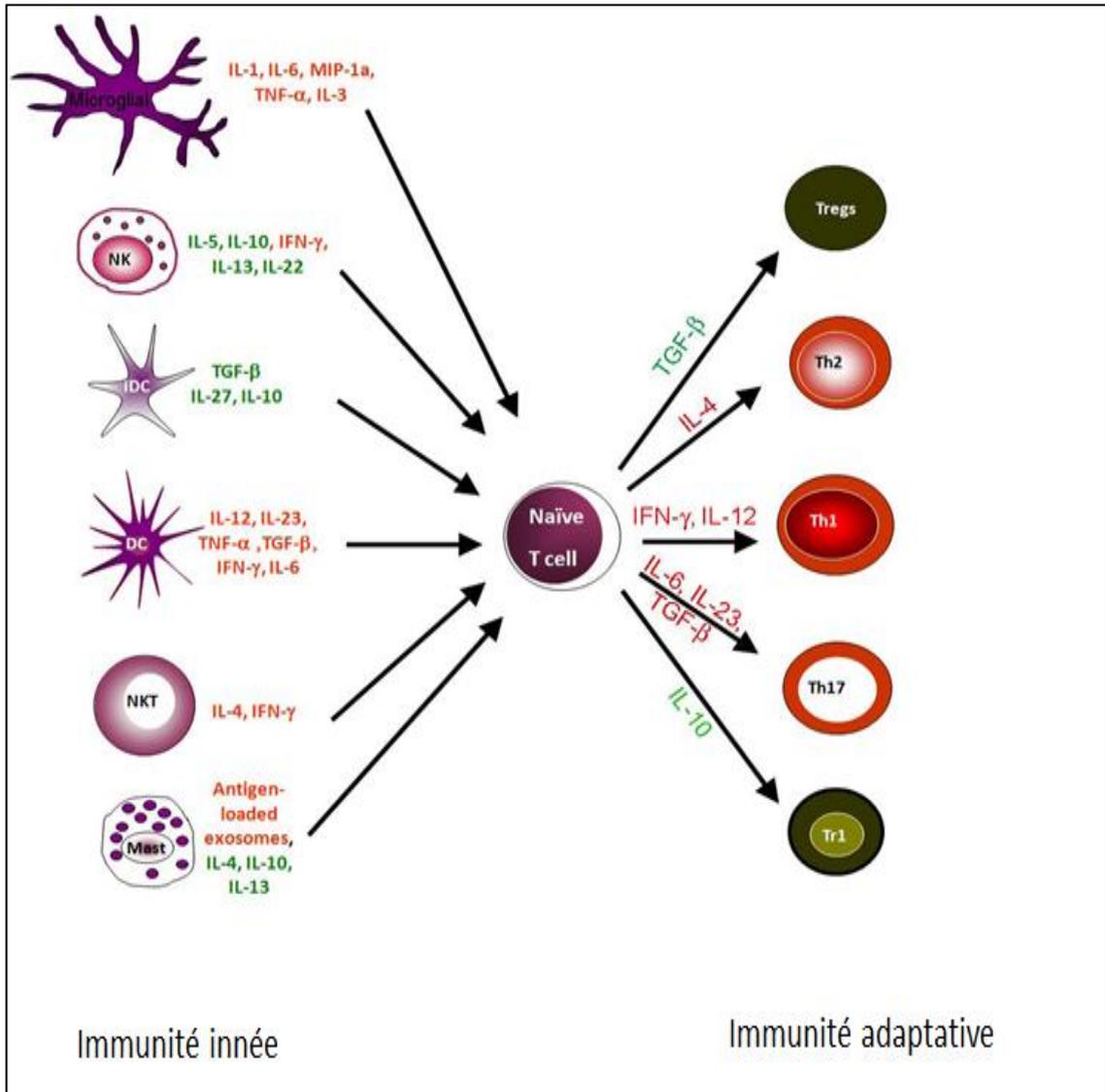
Le développement d'une réponse immunitaire en réaction à une agression tumorale induit l'activation de deux systèmes de défense : une réponse non-spécifique ou innée qui constitue la première ligne de défense suivie d'une réponse spécifique ou adaptative.

### II.1 L'immunité innée

L'immunité innée, constitue la première ligne de défense contre les infections et le contrôle de la croissance des cellules cancéreuses. Ceci est orchestré par des cellules cytotoxiques telles que les lymphocytes Natural killer (NK ou NKT), les cellules phagocytaires telles que (les macrophages (MO) et les cellules dendritiques (DC)...), et les lymphocytes T (NKT), ou par voie humorale (les IgG et le complément) (Figure 11). Les précurseurs de cellules dendritiques comme toutes les cellules de l'immunité innée reconnaissent les PAMPs « Pathogen Associated Molecular Patterns » à la surface des cellules tumorales via les récepteurs PRR « Pattern Recognition Receptors », ces derniers induisent la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires par les cellules dendritiques comme l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) qui active les cellules de l'immunité innée. L'internalisation de l'antigène par les DC immatures permet la maturation de ces dernières qui activent à leur tour, les effecteurs de l'immunité adaptative.

### II.2 Les effecteurs de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative, constitue la deuxième ligne de défense, elle est dépendante de la reconnaissance de molécules spécifiques produites par la tumeur, par les cellules immunitaires B et T. Les lymphocytes B produisent des anticorps ; ils sont responsables de la réponse à médiation humorale. Les lymphocytes T sont responsables de la réponse à médiation cellulaire. Ils sont de trois types : les lymphocytes T auxiliaires (helper Th), les T régulateurs (Treg) et les lymphocytes T cytotoxiques (Tc).



**Figure 11 :** Les différents effecteurs de l’immunité innée et de l’immunité adaptative d’après (Gandhi et al, 2010).

*Les cytokines de l’immunité innée induisent la différenciation des cellules de l’immunité adaptative ; en rouge les cytokines inflammatoires de l’immunité innée induisant la différenciation en cellules T effectrices (Th1, Th2 et Th17), en vert les cytokines anti-inflammatoires induisant la différenciation des T régulatrices (Treg et Tr1).*

## II.2.1 Les lymphocytes B (LB)

Les lymphocytes B représentent les cellules immunitaires à médiation humorale, ils sont activés suite à la fixation d'un antigène (Ag), ils se différencient en plasmocytes qui produisent des anticorps (Acs) dirigés contre ces Ags. Il existe différents mécanismes impliquant les anticorps spécifiques des antigènes tumoraux dans la mort des cellules tumorales.

- D'une part, par un mécanisme principal appelé cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody dependant cell cytotoxicity). En effet, la fixation des Acs spécifiques sur les cellules tumorales entraîne l'activation cellules immunitaires comme les macrophages, et les cellules NK, par la fixation de la région Fc des ACs à des récepteurs spécifiques à la surface de ces cellules. Ce complexe ainsi formé permet la lyse et l'élimination des cellules tumorales.
- D'autre part, les Acs spécifiques des antigènes tumoraux peuvent servir à l'élimination directe des cellules tumorales par la voie classique du complément et donc la lyse des cellules (Okroj et al, 2013).

## II.2.2 Les lymphocytes T (LT)

Les lymphocytes T sont les principaux effecteurs de la réponse immunitaire adaptative. Ils sont divisés en deux sous populations principales, les LT CD4+ et les LT CD8+.

### II.2.2.1 Les cellules T CD4+

Les antigènes extracellulaires sont présentés par les molécules du CMH de classe II, qui sont exprimées par les cellules immunitaires présentatrices d'antigène (les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B); les cellules de l'immunité innée, notamment les cellules dendritiques internalisent l'agent pathogène et le présentent par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II), aux récepteurs T (TCR) présents à la surface des lymphocytes T CD4+. Ce dernier marqueur joue le rôle de cellule accessoire ayant une affinité pour la molécule de CMH-II.

La reconnaissance et la forte affinité TCR/CMH-II-peptide associée à l'interaction CD28/B7 induisent l'activation des cellules T CD4+ naïfs, ce qui permet leur multiplication par sélection clonale et leur différenciation en LT CD4+ effecteurs.

Les lymphocytes T CD4 activés présentent une hétérogénéité fonctionnelle avec différents profils de sécrétion cytokinique. De plus, des facteurs de transcription propres à chaque type cellulaire sont indispensables à la différenciation et aux fonctions de chaque type de cellules effectrices (Tableau 2).

On distingue, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs auxiliaires (« T helpers » ou Th) et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à activité régulatrice (Treg) (Figure 11).

#### a. Les lymphocytes Th1

Les cellules de type Th1 se caractérisent par la sécrétion de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), de l'interleukine-2 (IL-2) et de « Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  » (TNF- $\alpha$ ) qui sont impliqués dans l'activation, le développement et la persistance d'une réponse des lymphocytes T cytotoxiques. L'activation des cellules Th1 dépend de l'expression et de la régulation des facteurs de transcription spécifiques T-bet et STAT4 (Espinosa et al, 2012 et Ivanova et al, 2015). L'IFN- $\gamma$  produit en grande quantité par les cellules Th1 active les macrophages et participe à la génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) conduisant à une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Dans le cas de cancer, l'IFN- $\gamma$  secrété empêche l'angiogenèse et induit la reconnaissance des cellules tumorales par les LT cytotoxiques (CTL). Ainsi, les cellules Th1 activées permettent la prolifération des cellules LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'Ag tumoral et la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

#### b. Les lymphocytes Th2

Les cellules de type Th2 sont, quant à elles, caractérisées par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et IL-13 et sont impliquées dans le développement d'une réponse humorale. L'activation des cellules Th2 dépend de l'expression et de la régulation des facteurs de transcription spécifiques [GATA-3](#) et STAT6 (Tableau 2) (Ouyang et al, 2000 et Ivanova et al, 2015). A l'inverse de cellules Th1, les cytokines produites par les cellules Th2 aident à l'activation des lymphocytes B, conduisant à la production d'anticorps.

Dans le cas de cancer, l'IL-4 inhibe l'angiogenèse en agissant sur les cellules endothéliales du stroma tumoral (Volpert et al, 1998).

### c. Les lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 jouent un rôle important dans la réponse immune protectrice lors d'infections bactériennes et fongiques ainsi que dans les maladies auto-immune et le cancer. Les cellules de type Th17 se caractérisent principalement par la production d'IL-17A, d'IL-17F, de TNF- $\alpha$ , d'IL-6, d'IL-21 et d'IL-22 qui semblent impliquées dans de nombreuses pathologies auto-immunes et dans la réponse anti-tumorale. L'activation de Th17 dépend de l'expression et de la régulation des facteurs de transcription spécifiques ROR $\gamma$ t et STAT3 (Tableau 2) (Hirahara et al, 2010 et Ivanova et al, 2015).

En effet, ils jouent un rôle dans la réponse immunitaire anti-tumorale par l'induction d'une réaction auto-immune, notamment un rôle pro-tumorale en favorisant le développement tumoral (Zou et al, 2010).

### d. Les lymphocytes régulateurs

Les T régulateurs sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire en régulant les lymphocytes T effecteurs par leur action immunosuppressive, ils participent donc au maintien de l'homéostasie. Ils diminuent les réponses immunitaires anti-tumorales, favorisant ainsi le développement des cancers (Roychoudhuri et al, 2015).

En plus des T régulateurs naturels (nTreg) de phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, générés dans le thymus contre les antigènes du soi (Haribhai et al, 2007), des cellules T régulatrices peuvent être induites en périphérie à partir de T CD4 naïfs. On distingue les (iTreg) ou Treg induits qui sont caractérisés par l'expression des molécules CD4 et CD25 et du facteur de transcription Foxp3 (Ivanova et al, 2015), ainsi que par la sécrétion de TGF- $\beta$  (Josefowicz et al, 2009) mais aussi d'IL-35.

Comme les iTreg, les cellules régulatrices type1 (Tr1) sont également des cellules T régulatrices, issues de la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs. Elles expriment CD4, CD25 mais pas FoxP3. Elles sont activées suite à la sécrétion de différentes cytokines produites par les cellules dendritiques et les macrophages mais également par d'autres cellules immunitaires (Carbo et al,

2014 et Ivanova et al, 2015). Elles sont caractérisées par la sécrétion de l'IL-10, cytokine immunorégulatrice majeure (Tableau 2).

#### e. Les lymphocytes T helper folliculaires (Thf)

Les cellules Thf, LT CD4 folliculaires « helper », jouent un rôle primordial dans l'immunité humorale. Ils expriment le récepteur de chimiokine CXCR5 et migrent vers les follicules B des organes lymphoïdes secondaires, où ils soutiennent la différenciation et la maturation des lymphocytes B via la sécrétion d'IL-4 et d'IL-21 (Ma et al, 2012). Ils contribuent ainsi à la formation des centres germinatifs et à la production d'anticorps de haute affinité. L'activation des Thf dépend de l'expression et de la régulation d'un facteur de transcriptions spécifique bcl-6 (Ivanova et al, 2015).

#### f. Autres profils des lymphocytes TCD4+

[Les cellules T helper type 9 \(Th9\) jouent un rôle dans l'immunité anti-tumorale en stimulant les lymphocytes LT CD8+ \(Lu et al, 2012\). Elles se caractérisent par la production d'IL-9 qui joue un rôle probable dans la tumorigenèse \(Knoops et al, 2004\)](#)

[Les cellules T helper type 22 \(Th22\) se caractérisent par la production d'IL-22 et du TNF- \$\alpha\$ , elles expriment des protéines impliquées dans le remodelage tissulaire, et des chimiokines impliquées dans l'angiogenèse et la fibrose \(Eyerich et al, 2009, Trifari et al, 2009\).](#)

#### II.2.2.2 Les cellules T CD8+

Les T CD8+ ou LT cytotoxique (CTL), représentent les effecteurs principaux de l'immunité adaptative à médiation cellulaire. Les antigènes intracellulaires sont présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) qui est exprimé par l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme mais également par les cellules cancéreuses.

Le CMH-I associé à un peptide antigénique va être reconnu par les récepteurs T (TCR) présents à la surface des lymphocytes T CD8+.

La reconnaissance et la forte affinité TCR/CMH-I-peptide et l'interaction CD28/B7 induisent l'activation des cellules T CD8+ naïfs, leur amplification selon un mode de sélection clonale et leur différenciation en Tc conduisant à la lyse spécifique (TCR/CMH-I-peptide dépendant) des cellules cibles, y compris les cellules tumorales.

La cytotoxicité des CTL peut passer principalement par deux mécanismes : la voie intrinsèque (la voie perforine/Granzyme) ou la voie extrinsèque (la voie Fas/FasL).

**Tableau 2 :** Les différents profils des lymphocytes TCD4+

Cellules	Cytokines secrétées	Marqueurs et Facteurs de Transcription	Induites sous l'action	Fonctions
Th1	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	T-bet/STAT1/STAT4	IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$	Favorise la réponse immunitaire à médiation cellulaire
Th2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-13	GATA-3/STAT6	IL-4, IL-2	Favorise la réponse immunitaire à médiation humorale
Th17	IL-17, IL-22	ROR $\gamma$ t/STAT3	TGF- $\beta$ , IL-6, IL-23	Défense contre les pathogènes, cancer auto-immunité
Thf	IL-21	Bcl-6/CXCR5	IL-6, IL-21	La différenciation de LB
Th9	IL-9	PU.1	TGF- $\beta$	Favorise la réponse immunitaire anti-tumorale
Th22	IL-22	AhR	IL-6, TNF- $\alpha$	Intervient lors d'une réaction inflammatoire
nTreg	TGF- $\beta$	CD4 CD25 Foxp3/STAT5	Hormones corticostéroïdes et les œstrogènes	Maintien de la tolérance et de l'homéostasie immunitaire
iTreg	TGF- $\beta$ , IL-35	CD4 CD25 Foxp3/STAT5	TGF- $\beta$ , IL-2	
Tr-1	IL-10	CD4 CD25	IL-10	

### II.3 Le microenvironnement tumoral : Infiltration immunitaire

Malgré les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes immunitaires, le rôle de l'infiltration des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral reste encore obscur. Cependant, il est connu depuis plusieurs années que la composition de l'infiltrat immunitaire d'une tumeur peut avoir un impact sur son développement et représente un puissant marqueur pronostique. La présence des cellules immunitaires, plus particulièrement de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) a été décrite dans la plupart des tumeurs solides, elle est considérée comme un indicateur d'une réponse active ou immunosuppressive de l'hôte contre la tumeur. Ceci pourrait être un facteur de bon ou de mauvais pronostic

Chez des malades atteints du cancer du poumon non-à petite cellules, les cellules NK intra-tumorales acquéraient un phénotype anergique dans les stades les plus avancés, en perdant leur capacité sécrétrice d'IFN- $\gamma$  et leur capacité cytotoxique, et également leur valeur pronostique (Platonova et al, 2011). Des études récentes menées chez des patients atteints de cancer du poumon à petite cellules ont démontré que les patients qui conservent une infiltration intra-tumorale de lymphocytes T (TILs) au stade IIIA (N2) de leur tumeur après résection complète ont une probabilité de survie bien supérieure aux autres (Freng et al, 2016).

Les lymphocytes T CD8+ comptent parmi les cellules les plus souvent associées à un pronostic favorable. De nombreuses études démontrent notamment que la présence de lymphocytes T CD8+ associés à la tumeur sont de bon pronostic dans de nombreux types de cancers solides, en effet, l'augmentation de l'infiltration intra-tumorale de lymphocytes T CD8+ est associée à une meilleur survie chez les malades atteints d'un cancer de la vessie à stade invasif (Sharma et al, 2007, Faraj et al, 2015), ainsi que chez les malades atteints d'un cancer du sein (Mahmoud et al, 2012).

Notamment, la présence de cellules NK et de lymphocytes T CD8+ est très largement considérée comme de bon pronostic dans le cancer colorectal (Sconocchia et al, 2014).

Cependant, l'implication des sous-populations de lymphocytes T CD4+ est plus controversée. Les résultats concernant la valeur pronostic des cellules Th2, Th17 et Tregs sont souvent contradictoires, certains travaux rapportent que l'infiltration intra-tumorale de Tregs est associée à un mauvais pronostic dans le cancer et induit un effet immunosuppresseur sur l'environnement tumoral de l'estomac (Yoshii et al, 2012) et dans les mélanomes (Jacquelot et al, 2016), ainsi une faible densité de cellules Tregs dans la tumeur est associée à une survie plus longue.

Cependant, d'autres études menées chez des patients atteints de lymphomes folliculaires montrent qu'une forte densité de cellules Tregs dans la tumeur est associée à une longue survie (Carreras et al, 2009).

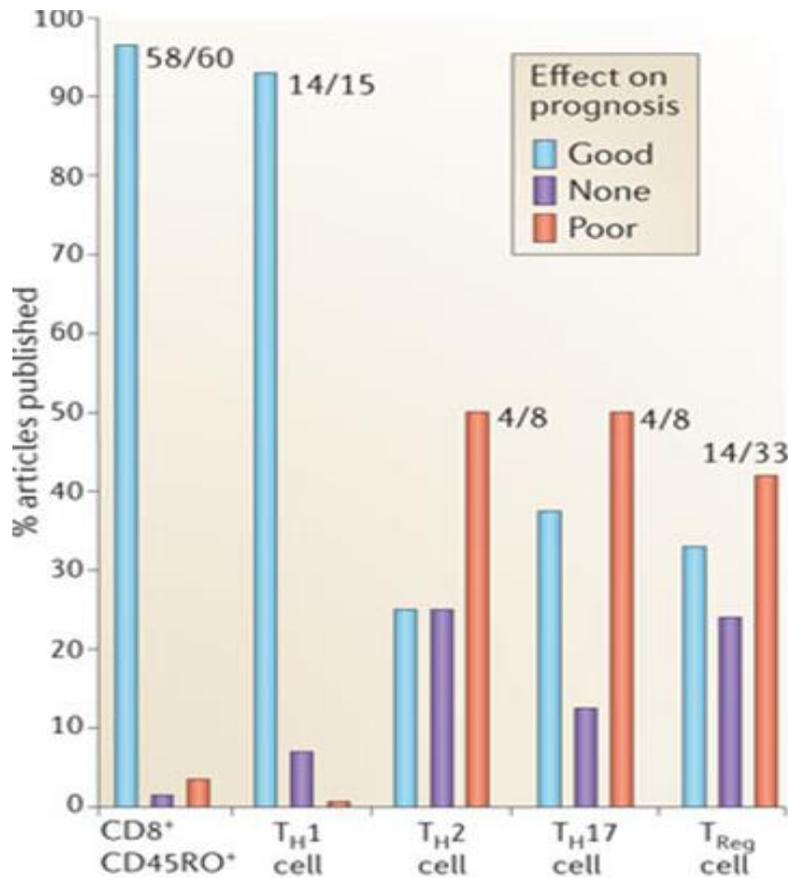
Récemment, il a été montré que la faible expression de Foxp3 dans les cellules cancéreuses gastriques favorise la progression tumorale alors que l'infiltration tumorale par des cellules Tregs exprimant Foxp3 était associée au bas grade et stade, la diminution de la taille tumorale et la diminution de la récurrence de la maladie (Suh et al, 2015).

La controverse concerne également les cellules Th17, et de façon générale l'inflammation au sein du microenvironnement tumoral. La libération de cytokines pro-inflammatoires telle qu'IL-17 active le système immunitaire et permet le recrutement et l'infiltration des cellules anti-tumorales à un stade précoce du cancer de la vessie (Baharlou et al, 2015). A l'inverse, ce contexte inflammatoire au sein de la tumeur peut favoriser la progression tumorale et l'apparition de métastases dans différents types du cancer (Martinez et al, 2008).

Concernant la sous population Th2, son développement est contrôlé par le facteur de transcription GATA-3. Des études menées chez des patientes atteintes du cancer du sein montrent qu'une forte expression de GATA-3 dans la tumeur est associée à une survie plus longue, ainsi sa faible expression est associée à l'augmentation de la taille tumorale et à la négativité des récepteurs d'œstrogène et de progestérone (Yoon et al, 2010). GATA-3 est donc associé au bon pronostic du cancer du sein, il joue également un rôle dans la suppression des métastases pulmonaires (Dydenborg et al, 2009). Les résultats des études concernant la valeur pronostic de cellules Th2 sont contradictoires, en effet, des études ont montré que les interleukines IL-4, IL-5 ou IL-13 ne présentent pas une valeur pronostique (Tosolini et al, 2011).

La différenciation de la sous population Thf est contrôlée par le facteur de transcription bcl-6, son expression est très élevée dans divers types du cancer, notamment dans le cancer du sein (Wu et al, 2014), son rôle dans le microenvironnement tumoral est aussi controversé. Wu et al, ont montré que l'expression de bcl-6 est associée au stade et au grade avancé et à l'apparition des métastases donc à la progression tumorale du cancer du sein, ainsi qu'à une mauvaise survie (Wu et al, 2014). Cependant des études sur le même type de cancer sont contradictoires, en effet, Pinto et al, ont montré que l'expression de bcl-6 diminue dans le cancer métastatique du sein (Pinto et al, 2009).

On peut dire qu'une infiltration tumorale avec des taux élevés d'effecteurs immunitaires (lymphocytes CD8+, lymphocytes CD4+, cellules Th1, cellules NK), associée à des taux faibles de cellules immunosuppressives donne un meilleur pronostic du cancer (Figure 12) (Fridman et al, 2012).



**Figure 12 :** Méta-analyse de l'impact de différentes populations lymphocytaires T sur le pronostic de différents cancers rapporté dans les publications d'après (Fridman et al, 2012).

'Good' signifie que la population lymphocytaire est associée au bon pronostic, 'None' signifie qu'il n'existe pas de valeur pronostic, 'Poor' signifie que la population lymphocytaire est associée au mauvais pronostic.

### III. Mécanismes de cytotoxicité des cellules immunitaires

Une fois les lymphocytes T et les cellules NK activés, ils vont pouvoir lyser spécifiquement leurs cellules cibles par différentes voies effectrices. Au cours de cette phase effectrice, les cellules cytotoxiques peuvent induire l'apoptose selon deux voies : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque de l'apoptose (Figure 13) (Lavrik et al, 2005, Wong et al, 2011 et Favaloro et al, 2012).

#### III.1 La voie intrinsèque

Lorsque les lymphocytes T et les cellules NK cytotoxiques reconnaissent une cellule cible, ces cellules effectrices libèrent par exocytose le contenu de leurs granules cytotoxiques. Ces derniers

contiennent une molécule appelée perforine formant par polymérisation des pores à la surface des cellules cibles, par lesquels pénètrent des sérines estérases appelées granzymes libérées par les granules. Les granzymes clivent certaines protéines cellulaires activant des nucléases et des enzymes induisant l'apoptose. L'action de Perforine/ Granzymes permet d'éliminer les cellules infectées par virus ou les cellules cibles transformées (pré-cancéreuses).

La voie apoptotique induite par Perforine/ Granzymes est la voie intrinsèque également nommée voie mitochondriale de l'apoptose qui est généralement induite par un signal interne à la cellule conduisant à l'activation de la procaspase-9.

Il est en effet établi que l'activation de la voie mitochondriale est initiée par le clivage des protéines de la famille Bcl-2. La famille Bcl-2 comprend des protéines pro-apoptotiques, telles que Bax, Bak, Bid, Bad et Bcl-Xs, et des protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2 et Bcl-XL. Suite à un stimulus apoptotique, une protéine pro-apoptotique est capable de s'ancrer dans la membrane externe mitochondriale, ce qui induit la formation de pores et permet la libération du cytochrome C et des protéines activatrices des caspases, de la mitochondrie vers le cytoplasme. La libération du cytochrome C mitochondrial résulte en une activation d'Apaf-1 (**A**poptotic **P**rotease **A**ctivating **F**actor-1) qui s'associe à la procaspase-9 pour former un complexe nommé apoptosome. Une fois la caspase 9 active, s'ensuit l'activation de la cascade des caspases, où les caspases effectrices 3, 6 et 7 sont activées et induisent l'apoptose de cellule cible ((Favaloro et al, 2012) (Figure 13).

### III.2 La voie extrinsèque

#### III.2.1 La voie des récepteurs à domaine de mort

Cette voie est déclenchée par un signal extérieur de la cellule et nécessite l'intervention des récepteurs de mort (DR ; Death Receptor) (Figure 13). Les récepteurs à domaine de mort appartiennent à la superfamille des TNF-R. Ces récepteurs possèdent tous quatre domaines riches en cystéine dans leur partie extracellulaire et un domaine de mort DD (Death Domain) dans leur partie intracellulaire qui permet le recrutement d'autres effecteurs possédant des domaines de mort homotypiques, ceci permet de déclencher des cascades de signalisation variées. On dénombre chez l'homme au moins huit récepteurs de mort : le récepteur au TNF (TNF-R1, TNF-R2), le récepteur CD95 (Fas), le récepteur DR3, le récepteur TRAILR-1 (ou DR4), le récepteur TRAILR-2 (ou

DR5), le récepteur DR6, le récepteur à l'ectodysplasine A (ou EDA-R) et le récepteur à l'NGF (Nerve Growth Factor) (Wajant et al, 2003). Ces récepteurs de mort peuvent être divisés en deux groupes. Les récepteurs du premier groupe (CD95, TRAILR-1, TRAILR-2) forment dans leur partie cytosolique un complexe multiprotéique nommé DISC (Death Inducing Signaling Complex). Les récepteurs du second groupe (TNFR-1, DR3, DR6, EDAR) forment un complexe multiprotéique nommé Traddosome « TRADD » (TNF Receptor Associated Death Domain) (Figure 13).

L'activation des récepteurs de mort tels que Fas (DR2), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) par la fixation de ligands déclenche une succession d'événements moléculaires tels que l'oligomérisation des récepteurs transmembranaires induisant le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques FADD (Fas-Associated Death Domain) et/ou TRADD qui à leur tour vont recruter les procaspases initiatrices 8 et 10. Le complexe multiprotéique formé, contenant le ligand, le récepteur de mort, les protéines adaptatrices et les procaspases initiatrices porte le nom de DISC, et induit l'activation autocatalytique des caspases initiatrices 8 et 10 et des caspases effectrices, parmi lesquelles la caspase 3 induisant l'apoptose de la cellule cible (Figure 13).

### III.2.1.1 La voie TNF/TNF-R

Le facteur de nécrose tumorale TNF (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine inflammatoire produit par les macrophages, les monocytes et les lymphocytes T activés durant un processus inflammatoire. Il est responsable de différentes signalisations impliquées dans la nécrose ou l'apoptose, dans la résistance aux infections par les virus ainsi que dans des processus de carcinogénèse.

Le TNF- $\alpha$  est d'une part synthétisé sous la forme d'une protéine transmembranaire de type II assemblée en homotrimère et d'autre part sous une forme soluble résultant du clivage de sa forme membranaire par une métalloprotéase appelée TACE (TNF Alpha Converting Enzyme). Ce TNF possède deux récepteurs membranaires distincts : le récepteur de type I (TNF-R1) et le récepteur de type II (TNF-R2). La liaison de TNF- $\alpha$  avec son récepteur TNF-R1, exprimé constitutivement dans la plupart des cellules, entraîne le recrutement de protéines adaptatrices nommées TRADD et FADD qui vont à leur tour recruter d'autres protéines comme les procaspases 8, 10 et 3 qui participent aux différentes voies d'apoptose (Idriss et al, 2000). Cette liaison TNF- $\alpha$  avec son

récepteur TNF-R1 peut aussi induire l'apoptose par la voie JNK et la voie NF- $\kappa$ B, via le recrutement des protéines TRAF et RIP (Micheau et al, 2003, Lavrik et al, 2005) (Figure 13).

Le récepteur de type II (TNF-R2) est un récepteur exprimé de façon inductible sur des cellules immunitaires spécifiques (CD8+, CD4+...), sa liaison avec son ligand TNF- $\alpha$  induit alors un signal de survie cellulaire ce qui aboutit à l'homéostasie cellulaire dans les conditions normales ([Faustman](#) et al, 2013).

### III.2.1.2 La voie Fas / FasL

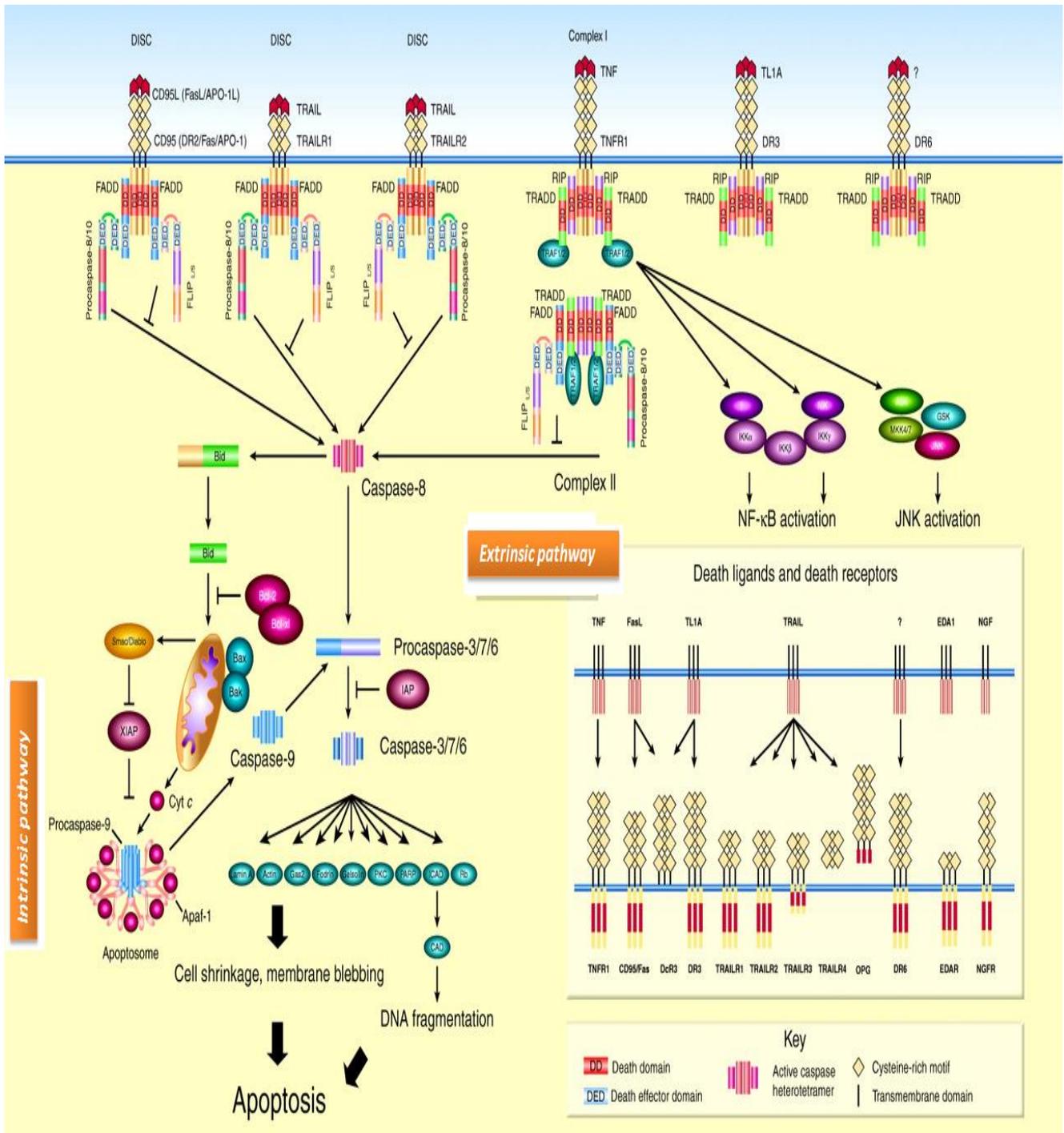
#### a. Structure de Fas et FasL

Le récepteur Fas est une glycoprotéine transmembranaire de 50 kDa de type I (la partie N terminale est extracellulaire). Chez l'homme, le gène qui code pour le récepteur Fas est localisé sur le chromosome 10 (10q24.1). Il est composé de 9 exons et s'étend sur 26Kb.

La protéine Fas comprend 317 acides aminés avec une masse moléculaire est de 45KDa. La partie extracellulaire est constituée de trois domaines extracellulaires riches en cystéines (CRD1, CRD2 et CRD3), le domaine PLAD (Preiligand Assembly Domain) qui est localisé au niveau du CRD1 et qui permet la trimérisation des récepteurs en repos, ainsi que la liaison au ligand Fas et la transduction de signal apoptotique. La partie intracellulaire est composée d'un domaine de mort ou (DD) (Schneider et al, 1997a) (Figure 14.a).

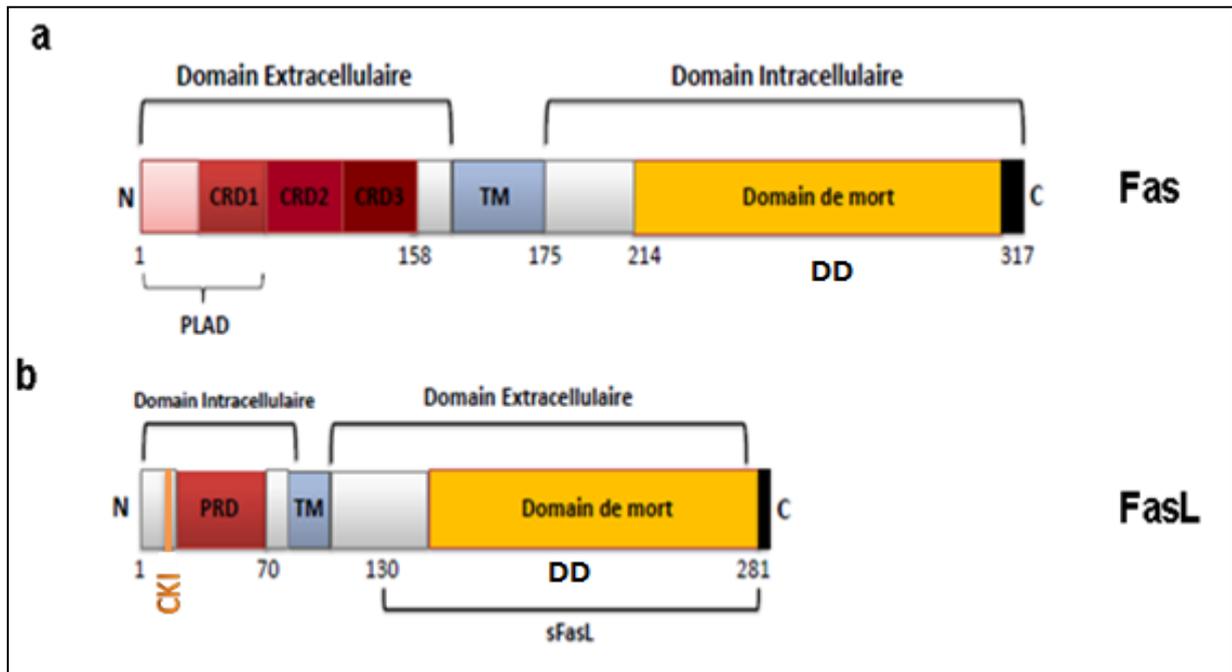
La protéine FasL appartient à la famille du **TNF** (*Tumor Necrosis Factor*) /**NGF** (*Nerve Growth Factor*). Chez l'homme, le gène qui code pour la protéine FasL est localisé sur le chromosome 1 (1q23). Il est composé de 4 exons et s'étend sur 8Kb (Takahashi et al, 1994).

La protéine FasL (CD95L/CD178) est une protéine transmembranaire de 40 kDa de type II (la partie C terminale est extracellulaire). Cette protéine est composée de 281 acides aminés dont 80 sont intra-cytoplasmiques ce qui distingue FasL des autres de la famille du TNF (Suda et al, 1993). Cette séquence intra-cytoplasmiques est très conservée entre les espèces ; elle est constituée de deux domaines particuliers ; **CKI** (**C**asein **K**inase **I**) et **PRD** (**P**rominent **P**roline **R**ich **D**omain) ayant probablement des interactions avec les protéines régulatrices. FasL présente 3 sites de N-glycosylation sur les asparagines en position 184, 250, et 260. La glycosylation semble être indispensable pour l'expression de la protéine ([Orlinick](#) et al, 1999) (Figure 14.b)



**Figure 13 :** Schéma montrant les deux voies d'apoptose : la voie intrinsèque (la voie mitochondriale) et la voie extrinsèque (Les voies de signalisation apoptotique des récepteurs à domaine de mort) d'après (Lavrik et al, 2005).

*La voie intrinsèque consiste en l'activation de la voie mitochondriale et la voie extrinsèque consiste en l'engagement de récepteurs de mort (Fas, TNFR1, DR4, DR5 ...) exprimés à la surface de la cellule cible.*



**Figure 14** : Structure de Fas et FasL et leurs différents domaines.

a. Structure de récepteur Fas : **CRD** : (domaine riche en cystéines), **TM** (domaine transmembranaire), région **PLAD** (preligand assembly domain), **DD** (Death domain) b. Structure de ligand FasL : région **PRD** (domaine riche en proline), région **CKI** (Casein Kinase I).

#### b. Expression des protéines Fas et FasL

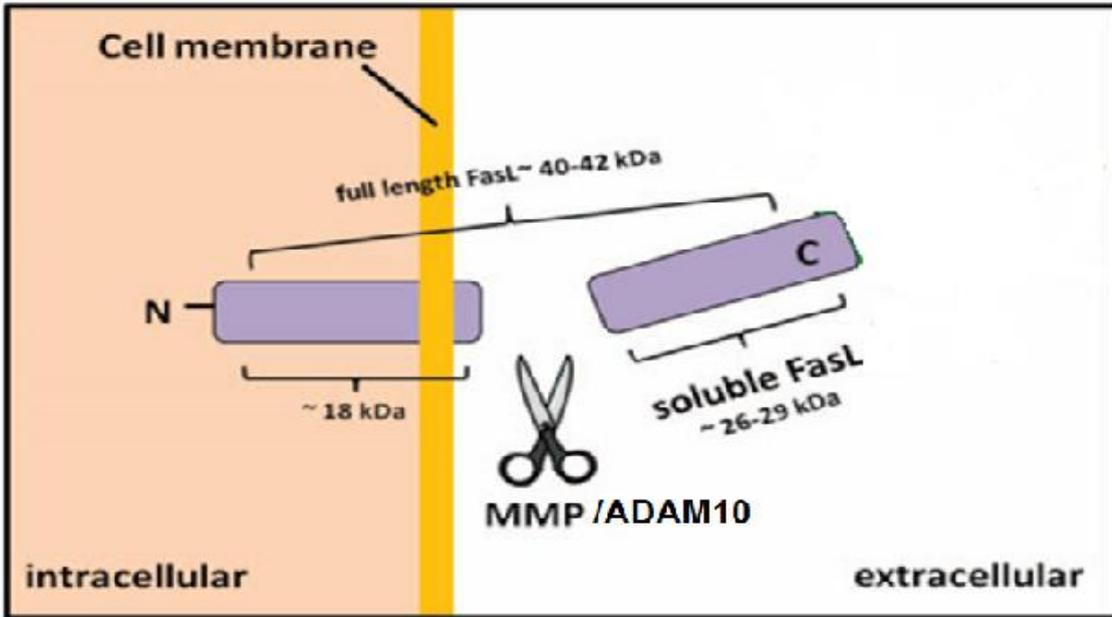
La protéine Fas est exprimée de façon ubiquitaire, mais dans certaines conditions telles que l'activation des lymphocytes T ou dans les lymphocytes T infectés par des virus tels que le virus de la leucémie humaine (HTLV-1), le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1) ou le virus d'Epstein- Barr (EBV) son taux d'expression peut être augmenté (Debatin et al, 1994). D'autres facteurs peuvent également induire ou augmenter l'expression de Fas à la surface cellulaire, comme l'IFN- $\gamma$  et les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . De plus, son expression peut augmenter au cours de la différenciation cellulaire, en effet, les progéniteurs hématopoïétiques immatures humains possédant le marqueur cellulaire CD34, expriment très faiblement Fas, cette expression de Fas est augmentée graduellement au cours de la différenciation cellulaire (Liang, 2010).

Contrairement à son récepteur, FasL possède une distribution tissulaire très limitée. La protéine FasL est exprimée de façon constitutive au niveau de l'œil, du cerveau, du plasma sanguin et des cellules de sertoli (au niveau des testicules) ; ces sites sont dits « immunoprivilégiés » car les cellules immunitaires sont éliminées lorsqu'elles les infiltrent, empêchant ainsi de provoquer une réponse immunitaire inflammatoire qui peut conduire à une perte de fonction (Griffith et al, 1995). L'expression de FasL est induite à la surface des lymphocytes T activés et les cellules NK activées, et participe à l'élimination des cellules infectées ou transformées, par un processus appelé AICD (Activation Induced Cell Death). L'AICD consiste à l'induction de la mort des cellules T activées pour donner la fin à leur réponse contre les pathogènes.

Enfin, FasL peut être exprimé sous forme soluble (sFasL) après le clivage par des métallo-protéases matricielles (Matrix Metalloprotease ; MMP-3 et MMP-7) ou par la protéase ADAM10 (A Disintegrin And Metalloprotease 10). La forme soluble est une protéine homotrimérique, qui va se fixer sur le récepteur Fas. Son rôle suite à cette fixation est encore mal connu (Schulte et al, 2007, Garcia et al, 2013) (Figure 15).

D'après certaines études, FasL membranaire tue les cellules cibles Fas positives plus efficacement par rapport à la forme soluble. Il semble que la forme soluble « sFasL » lorsqu'elle est produite puisse inhiber l'activité cytotoxique de FasL membranaire et diminuer le signal apoptotique (Tanaka et al, 1998, Schneider et al, 1998).

D'autres études ont montré que les souris dépourvues de FasL soluble (sFasL KO) ont des lymphocytes T normaux, capables de tuer les cellules cibles, alors que les souris (mFasL KO) dépourvues de FasL membranaire ont des lymphocytes T incapables de tuer les cellules cibles. Ainsi, ces résultats ont montré que mFasL est essentiel pour l'activité cytotoxique et qu'un excès de sFasL (en l'absence de mFasL) favorise l'auto-immunité et la tumorigenèse (O'Reilly et al, 2009).



**Figure 15 :** Clivage de FasL par des métalloprotéases ou par la protéase d'après (Garcia et al, 2013).

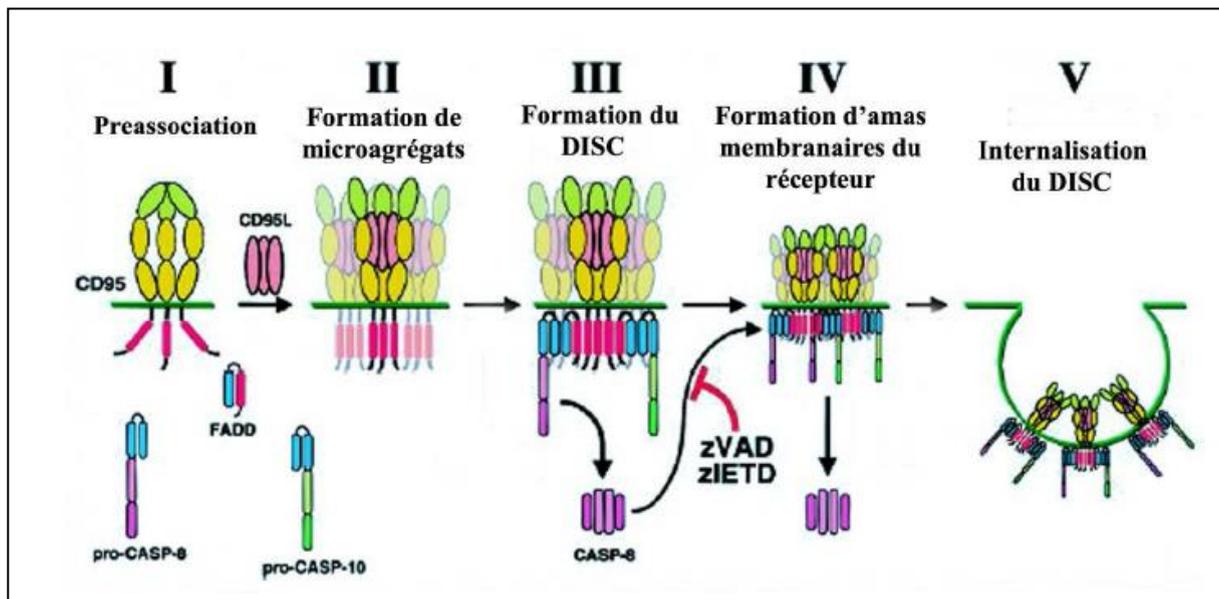
*Les métalloprotéases (MMP-3 et MMP-7) ou la protéase (ADAM-10) clivent la forme membranaire de FasL « mFasL » (40-42 kDa) libérant dans le domaine extracellulaire une forme soluble « sFasL » (26-29kDa).*

### c. Les voies de signalisation d'apoptose par Fas/FasL

Le processus d'apoptose induit par fixation de FasL sur le récepteur Fas aboutit à l'activation des caspases, une famille de protéases à cystéine aspartate-spécifique, d'où l'appellation « cysteine-aspartic protease ». Cette activation peut être atteinte par deux voies de signalisation apoptotiques distinctes mais convergentes, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. En effet, l'induction de l'apoptose par la voie Fas/FasL s'effectue en plusieurs étapes successives. Selon les travaux d'Algeciras-schimmich et al 2002, la phase de déclenchement du signal Fas peut être subdivisée en cinq étapes distinctes ; dans un premier temps, la pré-association de Fas indépendamment de FasL permet sa stimulation qui conduit à la formation rapide de micro-agrégats du récepteur Fas. Dans un second temps, la protéine adaptatrice FADD, est recrutée via l'interaction entre le DD (Domaine de mort) de Fas et DD homologue au niveau de FADD au niveau de C-terminal.

Un second domaine appelé DE (domaine effecteur de mort ; Death Effector) situé au niveau N-terminal de FADD interagissent avec deux DED de procaspases initiatrices -8 et 10 ce qui permet le recrutement de ces procaspases initiatrices, et la formation du DISC (Death Inducing Signaling Complex) selon un processus faisant intervenir les filaments d'actine et l'activation de la caspases-8 mais avec peu d'efficacité pour pouvoir induire l'apoptose.

Cependant, cette activation permet la formation de regroupements membranaires de Fas qui vont amplifier le signal apoptotique. Le complexe Fas/FasL sera alors internalisé grâce à la formation de vésicules d'endocytose par un processus encore incompris (Algeciras-schimmich et al, 2002) (Figure 16).



**Figure 16 :** Les événements membranaires proximaux de la voie de signalisation Fas.

#### d. Fas/FasL et cancer

L'expression de FasL a été observée dans différents types de cancers, comme des carcinomes colorectaux (O'Connell et al, 1996), hépatocellulaires (Strand et al, 1996), du sein (O'Connell et al, 1999), ou de la vessie (Chopin et al, 2003). Le rôle de cette expression est controversé. Certaines études ont montré que l'expression de FasL pourrait induire le recrutement des polynucléaires et une réponse anti tumorale (Maher et al, 2002).

D'autres études montrent, que FasL aide les cellules tumorales à échapper à la surveillance du système immunitaire et ceci par différents mécanismes. En effet, l'expression de FasL par des cellules tumorales comme des lymphomes, des mélanomes, des carcinomes hépatocellulaires, gastriques ou pulmonaires, serait capable d'induire l'apoptose des lymphocytes infiltrant la tumeur exprimant Fas. De plus, l'expression de FasL ne serait pas restreinte aux lymphocytes mais peut aussi s'observer sur certains tissus ou organes dits « immunoprivilégiés » leur permettant d'induire l'apoptose des cellules inflammatoires exprimant Fas.

Le rôle de FasL dans la réponse anti-tumorale est complexe. Les études *in vitro* ont montré que, d'une part, l'expression de FasL sur les lymphocytes T et les cellules NK peut induire l'apoptose des cellules tumorales qui expriment Fas (Krammer, 2000) et d'autre part, l'expression de FasL par les cellules tumorales est considérée comme un des mécanismes d'échappement tumoral du système immunitaire (Igney and Krammer, 2005).

Des travaux ont montré que la survie des souris déficientes en FasL et porteuses de tumeur pulmonaire, est significativement diminuée par rapport aux souris contrôles. Ce résultat démontre le rôle de FasL dans le contrôle des réponses anti tumorales *in vivo* (Peyvandi et al, 2012). Plus récemment, cette même équipe a montré que l'environnement immunosuppresseur produit par le ciblage de FasL est corrélé avec la diminution de survie des souris porteuses de tumeur d'où le rôle de FasL dans la modulation des cellules immunosuppressives (Peyvandi et al, 2015).

Cependant, il est décrit que la forme soluble de FasL (sFasL) possède une fonction opposée que FasL membranaire (mFasL). Des nouvelles études ont montré que la forme soluble de FasL nommé « cl-CD95L » détectée en très grande quantité dans le sérum des malades atteints du cancer du sein triples négatifs par rapport à un cancer non triple négatif, est également impliquée dans l'apparition des métastases et elle favorise la migration cellulaire (Malleter et al, 2013).

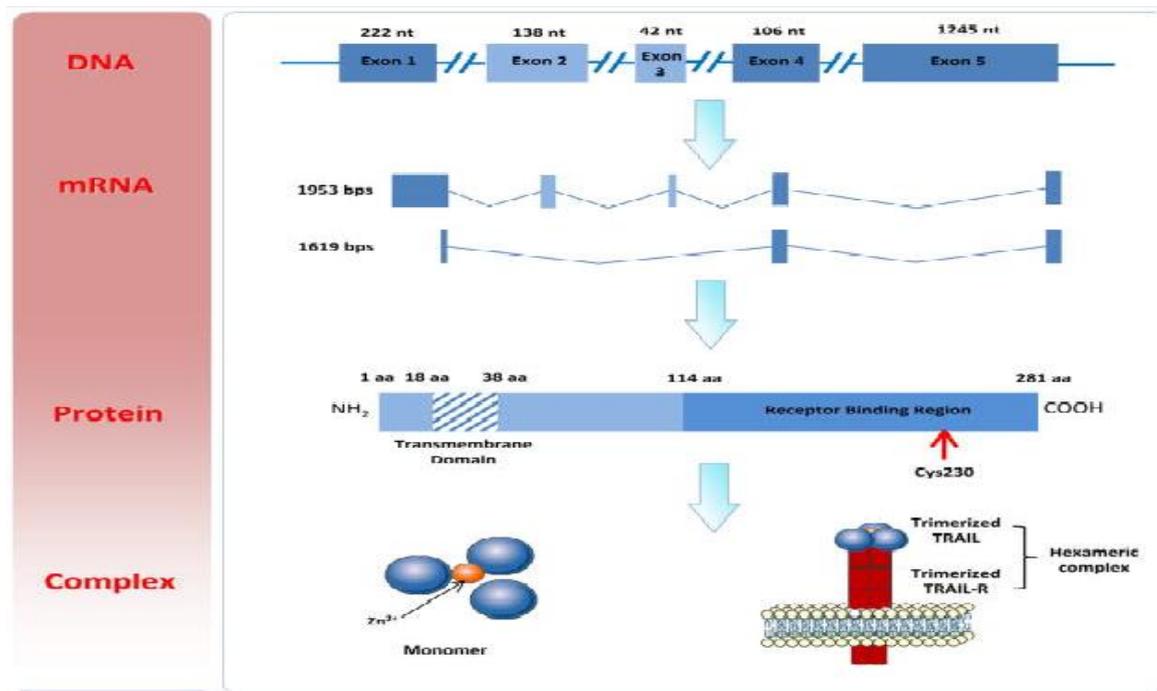
### III.2.1.3 La voie TRAIL/TRAIL-Rs

#### a. Structure de TRAIL/TRAIL-Rs

TRAIL est une protéine transmembranaire de type II. La molécule TRAIL (Apo2L/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand) appartient également à la famille du **TNF** (*Tumor Necrosis Factor*) /**NGF** (*Nerve Growth Factor*). Pour l'homme, le gène qui code pour la protéine

TRAIL est localisé sur le chromosome 3 en position (3q26). Il est composé de 5 exons et s'étend sur 18Kb (Figure 17). La protéine TRAIL est composée de 281 acides aminés (Figure 17).

Cinq récepteurs capables de lier TRAIL ont été identifiés (Figure 18). Deux d'entre eux, DR4 et DR5 sont capables d'induire l'apoptose tandis que les trois autres, Decoy Receptor (DcR1, DcR2) et l'ostéoprotégérine (OPG), agissent comme récepteurs antagonistes, ils sont incapables d'induire un signal apoptotique et sont qualifiés de "récepteurs leurres" (Chaudhary et al, 1997, Ashkenazi et al, 1999) (Figure 18).

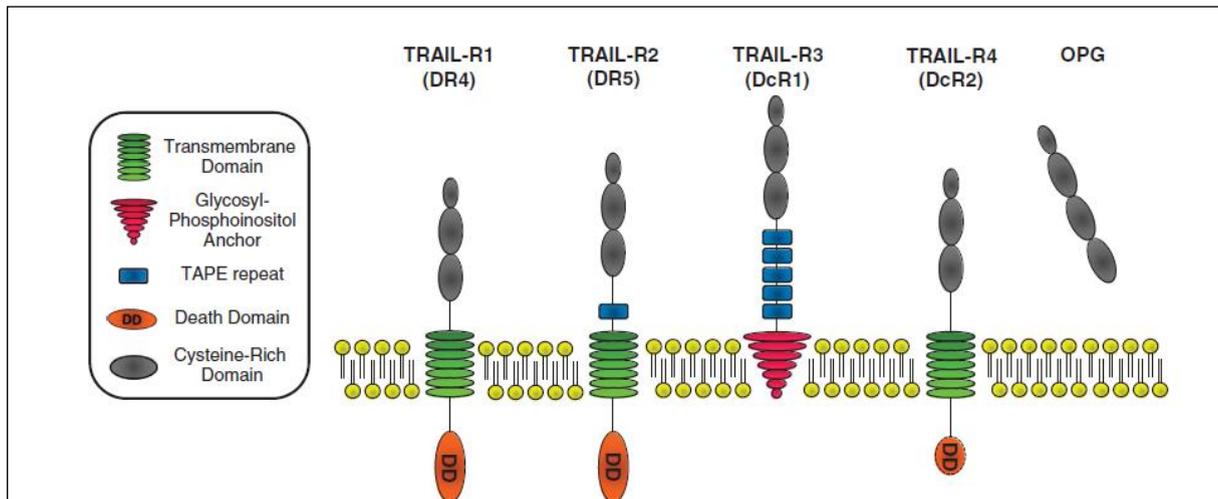


**Figure 17 :** TRAIL et ses différents domaines d'après (Stuckey et al, 2013).

*Au niveau génomique ; Le gène qui code pour TRAIL est composé de 5 exons situé sur le bras long du chromosome 3 (3q26). Au niveau transcriptionnel ; l'ARNm est transcrit selon deux variants ; un ARNm codant pour la forme membranaire (mTRAIL) et un ARNm codant pour la forme soluble (sTRAIL). Au niveau protéique ; la protéine est composée de (281 aa) avec une région TM (domaine transmembranaire), une région RBD (receptor binding domain).*

*Un domaine riche en cystéine (Cys230) est essentiel pour fixer l'ion de Zinc à l'interface trimérique.*

*Trois molécules de sTRAIL s'associent pour former un homotrimère, ce complexe se fixe sur trois molécules de TRAIL-R pour former un complexe hexamerique*



**Figure 18 :** Les différents récepteurs de TRAIL chez l'Homme d'après (Lemke et al, 2014).

Les récepteurs agonistes *TRAIL-R1* et *TRAIL-R2* contiennent un domaine de mort intracellulaire capable d'engager une signalisation apoptotique, contrairement aux récepteurs antagonistes *TRAIL-R3*, *TRAIL-R4* et *OPG* (ostéoprotégérine).

#### b. Expression des protéines TRAIL/TRAIL-Rs

L'expression du TRAIL est induite à la surface des lymphocytes T activés, des cellules NK et des macrophages. Sous sa forme homotrimerique, TRAIL présente une activité optimale qui lui confère une activité anti-tumorale.

Le récepteur TRAIL est exprimé de façon ubiquitaire, donc la plupart des tissus et des cellules présentent une cible pour ce ligand (Spierings et al, 2004).

TRAIL peut être exprimé sous forme membranaire (mTRAIL) ou soluble (sTRAIL) après le clivage de la partie extracellulaire par des protéases à cystéine. Cette forme soluble est fonctionnelle.

#### c. La voie de signalisation d'apoptose par TRAIL/TRAIL-Rs

La liaison de TRAIL sur les récepteurs de mort *TRAIL-R1* et *TRAIL-R2* induit un signal de mort très similaire à celui observé dans la voie Fas/FasL. Cette liaison induit la multimérisation des récepteurs et des ligands ce qui aboutit au recrutement de la protéine adaptatrice FADD et des

procaspases initiateuses 8 et 10 ce qui permet la formation du complexe initiateur de l'apoptose, ou DISC (Death-Inducing Signaling Complex), ce qui induisant un signal apoptotique.

A l'inverse, la liaison de TRAIL sur les récepteurs TRAIL-R3 et TRAIL-R4 ne permet pas d'induire un signal apoptotique puisqu'ils ne présentent pas de DD fonctionnel. Ils sont ainsi qualifiés de récepteurs leurres, ou récepteurs antagonistes de TRAIL (Figure 18). TRAIL-R3 inhibe la formation du DISC en séquestrant le ligand TRAIL au sein de radeaux lipidiques membranaires (effet de titration du ligand). Alors que, TRAIL-R4 agit en s'associant avec TRAIL-R2 au sein du DISC et en excluant TRAIL-R1 de ce complexe. Puisqu'il ne possède pas de domaine de mort fonctionnel, la quantité de caspases initiateuses recrutées dans le DISC est trop faible pour induire l'activation de ces dernières. Ceci induit un signal de prolifération et de survie cellulaire (Merino et al, 2006 , Stuckey et al, 2013). En effet, des études ont montré que TRAIL peut induire un signal non-apoptotique qui inclut l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, PKB/Akt et MAPKs. Il arrive que TRAIL-R1 et TRAIL-R2 puissent activer la protéine kinase B (PKB)/Akt et MAPK comme le c-Jun NH2-terminal kinase (JNK). Les travaux de Secchiero et al, ont montré que TRAIL peut activer la voie PI3K/Akt et la voie ERK dans les cellules endothéliales, induisant la phosphorylation de serine/thréonine kinase Akt de manière dépendante de l'activation PI3K (Secchiero et al, 2003). D'autres études ont expliqué que la résistance au traitement par la molécule TRAIL est due à l'activation de certaines voies anti-apoptotiques via TRAIL. En effet, ces études ont montré que l'expression de p-Akt et de la protéine mTOR augmente deux heures après un traitement avec la molécule TRAIL. De plus, TRAIL peut activer également les voies MEK/ERK et NF- $\kappa$ B dans les cellules de cancer de l'ovaire (Xu et al, 2010).

#### d. Rôles physiologiques de la signalisation de la voie TRAIL/TRAIL-Rs

Des études d'inactivation génétique (KO TRAIL ou mDR5) chez la souris ont permis de montrer que TRAIL ne joue pas un rôle dans des conditions normales, non pathologiques. En effet ces souris survivent après une inactivation génétique (modèles knockout TRAIL-/- ou mDR5-/-).

La protéine TRAIL joue son rôle d'inducteur d'apoptose suite à l'activation de cellules immunitaires et/ou lors d'un déséquilibre du système immunitaire, ce qui induit la production de TRAIL en réponse à des cytokines pro-inflammatoires de type interféron, en particulier l'IFN- $\gamma$ .

TRAIL possède également un rôle en tant que régulateur de l'immunité par son rôle dans le déclenchement de l'apoptose de certaines populations leucocytaires, modulant à la baisse la réponse immunitaire, en effet les cellules NK éliminent les cellules dendritiques immatures via TRAIL (Hayakawa et al, 2004, Takeda et al, 2005).

#### e. TRAIL/TRAIL-Rs et cancer

Contrairement aux autres membres de la famille du TNF, TRAIL est connue pour être capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales sans affecter les cellules saines d'où son intérêt dans l'utilisation thérapeutique comme une arme anticancéreuse (Ashkenazi et al, 1999). Que ce soit in vitro ou in vivo, plusieurs études ont montré que l'absence de la protéine TRAIL favorise la croissance tumorale et la progression de la tumeur, elle joue ainsi un rôle anti-tumoral et anti-métastatique. Ce rôle a été montré sur plusieurs modèles murins ainsi que lors d'études chez des patients atteints de différents types de cancer. Des nouvelles études, ont montré que TRAIL induit l'apoptose des cellules tumorales de prostate et il ne présente pas des effets cytotoxiques sur les cellules saines (Ma et al, 2015). Plusieurs essais cliniques in vitro et in vivo ont montré l'efficacité de TRAIL dans le traitement des différents types de cancer. L'anticorps monoclonal humain agoniste du TRAIL-R2 a été développé (TRAIL-R2 mAb), il est un très bon candidat comme traitement potentiel pour une grande variété de cancers, en interagissant spécifiquement avec le récepteur TRAIL-R2, induisant l'apoptose et exerçant un effet anti-tumoral sur divers types de tumeurs, seul ou combiné à la chimiothérapie (Mori et al, 2004).

La forme soluble de TRAIL « sTRAIL » joue également un rôle anti-tumoral, il a été montré l'existence de TRAIL soluble dans les urines des malades atteints du cancer de la vessie et ceci après un certain temps de traitement au BCG. Ainsi les bons répondeurs au BCG ont un taux plus élevé de « sTRAIL » que les mauvais répondeurs. De plus, on observe une augmentation de l'expression de TRAIL soluble au niveau des neutrophiles présents dans les urines des patients après traitement au BCG.

Ces études suggèrent que TRAIL peut jouer un rôle dans l'immunité anti-tumorale induit par la BCG thérapie (Ludwig et al, 2004). De même, l'analyse de plus de 300 tumeurs des malades atteints du cancer du sein a révélé une corrélation entre la dérégulation de TRAIL et la survenue de métastases au niveau cérébral (Bos et al, 2009).

Les propriétés anti-métastatiques de TRAIL ont été montrées dans des modèles des souris, dans lesquels l'ablation génétique d'un seul allèle du gène mDR5 est suffisante pour enclencher une lymphomagenèse expérimentale. De plus, l'ablation génétique de deux allèles du gène mDR5 augmente significativement la survenue de métastases de lymphomes et de carcinomes de la peau (Finnberg et al, 2008, Grosse-Wilde et al, 2008).

Nous avons vu que l'interaction de molécules membranaires exprimées à la surface du lymphocyte T (Fas-Ligand, TRAIL) avec leurs récepteurs (Fas, DR4/DR5) sur la cellule tumorale déclenche l'apoptose. Ces cytokines (FasL, TRAIL...) sont utilisées comme molécules effectrices par les lymphocytes cytotoxiques afin d'induire l'apoptose des cellules cibles. Cependant, il arrive que les cellules tumorales échappent au système immunitaire, résistant à l'attaque immunologique par différents mécanismes. Parmi ces mécanismes on note l'augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, c-flip, Akt...), ce phénomène est dû à certaines dérégulations au niveau des mécanismes de voies de résistance à l'apoptose. Parmi ces voies figure la voie PI3K/Akt/mTOR.

## **F-MECANISME DE RESISTANCE A L'APOPTOSE (VOIE PI3K/AKT)**

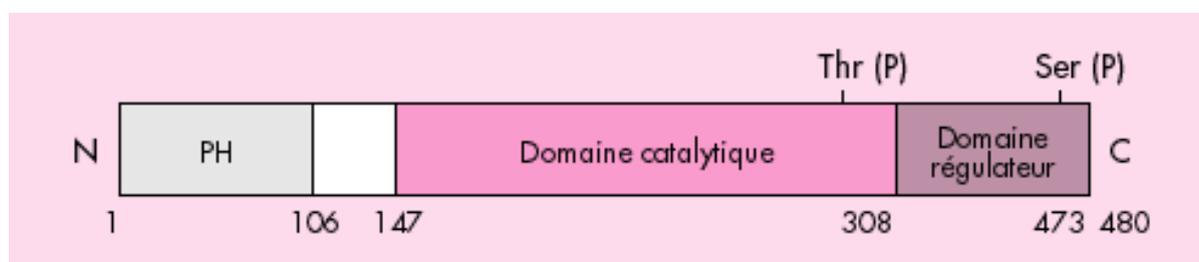
### **I. La voie de signalisation PI3K/Akt**

La voie phosphatidylinositol-3-kinase PI3K/Akt est une voie de transduction du signal intracellulaire jouant un rôle dans l'homéostasie cellulaire et ceci par la régulation de l'apoptose, la croissance, la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogenèse. Les protéines de cette voie sont des proto-oncogènes et des anti-oncogènes. Elle est activée par deux manières différentes : l'activation exogène par liaison des facteurs de croissance à des récepteurs kinases, l'activation endogène suite à la délétion et/ou la surexpression des protéines de cette voie (Coutte et al, 2012). En effet, la dérégulation de cette voie est fréquemment observée dans les processus tumoraux, d'où son importance dans la recherche des thérapies anti-tumorales.

## I.1 Structure de la kinase Akt

Akt est une sérine/thréonine kinase, de 59 kDa, qui appartient à une famille de trois membres chez les mammifères : Akt1/PKB $\alpha$  (protéine kinase B $\alpha$ ), Akt2/PKB $\beta$  (protéine kinase B $\beta$ ) et Akt3/PKB $\gamma$  (protéine kinase B $\gamma$ ), chacune codée par un gène différent. Chaque isoforme d'Akt possède (Figure 19) :

- un domaine PH (*pleckstrin-homology*) en N-terminal leur permettant de se lier aux phosphoinositides PIP2 et PIP3, avec une haute affinité et d'être recrutée à la membrane plasmique lorsque PI3K est activée (Franke et al, 1994).
- un domaine catalytique central sérine/thréonine Kinase.
- un domaine HM (*Hydrophobic Motif*) en C-terminal, correspondant à une courte région régulatrice.



**Figure 19** : Structure de la protéine kinase Akt d'après (Fischer et al, 1998).

*Le domaine amino-terminal d'Akt (aa 1-147) contient le domaine PH (aa 1-106) et une région riche en acides aminés acides (79-147). Ce domaine est impliqué dans la liaison aux phospholipides membranaires, dans des interactions « protéine-protéine » et dans la formation de complexes multimériques.*

## I.2 Expression de la kinase Akt

L'expression de chaque isoforme est variable selon les tissus. Akt1 s'exprime dans la plupart des tissus et favorise la croissance cellulaire, en bloquant l'apoptose. Akt2 s'exprime en plus forte concentration dans le tissu adipeux et dans les tissus sensibles à l'insuline comme les cellules adipeuses, le foie et le muscle (Altomare et al, 1998). Cette isoforme est nécessaire pour le transport du glucose (Garofalo et al, 2003). Akt3 semble être principalement exprimée dans le cerveau, le poumon et les testicules (Yang et al, 2004).

### I.3 La voie de signalisation PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt possède deux sous voies d'activation, une voie directe qui permet la liaison de la tyrosine kinase (RTK) à la sous unité régulatrice P85 et une voie indirecte passant par l'intermédiaire de Ras via sa liaison à la sous unité catalytique P110 (Figure 20).

La voie directe peut être activée par la fixation de ligands spécifiques, comme certains facteurs de croissance (PDGF, EGF, IGF1) ou des interleukines (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6...) sur des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Cette liaison du ligand sur le récepteur induit la dimérisation et la stabilisation du récepteur RTK. Cette dimérisation entraîne la trans-phosphorylation des résidus tyrosine kinase du domaine tyrosine kinase signifiant l'activation du récepteur, puis, en cascade, l'activation des effecteurs en aval, dont la PI3K. La PI3K phosphoryle le PIP2 en PIP3 conduisant à l'activation d'Akt et à la stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire. La phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homologue) s'oppose à l'action de la PI3K en déphosphorylant PIP3 en PIP2, désactivant ainsi l'Akt.

PIP3 transduit un signal intracellulaire en se fixant directement sur un domaine PH (pleckstrin homology) de différentes protéines. Deux kinases contenant le domaine PH ; PDK et Akt sont recrutées vers la membrane cytoplasmique via PIP3, ainsi, PDK1 active Akt par sa phosphorylation sur la thréonine 308. Il semble aussi que PDK2 active Akt par sa phosphorylation sur la serine 473, cette activation peut être menée aussi par d'autres kinases jouant la même fonction que PDK2 (Dong et al, 2005).

Mammalian TOR (mTOR) est une protéine kinase qui existe en deux complexes distincts : le premier complexe est mTORC1 comprenant mTOR, GβL, et raptor et le deuxième complexe mTORC2 contenant mTOR, GβL, et rictor. Le complexe qui contient le raptor (mTORC1) est sensible à la rapamycine et régule la croissance cellulaire, par la phosphorylation de S6K1. Le complexe qui contient le rictor (mTORC2) ne semble pas sensible à la rapamycine, et sa fonction cellulaire est encore discutée. Des études ont montré que (mTORC2) fonctionne comme PDK2 dans plusieurs des cellules non-cancéreuses et cancéreuses, chez la drosophile et les lignées humaines le mTORC1 et les protéines qui sont associées sont nécessaires pour la phosphorylation de Akt Ser473. In vitro, mTORC2 phosphoryle directement Akt Ser473 et facilite la phosphorylation de Akt thr308 par PDK1 (Sarbassov et al, 2005).

L'activation complète d'Akt nécessite la phosphorylation d'Akt sur la Thr 308 et la Ser 473 par deux kinases différentes (PDK1 et PDK2). La forme active d'Akt phosphoryle différents substrats et permet la croissance et la survie cellulaire par différents mécanismes.

Akt activée inhibe la famille des protéines Bcl-2 pro-apoptotique (BAD et BAX...), phosphoryle la protéine FoxO (forkhead box O transcription factors), et GSK3 (glycogen synthase kinase 3) et régule négativement le facteur de transcription NF- $\kappa$ B ce qui augmente l'expression des signaux anti-apoptotiques.

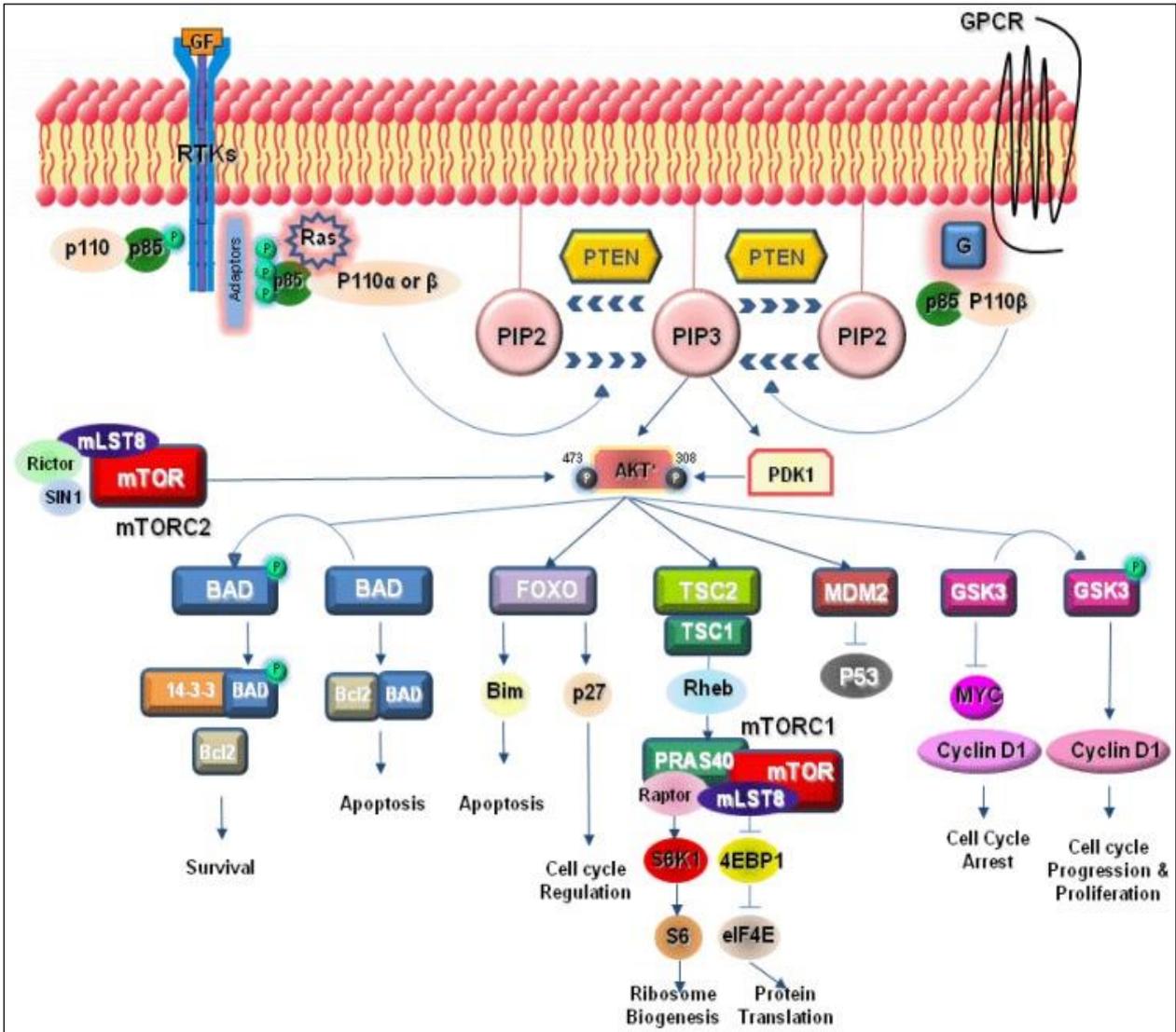
La phosphorylation de la protéine TSC2 (Tuberous sclerosis complex-2) par Akt activée entraîne sa combinaison avec la protéine TSC1 (Tuberous sclerosis complex-1) formant ainsi Rheb (Ras homologue enriched in brain). Ceci permet l'activation de Rheb, qui stimule le complexe mTORC1 qui phosphoryle à son tour S6K1 (p70S6 kinase) et 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1), induisant l'augmentation de la synthèse des protéines (Sarris et al, 2012) (Figure 20).

#### I.4 Rôles physiologique de la signalisation de la voie PI3K/Akt

La kinase Akt joue plusieurs rôles dans les diverses voies de signalisation en relation avec le métabolisme, l'angiogenèse, la transduction du signal cellulaire impliquée dans la division cellulaire. Elle joue également un rôle majeur dans l'inhibition de l'apoptose en réponse à des facteurs de croissance.

L'interaction directe entre PIP et le domaine PH d'Akt permet la relocalisation d'Akt du cytoplasme vers la face interne de la membrane plasmique où se trouvent les PIP3 générés par la PI3K. Cette relocalisation permet à Akt d'interagir avec les kinases qui la phosphorylent et l'activent, notamment PDK1 et PDK2.

En effet, il y a quatre sites de phosphorylation sur Akt : S124, T308, T405 et T473, les sites T308 et T473 sont phosphorylés en réponse aux stimuli alors que les deux autres sites de phosphorylation S124 et T405 sont constitutivement phosphorylés, donc seules les phosphorylations sur les sites T308 et S473 sont capables de modifier l'activité d'Akt.



**Figure 20** : La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR d'après (Sarris et al, 2012).

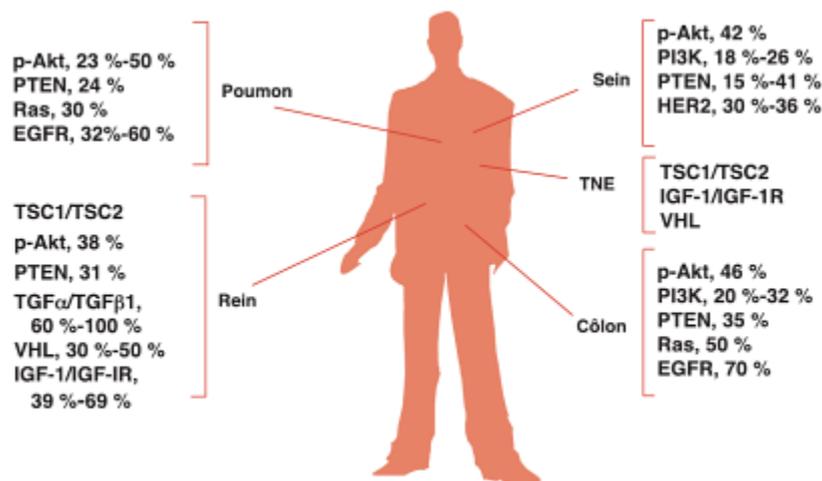
### I.5 PI3K/Akt et cancer

La voie PI3K/Akt est une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire, prolifération cellulaire, et l'angiogenèse d'où son intérêt dans l'étude de l'oncogenèse et la compréhension de plusieurs mécanismes de dérégulation cellulaire.

En effet, la plupart de ces protéines sont codées par des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes, dont la mutation peut favoriser le développement d'un processus tumoral.

Parmi ces protéines, la phosphatase PTEN, la protéine mTOR, (mammalian target of rapamycin), la protéine Akt, la protéine PI3K... (Figure 21).

La recherche des éventuelles mutations au niveau génomique ou de certaines dérégulations au niveau protéique a été l'objet de plusieurs études. En effet, il a été montré dans plusieurs types de cancer, une surexpression de Ras, une perte de fonction de PTEN, ou encore une mutation de PI3K ou d'Akt ou une activation de récepteurs à tyrosine-kinase RTK (notamment PDGFR, IGFR, et HER 1-4), qui deviennent autonomes par rapport à leurs facteurs de croissance (Dreyer et al, 2009). Cependant, aucune mutation de la protéine mTOR n'a été décrite à ce jour, ce qui en fait une cible thérapeutique particulièrement intéressante, son inhibition par la rapamycine et ses différents analogues a donné des résultats prometteurs dans différents types de tumeurs.



**Figure 21 :** Les altérations de la voie PI3K/Akt/mTOR dans différents types de cancer d'après (Soria et al, 2013) ; (TNE : Tumeur neuro-endocrine).

D'autres travaux basés sur l'utilisation des inhibiteurs de mTOR en association avec d'autres inhibiteurs comme EGFR, ont montré une synergie des inhibiteurs de mTOR et des inhibiteurs (REGF/HER2) lorsqu'ils sont combinés dans des essais précliniques, ainsi que des essais cliniques sur des tumeurs solides (Patnaik et al, 2007).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine inhibe aussi la voie Akt via mTOR-2 dans le cancer leucémique, en effet les patients traités par des inhibiteurs de mTOR ont une diminution de la phosphorylation d'Akt Ser473, ces mêmes résultats sont observés sur des lignées cellulaires leucémiques (Zeng et al, 2007).

D'autres travaux expérimentaux suggèrent qu'Akt pourrait être impliquée dans la faible efficacité de la chimiothérapie chez les patients maintenant un tabagisme actif lors du traitement du cancer bronchique non à petites cellules. Il semble que la nicotine et certains produits contenus dans le tabac (NNK) induisent l'activation de la voie de signalisation Akt, d'où une augmentation de la prolifération des cellules tumorales du poumon (Tsuturani et al, 2005).

De nombreuses études pharmacologiques ont validé le potentiel thérapeutique de la voie PI3K/Akt/mTOR dans le traitement de plusieurs types de cancer. L'utilisation des inhibiteurs de kinase qui ciblent les protéines PI3K, Akt, mTOR, et PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) a été l'objet des plusieurs essais cliniques, notamment, l'essai clinique avec l'inhibiteur de PI3K, LY294002, dans les gliomes malins. Il s'agit d'un traitement radiosensibilisateur, l'inhibition de PI3-kinase rehaussant la sensibilité des tumeurs à la radiothérapie (Nakamura et al, 2005).

D'autre part, plusieurs mécanismes ont contribué à l'activation de la voie Akt dans le cancer humain, notamment la dérégulation de la phosphatase PTEN et la voie PI3K. Il a été décrit des mécanismes inclus dans l'activation de PI3K suite à la stimulation autocrine ou paracrine de récepteur tyrosine kinase (RTK) (Yuan et al, 2008), l'augmentation de l'expression des récepteurs de facteur de croissance (GFR) « Growth Factor Receptor » comme EGFR « Epidermal Growth Factor Receptor » dans le glioblastome et HER-2/neu dans le cancer du sein (Bacus et al, 2002) et/ou l'activation de l'oncogène Ras (Liu et al, 2000).

Concernant la voie Akt, sa dérégulation a été observée dans différents types tumoraux, comme le cancer gastrique, en effet cette voie joue un rôle majeur dans la migration de cellules cancéreuses gastriques (Huang et al, 2014), ainsi que dans la prolifération et la migration des cellules de l'hépatoblastome (Xia et al, 2014).

D'autres études ont montré que la voie PI-3K/Akt pourrait être impliquée à la fois dans la tumorigenèse et la progression tumorale vésicale, hypothèse déjà vérifiée dans les cancers de la prostate, de l'ovaire, du pancréas et du sein. Il a été montré que l'activation de cette voie de signalisation procurait une résistance aux traitements, notamment dans le cancer de la vessie (Walleranda et al, 2008).

# **Objectifs et stratégies de l'étude**

Dans le monde, le cancer de la vessie est le deuxième cancer urologique. En Tunisie, il est la deuxième cause de mortalité par cancer, chez l'homme. Deux groupes histologiques ont été définis, d'un côté les tumeurs superficielles qui représentent 70-80% des cas, caractérisées par un taux élevé de récurrence ce qui nécessite un suivi à long terme. Ces tumeurs sont généralement de bon pronostic impliquant un traitement endoscopique et intravésical.

De l'autre, les tumeurs invasives qui représentent 20-30% des cas, caractérisées par l'agressivité et le fort pouvoir de progression de la maladie, avec moins de 50% de survie à cinq ans. Ces tumeurs sont de mauvais pronostic exigeant une approche beaucoup plus vigoureuse. C'est la cystectomie radicale, la chimiothérapie et la radiothérapie qui sont les options thérapeutiques envisagées dans ce dernier cas.

Bien que des patients répondent aux traitements comme la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'immunothérapie par BCG, l'efficacité de ces traitements reste limitée, plusieurs patients qui sont des mauvais répondeurs présentent une résistance aux traitements entraînant un échappement tumoral au bout de 6 à 36 mois. À l'heure actuelle, il n'existe pas ou peu de nouvelles approches thérapeutiques beaucoup plus efficaces et sélectives. Il est donc important d'améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la carcinogénèse vésicale afin d'identifier les différentes voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse et la progression tumorale, ce qui nous permet d'identifier certaines molécules clés servant à la fois de marqueurs pronostiques et prédictifs mais aussi de cibles thérapeutiques.

Nous sommes partis de l'hypothèse que l'importance et la nature de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires pourrait être un critère pronostique. Dans la première partie du travail, nous nous sommes intéressés à déterminer une fraction de l'infiltration immunologique au niveau des tumeurs des patients atteints du cancer de la vessie. Dans ce cadre, notre objectif était de regarder l'expression de certains facteurs immunologiques de trois populations de lymphocytes T [Th1, Th2 et T folliculaires (Tfh)] dans le microenvironnement tumoral.

La caractérisation de ces populations lymphocytaires T a été réalisée par la quantification par qPCR de l'expression de trois facteurs de transcription associés aux phénotypes Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3) et Tfh (bcl-6). La quantification du niveau d'expression de ces gènes dans les tissus tumoraux a été corrélée avec les différents paramètres cliniques.

L'importance de ces sous populations lymphocytaires détermineraient en fait la fonction cytotoxique qui est décrite comme la plus efficace contre la tumeur, notamment à travers l'induction de l'apoptose. Parmi les marqueurs régulant l'apoptose figurent des récepteurs solubles. Ainsi, la deuxième partie de ce travail a été essentiellement consacrée à l'étude du rôle de FasL soluble et de TRAIL soluble dans le sérum des malades atteints du cancer de la vessie. En effet, les formes solubles de FasL et TRAIL peuvent jouer un rôle anti ou pro-tumoral dans le développement des cancers. Pour comprendre son rôle dans le cancer de la vessie, une étude sur le sérum obtenu chez 64 patients tunisiens atteints du cancer de la vessie vs 72 sujets sains a été préconisée. Notre objectif était de comprendre le rôle que peut jouer les formes solubles de FasL et TRAIL dans le cancer de la vessie, en comparant leurs taux chez des patients par rapport au sujets sains et de chercher une corrélation entre leurs taux sériques et les différents paramètres cliniques des patients afin de trouver un marqueur de pronostic pouvant être évalué par des méthodes non invasives.

Il a été établi que malgré une réponse cytotoxique, les cellules tumorales pouvaient résister à la réponse immunitaire en développant entres mécanismes d'échappement tumoral, une résistance à l'apoptose. Nous avons focalisé, dans la troisième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine Akt au niveau tumoral. Tenant compte du rôle pro-tumoral que peut jouer Akt dans le développement des cancers, nous avons entrepris une étude sur des biopsies obtenues chez 72 patients tunisiens atteints du cancer de la vessie. Notre objectif était de comparer l'expression d'Akt sous sa forme phosphorylée dans des tissus tumoraux versus les tissus sains adjacents et de chercher une corrélation entre le niveau d'expression et les différents paramètres cliniques des patients afin de déterminer la valeur pronostique d'Akt et de son taux de phosphorylation dans le cancer de la vessie.

# **Matériels et Méthodes**

## **I. Sujets de l'étude**

L'étude porte sur 117 malades et 72 témoins ayant tous signé un consentement éclairé selon le modèle de consentement du CEBM (Comité d'Ethique Bio-Médicale) présenté dans l'une des deux langues au choix (Arabe et Français). Les 117 patients sont tunisiens, atteints du cancer de la vessie et traités au service d'Urologie de l'Hôpital Charles Nicolle de Tunis. Les 72 témoins sont des individus sains non atteints de maladies cancéreuses recrutés en tant que donneurs de sang volontaires à la banque du sang de Rabta de Tunis. Les témoins sont appariés en âge et en sexe au groupe de malades et ont donné un consentement éclairé pour participer à une recherche sur le cancer en général.

L'inclusion des malades dans le protocole est effectuée après confirmation de la tumeur vésicale. Alors le consentement éclairé est signé et le prélèvement du sang est réalisé et les tumeurs fraîches sont prélevées auprès des chirurgiens du service d'urologie de l'hôpital Charles Nicolle. Les données sur les dossiers sont collectées auprès du même service.

## **II. Données épidémiologiques et anatomo-cliniques**

Les sources des données épidémiologiques, cliniques et anatomo-pathologiques des patients atteints de cancer de la vessie sont les dossiers des malades hospitalisés dans le service d'urologie incluant les comptes rendus d'anatomopathologie du service d'anatomie pathologique de l'hôpital Charles Nicolle de Tunis. Ces données incluent pour les malades ; l'âge, le sexe, l'origine géographique, le statut tabagique, le grade, le stade, le traitement et le suivi du traitement (récidive et progression). Les dossiers de malades reçoivent un code et les données relatives au dossier sont strictement utilisées à des fins de recherche et de publication (corrélation du grade, du stade, de la récidive et de la progression avec les marqueurs biochimiques étudiés).

Les données relatives à la population des témoins sont recueillies suite à un questionnaire rempli pour chaque individu incluant l'âge, le sexe, l'origine géographique.

**Tableau 3 :** Paramètres cliniques et épidémiologiques des patients atteints du cancer de la vessie

<i>Cancer de la vessie</i>					
Marqueurs étudiés		T-bet, GATA-3, bcl-6	sFasL	sTRAIL	p-Akt
Nombre de patients		65	64	62	72
Sexe	Homme	61 (93.84%)	59 (92.18%)	57 (91.93%)	65 (90.27%)
	Femme	4 (6.15%)	5 (7.81%)	5 (8.04%)	7 (9.72%)
	Sexe-ratio	15.25	11.80	11.40	9.28
Age (ans)	Intervalle	42-107	41-88	41-88	41-94
	Moyenne	65.63± 13.13	63.30 ± 11.67	64.05± 9.74	66.06 ± 11.04
Origine géographique		Nord de la Tunisie			
Années d'échantillonnage		2008-2012			
Type de prélèvement		Biopsie Fraiche congelée	Sérum frais congelé	Sérum frais congelé	Biopsie Fraiche congelée

### II.1. Paramètres pathologiques :

Plusieurs paramètres ont été pris en compte :

- Type histologique (présence ou absence des signes de malignité).
- Classification : OMS (1973 et 2004) pour le grade et TNM pour le stade.
- (présence/absence) des Métastases.
- Traitements (simple résection transurétrale, BCG thérapie, chimiothérapie, radiothérapie, cystectomie partielle ou totale).
- Réponse aux traitements (Rémission complète/Rechute/Décès).

## **II.2 Paramètres épidémiologiques :**

- Sexe
- Age (ans)
- Origine géographique
- Consommation du Tabac (PY)

## **III. Matériel biologique**

Les échantillons sanguins utilisés dans cette étude sont prélevés sur EDTA (anticoagulant), un prélèvement sanguin de 2 à 3 ml dans les conditions adéquates (par un personnel hospitalier compétent). Le sérum est récupéré par centrifugation du sang total (15 min, 1500rpm, 4°C). Les biopsies fraîches sont prélevées à sec par le chirurgien urologue au service d'urologie de l'Hôpital Charles Nicolle de Tunis. Le volume de la biopsie prélevée varie entre 3 et 5 mm<sup>3</sup> selon la taille tumorale. Le sérum et les biopsies collectés sont conservés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Lignées cellulaires RT112 et J82 sont du Manassas, VA.

## **IV. Les réactifs biologiques**

- L'anticorps FasL (BD pharmingen).
- L'anticorps Fas (Millipore).
- L'anticorps TRAIL (BD pharmingen).
- L'anticorps DR4 (Millipore).
- L'anticorps DR5 (Millipore).
- L'anticorps antagoniste du récepteur Fas (Clone ZB-4) (Millipore).
- L'anticorps antagoniste du récepteur DR (Fc-TRAIL-R2) (Pr.Olivier Micheau, Inserm U866).
- L'anticorps phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology).
- L'anticorps Akt totale polyclonal (Cell Signaling Technology).
- L'anticorps  $\beta$ -actine.
- L'anticorps GADPH (Santa Cruz, CA).
- Kit ELISA (Diacclone Research).

- Inhibiteurs de protéases (Roche GmbH Germany Mannheim).
- Inhibiteur d'Akt « Triciribine » (Calbiochem).
- Inhibiteurs de phosphatases (Sigma).
- Les amorces pour l'amplification des ARNm « L32, T-bet, GATA-3 et bcl-6 » (Eurogentec).

## V. Méthodes

### V.1. Etude par qRT-PCR de l'expression des gènes T-bet, GATA-3 et bcl-6

L'expression de certains transcrits décrits a été confirmée par qRT-PCR. Ainsi, l'expression des gènes *T-bet*, *GATA-3* et *bcl-6* a été vérifiée dans les tissus des malades atteints d'une tumeur vésicale en prenant comme gènes de référence *L32*.

Après avoir extrait et rétro-transcrit l'ARN total en ADNc, une réaction de PCR en temps réel est réalisée afin d'amplifier cet ADNc. Les paramètres d'amplification utilisés sont : (i) une étape de d'activation de la polymérase (hot start) et de dénaturation de 15 minutes à 95°C, (ii) 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes suivis de 45 secondes à 62°C pour l'hybridation et l'extension des amorces. Une analyse de fusion entre 60 à 95°C (40 minutes) a été réalisée post-amplification. Les expériences ont été réalisées sur un thermocycleur ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems).

Cette technique consiste à détecter la fluorescence émise par les amplicons synthétisés à chaque cycle au fur et à mesure de leur formation. Cette détection se fait en temps réel avec la possibilité d'utiliser une molécule fluorescente, le Syber green, qui va s'incorporer dans la double hélice d'ADN néo-synthétisé. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADNc initialement présente. Un seuil de fluorescence est établi par la machine de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un numéro de cycle PCR (Ct : cycle threshold ou cycle seuil).

Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc initiale c.à.d, plus l'échantillon est concentré en molécules cibles au départ, moins il faudra de cycles pour détecter le produit d'amplification.

Le cycle seuil ou Ct (Cycle Threshold) de chaque gène a été déterminé lors de trois expériences distinctes, à partir du même échantillon d'extrait d'ARN. Un gène endogène L32 est utilisé comme contrôle interne pour normaliser les données.

L'expression du gène d'intérêt (A) pour chaque patient est normalisée par rapport à l'expression du gène endogène L32 selon la formule suivante :

$$\Delta Ct \text{ gène A} = Ct \text{ calib (gène A)} - Ct \text{ gène A}$$

$$\Delta Ct \text{ L32} = Ct \text{ calib (L32)} - Ct \text{ L32}$$

$$NRQ = \frac{2^{(\Delta Ct \text{ gène A})}}{2^{(\Delta Ct \text{ L32})}}$$

(NRQ: normalized relative quantity).

## **V.2 Dosage de sFasL et sTRAIL par un Kit ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**

La méthode d'Enzyme linked assay (ELISA) consiste à révéler par une réaction antigène-anticorps sur le sérum, la présence de cytokines solubles dans le sérum des malades et des témoins.

- Un anticorps primaire spécifique est adsorbé sur un support plastique. L'antigène est capté par l'anticorps et révélé par un anticorps secondaire spécifique couplé à la peroxydase
- La mesure de la quantité d'antigène se fait par l'ajout du substrat chromophore dont la coloration est en fonction de la quantité d'anticorps secondaire fixé.
- La mesure de la densité optique est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre
- La concentration de sFasL et de sTRAIL dans le sérum de chaque échantillon est déterminée à partir d'une courbe étalon utilisant des concentrations connues de l'antigène.

La gamme étalon et les échantillons sont dilués en Tampon de dilution. Une gamme étalon est constituée de 2000 pg/ml à 62.5 pg/ml pour sFASL et de 3000 pg/ml à 93.75 et pg/ml pour sTRAIL. Les échantillons dilués sont incubés pendant 2 heures à température ambiante.

Après 3 lavages, l'anticorps secondaire Anti-FasL biotinylé dilué est ajouté pendant une heure à température ambiante suivi d'un lavage et d'une incubation de 20 minutes à température ambiante avec de HRP-Streptavidine diluée. Après 3 lavages l'étape de révélation est réalisée : 100µl de substrat TMB (Tétra methyl benzidine) est ajouté dans chaque puits, l'oxygène produit par la réaction enzymatique due à la peroxydase transforme le TMB, chromophore incolore en un composé coloré : une coloration bleue se développe en 15 à 20 minutes dans l'obscurité, son intensité est en fonction de la quantité de FasL et TRAILL soluble. La réaction est stoppée avec 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1M et la densité optique (D.O) est mesurée à 450 nm au spectrophotomètre.

### **V.3 Analyse des échantillons par Western blot**

Les extraits cellulaires totaux à partir de deux lignées cancéreuses de vessie RT112 et J82 sont lysés dans un tampon de lyse adéquate associée à des inhibiteurs de protéases.

- Une fois les protéines totales sont récupérées, elles sont dosées selon la technique de Bradford.
- Trente microgrammes de protéines sont déposés et séparés sur gel d'acrylamide puis transférés sur une membrane de cellulose. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire qui va se fixer sur son antigène spécifiquement.
- La membrane est ensuite incubée avec un deuxième anticorps couplé à la peroxydase.
- La révélation des bandes attestant la présence des protéines se fait par l'ajout de la peroxydase.
- La lecture des signaux émis se fait sur un Chemidoc.

Trente microgrammes de protéines sont repris (Vol. /Vol.) dans un tampon de charge (Tris-HCl 62.5mM-Ph 6.8, β-mercapto-éthanol 5%, SDS 2.3%, glycérol 10%, Urée 5M, bleu de bromophénol), chauffés à 95°C pendant 5 minutes, puis séparés sur un gel de polyacrylamide en sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE). Le pourcentage du gel est choisi selon le poids moléculaire des protéines d'intérêt.

La migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique de 90 Volts dans un tampon de migration constitué de (glycine 200 mM, SDS 0.1%, Tris-HCl 25 mM, pH 6.8).

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech, Royaume-Uni) à 50 Volts pendant 1 heure 30 minutes dans un tampon de transfert (Tris-base 50 mM, acide borique 50 mM).

La membrane est ensuite saturée avec une solution de PBS, Tween-20 0.1% (PBS-T) contenant 8% de lait écrémé en poudre (Régilait) ou 5% de BSA (sérum albumine Bovine), selon l'anticorps primaire utilisé, durant 1 heure sous une agitation lente à température ambiante et ceci pour bloquer les sites non spécifiques.

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire (tableau 4) une nuit à 4°C sous une agitation lente, et ensuite lavée 3 fois 10 minutes avec le PBS-Tween 0.1%, puis incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch Laboratories, WG, USA), dilué au 1/10 000 dans le PBS-Tween 0.1%.

Après 3 lavages de 10 minutes dans le même tampon, la membrane est incubée une minute dans une solution de luminol (Santa Cruz ou Amersham). Enfin les protéines sont révélées par autoradiographie sur film photosensible (Amersham Pharmacia Biotech, Royaume-Uni).

**Tableau 4 :** Liste des anticorps utilisés en western blot

Anticorps primaires	Référence	PM (kDa)	Hôte	Dilution	Durée et Température d'incubation
<b>Akt</b>	9271	60	lapin	1/1000	Une nuit, 4°C
<b>p-Akt Ser473</b>	4060	60	lapin	1/1000	Une nuit, 4°C
<b>FASL</b>	556387	40-42 (forme membranaire) et 26 (forme soluble)	souris	1/1000	Une nuit, 4°C
<b>Fas</b>	05-338	45	humain	1/1000	Une nuit, 4°C
<b>TRAIL</b>	556468	32 (forme membranaire) et 28 (forme soluble)	souris	1/1000	Une nuit, 4°C
<b>DR4</b>	2202429	57	lapin	1/1000	Une nuit, 4°C
<b>DR5</b>	2239577	57	lapin	1/1000	Une nuit, 4°C
<b>GADPH</b>	Sc-32233	37	souris	1/1000	Une nuit, 4°C
<b>Actine</b>	Sc-1616	43	chèvre	1/1000	Une nuit, 4°C

## **V.4 Traitement des lignées cellulaires**

Deux lignées cellulaires de cancer de la vessie RT112 et J82 sont cultivées dans les conditions adéquates. Les cellules sont traitées par le sérum des patients en présence ou en absence d'un anticorps antagoniste au récepteur Fas « ZB4 » ou en présence ou en absence d'un anticorps antagoniste au récepteur TRAIL-R (Fc-TRAIL-R2) pendant 24h (les anticorps anti-Fas et anti-DR5 sont rajoutés dans le milieu de culture pendant une heure avant le traitement avec le sérum des patients).

L'évaluation du nombre de cellules vivantes par puits est réalisée à 490 nm grâce à un spectrophotomètre après coloration.

### *V.4.1 Culture des lignées cellulaires cancéreuses*

Les lignées cellulaires RT112 et J82 sont des lignées humaines, issues d'un cancer de la vessie et proviennent de « American Tissue culture collection (Manassas, VA) ».

Ce sont des cellules adhérentes qui, une fois en culture dans des conditions favorables, se développent et forment un tapis sur le fond des fioles. La lignée cellulaire est cultivée dans du milieu de culture composé de RPMI 1640 avec L-glutamine (Biowhittaker) additionné de 10 % de SVF (Sérum de Veau Fœtal).

Les cultures ont été effectuées dans des fioles Nunc stériles de 75 cm<sup>2</sup> maintenues dans une chambre de culture à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. A confluence, les cellules sont trypsinisées, lavées avec du milieu Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Biowhittaker), puis détachées en les incubant pendant 5 minutes à 37°C dans de l'HBSS contenant 0.125% de trypsine (Biowhittaker) et 0.1% d'EDTA (Acide Ethylène-Diamin-Tétraacétique). L'effet de la trypsine est neutralisé en ajoutant 4 vol de milieu de culture.

### *V.4.2 Test de viabilité cellulaire*

La viabilité cellulaire, avant culture, est vérifiée par un test d'exclusion du bleu Trypan. Pour chaque expérience, les cellules sont trypsinisées et la suspension cellulaire est diluée au demi par du bleu de trypan, puis le nombre de cellules vivantes est dénombré à l'aide d'une lame de Malassez. La quantité des cellules comptées correspond au nombre de cellules (en millions) par millilitre.

#### *V.4.3 Analyse de la cytotoxicité cellulaire in vitro : le test MTS*

Les cellules ( $2.10^5$  cellules/ml) sontensemencées en plaque de 96 puits, 10µl de MTS ou [3-(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxypheryl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium, inner salt, Promega] ont été ajoutés par puits de culture et les plaques sont incubées à 37°C à l'obscurité pendant 4h puis l'absorbance est lue toutes les heures à 490 nm. Les cellules vivantes, métabolisent par leurs enzymes mitochondriales le MTS en cristaux de bleu de formazan. L'absorbance, proportionnelle au nombre de cellules vivantes est mesurée à 490 nm au spectrophotomètre.

Les cellules sont inoculées à la densité de ( $2.10^5$  cellules/ml) dans des plaques transparentes 96 puits (100 µL par puits). Après 24 heures de culture, le milieu est éliminé par retournement de la microplaque. Une gamme anti Fas clone ZB4 est préparée dans du milieu sans sérum en répliqués (n= 3) par concentration. Les cellules sont exposées à la ZB4 (200 µL par puits) pendant 24 heures. Des contrôles « Cellules » (cellules incubées avec du milieu de culture sans sérum) sont systématiquement réalisés sur chaque plaque (minimum 3 puits par contrôle). Tous les puits reçoivent ensuite 20µL de solution de MTS dans du milieu de culture afin d'évaluer le pourcentage de survie des cellules. La microplaque est incubée une heure à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Une mesure de la fluorescence permettant d'évaluer la quantité de cellules par puits est faite à une longueur d'onde d'excitation 490 nm de microplaques.

#### *V.4.4 Les agents utilisés pour le traitement des cellules*

##### a. Anticorps antagoniste du récepteur Fas (clone ZB4)

L'anticorps du récepteur Fas (anti-Fas, clone ZB4) (Millipore), (1mg/ml) est utilisé comme prétraitement. Il est ajouté dans le milieu de culture pendant une heure à une concentration de 500ng/ml.

*b. Anticorps antagoniste du récepteur DR (Fc-TRAIL-R2)*

L'anticorps du récepteur TRAIL (anti-DR) a été fourni par l'équipe de Pr.Olivier Micheau (Inserm U866). Il est ajouté dans le milieu de culture pendant 1 heure à une concentration de ng/ml et avant le traitement avec les sérums des malades.

*c. Agents chimiques*

Inhibiteur de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR : le triciribine (Akt). Les cellules sont ensemencées pendant 24 h et traitées avec 10 $\mu$ M de triciribine pendant 48h.

## **V.5 Etude des protéines phosphorylées et non phosphorylées à partir des extraits tissulaires**

Une biopsie de tissu cancéreux de la paroi vésicale est broyée grâce à l'appareil de Potter. Le culot cellulaire est repris dans 250  $\mu$ l de tampon de lyse RIPA en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche GmbH Germany Mannheim) et d'inhibiteurs de phosphatases : cocktail 3 (Sigma-P0044) et cocktail 2 (Sigma-P5726), l'éclatement des cellules est achevé par écrasement pour lyser les membranes. Afin d'éviter la dénaturation des protéines, on travaille en milieu tamponné et à 0°C (glace). On élimine les débris cellulaires par centrifugation (20 000 rpm, 30 min à 4°C). On obtient enfin un homogénat cellulaire.

Après avoir cultivé les lignées cellulaires de cancer de la vessie RT112 et J82 dans les conditions adéquats (décrits dans la version publiée), un traitement avec ou sans cisplatine en présence ou absence d'un inhibiteur d'Akt « le triciribine » a été réalisé sur les deux lignées. La viabilité cellulaire est évaluée par un test MTS [3-(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium, inner salt, Promega] près 48h d'incubation

### *V.5.1 Extraits totaux pour l'étude de l'expression des protéines non phosphorylées*

Les cellules (10<sup>6</sup>/puit) sont déposées dans une plaque de 6 puits dans 2 ml de milieu complet puis stimulées 24 heures plus tard dans 1 ml de milieu complet frais. La plaque de 6 puits est ensuite mise sur la glace et le milieu de culture est remplacé par 1 ml de PBS froid.

Les cellules sont ensuite décollées à l'aide d'un grattoir, transférées dans un tube eppendorf et centrifugées (1500rpm, 5min, 4°C). Le culot cellulaire est repris dans 100 µl de tampon de lyse le *Boling Buffer* (1% SDS, 1mM de Vanadate de Soduim, 10 mM de Tris pH 7.4) en présence d'inhibiteurs de protéases pendant 15 minutes dans la glace. Le lysat est ensuite ultrasoniqué (10s à 10%+5s à 10%), centrifugé (10 000 rpm, 15 min à 4°C) pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant qui contient les protéines cellulaires totales, est récupéré.

#### *V.5.2 Extraits totaux pour l'étude de l'expression des protéines phosphorylées*

Les biopsies sont lysées dans 100 µl de tampon de lyse constitué de *Boling Buffer*, en présence d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases : cocktail 3 (Sigma-P0044) et cocktail 2 (Sigma-P5726), pendant 30 minutes à 4°C en vortexant toutes les 5 minutes. Le lysat est ensuite centrifugé (14000 rpm pendant 15 min à 4°C) pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant qui contient les protéines cellulaires totales, est récupéré. L'extrait protéique obtenu est ensuite dosé au spectrophotomètre au 690 nm.

## **V.6 Analyses statistiques**

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel graphpad prism (version 6.0). La comparaison entre les groupes des malades et des sujets sains a été réalisée par le non paramétrique *t-test* de Mann-Whitney (*Tow-tailed test*) et la comparaison entre les différents sous-groupes des malades a été effectuée par le non paramétrique test d'*Annova*. On a utilisé (*logistic regression test*) pour évaluer l'impact du tabac sur l'expression et l'activation des différents marqueurs étudiés. Les courbes de survie ont été établies à partir de (*Kaplan-Meir Test*). Les différences sont considérées significatives si l'indice de significativité  $p < 0.05$ .

# Résultats

## **A-Etude épidémiologique et clinique du cancer de la vessie au sein de notre cohorte :**

Notre cohorte est constituée de 117 malades atteints du cancer de la vessie (sachant que pour certains malades nous avons réussi à collecter les deux matériels biologiques (sérums et biopsies), pour d'autres nous avons réussi à avoir ou bien le sérum tout seul à cause de la petite taille tumorale ou bien la biopsie toute seule à cause des problèmes de prélèvement sanguin chez le patient.

### **I-Données épidémiologiques : (Age, sexe, origines géographiques et tabac)**

Dans notre cohorte d'étude, tous nos malades sont originaires du nord de la Tunisie, 109/117 sont des hommes et 8/117 sont des femmes avec un ratio-sexe de 13.62 et un âge moyen de diagnostic de la maladie de  $66.32 \pm 13.30$  ans. Cette moyenne d'âge n'est pas significativement différente de la moyenne d'âge internationale qui est entre (65 et 70 ans) (Kirkali et al, 2005). Ce résultat exclut l'hypothèse d'un diagnostic tardif de la maladie dans la population tunisienne par rapport aux autres populations.

Sachant que le cancer est une maladie multifactorielle, qui dépend des facteurs biologiques et des facteurs environnementaux, le tabagisme est le facteur étiologique le plus associé à la survenue des tumeurs de la vessie. Dans notre cohorte, le tabac semble être un facteur de risque de survenue des tumeurs vésicales avec la présence d'une grande proportion de fumeurs (94/109) vs (15/109) de non-fumeurs. Dans la population tunisienne, la présence d'une grande proportion de fumeurs (plus de 55% des hommes sont des fumeurs) (Fakhfakh et al, 2005) permet d'expliquer la fréquence élevée du cancer vésical chez les hommes.

L'incidence du cancer de la vessie est aussi liée à l'ancienneté du tabagisme et au nombre de cigarettes fumées par jour (paquet par année : PA). Il existe ainsi un effet dose, c'est-à-dire une accumulation des effets nocifs dans le temps. En effet, parmi nos malades fumeurs (58/94) sont de gros fumeurs (plus de 40 PA) parmi ces gros fumeurs 36.12% ont commencé de fumer très jeune âge.

## **II-Données cliniques (stade, grade, récurrence et progression de la maladie)**

Dans le présent travail, nous avons analysé une cohorte de 117 malades atteints des tumeurs vésicales au premier diagnostic à différents stades et grades de la maladie. La classification anatomopathologique TNM a permis de composer les tumeurs vésicales en deux groupes :

- Les tumeurs superficielles ou non-invasives, représentant 66.36% (73/110) des tumeurs primaires. Cette valeur est plus faible que celles décrites dans la littérature qui estime une fréquence des tumeurs superficielles au moment du premier diagnostic de 70 à 80% (Kirkali et al, 2005).
- Les tumeurs invasives, représentant 33.63% (37/110) des tumeurs primaires. Cette valeur est parmi les plus élevée par rapport aux valeurs décrites dans la littérature (20 à 30%).

La classification anatomopathologique de grade selon OMS-1973 est composée de trois groupes de tumeurs vésicales :

- Les tumeurs de bas grade, représentant 38.18% (42/110) des tumeurs primaires.
- Les tumeurs de grade moyen, représentant 10% (11/110) des tumeurs primaires.
- Les tumeurs de haut grade, représentant 51.81% (57/110) des tumeurs primaires.

Dans notre travail, nous avons aussi essayé de suivre l'histoire évolutive du cancer de la vessie chez notre cohorte depuis son initiation jusqu'à sa progression. Ce suivi des malades a été fait après au moins trois ans après l'apparition des tumeurs primaires. Le suivi de l'évolution de la maladie a été réalisé après le traitement. 51.51 % (51/99) de nos malades récidivent et (48/99) 48.48% ne récidivent pas après une simple résection vésicale ou après un traitement.

Le taux de récurrence semble être important dans notre population, puisque plus de la moitié des malades rechutent après le traitement. L'importance des fréquences de récurrence reste un problème majeur dans le cancer de la vessie ce qui nécessite une surveillance des patients à vie et un intérêt de chercher des nouvelles thérapies qui limitent la rechute, la résistance aux traitements et qui augmentent les chances de guérison.

La recherche d'un lien entre les facteurs cliniques et les facteurs environnementaux (le tabac et la sévérité de la maladie) est utile à déterminer.

Les résultats obtenus à partir de notre cohorte ont montré que les fumeurs ont 1.78 fois plus de risque d’avoir une récurrence de leur maladie que les non-fumeurs ( $P=0.009$ ) (Tableau suivant). Cependant, la quantité de tabac fumé ne semble pas un facteur de risque. Ces résultats ont été déjà observés dans plusieurs travaux.

**Tableau 5 :** Distribution des fréquences du tabac selon la récurrence de la maladie

Statut tabagique		Pas de récurrence	Récurrence	P	RR (CI 95%)
Non-fumeurs	15 (12.82%)	11	3	1*	
Fumeurs	94 (80.34%)	37	47	0.009	1.78 (1.23-2.56)
1-19PA	5 (5.31%)	3	1	0.10	-
20-39PA	31 (32.97%)	11	19	0.14	-
≥40PA	58 (61.70%)	23	29	0.25	-

PA : paquet par année, RR : risque relative.

## **B- Signification clinique de l'expression des facteurs de transcription T-bet, GATA-3 et de bcl-6 dans le carcinome de la vessie**

### **I-Introduction**

Le microenvironnement tumoral peut avoir un double effet, pro-tumoral ou anti-tumoral puisque son action dépend entre autres, de la nature des cellules tumorales, et de leur comportement (Immunosuppression).

L'inflammation chronique est pro-tumorale, puisqu'elle favorise le développement tumoral, en fournissant le combustible nécessaire à la croissance tumorale par la sécrétion de facteurs de croissance et des molécules pro-angiogéniques. Cependant, le rôle de l'inflammation aiguë et de l'infiltration lymphocytaire n'a jusqu'à présent pas vraiment été établi. Il est cependant connu depuis plus d'un siècle que l'inflammation aiguë peut jouer un rôle anti-tumoral, ces observations ont conduit à l'élaboration de traitements induisant l'inflammation, comme le BCG, qui est encore utilisé dans les cancers superficiels de la vessie comme un traitement adjuvant efficace après résection.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'infiltration des sous populations lymphocytaires TCD4 au niveau des tumeurs vésicales. Cette infiltration est évaluée à travers la quantification du niveau d'expression de certains gènes codant les facteurs de transcription caractéristiques respectivement des TH1, TH2 et THf dans les tissus tumoraux prélevés chez 65 patients tunisiens atteints de cancer de la vessie.

Dans un premier temps nous avons extrait l'ARN à partir des biopsies, synthétisé l'ADNc et quantifié l'expression de T-bet, GATA-3 et bcl-6 par qPCR en utilisant le gène L32 comme contrôle interne. Le niveau d'expression de ces gènes a été corrélé avec les différents paramètres cliniques ce qui nous a permis de conclure quant à la valeur pronostique de T-bet, GATA-3 et bcl-6 chez nos patients. Parallèlement, nous avons analysé la survie dans notre cohorte des patients afin de prédire la probabilité de taux de guérison selon la stratification au premier diagnostic cliniques ou après un traitement appliqué.

## **II-Résultats**

### **1. La survie des patients atteints de cancer de la vessie**

#### **1.1 Corrélation survie et paramètres cliniques**

L'interprétation des courbes de survie nous a permis d'estimer le taux de survie des patients lié à la récurrence et la progression du cancer et à son stade et grade au moment du diagnostic. En effet, on observe une augmentation de la durée moyenne de survie des patients à stade superficiel, de bas grade, sans histoire de récurrence ou de progression tumorale (Figure. 1 A, B, C, D).

#### **1.2 Corrélation survie et expression T-bet, GATA-3 et bcl-6**

Nous avons aussi montré que l'augmentation de l'expression de GATA-3 et de bcl-6 a été corrélée avec la survie des malades ( $P= 0.03$ ) (Fig. 5B, C). Cependant, aucune corrélation entre l'expression de T-bet et le taux de survie n'a été observée ( $P= 0.78$ ) (Figure.5A).

### **2. Association de l'expression de T-bet, GATA-3 et bcl-6 et les différents paramètres cliniques**

L'analyse quantitative de l'expression de T-bet, GATA-3 et bcl-6 dans les biopsies tumorales prélevées de patients tunisiens, a montré que le taux de l'expression de ces gènes varie selon les différents paramètres cliniques.

#### **2.1 Corrélation de l'expression de T-bet en fonction de la classification clinico-pathologique**

Nous avons trouvé, que l'expression de T-bet était significativement plus élevée dans les tumeurs de stade invasif que dans les tumeurs de stade superficiel ( $P= 0.02$ ) (Figure. 2A). De plus, cette expression était significativement plus élevée dans les tumeurs de haut grade que dans les tumeurs de moyen et de bas grade ( $P= 0.005$ ) (Figure. 2B). Aucun lien n'a été observé entre l'expression de T-bet et la récurrence de la maladie d'une part (Figure. 2C) et l'expression de T-bet et la progression de la maladie d'un autre part (Figure. 2D). Ce qui suggère que T-bet n'est pas un marqueur de récurrence ou de progression dans le cancer de la vessie.

## **2.2 Corrélation de l'expression de GATA-3 en fonction de la classification clinico-pathologique**

L'étude de corrélation de l'expression quantitative de GATA-3 avec les différents paramètres cliniques des patients, nous a permis de dégager des associations significatives. En effet, nous avons montré, que l'expression de GATA-3 était significativement plus élevée dans les tumeurs de stade superficiel que dans les tumeurs de stade invasif ( $P= 0.008$ ) (Figure. 3A). Ainsi, cette expression est plus élevée dans les tumeurs de moyen et de bas grade comparées aux tumeurs de haut grade ( $P= 0.001$ ) (Figure. 3B).

Le taux de l'expression de GATA-3 n'est pas associé à la récurrence ou à la progression de la maladie (Figure. 3C, D).

## **2.3 Corrélation de l'expression de bcl-6 en fonction de la classification clinico-pathologique**

L'expression de bcl-6 a été aussi corrélée au stade superficiel et au bas et moyen grade ( $P= 0.0003$ ) et ( $P<0.0001$ ) (Figure. 4A, B) respectivement, sans aucune association avec la récurrence ou à la progression de la maladie (Figure. 4C, D).

## **3. Association de l'expression de T-bet, GATA-3 et bcl-6 avec la réponse au traitement par BCG et la consommation du tabac**

Le traitement des patients a été effectué selon plusieurs critères tels que le stade, le grade et l'état général du patient. Parmi nos patients, (29/65) (44.61%) ont été traité par la BCG thérapie, avec (14/29) 48.27% de rechute après ce traitement (mauvais répondeurs au BCG) et (15/29) 51.72% en rémission jusqu'au dernier suivi (bons répondeurs au BCG). Une corrélation entre l'expression de T-bet dans les cellules tumorales au moment du premier diagnostic et la réponse au traitement par BCG a été observée ( $P= 0.02$ ) (Figure.6A).

Aucune corrélation entre l'expression de GATA-3 et bcl-6 et la réponse au traitement par BCG n'a été observée (Figure. 6B et C).

L'expression de T-bet, GATA-3 et bcl-6 a été aussi corrélée à la consommation du tabac, nous n'avons pas montré de différences significatives entre l'expression de T-bet chez les gros fumeurs et les malades qui fument légèrement (Figure. 7A).

Cependant l'expression de GATA-3 et bcl-6 est plus faible chez les gros fumeurs (Figure. 7B, C). Nous avons observé aussi que les gros fumeurs sont des mauvais répondeurs à la BCG thérapie (Figure. 7C).

### **III-Conclusion**

L'étude de l'infiltration des lymphocytes T au niveau de microenvironnement tumoral du cancer de la vessie, nous a permis de déterminer la valeur pronostique de trois facteurs de transcriptions T-bet, GATA-3 et bcl-6 qui semble être importants.

## **ARTICLE 1**

# **Clinical significance of T-bet, GATA-3, and bcl-6 transcription factors expression in bladder carcinoma**

**Islem Ben Bahria-Sediki**, Nadhir Yousfi, Catherine Paul, Mohamed Chebil, Mohamed Cherif, Rachida Zermani, Amel Ben Ammar Gaaied, Ali Bettaieb

**Article soumis dans Journal of Translational Medicine, Mars 2016**

## **Clinical significance of T-bet, GATA-3, and bcl-6 transcription factor expression in bladder carcinoma**

Islem Ben Bahria-Sediki<sup>1,2,3</sup>, Nadhir Yousfi<sup>1,2</sup>, Catherine Paul<sup>1,2</sup>, Mohamed Chebil<sup>4</sup>, Mohamed Cherif<sup>4</sup>, Rachida Zermani<sup>4</sup>, Amel Ben Ammar El Gaaied<sup>3</sup>, Ali Bettaieb<sup>1,2,\*</sup>.

<sup>1</sup> EPHE, PSL Research University, Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), F-75014, Paris, France. <sup>2</sup> Bourgogne Franche-Comté University, LIIC, EA7269, F-21000 Dijon, France ; <sup>3</sup>Laboratoire de Génétique, Immunologie et Pathologies Humaines, Faculté de Sciences Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunisia ; <sup>4</sup>Hôpital Charles Nicolle de Tunis, Tunisia.

Keywords: Bladder carcinoma, T-bet, GATA-3, bcl-6, prognosis.

\*Corresponding author:

Ali Bettaieb

Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des cancers, EPHE

EA 7269, Université de Bourgogne

UFR des Sciences de Santé, 7 boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon, France

E-mail: ali.bettaieb@u-bourgogne.fr

Tel : (+33) 3 80 39 34 51

Fax : (+33) 3 80 39 34 34

[Disclosure of potential conflicts of interest:](#)

[No conflicts of interest were disclosed.](#)

## **Abstract**

**Background:** The aim of this study was to investigate the clinical significance of three immune cell-related transcription factors, T-bet, GATA-3 and bcl-6 in bladder cancer in Tunisian patients.

**Methods:** Expression of T-bet, GATA-3 and bcl-6 genes was assessed using RT-qPCR in 65 bladder cancers from patients: 32 being diagnosed as low- and medium-grade, 31 as high-grade, 25 as muscle invasive stage and 39 as non-muscle invasive stage. Gene expression was statistically correlated according to the grade, the stage, tobacco consumption, the BCG response and disease severity.

**Results:** T-bet levels in patients with high-grade bladder cancer were significantly elevated compared to patients with low- or medium-grade bladder cancer ( $p = 0.005$ ). In invasive carcinoma (T2-T4), the T-bet levels were significantly higher than in superficial non-invasive bladder tumors (Tis, Ta, and T1) ( $p = 0.02$ ). However, T-bet is predictive of the response to BCG. Its expression is high in good responders to BCG ( $p = 0.02$ ). In contrast, the expression of GATA-3 and bcl-6 in non-invasive carcinoma ( $p = 0.008$  and  $p = 0.0003$ ) and in patients with low- and medium-grade cancers ( $p = 0.001$  and  $p < 0.0001$ ) is significantly higher than in invasive bladder tumors and in patients with high-grade bladder carcinoma, respectively. In addition, heavy smokers, whose tumors express low levels of GATA-3 and bcl-6, are poor responders to BCG ( $p = 0.01$  and  $p = 0.03$ ). Finally, better patient survival correlated with GATA-3 and bcl-6 ( $p = 0.04$ ) but not T-bet expression.

**Conclusions:** Our results suggest that T-bet expression in bladder tumors could be a positive prognostic indicator of BCG therapy, even if high levels are found in high-grade and stage of the disease. However, GATA-3 and bcl-6 expression could be considered as predictive factors for good patient survival.

## Background

Global analysis of cancers revealed the importance of the adaptive immune cell response against tumors for cancer patient survival. However, the clinical outcome depends on the nature, functional orientation, density and location of immune cells within the tumor microenvironment [1]. For instance, ample clinical evidence shows that longer survival of cancer patients is associated with increased expression of genes characteristic of type 1 effector T cells, in particular the T-box master transcription factor regulator (T-bet) [2, 3]. Although T-bet is the master regulator of Th1 cell differentiation, it is expressed in multiple cells of the innate and adaptive immune system, including innate lymphoid cells (ILCs) [4, 5]. These cells are a relatively rare subset of T-cells in comparison to lymphocytes in lymphoid tissues, but they are enriched in skin, lung, intestine, and adipose tissues [6]. They consist of three distinct groups, ILC1, ILC2 and ILC3. These cells are characterized by their non-cytotoxic phenotype and their ability to produce many cytokines including IFN $\alpha$ , TNF- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-9 and IL-22 [7]. CD8<sup>+</sup>-infiltrating lymphocytes are also predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma [8] and are associated with a favorable prognosis in ovarian cancer [9]. This contrasts with the accumulation of tumor-infiltrating regulatory T cells (Tregs), where it is attested that the master regulator of Treg differentiation Foxp-3 is expressed. This creates an immunosuppressive microenvironment leading to tumor progression [10]. This is due to the ability of Treg cells to dampen the activity of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, as well as natural killer (NK) cells, mainly by the release of transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ 1) and IL-10 [11]. Other adaptive cells are differently associated to cancer patient outcome. The Th2 response, evidenced inter alia by the expression of GATA-3, was associated with tumor immune evasion in a mouse study [12], but was not associated with a clinical outcome in human studies [13, 14] or in patient's prognosis [15]. Patients with a low Th17 response had a better disease-free survival [15], whereas Th17 cells increased with advanced gastric cancer [16].

The opposite effect was observed for ovarian cancer [17]. Concerning follicular helper T cells (Tfh), an additional effector subset of T helper lymphocytes whose development is controlled by the B-cell lymphoma 6 transcription factor (bcl-6), the presence of Tfh was high in various human cancers including malignancies in the lymphoid system [18]. Where the Tfh presence is significant, it has been associated with a better patient cancer outcome (breast cancer) [19], whereas a decreased proportion of Tfh was associated with increased hepatocellular carcinoma disease progression [20].

In the field of bladder cancer, few studies have addressed the role of immune cells in anti-tumor or pro-tumor activity and the correlation between those infiltrates and the clinical outcome [8].

Bladder cancer is the ninth most common malignancy worldwide, with its highest incidence rates in Western countries [21]. In Tunisia, bladder cancer is the second cause of cancer in the Tunisian male. The most effective therapy against superficial bladder cancer is intra-vesicle infiltration with *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) [22]. However, some recurrence and progression occur after this therapy, which renders the response to BCG unpredictable. Hence, it is necessary to pinpoint reliable predictive biomarkers that could identify groups at elevated risk of treatment failure for a specific therapy.

The aim of this study is to assess the prognostic value of three genes in tumors from bladder cancer patients in Tunisia: T-bet, GATA-3 and bcl-6. We found that upon disease progression, patients with high expression levels of T-bet had reduced disease-free survival, but were good responders to BCG. In contrast, reductions in bcl-6 and GATA-3 expression correlated with invasive and high-grade of bladder cancer and were associated with a decrease in disease-free survival. Our results suggest that Th1-, Th2- and Tfh- associated gene expression could represent potential prognostic markers in patients with bladder cancer.

## **Methods**

### **Patients and samples**

A total of 65 patients with bladder carcinoma, for whom transurethral resection tissue was available, were followed-up in the Urology Department of Charles Nicolle Hospital (Tunis, Tunisia). Informed consent was obtained from all patients before their enrolment in the study. This study is in agreement with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Tunis Pasteur Institute. All patients were from the North of Tunisia: 93.84% of them were men and 6.15% were women, and the mean age at diagnosis was  $65.63 \pm 13.13$  years. Histopathological grading and staging were performed according to the WHO and TNM classification, respectively (Table 1).

### **RNA Extraction from Tumors**

Fresh bladder tumor samples ranging from stage and grade according to the TNM classification were obtained after surgical removal and 65 tissues samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the extraction of RNA. Total RNA from tumor tissue was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After determination of the quality and concentration of the RNA by measuring optical density values at 260 nm and 280 nm with a nano-Drop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies), the RNA was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### **RT-qPCR analysis**

The mRNA levels of three genes, namely T-bet, GATA-3, and bcl-6, were determined by quantitative real-time reverse-transcriptase PCR (RT-qPCR). In a first step, complementary DNA (cDNA) was reverse transcribed from one microgram ( $1\mu\text{g}$ ) of total RNA, using a random oligonucleotide primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions. The cDNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. For real-time PCR the SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems by life technologies) was used.

PCR reactions were carried out on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using the following conditions: an initial incubation at 50°C for 2 min then 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. L32 mRNA was measured as the endogenous control (reference gene). All reactions were performed in triplicate. Primers for the amplification of the T-bet, GATA-3, bcl-6, and L32 genes are described in Table 2, and were from Eurogentec.

Relative mRNA levels for each sample were quantified using the Ct approach (fluorescence threshold), normalized to L32 mRNA as the standard. Expression of L32 was used as an endogenous reference and expression of T-bet, GATA-3 and bcl-6 target genes in each sample were normalized to the mean of all Ct (Ct Calib). Thus, the relative gene expression level was calculated as the normalized relative quantity:

$$NRQ = \frac{2^{-(\Delta Ct \text{ gene})}}{2^{-(\Delta Ct L32)}}$$

Where  $\Delta Ct \text{ target gene} = Ct (\text{calib- target gene}) - Ct \text{ target gene}$

and  $\Delta Ct L32 = Ct (\text{calib-L32}) - Ct L32$

### **Statistical analysis:**

For basic statistical calculations, all gene expression levels were treated as continuous variables. Differences in gene expression between different clinical statuses were analyzed by the Student test using Graph pad prism 6. The nonparametric Mann-Whitney U test was used for statistical evaluation of the differences between two independent groups. Survival time was analyzed using Kaplan–Meier curves. Overall survival (OS) was also compared using the log-rank and the Gehan–Wilcoxon tests. Differences were considered statistically significant when the p-value was <0.05.

## **Results**

### **Outcome of patients upon surgery**

The OS of our cohort of patients with bladder carcinoma was determined according to clinic-pathological features. As expected, little or no mortality was observed in patients without recurrence and disease progression, compared to those with recurrence and progression (Fig. 1 A, B). Similarly, patients with superficial and low- or medium-grade cancers had prolonged disease-free survival compared to those with invasive or high-grade disease (Fig. 1 C, D).

### **T-bet expression in bladder tumor**

Expression of the Th1 transcription factor T-bet in bladder carcinoma was determined by real-time PCR as a function of the TNM histological stage of the disease. In invasive carcinoma (T2-T4), the level of T-bet was significantly higher ( $p = 0.02$ ) than in superficial non-invasive bladder tumors (Tis, Ta, and T1) (Fig. 2A). Likewise, T-bet gene expression in patients with high-grade bladder cancer was significantly higher than that in patients with low- and medium-grade disease ( $p = 0.005$ ) (Fig. 2B). There were no statistical differences between patients with or without recurrence (Fig. 2C), or with or without progression (Fig. 2D), suggesting that T-bet was not a marker of progression or recurrence of patients with bladder cancer. However, its reduction may be of good prognostic value. To determine whether T-bet positive cells are Th1, we evaluated the expression of interferon gamma ( $IFN\gamma$ ) in tumors, by RT-qPCR. We found that there was no  $IFN\gamma$  expression in tumors, whatever their grade or stage (data not shown).

### **GATA-3 expression in bladder cancer tissue**

We next investigated by real-time PCR expression of the Th2-associated gene GATA-3 in bladder tumors. The expression level of GATA-3 in non-invasive carcinoma (Tis, Ta, and T1) was significantly higher ( $p = 0.008$ ) than in invasive bladder tumors (T2-T4) (Fig. 3A). Likewise, GATA-3 gene

expression in patients with low- and medium-grade cancers was significantly higher than that in patients with high-grade bladder carcinomas ( $p = 0.001$ ) (Fig. 3B). On the other hand, GATA-3 levels were not associated with recurrence or progression of non-muscle-invasive tumors (Fig. 3 C, D). Limited to phenotyping of Th2 by the expression of GATA-3, these results suggest that reduced Th2 phenotype correlates with disease aggressiveness and a poor prognostic value.

### **bcl-6 expression in bladder cancer tissue**

We next assessed whether bcl-6 gene expression in bladder cancer was correlated to the clinic-pathological features of patients. Real-time PCR analysis showed that bcl-6 gene expression was higher in non-invasive bladder cancer tissue (Tis, Ta, and T1) than in invasive bladder tumors (T2-T4) ( $p = 0.0003$ ) (Fig. 4A). Patients with low- and medium-grade carcinomas expressed the bcl-6 gene to high levels compared to patients with high-grade disease ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 4B). Gene expression of the bcl-6 gene was not associated either with disease progression or with recurrence of bladder cancer tumors (Fig. 4 C, D). Limited to the phenotyping of Tfh by the expression of bcl-6, these results suggest that similarly to Th2, reduced tumor infiltration with Tfh cells correlates with disease aggressiveness and poor prognostic value.

### **Survival analysis**

Next, we analyzed T-bet, GATA-3, and bcl-6 levels in relation to OS of patients with bladder cancer. No correlation was found between T-bet expression and patient survival ( $p = 0.78$ ) (Fig. 5A). However, high expression of GATA-3 and bcl-6 were associated with a better OS rate ( $p = 0.04$ ) (Fig. 5B, C).

## **The prognostic value of T-bet, GATA-3 and bcl-6 in the response to BCG treatment and in tobacco addicts**

We further compared the expression of the three transcription factors, T-bet, GATA-3 and bcl-6 to treatment with BCG, in good or poor BCG responders. Real-time PCR analysis showed that there is no significant difference between the patient response to BCG and the expression of GATA-3 (Fig. 6B) and bcl-6 (Fig. 6C), whereas the expression of T-bet is higher among patients who respond well to BCG as compared to non-responders ( $p = 0.02$ ) (Fig. 6A). These results suggest that T-bet might be a predictor of the response to BCG therapy in patients with bladder cancer.

We also correlated the expression of these three genes with tobacco addiction of patients with bladder cancer. First, we showed that heavy smokers are poor responders to BCG (Fig. 7D). T-bet expression was not significantly different between heavy smokers and those who smoked less since their disease onset (Fig. 7A). In contrast, the expression of both GATA-3 (Fig. 7B) and bcl-6 (Fig. 7C) was significantly lower in heavy smokers than in light ones ( $p = 0.01$  and  $p = 0.03$ ) respectively. These results suggest that smoking during treatment can be detrimental for disease outcome.

## Discussion

The present study showed differences in levels of immune-related transcription factors between groups of patients suffering from bladder cancer, according to the histopathological features of the disease. We found that the expression of GATA-3, a well-defined regulator of T helper2 (Th2) cell differentiation, was significantly higher in non-invasive carcinoma than in patients with low- or medium-grade disease. Our results did not allow the expression of GATA-3 to be associated with Th2, since we have not analyzed the expression of Th2-associated cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13. It is also known that GATA-3 regulates the specification and differentiation of many cell and tissue types, including: innate lymphoid cells (ILC2), adipose tissue, endothelial cells, urothelium (a constituent of the bladder tumor environment) [23, 24]. Although we were unable to associate the expression of GATA-3 to Th2 or another type of cell, it remains possible that this transcription factor serves as a good prognosis biomarker in bladder cancer, since its expression is associated with patient survival.

We also examined the expression of bcl-6, which has been defined as an essential element for the development of Tfh cells. This transcription factor has been described to be highly expressed in various human cancers. We found that the level of bcl-6 was significantly higher in non-invasive carcinoma and in low- and medium-grade tumors than in invasive and high grade. Although overexpression of bcl-6 was frequent in diffuse large B cell lymphoma [25], its involvement in other cancer types was controversial. Our study is consistent with one indicating that bcl-6 expression was significantly increased in transitional cell carcinoma. In addition, bcl-6 expression correlated positively with low- and medium-grades of bladder cancer [26]. If we consider that the cells that express bcl-6 are largely Tfh, our results are consistent with those indicating that impaired function of Tfh cells is associated with hepatocellular carcinoma progression [20]. Recent data also revealed that a detectable Tfh cell presence is associated with long-term positive clinical outcome in patients with either breast or colon cancer [19, 27].

Conversely, further studies revealed that bcl-6 expression was associated with disease progression and poor survival of breast cancer patients [18]. To assign bcl-6 to Tfh required the expression of markers associated with Tfh, such as: CXCR5, CXCL13 and IL-21 to be assessed. Considering the expression of bcl-6 only in tumors, we can suggest that the expression of this transcription factor is associated with a good prognosis in bladder cancer.

Finally, we also revealed that high levels of T-bet were associated with invasive carcinomas and patients with high-grade cancer. Although T-bet was originally cloned as a key transcription factor, involved in the commitment of T helper (Th) cells to the Th1 lineage, it plays multiple roles in many subsets of immune cells, including innate lymphoid cells or type 1 (ILC1), B cell, Th17 and dendritic cells [28]. In the present work, we observed an inverse correlation between T-bet and GATA-3 expression in tumors, which would be in agreement with a balance between Th1 and Th2 cells that has been well-established. We can thus propose the hypothesis that the presence of Th1-type cells limits that of Th2-type. However, from our results it appears that these Th1 cells are not active in tumors, which explains their association with high-grade and stage cancer. Indeed, it is known that T-bet is responsible for the expression of IFN $\gamma$ , a cytokine secreted by Th1 [29] that exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic mechanisms [30]. In our study, we failed to detect IFN $\gamma$  in tumors (data not shown). From this point of view, our results suggest that the increased expression of T-bet in the tumors in the absence of IFN $\gamma$  may be considered as a marker of high-grade and advanced-stage disease. Interestingly, we found that T-bet expression correlated with a good response to BCG therapy. This result could be explained by the BCG reactivation of unreactive Th1-type cells present in tumors, which is expected to induce local inflammation. Our results are in agreement with those showing the association of Th1 to good prognosis and survival of patients with cancer [15]. Similarly, our results agree with those that suggest that the BCG therapy response is correlated with the magnitude of T-cell infiltration in patients' populations [31].

Using a mouse tumor model, several groups have reported that BCG-mediated antitumor activity requires a functional immune system, including CD4+ and CD8+ T lymphocytes [32]. Despite the characterization of biomarkers predicting a response to BCG immunotherapy, few are promising as predictive markers of a response to BCG treatment [33].

In conclusion, our results suggest that T-bet can be used as a predictive marker for good responses to BCG therapy. This conclusion could explain the fact that T-bet expression is not correlated with recurrence, progression nor survival, even though it is associated to high-grade and -stage in the diagnosis of bladder cancer, whereas an increase of GATA-3 and bcl-6 expression are associated with a good survival rate. More detailed characterization of cell populations expressing these transcription factors might provide opportunities to eliminate pro-tumoral cells in bladder cancer or harness anti-tumoral cells or compounds.

### **Abbreviations**

BCG: Bacillus Calmette-Guerin; bcl-6: B-cell lymphoma 6; GATA-3: Trans-Acting T-cell-specific transcription factor 3; Tfh: T-cell follicular "helper"; T-bet: T-box transcription factor TBX21; TNM: Tumor Node Metastasis; WHO: World Health Organization.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Authors' contributions**

AB, ABG, IBS conceived the study and interpretation of results; IBS carried out the study; NY and CP participated in analyses of results; IBS, MC, MS, RZ, SR participated in blood and tissue collection and tumor pathological characterisation; IBS, AB, ABG participated in data interpretation and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## **Acknowledgments**

We would like to thank Lionel Apetoh, Inserm U866, Dijon, France for his criticism of the paper. Financial support: This study was supported by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” of Tunisia (to Ben Bahria-Sediki); the “Région de Bourgogne” (to Ben Bahria-Sediki, Bettaieb).

## References

1. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;29;313(5795):1960-4.
2. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2654-66.
3. Atreya I, Schimanski CC, Becker C, Wirtz S, Dornhoff H, Schnurer E, et al. The T-box transcription factor eomesodermin controls CD8 T cell activity and lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Gut*. 2007;56(11):1572-8.
4. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*. 2001;292(5523):1907-10.
5. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(11):777-89.
6. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*. 2015;21(7):698-708.
7. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015;517(7534):293-301.
8. Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):3967-72.
9. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(51):18538-43.
10. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):186-92.
11. Byrne WL, Mills KH, Lederer JA, O'Sullivan GC. Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res*. 2011;71(22):6915-20.
12. Ziegler A, Heidenreich R, Braumuller H, Wolburg H, Weidemann S, Mocikat R, et al. EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion. *Blood*. 2009;113(15):3494-502.

13. Evans CF, Galustian C, Bodman-Smith M, Dalgleish AG, Kumar D. The effect of colorectal cancer upon host peripheral immune cell function. *Colorectal Dis.* 2010;12(6):561-9.
14. Kemp RA, Ronchese F. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol.* 2001;167(11):6497-502.
15. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2011;71(4):1263-71.
16. Zhang B, Rong G, Wei H, Zhang M, Bi J, Ma L, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(3):533-7.
17. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood.* 2009;114(2):357-9.
18. Wu Q, Liu X, Yan H, He YH, Ye S, Cheng XW, et al. B-cell lymphoma 6 protein stimulates oncogenicity of human breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2014;14:418.
19. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013;123(7):2873-92.
20. Jia Y, Zeng Z, Li Y, Li Z, Jin L, Zhang Z, et al. Impaired function of CD4+ T follicular helper (Tfh) cells associated with hepatocellular carcinoma progression. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117458.
21. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
22. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Comperat E, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol.* 2013;64(4):639-53.
23. Higgins JP, Kaygusuz G, Wang L, Montgomery K, Mason V, Zhu SX, et al. Placental S100 (S100P) and GATA3: markers for transitional epithelium and urothelial carcinoma discovered by complementary DNA microarray. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(5):673-80.
24. Asch-Kendrick R, Cimino-Mathews A. The role of GATA3 in breast carcinomas: a review. *Hum Pathol.* 2016;48:37-47.
25. Duan S, Cermak L, Pagan JK, Rossi M, Martinengo C, di Celle PF, et al. FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. *Nature.* 2012;481(7379):90-3.

26. Lin Z, Kim H, Park H, Kim Y, Cheon J, Kim I. The expression of bcl-2 and bcl-6 protein in normal and malignant transitional epithelium. *Urol Res.* 2003;31(4):272-5.
27. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity.* 2013;39(4):782-95.
28. Oh S, Hwang ES. The role of protein modifications of T-bet in cytokine production and differentiation of T helper cells. *J Immunol Res.* 2014;2014:589672.
29. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100(6):655-69.
30. Brandacher G, Winkler C, Schroecksnadel K, Margreiter R, Fuchs D. Antitumoral activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Curr Drug Metab.* 2006;7(6):599-612.
31. Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF. Intravesical Evans strain BCG therapy: quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J Urol.* 1992;147(6):1636-42.
32. Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 1993;150(3):1018-23.
33. Zuiverloon TC, Nieuweboer AJ, Vekony H, Kirkels WJ, Bangma CH, Zwarthoff EC. Markers predicting response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: a systematic review. *Eur Urol.* 2012;61(1):128-45.

## Figure legends

### Figure 1

Kaplan–Meir plots for overall survival (OS) according clinic-pathological feature in patients with primary bladder cancer. Stratified survival curves for 65 patients were evaluated.

(A) Patients with superficial and invasive stage  $*P=0.03$ . (B) Patients with low- and high- grade tumors  $*P=0.01$ . (C) Patients with and without recurrence history  $*P=0.04$ . (D) Patients with and without tumor progression  $***P=0.0002$ .

### Figure 2

Relative expression of T-bet in primary tumor biopsies. Histogram showing the expression levels of T-bet according to clinic-pathological features: (A) Statistical analyses of T-bet expression between superficial and invasive histological stage of bladder cancer  $*P=0.02$ . (B) Statistical analyses of T-bet expression between low and high histological grade of bladder cancer  $**P=0.005$ . (C) No correlation of T-bet expression according to recurrence. (D) No correlation of T-bet expression according to tumor progression. L32 was used as the endogenous reference, and the expression of T-bet target gene in each sample was normalized (as described in “methods” section). All PCR samples were assessed in triplicate.

### Figure 3

GATA-3 expression levels according to clinic-pathological features: (A) Statistical analyses of T-bet expression and pathological stage  $**P=0.008$ . (B) Statistical analyses of GATA-3 expression and pathological grade  $**P=0.001$ . (C) No correlation between GATA-3 expression and recurrence. (D) No correlation between GATA-3 expression and tumor progression.

### Figure 4

bcl-6 expression levels according to clinic-pathological features: (A) Statistical analyses of bcl-6 expression between superficial and invasive histological stages of bladder cancer  $***P=0.0003$ . (B) Statistical analyses of bcl-6 expression between low and high histological grades of bladder cancer  $****P<0.0001$ . (C) No correlation between bcl-6 expression and recurrence. (D) No correlation between bcl-6 expression and tumor progression.

### **Figure 5**

Kaplan–Meir plots for overall survival (OS) for T-bet, GATA-3, and bcl-6 gene expression in patients with primary bladder cancer. Stratified survival curves for 65 patients by relative gene expression evaluated by qPCR. (A) Survival of patients with low and high T-bet expression levels. (B) Survival of patients with low and high GATA-3 expression levels  $*P=0.04$ . (C) Survival of patients with low and high bcl-6 expression levels  $*P=0.04$ .

### **Figure 6**

Correlation of T-bet, GATA-3 and bcl-6 gene expression with response to BCG therapy. Expression of these transcription factors was evaluated by RT-qPCR. (A) Statistical analyses of T-bet expression for poor and good responders to BCG  $*P=0.02$ . (B) Statistical analyses of GATA-3 expression for poor and good responders to BCG. (C) Statistical analyses of bcl-6 expression for poor and good responders to BCG.

### **Figure 7**

Correlation of T-bet, GATA-3 and bcl-6 expression levels and intensity of tobacco consumption of patients with bladder cancer. (A) Frequency of smokers' patients according the BCG response. (B) Statistical analyses of T-bet expression levels between heavy and light smoker patients. (C) Statistical analyses of GATA-3 expression levels between heavy and light smokers  $*P=0.01$ . (C) Statistical analyses of bcl-6 expression levels between heavy and light smokers  $*P=0.03$ . PY: packets per year.

**Table 1:** Characteristics of TCC tumor samples and patient information

<i>Characteristics</i>	<i>Number of patients (n = 65)</i>	
<i>Mean age (years)</i>	<i>Median</i>	<b>65.63</b>
	<i>Range</i>	<b>42-107</b>
<i>Gender</i>	<i>Male</i>	<b>(93.84%)</b>
	<i>Female</i>	<b>(6.15%)</b>
<i>Tumor stage</i>	<i>Superficial (pta, pt1, TIS)</i>	<b>39 (60.00%)</b>
	<i>Invasive (pt≥2)</i>	<b>25 (38.46%)</b>
	<i>Unknown</i>	<b>1 (1.53%)</b>
<i>Tumor grade</i>	<i>Low-grade (GI)</i>	<b>24 (37.50%)</b>
	<i>Meduim-grade (GII)</i>	<b>8 (12.50%)</b>
	<i>High-grade (GIII)</i>	<b>31 (48.43%)</b>
	<i>Unknown</i>	<b>1 (1.56%)</b>
<i>Bladder cancer recurrence</i>	<i>Recurrence</i>	<b>28 (49.12%)</b>
	<i>No recurrence</i>	<b>29 (50.87%)</b>
<i>Bladder cancer progression</i>	<i>Progression</i>	<b>11 (39.28%)</b>
	<i>No progression</i>	<b>17 (60.71%)</b>

(TCC) Transitional cell carcinoma.

**Table 2:** Sequences of Primers for RT-PCR

<i>Target gene</i>	<i>Oligonucleotide sequence (5' → 3')</i>
L32	F- CTG CAG TCT CCT TGC ACA CTT R-TCT CCT GAA TGT GGT CAC CTG A
T-bet	F-CCC CTT GGT GTG GAC TGA GA R-ACG CGC CTC CTC TTA GAG TC
GATA-3	F-GTC CTC CCT GAG CCA CAT CT R-GTG GTC CAA AGG ACA GGC TG
bcl-6	F-ACC TGC GAA TCC ACA CAG GA R-AGT CGC AGC TGG CTT TTG TG

(F) forward primer, (R) reverse primer

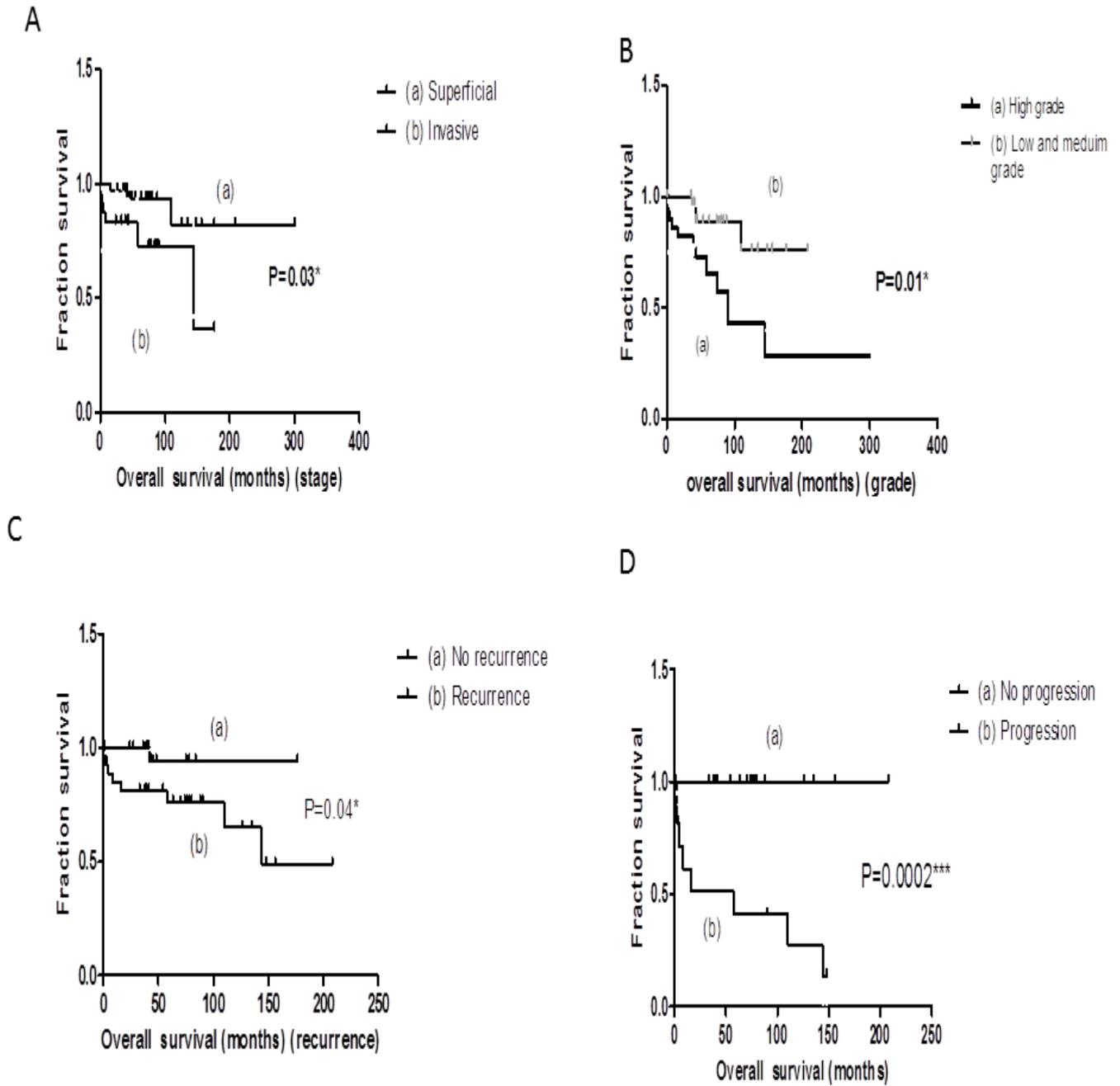


Figure 1

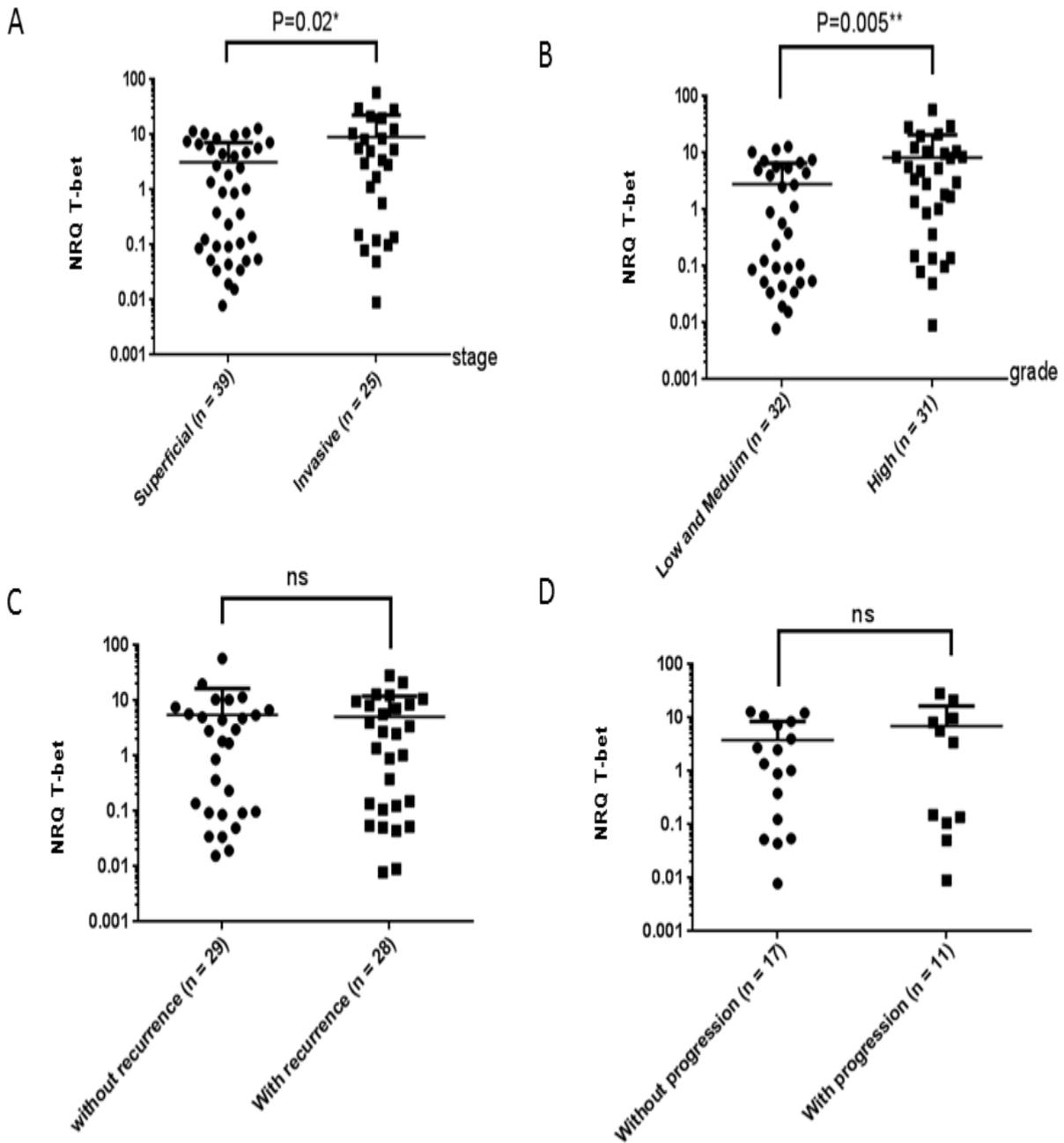


Figure 2

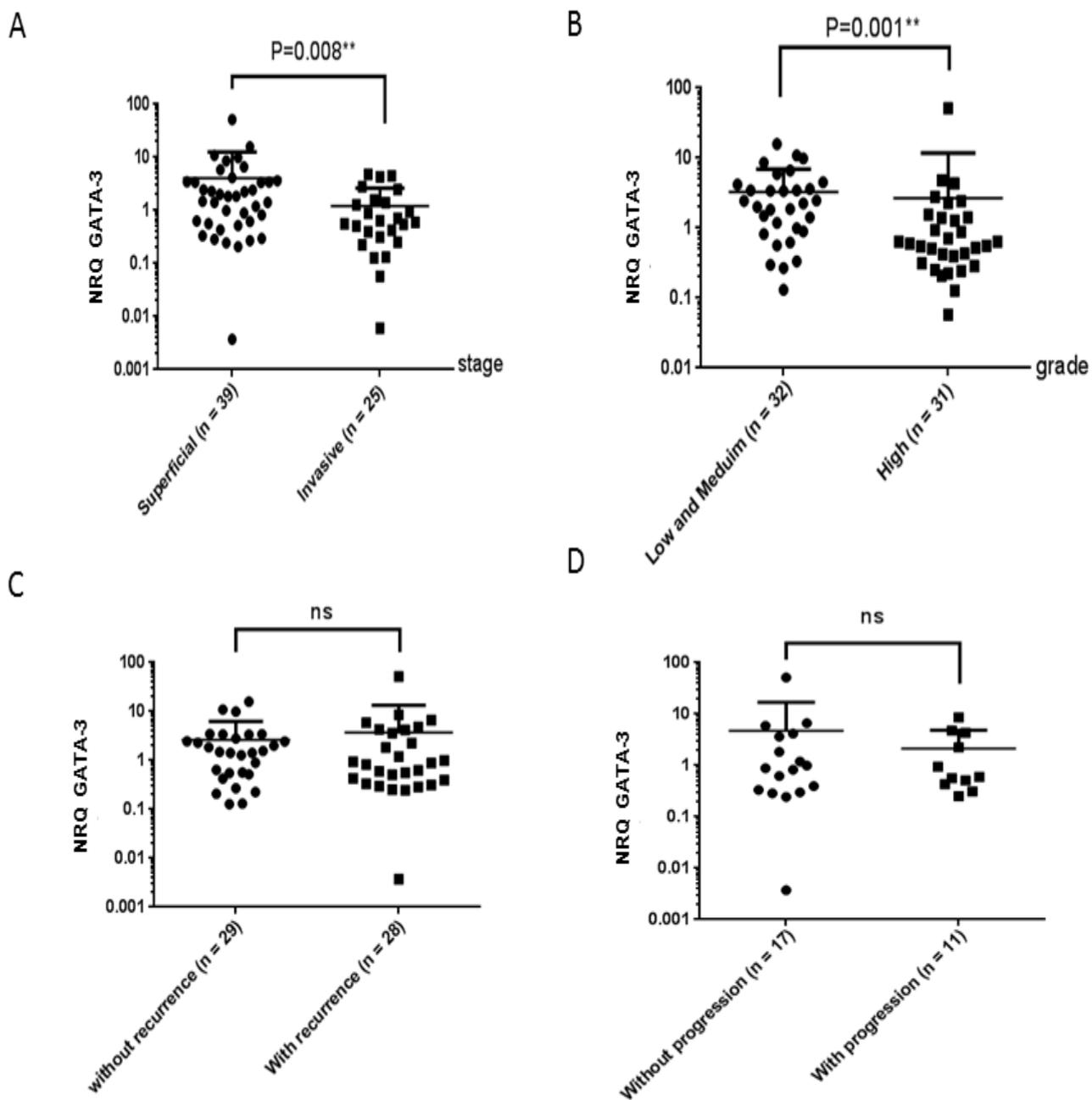


Figure 3

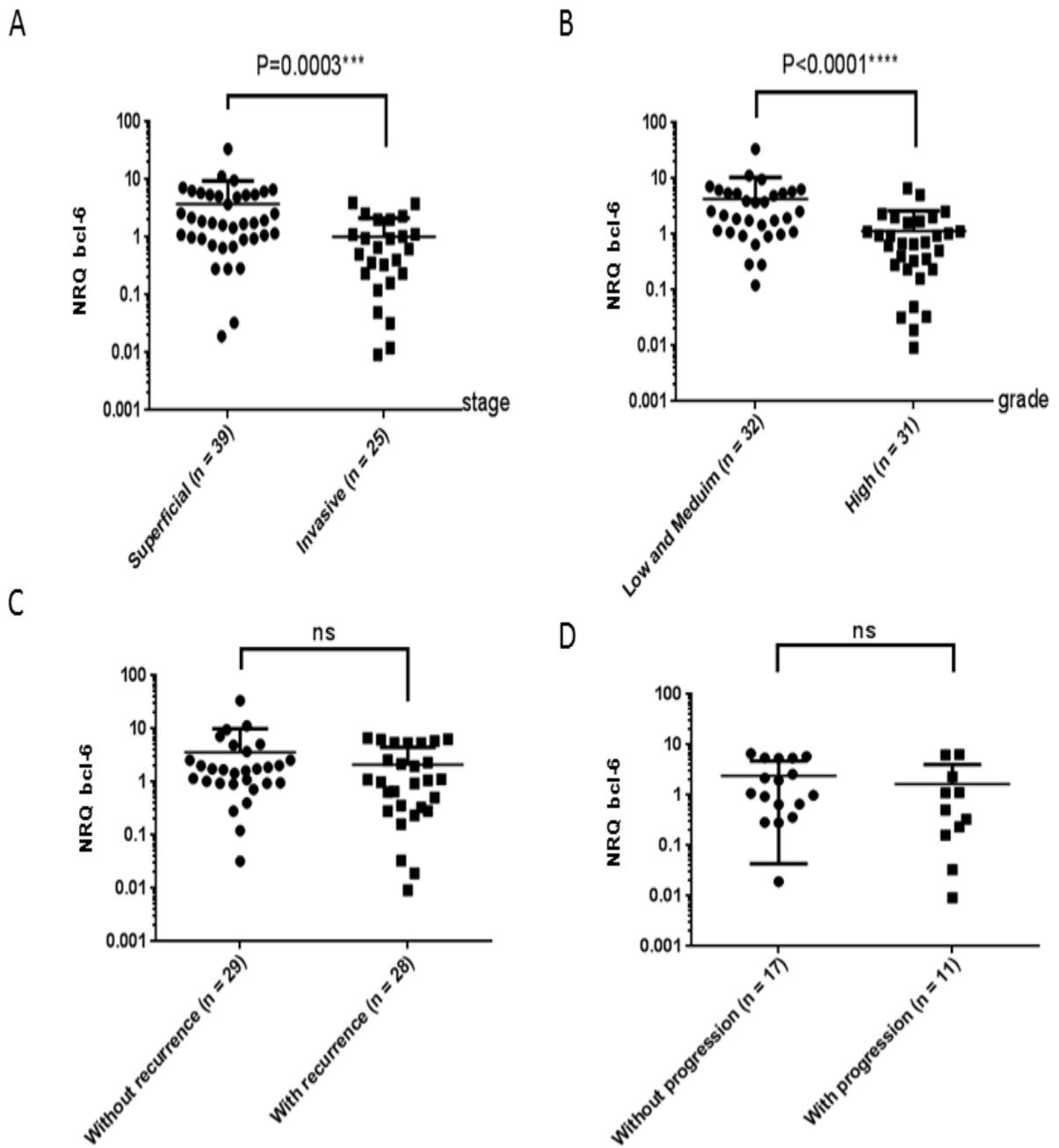


Figure 4

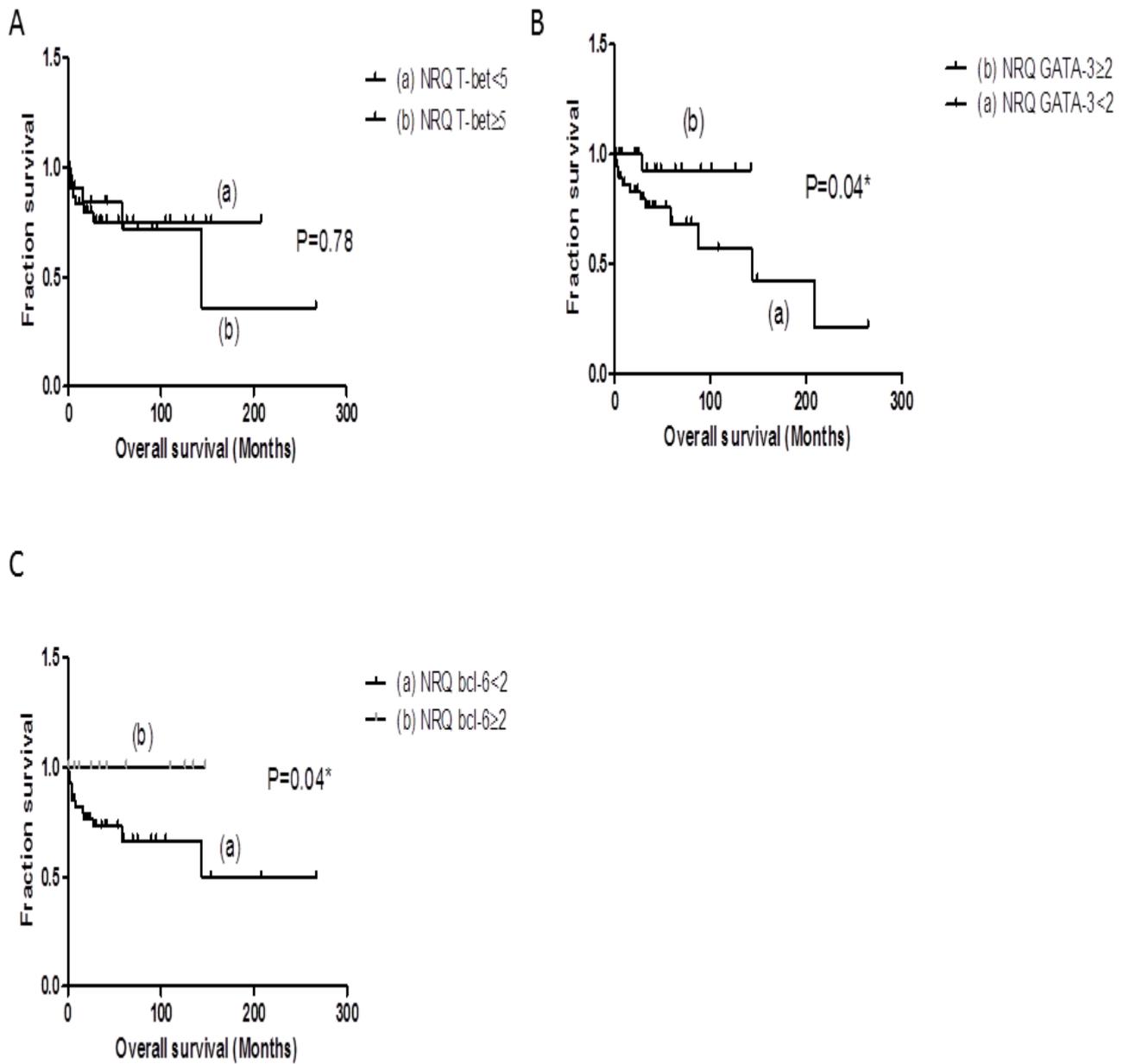


Figure 5

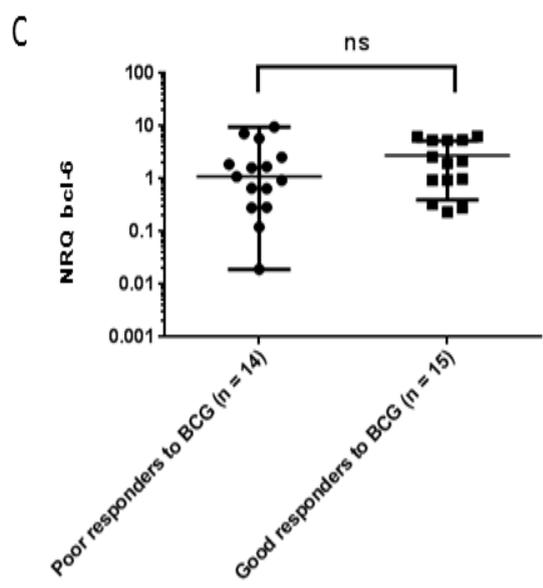
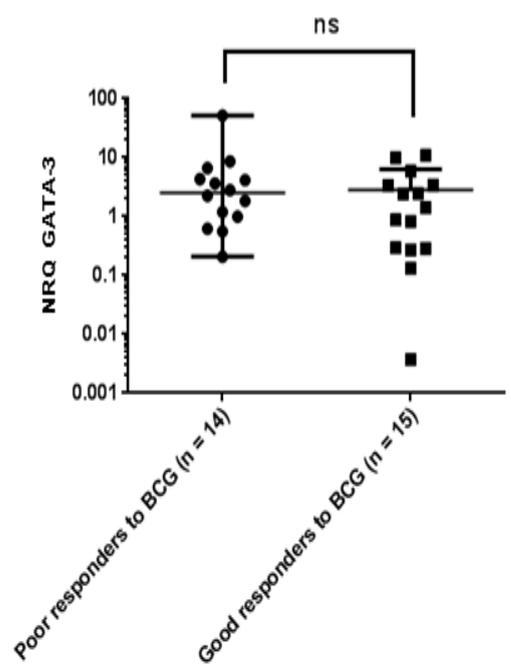
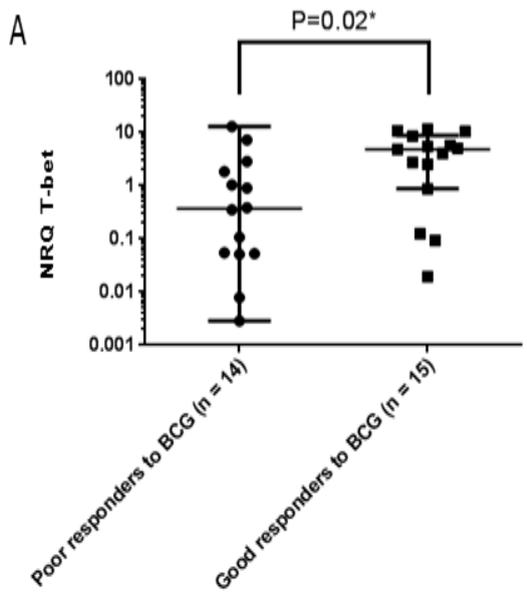


Figure 6

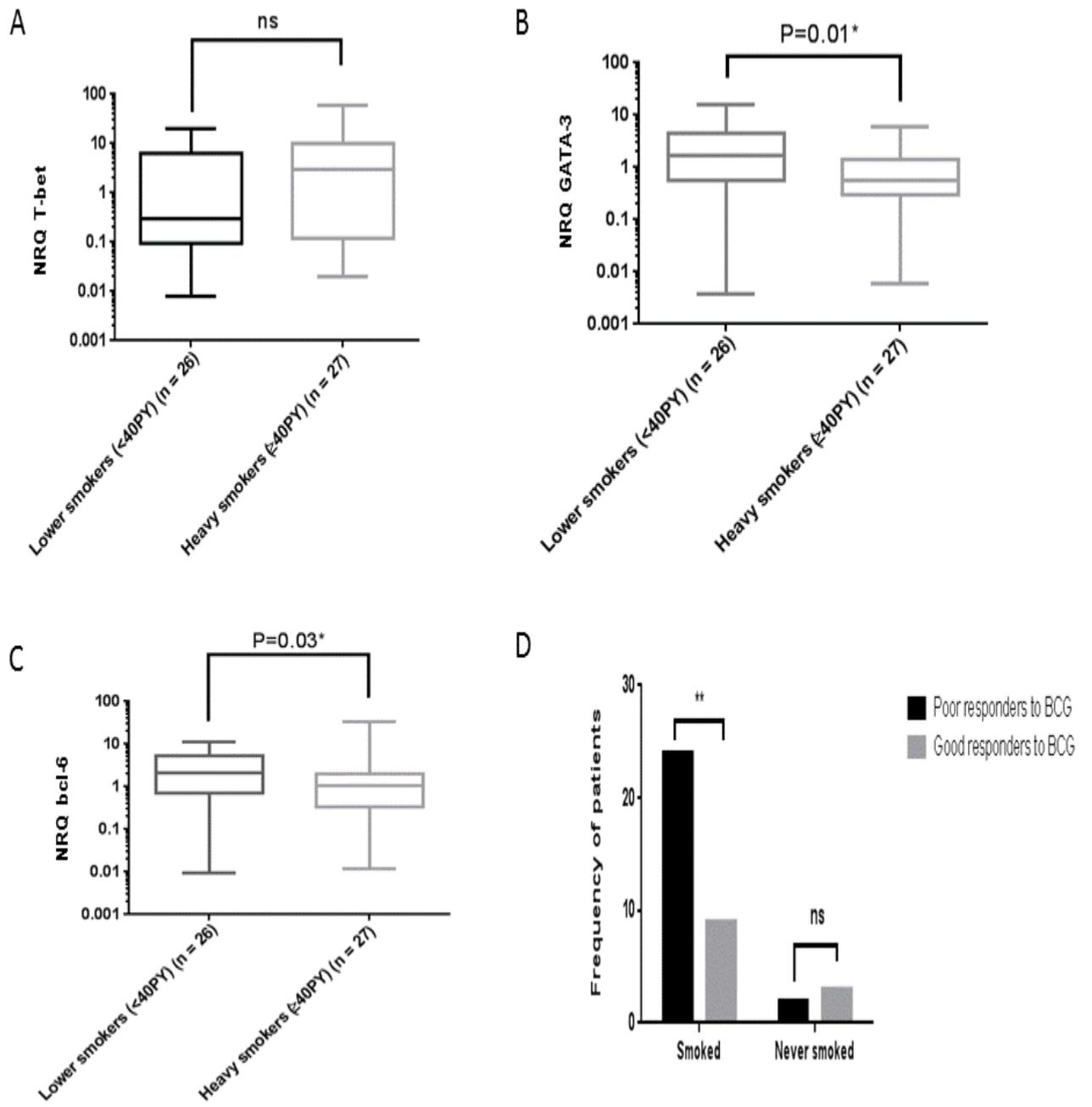


Figure 7

## **C-Valeur pronostique de FasL et TRAIL solubles et chez les patients atteints de cancer de la vessie**

### **I-Introduction**

Le carcinome urothélial est la tumeur de la vessie la plus courante, responsable de 90 à 95 % de tous les cancers de la vessie, il est classé en 2 catégories :

Les tumeurs superficielles (pta, pt1 et CIS), représentant 70 à 80% des tumeurs primaires, n'envahissent pas le muscle et caractérisées par l'importance des récurrences. La forme superficielle est de bon pronostic puisqu'il est traitable par une simple résection transurétrale et par l'immunothérapie « la BCG thérapie », cependant certains malades résistent à ce traitement et sont des mauvais répondeurs d'où la récurrence et la progression de la maladie.

Les tumeurs invasives (pt2, pt3 et pt4), représentant 20 à 30% des tumeurs primaires, envahissent le muscle et/ou les organes voisins, caractérisées par l'agressivité de la maladie et l'inefficacité du traitement d'où le mauvais pronostic.

La recherche des biomarqueurs immunologiques nous permet de mieux comprendre les résistances aux traitements basés sur l'immunothérapie notamment, la BCG thérapie. Pour ce faire, nous avons étudié deux molécules de la famille de TNF, impliquées dans l'immunité anti-tumorale, FasL et TRAIL.

L'activation de la voie Fas/FasL et TRAIL/DR4-DR5 déclenche l'apoptose des cellules cancéreuses. Les formes solubles de FasL (sFasL) et de TRAIL (sTRAIL) semblent protéger la cellule de l'apoptose, ainsi, leur rôle dans le développement des cancers n'est pas bien compris.

Notre objectif était d'évaluer le taux de sFasL et sTRAIL dans le sérum des malades atteints du cancer de la vessie, et leur corrélation avec les différents stades et grades clinicopathologiques, ainsi que de déterminer la possibilité de les utiliser comme des marqueurs prédictifs.

Cette étude a impliqué 64 malades atteints du cancer de la vessie vs 72 sujets sains non atteints des maladies cancéreuses, non apparentés aux malades et appariés selon le sexe, l'âge, et l'origine géographique. In vivo, le dosage de (sFasL) et (sTRAIL) dans le sérum a été réalisé par ELISA afin de déterminer le taux de (sFasL) et (sTRAIL) chez les malades ainsi que chez les sujets sains.

In vitro, la cytotoxicité cellulaire a été mesurée par un test MTS. L'expression de ces deux protéines et de leurs récepteurs a été réalisée par Western blot.

## **II-Résultats**

### **II-1 Dosage sFasL et sTRAIL dans le sérum**

In vivo, le dosage de sFasL et sTRAIL a confirmé la présence de ces deux cytokines dans le sérum des malades et des sujets sains. Nous avons montré que le taux de sFasL est plus élevé chez les malades par rapport aux sujets sains ( $P= 0.0016$ ) (Figure 1B, Tableau 2). De plus, la comparaison entre le taux de sFasL dans le sérum des sujets sains par rapport aux différents stades et grades histologiques de la tumeur, a montré que FasL soluble est plus élevé chez les malades à stade superficiel et de bas et moyen grade par rapport aux sujets sains (Figure 2A). Cependant, il n'existe pas des corrélations significatives entre le taux de sFasL chez les malades à stade invasif et chez les sujets sains.

Par ailleurs, le taux de sTRAIL ne varie pas entre les malades et les sujets sains (Figure 1A, 1B, Tableau 2). S'il n'existe pas de différences significatives entre le taux de sTRAIL chez les malades comparés aux sujets sains, par contre des différences significatives entre le taux de sTRAIL existent entre les malades à stade invasif et de haut grade et les sujets sains. Notre étude a montré en effet une faible concentration chez les malades à stade invasif et de haut grade par rapport aux sujets sains (Figure 2C). De plus, aucune différence significative entre le taux de sTRAIL chez les malades avec récurrences et sans récurrences (Figure 3F) n'est observée.

Le taux de sTRAIL est plus important que le taux de sFasL chez le groupe des malades et des sujets sains ( $P<0.0001$ ) (Figure 1C). La comparaison des malades en fonction de la classification clinico-pathologique du cancer de la vessie montre que le taux de sFasL et sTRAIL est plus élevé chez les malades à stade superficiel et de bas et moyen grade que chez les malades à stade invasif et de haut grade (Figure 3A, 3B, 3D et 3E, Tableau 2). Cependant, aucune différence significative entre le taux de sFasL et sTRAIL et la récurrence de la maladie n'est montrée (Figure 3C, 3F).

Nous avons aussi montré que l'augmentation de taux sérique de sFasL a été corrélée avec la survie des malades ( $P= 0.03$ ) (Figure. 5A). Cependant, aucune corrélation entre le taux de sTRAIL et le taux de survie n'a été observée ( $P= 0.11$ ) (Figure.5B).

Nous avons également montré que les bons répondeurs au BCG présentaient des taux plus élevés de sTRAIL que chez les mauvais répondeurs (Figure 5D) ( $P = 0.006$ ), cependant, il n'existe pas de corrélation entre le taux de sFasL et la réponse au BCG (Figure 5C) ( $P = 0.50$ ).

## **II-2 Effet cytotoxique de sFasL et sTRAIL dans le sérum sur lignées cellulaires du cancer de la vessie**

Nous avons tout d'abord confirmé par Western blot que deux lignées cellulaires de cancer de la vessie une à bas grade « RT112 » et l'autre à haut grade « J82 », expriment FasL, TRAIL et leurs récepteurs Fas, DR4, DR5 respectivement (Figure 4A).

In vitro, le test de la cytotoxicité de neuf échantillons de sérum sur ces deux lignées cellulaires, en présence ou en absence de deux anticorps antagonistes anti Fas et anti TRAIL, a montré que nos neuf échantillons de sérum induisent tous la mort de deux lignées cellulaires avec un degré de cytotoxicité variant entre 35 et 70% par rapport aux cellules non traitées (Figure 4B, 4C).

L'incubation de nos deux lignées cellulaires avec le sérum des malades après un prétraitement avec un antagoniste de Fas « ZB4 » et un antagoniste de TRAIL « Fc-TRAIL-R2 » entraîne l'inhibition de la mort cellulaire chez les deux lignées (Figure 4B, 4C). Le sérum de malade numéro 7 est le seul cas pour lequel nous n'avons pas obtenu une viabilité cellulaire.

## **III-Conclusion**

Ces données suggèrent que l'augmentation de l'activation de taux de sFasL et sTRAIL dans le sérum peut être associée au bon pronostic chez les malades atteints du cancer de la vessie dans la population tunisienne.

A travers ces résultats in vitro, « sFasL et sTRAIL dans le sérum des malades sont capables d'induire la mort de deux lignées cellulaires de cancer de la vessie », nous arrivons à confirmer les résultats obtenus in vivo, sFasL et sTRAIL circulants dans le sérum des malades atteints du cancer de la vessie sont inversement corrélés à l'agressivité de la maladie dans la population tunisienne.

Nous concluons suite à cette étude que chez la population tunisienne, ces corrélations permettent la recherche des bio-marqueurs solubles dans le sérum des malades (sFasL et sTRAIL) et qui jouent un rôle déterminant dans le pronostic du cancer de la vessie, d'où l'intérêt de leur utilisation par les cliniciens pour le meilleur choix de traitement.

## **ARTICLE 2**

# **Prognostic value of soluble FasL and TRAIL in patients with bladder cancer**

**Islem Ben Bahria-Sediki**, Mohamed Chebil, Carla Sampaio, Véronique Martel-Frchet, Mohamed Cherif, Rachida Zermani, Soumaya Rammeh, Amel Ben Ammar Gaaied, Ali Bettaieb.

**Article soumis dans Journal of Translational Medicine, Novembre 2015**

## **Prognostic value of soluble FasL and TRAIL in patients with bladder cancer**

Islem Ben Bahria-Sediki<sup>1,2,3</sup>, Mohamed Chebil<sup>4</sup>, Carla Sampaio<sup>1,2</sup>, Véronique Martel-Frchet<sup>5</sup>, Mohamed Cherif<sup>4</sup>, Rachida Zermani<sup>4</sup>, Soumaya Rammeh<sup>4</sup>, Amel Ben Ammar Gaied<sup>3,6</sup>, Ali Bettaieb<sup>1,2,6</sup>.

<sup>1</sup> EPHE, Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, Paris, F-75014, France ; <sup>2</sup>EA 7269, Université de Bourgogne, Dijon, F-21079, Dijon, France ; <sup>3</sup>Laboratoire de Génétique, Immunologie et Pathologies Humaines, Faculté de Sciences Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunisia ; <sup>4</sup>Hôpital Charles Nicolle de Tunis, Tunisia ; Unité INSERM/UJF U823, Equipe 5, Centre de recherche Albert Bonniot, Grenoble.

Running title: sFasL and sTRAIL significance in bladder cancer

Keywords: Bladder carcinomas, FasL, TRAIL, prognosis.

Financial support: This study was supported by the “Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche” of Tunisia (to Ben Bahria-Sediki); the “Fonds européen de développement régional (FEDER)” n°: 2013-0431SGO003S03654 and 2014-9201AAO049S02145 (to Sampaio ), the “Région de Bourgogne” (to Ben bahria-Sediki, Sampaio, Bettaieb).

<sup>6</sup>Corresponding authors :

Ali Bettaieb

Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des cancers, EPHE

EA 7269, Université de Bourgogne

UFR de Santé, 7 boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon, France

E-mail : ali.bettaieb@u-bourgogne.fr

Tel : (+33) 3 80 39 34 51

Fax : (+33) 3 80 39 34 34

[Disclosure of potential conflicts of interest:](#)

[No potential conflicts of interest were disclosed.](#)

## **Abstract**

**Background:** Activation of Fas/FasL and TRAIL/DR4-DR5 pathways in cancer cells triggers apoptosis. Soluble FasL and TRAIL are implicated in the protection from FasL or TRAIL-mediated apoptosis. However, the function of these soluble ligands in bladder cancer has not been studied in Tunisian patients suffering from this cancer. The objective of this study was to investigate the prognostic value of sFasL and sTRAIL in the serum of patients with bladder cancer.

**Methods:** The levels of soluble FasL (sFasL) and soluble TRAIL (sTRAIL) in the serum of 64 patients with bladder cancer and 72 healthy donors were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay. Cytotoxicity of sFasL and sTRAIL was examined using the microculture tetrazolium viability assay. Death receptor protein expression was analyzed by Western blot.

**Results:** The mean serum level of sFasL was higher in patients than in normal donors, whereas no difference was seen between sTRAIL from patients and controls. However, this statement must be nuanced according to the stage of the cancer. sFasL was only higher than in sera of healthy donors where patients had superficial stage or low- and medium-grade cancer, or no recurrence. No difference exists between controls and patients with invasive stage, high-grade or recurrent cancer. sTRAIL was significantly lower in sera from patients with invasive and high-grade bladder carcinoma than in controls but there were no statistical differences between controls and patients with superficial stage, low- and medium-grade cancer or no recurrence. The serum levels of sFasL and sTRAIL in patients with superficial non-invasive bladder tumors (Tis, Ta, and T1) or low- and medium-grade cancers was higher than for invasive carcinomas (T2-T4) and high-grade cancers. In addition, sFasL and sTRAIL from several patients exhibited cytotoxic effects on two established bladder cancer cell lines.

**Conclusion:** The data suggest that elevated levels of bioactive sFasL and sTRAIL in the serum might be associated with a good prognosis in patients of the Tunisian population with bladder cancer.

## Background

Bladder cancer is the ninth most common malignancy worldwide, with the highest incidence rates in Western countries [1]. It presents the second most common cause of death among genitourinary tumors, just behind prostate cancer [2]. Various risk factors have been associated with urothelial cancers, such as industrial carcinogens, cigarette smoking and male gender [3].

Tumor types of the urothelium include transitional cell carcinoma (TCC), squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma, as well as other infrequent lesions [4]. Eighty percent of TCC, the most common bladder cancer, occurs as a superficial cancer that is localized to the urothelium (stage Ta) or the lamina propria, (stage Pt1). In ~ 20% of cases, a muscle invasive tumor is seen, at stages Pt2-Pt4, which have a poor prognosis.

The most effective therapy against superficial bladder cancer is intra-vesicle instillations with Bacillus Calmette Guérin (BCG) [1, 5]. However, some recurrence and progression occurs after this therapy, which renders the response to BCG unpredictable. Hence, it is necessary to pinpoint reliable predictive biomarkers that could identify elevated risk groups of treatment failure for a specific therapy. As BCG is seen as the most effective immunotherapy agent for bladder cancer, the search for biomarkers related to the immune system could be of interest. Molecules belonging to the tumor necrosis factor (TNF) super family, such as the Fas ligand (FasL, CD178) and TNF-related-apoptosis-inducing ligand (TRAIL), which are involved in antitumor immunity [6], could represent good candidates as biomarkers for tumor recurrence and aggressiveness. Indeed, expression of these death receptor ligands in a variety of malignant cells and their circulating soluble forms are considered as mechanisms of immune escape [7]. Receptors of the nerve growth factor receptor super family such as TRAIL-R1/R2 (DR4, DR5) and Fas (APO-1, CD95) can induce an apoptotic signal after binding their specific ligands TRAIL and FasL, respectively [8].

Both FasL and TRAIL exist in two forms, a plasma membrane-bound form and a soluble form. These are generated by alternative mRNA splicing events [9, 10], or by metalloprotease-dependent cleavage [11, 12]. Both the membrane-associated and soluble forms of these ligands induce apoptosis. However, the soluble form has been reported to be a weak inducer of apoptosis compared to the membrane-bound form [13].

In this paper, we have evaluated the levels of serum circulating FasL (sFasL) and TRAIL (sTRAIL) of Tunisian patients with different stages and grades of bladder cancer, to determine their possible clinical use as markers to predict the prognosis and response to adjuvant therapy. The choice of this sample is related to the incidence of bladder cancer in Tunisia, it being the second cause of cancer in the Tunisian male. It is more common than prostate cancer, in contrast to the situation encountered in other populations.

## **Methods**

### **Patients and samples**

A total of 64 patients with bladder carcinoma, before surgery or therapy, were the subject of this study. Informed consent was obtained from all patients before enrolment in the study. This study is in agreement with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Tunis Pasteur Institute. Histological diagnosis revealed that all patients had transitional cell carcinoma of the bladder. Histopathological grading and staging were performed according to the WHO and TNM classification, respectively. Patient characteristics are presented in [Table 1](#).

Peripheral blood was obtained from the 64 patients as well as from 72 healthy donors. All blood samples were centrifuged at 4000 rpm for 20 min after blood clotting. Sera were collected and conserved at -80°C until use. The number of sera used for the determination of sFasL and sTRAIL depended on the patients' characteristics that are outlined in Table 1.

### **Cell culture**

The human RT112 and J82 bladder carcinoma cell lines were purchased from the American Tissue Culture Collection (Manassas, VA). Cells were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere, in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco BRL, Eriny, France) and 2 mmol/L L-glutamine. Cells were routinely detached with 0.125% trypsin, 0.1% ethylene-diamine-tetraacetate (EDTA) and washed once in the culture medium before treatment. Cultures were regularly checked and found to be free from mycoplasma contamination.

## **Measurements of sFasL and sTRAIL**

The serum levels of sFasL and sTRAIL were determined using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits purchased from Diaclone Research (Besancon, France) according to the manufacturer's instructions. The standard curve was prepared using serial dilutions of recombinant FasL (2000 to 62.50 pg/ml) and TRAIL (3000 to 93.75 pg/ml). Briefly, 100 µl of 2-fold diluted serum samples were added to microtiter plates already coated with an antibody directed against FasL or TRAIL, and incubated for 2 h at room temperature. Then wells were washed three times and incubated with 50 µl of biotinylated antibody for 1 h at room temperature. After three more washes, wells were incubated for 30 min at room temperature with 100 µl of Streptavidin-HRP, washed three times and incubated in the dark for 15-20 min with 100 µl of TMB Substrate solution. The reaction was stopped by adding 100 µl of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Peroxidase activity was determined by measuring the OD at 450 nm using a Micro-ELISA reader.

## **Immunoblot analysis**

Cells ( $3 \times 10^5$  per mL of culture) were washed twice with cold PBS and boiled in buffer (1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mmol/L sodium-orthovanadate, 10 mmol/L Tris pH 7.4) in the presence of a cocktail of protease inhibitors (Roche) for 15 min at 4°C. After centrifugation at 10 000 rpm for 15 min at 4°C, lysates were harvested and the protein concentration was measured using a Bio-Rad DC protein assay kit. Samples containing 30 µg of protein were incubated in loading buffer (125 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol blue), separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted onto nitrocellulose membrane (BioRad). After blocking non-specific binding sites for 1 h with 5% non-fat milk in 0.1% Tween 20 in PBS (TPBS), the membrane was incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Abs): anti-FasL, anti-TRAIL (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France), anti-Fas, anti-DR4 and anti-DR5 (Millipore, France) or anti-GAPDH (Santa Cruz, CA).

After three washes in TPBS, the membrane was incubated with secondary antibodies as appropriate for 2 h at room temperature, and then washed three times in TPBS. Immunoblots were detected by chemidoc.

### **Cell cytotoxicity assay**

J82 and RT112 cells ( $2 \times 10^4$ ) were seeded into a 96-well plate for 24 h, and treated with or without patient's sera (dilution: 1:10), in the presence or absence of the Fas antagonistic monoclonal antibody ZB4 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or the TRAIL antagonist Fc-TRAIL-R2. After 24 h incubation, cell toxicity was determined with the tetrazolium-based (MTS) assay as recommended by the manufacturers. Assays were performed in triplicate.

### **Statistical analysis**

GraphPad Prism version 6 was used for data plotting and statistical analysis. Correlation analysis was performed to determine possible associations between different parameters. The nonparametric Mann-Whitney U test was used for statistical evaluation of the differences between two independent groups. One-way Anova test was used to compare the mean of three or more groups. Survival time was analyzed using Kaplan–Meier curves. Overall survival (OS) was also compared using the log-rank and the Gehan–Wilcoxon tests. Differences were considered statistically significant for  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **Serum levels of sFasL and sTRAIL in healthy individuals and patients with bladder carcinoma**

The serum levels of sFasL and sTRAIL in samples from healthy donors and patients with bladder carcinoma were evaluated by ELISA. While the mean serum level of sTRAIL in healthy donors and in patients did not differ significantly (Figure 1A, Table 2), the level of sFasL was significantly higher in patients with bladder carcinoma than in controls ( $p = 0.0016$ ) but this increase remained modest (Figure 1B, Table 2). Of note, circulating sTRAIL was higher than sFasL both in controls and in patients (Figure 1C). When we compared the serum levels of sFasL and sTRAIL of healthy donors with patients at different histological stages and grades of bladder carcinoma, we found that sFasL was significantly higher than in sera of healthy donors in the sera of patients with superficial stage, low- and medium-grade cancer and patients without recurrence (Figure 2A, 2B). However, no significant differences exist between controls and patients with invasive stage or high grade cancer, or recurrence (Figure 2A, 2B). In contrast, the level of sTRAIL was significantly lower in sera from patients with invasive and high-grade bladder carcinoma than in controls, but there were no statistical differences between controls and patients with other profiles (Figure 2C, 2D).

### **Correlation of sFasL serum levels and histological stage and grade of bladder carcinoma**

The serum level of sFasL was determined in bladder carcinoma as a function of the TNM histological stage of the disease. In superficial non-invasive bladder tumors (Tis, Ta, and T1), the level of sFasL was significantly higher ( $p < 0.01$ ) than in invasive carcinomas (T2-T4) (Figure 3A, Table 2). The sFasL serum level in patients with low- and medium-grade carcinomas was significantly higher than that in patients with high-grade cancers (Figure 3B, Table 2). There were no statistical differences with regard to patients with or without recurrence (Figure 3C).

### **Correlation of sTRAIL serum levels with histological stage and grade of bladder carcinoma**

We also determined whether a correlation exists between the serum levels of sTRAIL and the histological stage and grade of bladder carcinoma. Similarly, to sFasL, the levels of sTRAIL in serum were significantly higher in patients with non-invasive than with invasive bladder carcinoma (Figure 3D, Table 2). The sTRAIL serum level in patients with low- and medium-grade carcinomas was significantly higher than that in patients with high-grade carcinoma (Figure 3E, Table 2). There was no statistical difference with regard to the analysis of patients with or without recurrence (Figure 3F).

### **Analysis of cytotoxic effects of sFasL and sTRAIL on cell lines established from human bladder carcinomas**

To determine whether sFasL and sTRAIL are cytotoxic, nine sera from patients with bladder carcinoma were tested for their ability to induce cell death in 2 cell lines established from human bladder carcinomas, RT112 and J82, in the presence or absence of Fas and TRAIL antagonists. We showed that both cell lines expressed Fas, FasL, DR4, DR5 and TRAIL, as evaluated by Western blot (Figure 4A). Almost all sera induced cell death in both RT112 (Figure 4B) and J82 cells (Figure 4C) cell lines. The degree of cytotoxicity ranged between 35 to 70% compared to untreated cells. Co-incubation of sera with the Fas antagonistic monoclonal antibody ZB4 (Figure 4B, 4C) or the TRAIL antagonist Fc-TRAIL-R2 (Figure 4C) inhibited sera-mediated cell death. Of note, in one patient (# 7), the antagonists seemed to enhance cell death compared to the other sera. These results indicated that sFasL and sTRAIL in sera from patients with bladder carcinomas were bioactive, namely able to induce cell death in bladder cancer cell lines.

### **Survival analysis**

The OS of our cohort of patients with bladder carcinoma was determined according to serum level, we analyzed sFasL and sTRAIL serum levels in relation to OS of patients with bladder cancer.

Low serum level of sFasL was associated with a better OS rate ( $p = 0.03$ ) (Figure 5A). However, no correlation was found between sTRAIL serum level and patient survival ( $p = 0.11$ ) (Figure 5B).

### **The prognostic value of sFasL and sTRAIL in the response to BCG treatment**

We further compared the serum level of the two soluble ligands, sFasL and sTRAIL to treatment with BCG, in good or poor BCG responders. ELISA analysis showed that there is no significant difference between the patient response to BCG and the expression of sFasL ( $p = 0.50$ ) (Figure 5C), whereas the serum level of sTRAIL is higher among patients who respond well to BCG as compared to non-responders ( $p = 0.006$ ) (Figure 5D). These results suggest that sTRAIL might be a predictor of the response to BCG therapy in patients with bladder cancer.

Altogether, our data indicated an inverse correlation between the circulating sFasL and sTRAIL and the aggressiveness of bladder carcinoma in a cohort of Tunisian patients.

## **Discussion**

This study is the first to analyze the serum levels of soluble FasL and TRAIL and their correlation with bladder cancer tumor stage and grade in African populations.

We found that high sFasL levels were present in the serum of Tunisian patients with bladder cancer, compared to normal individuals. In contrast, no significant difference was found for sTRAIL between normal donors and patients. Furthermore, high levels of the two cytokines were observed in patients with an early stage or low grades of the disease, compared to the late stage and high-grades. Our results seem to be rather different to previous reports. Mizutani and colleagues demonstrated that the level of serum FasL correlated with both bladder carcinoma disease progression and an increase in tumour grade [14]. This discordance could be related to ethno-geographical differences (North African vs Asian) or to different procedures used for cytokine measurement. Thus, the uniformity of such methodologies could greatly improve research in this area. For TRAIL, even though previous studies have evaluated the serum level of TRAIL in bladder cancer, here we found significantly higher urinary TRAIL levels in BCG-responsive patients than in non-responders, demonstrating the role of TRAIL as an effector molecule predictive marker of the response to BCG immunotherapy [15]. Since FasL and TRAIL are potent transducers of apoptotic signals in Fas and TRAIL-R-expressing cells, the level of these cytokines may be critical for the success of BCG treatment, or may be indicative of the magnitude or efficiency of the immune response. Our results corroborate prior results and conclusions, since FasL and TRAIL levels are higher in patients with early stages and low-grades of the disease. Although, the mechanisms involved in FasL and TRAIL release are not known, one can speculate that sustained immune system activation in patients with bladder carcinoma is at the origin of the increase of these cytokines.

When certain immune cells such as neutrophils are stimulated with drugs or BCG, they are able to kill cancer cells, including bladder carcinoma, in a TRAIL or FasL-dependent manner [15,17]. Our study also

found that sFasL and sTRAIL in patient sera are bioactive and induce death of bladder cancer cells. These findings suggest that the elevation of sFasL and TRAIL levels might be reflective of the decrease of disease aggressiveness and tumor progression. Recently, Pyevandi et al, reported that FasL deficiency impairs tumor immunity by promoting an accumulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells, supporting the pro-apoptotic role of FasL [18]. It was reported that sFasL, sTRAIL and their transmembrane forms can transduce apoptotic signals in cancer cells. However, the soluble forms are weak inducers of apoptosis, and compete with membrane ligands for cell killing [13,19]. Nevertheless, it is known that aggregated form of FasL, such as that cross-linked with antibodies, recovers its cytotoxic potential [20]. Recently, it was reported that sFasL from Bronchio-alveolar washing fluids can induce cell death. The biological activity of FasL is due to its structure. Indeed, the sFasL from patients was found to be bioactive and present as high molecular weight multimers and aggregates [21]. Daburon et al, also reported that a chimeric soluble FasL in its oligomerized form is cytotoxic and displays antitumor activity [22]. We can hypothesise that, in our case, sFasL and sTRAIL from sera of patients with bladder carcinomas could exist in aggregated forms, explaining their cytotoxic effects. They would consequently dampen down tumor progression and aggressiveness.

## **Conclusions**

In conclusion, sFasL and sTRAIL levels can be considered as prognostic markers in bladder cancer and these compounds could be very useful for the clinician making his choice of treatment, as well as for patient follow-up.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Authors' contributions**

AB, ABG, IBS conceived the study and interpretation of results; IBS carried out the study; CS and VF participated in analyses of results; IBS, MC, MS, RZ, SR participated in blood and tissue collection and tumor pathological characterisation; IBS, AB, ABG participated in data interpretation and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

**Acknowledgments:** We thank Mourad Sediki for help in statistical analyses and Dr. Olivier Micheau, UMR 866 Inserm-uB, Dijon, France, for useful discussions and comments about the manuscript.

### **References**

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 69-90.

2. Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, et al. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol.* 2003; 20: 327-36.
3. Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA. The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol.* 2004; 21: 392-401.
4. Simoneau AR, Jones PA. Bladder cancer: the molecular progression to invasive disease. *World J Urol.* 1994; 12: 89-95.
5. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, Van Rhijn BW, Compérat E, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol.* 2013; 64: 639-53.
6. Davidson WF, Giese T, Fredrickson TN. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med.* 1998; 187: 1825-38.
7. Whiteside TL. The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment. *Immunol Invest.* 2007; 36: 25-46.
8. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997; 88: 355-65.
9. Kamachi M, Aramaki T, Tanimura S, Ichinose K, Fujikawa K, Iwamoto N, et al. Activation of protein phosphatase causes alternative splicing of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): potential effect on immune surveillance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 360: 280-5.
10. Liu C, Cheng J, Mountz JD. Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation. *Biochem J.* 1995; 310: 957-63.
11. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med.* 1995; 182: 1777-83.
12. Kawakubo T, Okamoto K, Iwata J, Shin M, Okamoto Y, Yasukochi A, et al. Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface. *Cancer Res.* 2007; 67: 10869-78.
13. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* 1997; 186: 2045-50.
14. Mizutani Y, Yoshida O, Bonavida B. Prognostic significance of soluble Fas in the serum of patients with bladder cancer *J Urol.* 1998; 160: 1215.

15. Ludwig AT, Moore JM, Luo Y, Chen X, Saltgaver NA, O'Donnell MA, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for Bacillus Calmette-Guérin-induced antitumor activity. *Cancer Res.* 2004; 64: 3386-90.
16. Jinesh G G, Chundururu S, Kamat AM. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF- $\alpha$  but not through TRAIL and FasL. *J Leukoc Biol.* 2012; 92: 233-44.
17. Chiu HY, Sun GH, Chen SY, Wang HH, Ho MY, Chu CY, et al. Pre-existing Fas ligand (FasL) in cancer cells elicits tumor-specific protective immunity, but delayed induction of FasL expression after inoculation facilitates tumor formation. *Mol Carcinog.* 2013; 52: 705-14.
18. Peyvandi S, Buart S, Samah B, Vétizou M, Zhang Y, Durrieu L, et al. Fas Ligand Deficiency Impairs Tumor Immunity by promoting an Accumulation of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 2015; 75: 4292-301.
19. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998; 187: 1205-13.
20. Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 1428-40.
21. Herrero R, Kajikawa O, Matute-Bello G, Wang Y, Hagimoto N, Mongovin S, et al. The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. *J Clin Invest.* 2011; 121: 1174-90.
22. Daburon S, Devaud C, Costet P, Morello A, Garrigue-Antar L, Maillason M, et al. Functional characterization of a chimeric soluble Fas ligand polymer with in vivo anti-tumor activity. *PLoS One.* 2013; doi:10.1371/s0054000.

## Figure legends

## Figure 1

Serum sFasL and sTRAIL concentrations in patients with bladder carcinomas and in healthy donors. Serum levels were quantified by ELISA. 2-fold diluted serum samples were added to microtiter plates already coated with an antibody directed against FasL or TRAIL and incubated as recommended by the manufacturers. Optic density was measured by micro-ELISA reader. The concentrations of soluble ligands were calculated using a standard curve. n: number of individuals; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

### **Figure 2**

Comparison of sFasL and sTRAIL levels in healthy donors with patients according to stage and grade bladder carcinoma. Serum levels of sFasL and sTRAIL in patients with bladder carcinoma and in healthy donors were quantified by ELISA as recommended by the manufacturers. \*,  $P < 0.05$  \*\*,  $P < 0.01$ .

### **Figure 3**

Correlation of sFasL and sTRAIL levels in patients according to stage and grade bladder carcinoma. Serum levels of sFasL and sTRAIL in patients with bladder carcinoma were quantified by ELISA as recommended by the manufacturers. \*,  $P < 0.01$ .

### **Figure 4**

Cytotoxicity analyses of sFasL and sTRAIL on two human bladder carcinoma cell lines. **(A)** For Fas/FasL and DR4/DR5/TRAIL protein expression, RT112 and J82 cells were lysed and 50  $\mu\text{g}$  proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blot as described in materials and Methods. Protein expression of death receptors and their ligands were detected using specific monoclonal antibodies. GAPDH expression was used as protein loading control. **(B, C)** For the cytotoxic potential of soluble sFasL and sTRAIL, RT112 and J82 cells ( $2 \times 10^4$ ) were seeded on a microtiter plate for 24 h after which cells were treated with patients sera for 24 h before measurement of cell survival by MTS. Results are representative of two independent experiments performed in triplicate.

### **Figure 5**

Kaplan–Meir plots for overall survival (OS) for sFasL and sTRAIL serum level in patients with primary bladder cancer. Stratified survival curves for patients by serum level evaluated by ELISA. (A) Survival of patients with low and high sFasL serum level  $*P=0.03$ . (B) Survival of patients with low and high sTRAIL serum level  $P=0.11$ .

Correlation of sFasL and sTRAIL serum level with response to BCG therapy. (C) Statistical analyses of sFasL serum level for poor and good responders to BCG  $P=0.50$ . (D) Statistical analyses of sTRAIL serum level for poor and good responders to BCG  $** P=0.006$ .

**Table 1:** Serum sFasL and sTRAIL level according to histologic stage and grade of bladder cancer patients

Characteristics		Levels of serum sFasL (ng/ml) (Mean $\pm$ SD)	Levels of serum sTRAIL (ng/ml) (Mean $\pm$ SD)
Histologic stage	Superficial (non invasive) (Ta, T1, TIS)	(n = 43) 0.775 $\pm$ 0.24	(n = 40) 2.094 $\pm$ 0.77
	Invasive (T2-T4)	(n = 18) 0.662 $\pm$ 0.12	(n = 19) 1.726 $\pm$ 1.02
Histologic grade	Low-grade (GI)	(n = 34) 0.785 $\pm$ 0.26	(n = 33) 2.148 $\pm$ 0.75
	Meduim-grade (GII)	(n = 5) 0.724 $\pm$ 0.13	(n = 4) 1.728 $\pm$ 0.25
	High-grade (GIII)	(n = 22) 0.689 $\pm$ 0.15	(n = 22) 1.761 $\pm$ 1.04
Bladder cancer recurrence	With recurrence	(n = 19) 0.763 $\pm$ 0.28	(n = 18) 1.883 $\pm$ 0.85
	Without recurrence	(n = 45) 0.719 $\pm$ 0.19	(n = 44) 1.996 $\pm$ 0.87

n: number of samples; sFasL: soluble Fas ligand; sTRAIL: soluble TRAIL; Mean: mean serum range; SD, standard deviation.

**Table 2:** Serum sFasL and sTRAIL levels in patients with Bladder carcinoma and in Healthy Donors

Serum	Level of serum sFasL (ng/ml) (Mean $\pm$ SD)	Level of serum sTRAIL (ng/ml) (Mean $\pm$ SD)
Normal donors	(n = 52) 0.61 $\pm$ 0.21	(n = 71) 2.11 $\pm$ 0.85
Patients with bladder carcinoma	(n = 64) 0.75 $\pm$ 0.22	(n = 62) 1.94 $\pm$ 0.86

n: number of samples; sFasL: soluble Fas ligand; sTRAIL: soluble TRAIL; Mean: mean serum range; SD, standard deviation

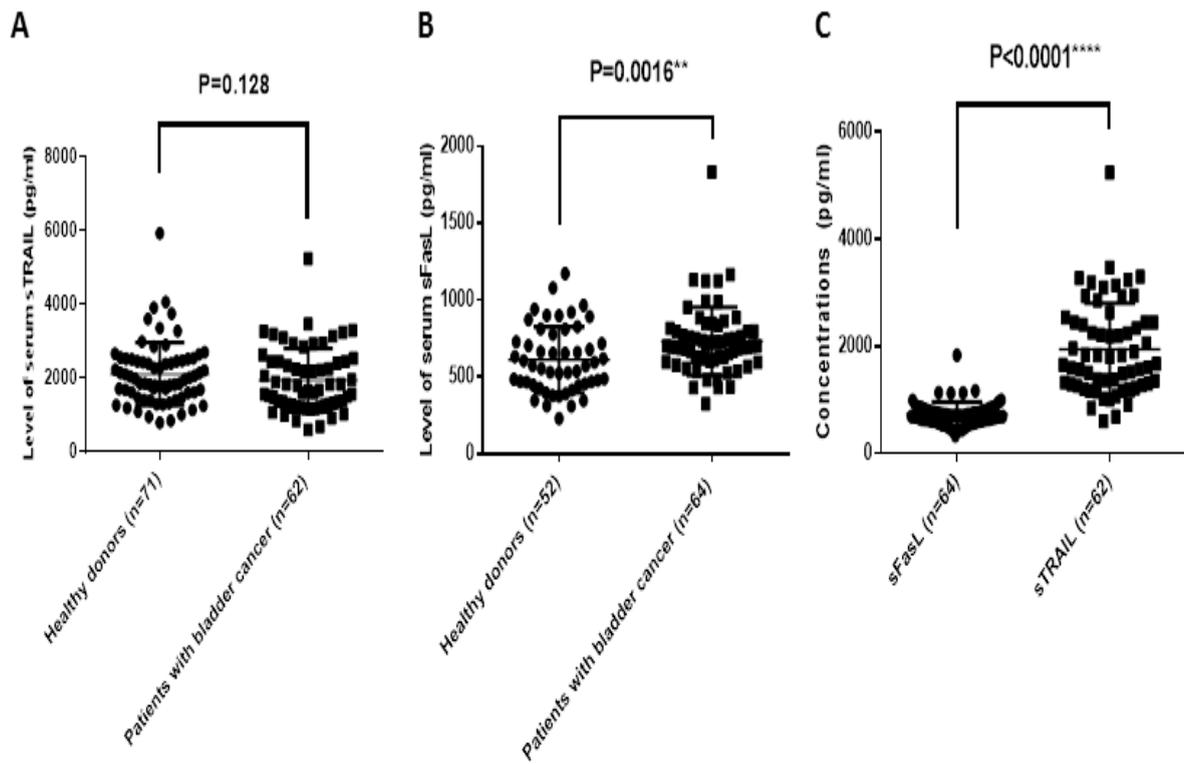
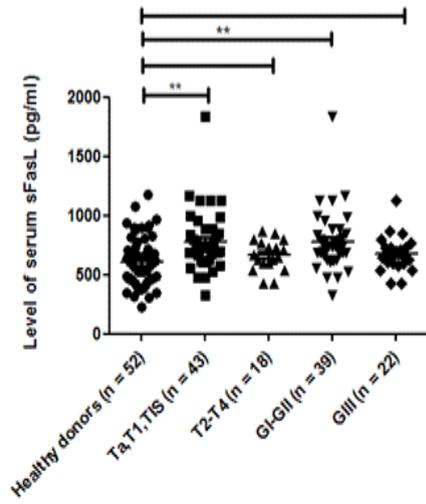


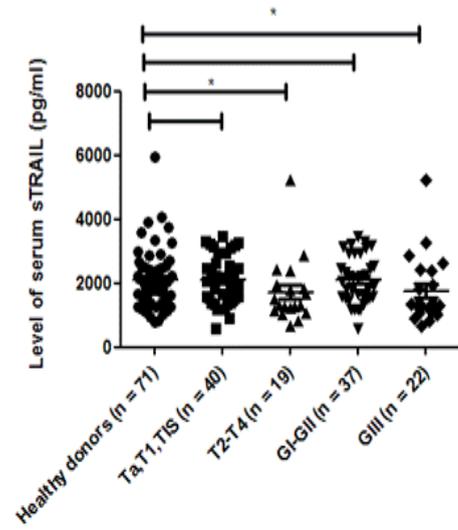
Figure 1



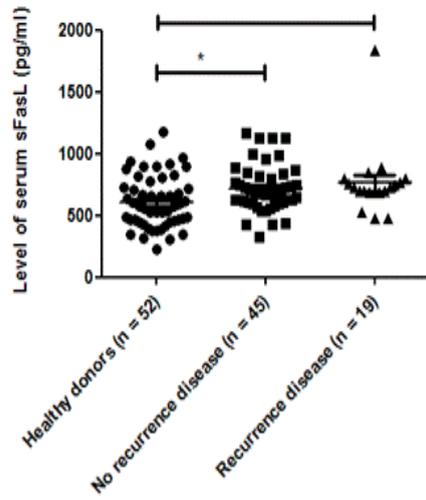
A



C



B



D

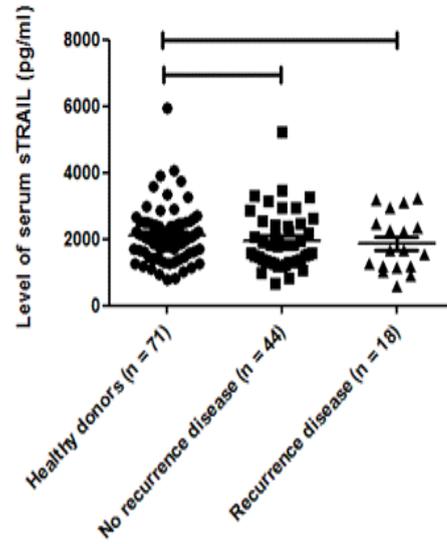
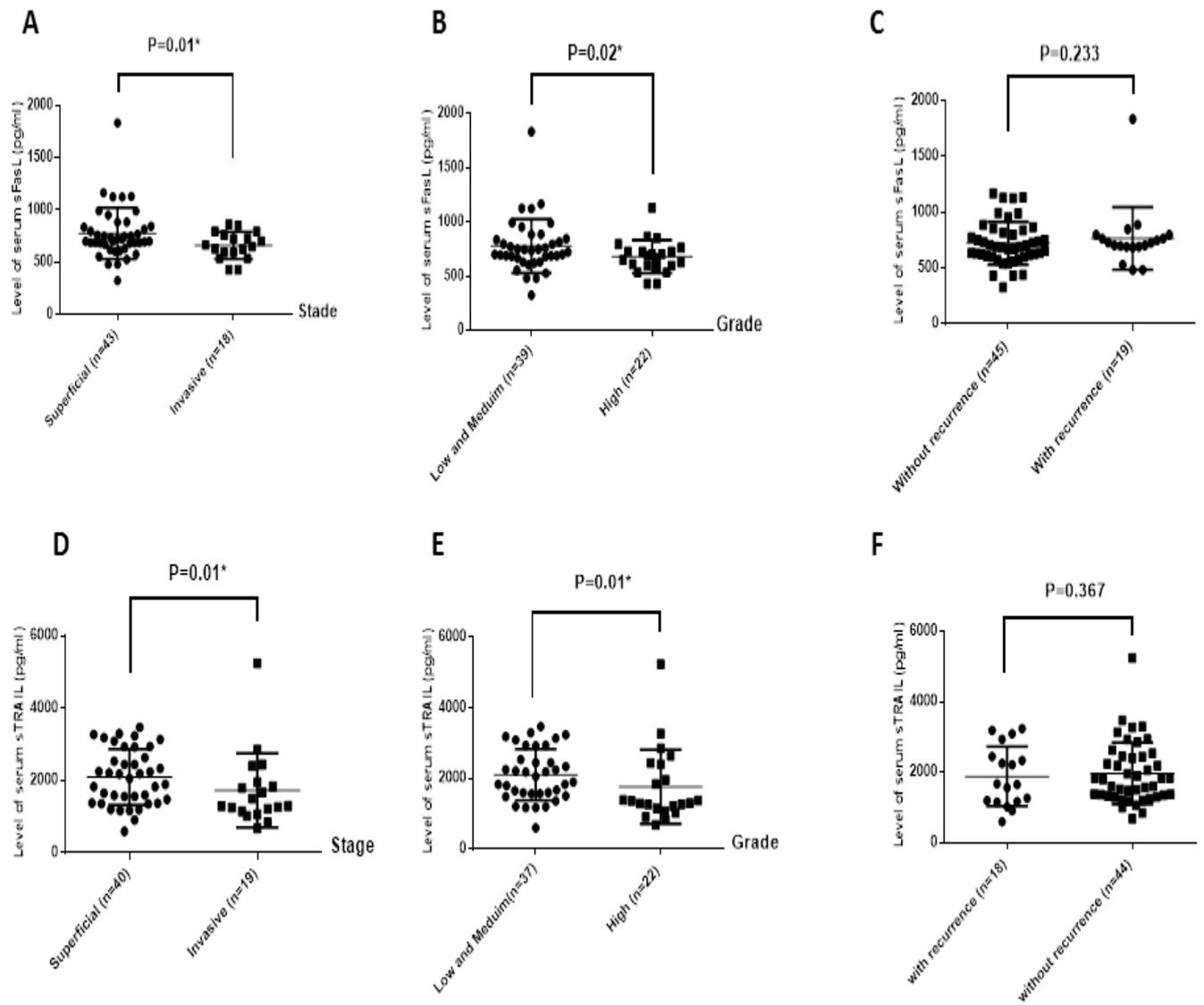


Figure 2



**Figure 3**

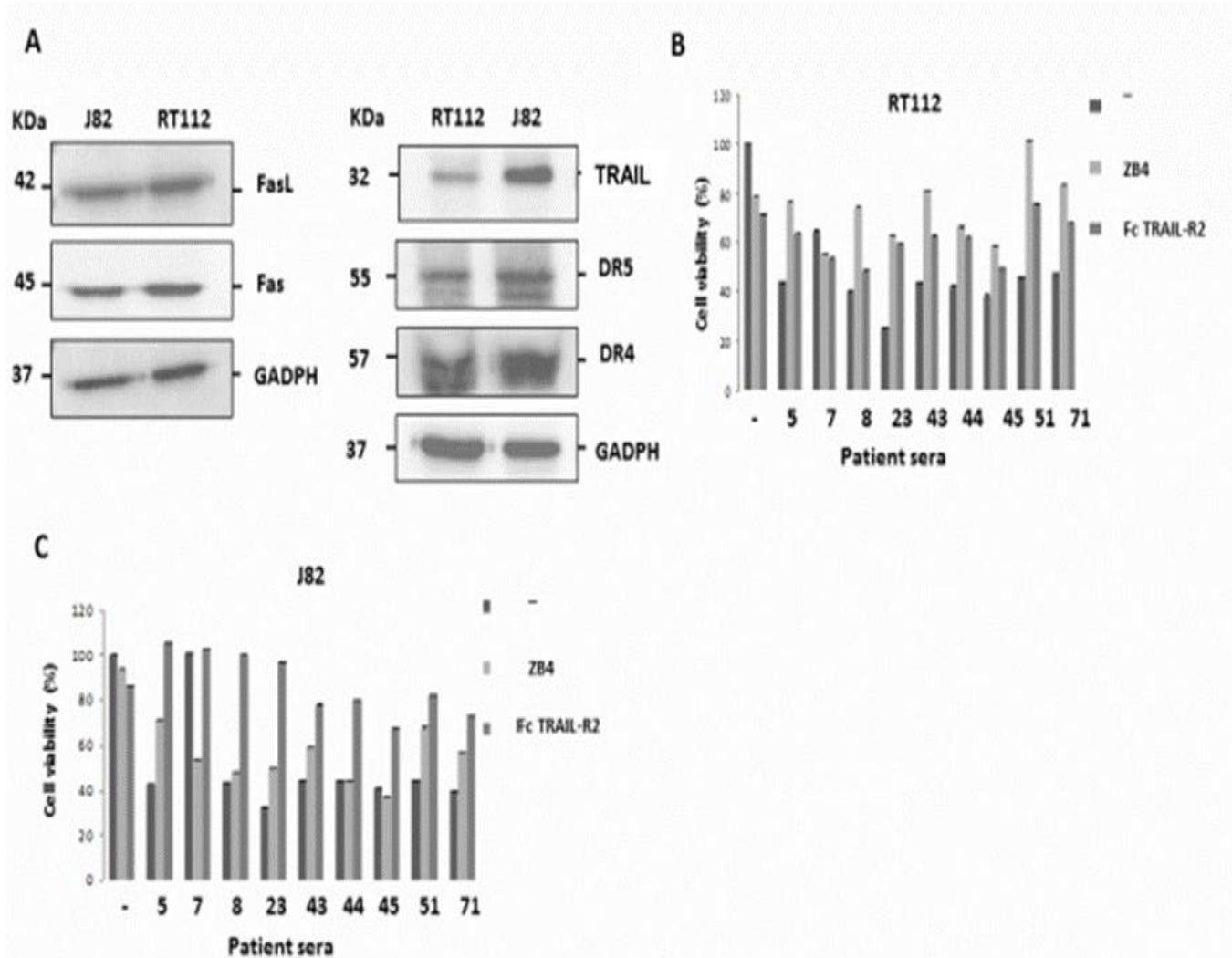
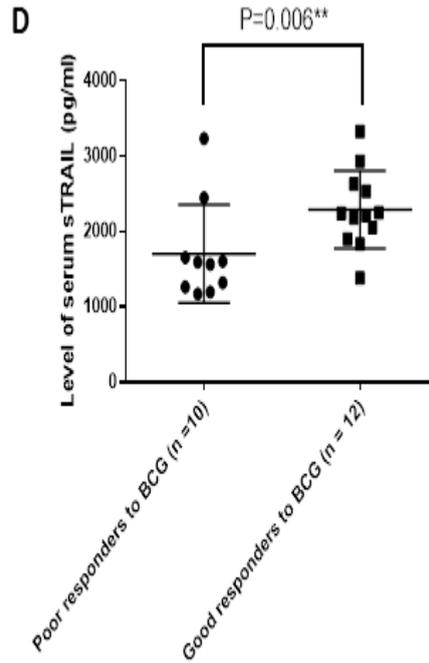
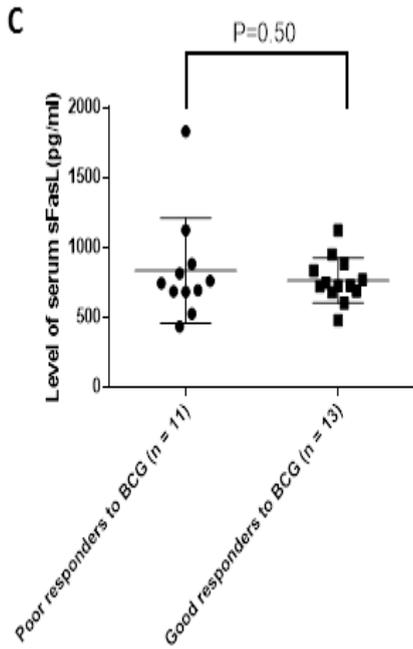
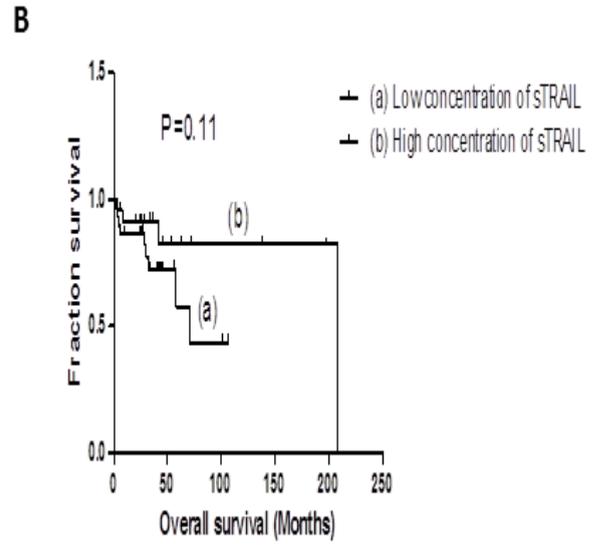
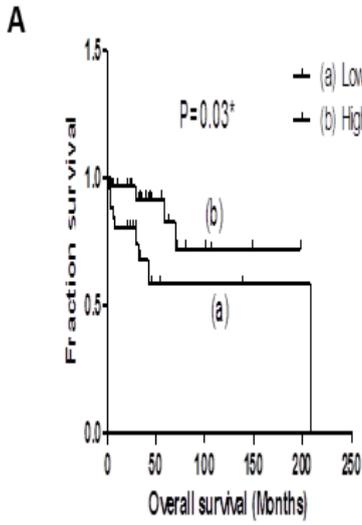


Figure 4



**Figure 5**

## **D- L'activation d'Akt est corrélée avec l'agressivité de la tumeur chez des patients tunisiens avec cancer de la vessie**

### **I-Introduction**

Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués dans l'initiation et la progression tumorale du cancer de la vessie, notamment la surexpression des oncogènes comme H-ras et FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) ou la sous-expression des gènes suppresseurs de la tumeur comme P53, *phosphatase and tensin homologue (PTEN)* and *retinoblastoma (Rb1)*. Parmi les voies de signalisations mises en jeu dans la carcinogenèse vésicale, on note la voie de signalisation PI3K/Akt qui est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de l'angiogenèse et elle est fréquemment dérégulée dans de nombreux cancers.

La voie PI3K/Akt est une voie de signalisation intracellulaire composée de différentes kinases activées en cascade. Une dérégulation des protéines constituant cette voie sont décrites dans plusieurs types de cancers, notamment dans les voies de la carcinogenèse des tumeurs vésicales. Leur étude pourrait révéler des nouveaux marqueurs pronostiques et apporter de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les travaux de la dernière partie de cette thèse portent sur l'étude de l'expression de la protéine kinase Akt phosphorylée sur la sérine 473 dans les tumeurs vésicales, Nous nous sommes proposé de faire une mise au point sur l'activation d'Akt dans les tumeurs vésicales et leur rôle potentiel comme marqueurs de pronostic en cancérologie.

72 biopsies tissulaires tumorales de cancer de la vessie et 7 biopsies tissulaires saines sont lysées dans du tampon de lyse adéquat associé à des inhibiteurs de phosphatases et à des inhibiteurs de protéases afin d'obtenir des protéines phosphorylées tissulaires et cellulaires totales. L'analyse de l'expression protéique se fait par immuno-empreinte ou western blot pour détecter l'expression des protéines Akt totale et Akt sous sa forme phosphorylée « p-Akt ».

## II-Résultats

L'analyse quantitative de l'expression de p-Akt sur 72 biopsies tumorales et 7 biopsies saines adjacentes prélevées des malades tunisiens, a montré que l'expression de p-Akt était plus élevée dans les tumeurs que dans les tissus sains adjacents. L'expression de p-Akt était significativement plus élevée dans les tissus tumoraux (Mean =  $1.32 \pm 0.68$ ) ( $P < 0.0001$ ) comparés aux tissus sains adjacents (Mean =  $0.44 \pm 0.009$ ) (Figure 1c).

Le taux de p-Akt varie selon les différents stades et grades anatomopathologique de la maladie ainsi que la survie globale des patients et la réponse au BCG. En effet, nous avons montré que 93% des tumeurs primaires présentent une expression élevée de p-Akt (Figure 1b).

L'expression élevée de p-Akt est corrélée avec le stade infiltrant, le haut grade, la mauvaise réponse au BCG et une diminution de taux de survie globale chez les patients. Le tabac n'est pas corrélé à l'activation d'Akt cependant il était un facteur de risque de récurrence de la maladie dans notre population. Ces données suggèrent que la phosphorylation d'Akt, est corrélée à la progression et à l'agressivité de la maladie.

L'étude de corrélation de l'expression quantitative de p-Akt avec les différents paramètres cliniques et épidémiologiques des patients, nous a permis de conclure plusieurs associations significatives. L'expression de p-Akt a été corrélée avec le stade infiltrant et avec le haut grade ( $P < 0.0001$ ) et ( $P < 0.0001$ ) respectivement, (Figure. 2a, 2b). On a pu confirmer ces résultats in vitro sur deux lignées cellulaires de cancer de la vessie une à bas grade « RT112 » et l'autre à haut grade « J82 », la lignée de haut grade exprime beaucoup plus la protéine Akt sous sa forme phosphorylée que la lignée de bas grade (Figure. 2c). Ces résultats in vivo confirmés par des données in vitro, nous a permis de conclure que p-Akt joue un rôle dans l'agressivité de la maladie.

L'utilisation d'un inhibiteur d'Akt « le triciribine » afin de sensibiliser les cellules cancéreuses « RT112 » et « J82 » à la chimiothérapie de routine du cancer de la vessie « la cisplatine » n'a pas montré un effet combiné du double traitement. En effet, il n'y avait pas des différences significatives entre le traitement avec cisplatine seul ou associé au triciribine (Figure. 2d).

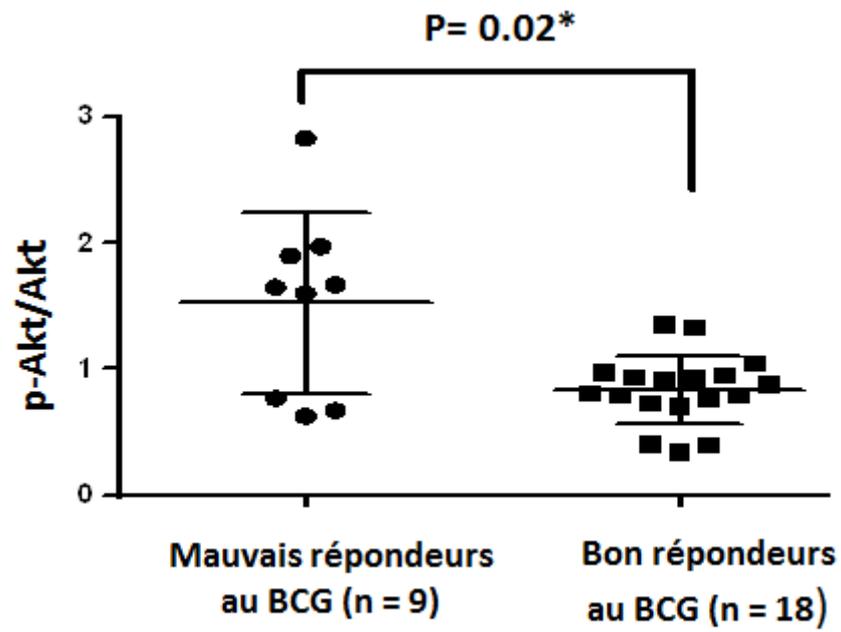
Les corrélations de l'expression de p-Akt avec la récurrence, la progression, la survie globale des malades et la réponse au BCG montrent que l'expression de p-Akt n'a pas été associée avec la récurrence de la maladie (Figure. 3b), cependant, une forte expression de p-Akt est associée à la progression de la maladie (P= 0.0005) (Figure. 3a), un faible taux survie (P= 0.03) (Figure 3c), et une mauvaise réponse au BCG (P= 0.02) (Figure 22).

L'expression de p-Akt a été analysée en considérant la consommation de tabac, et nous n'avons pas trouvé des différences significatives de l'expression de p-Akt ni entre les non-fumeurs et les fumeurs (Figure. 4a), ni entre les fumeurs selon l'intensité du tabac.

Cependant, on a pu montrer que le tabac est associé à la récurrence de la maladie, en effet, 66% de non-fumeurs ne récidivent pas contre 72% des fumeurs récidivent, le tabac semble être un facteur de récurrence de la maladie (Figure. 4b). En revanche, chez les malades qui ont une histoire de récurrence, l'expression de p-Akt ne montre pas de différences significatives entre les non-fumeurs et les fumeurs (Figure. 4d), cependant chez les malades qui n'ont pas une histoire de récurrence, l'expression de p-Akt est plus importante chez les non-fumeurs (P= 0.01) (Figure. 4c).

### **III-Conclusion**

L'activation d'Akt a été bien corrélée avec l'agressivité et la progression du cancer de la vessie d'un part, la diminution de la survie des malades et la mauvaise réponse au BCG d'autre part. On peut conclure que l'activation d'Akt peut être utilisée comme un marqueur prédictif dans le cancer de la vessie dans la population tunisienne. Aussi bien, le tabac est un facteur de risque de cancer de la vessie dans la population tunisienne, il augmente les chances de récurrence de la maladie.



**Figure 22** : Corrélation l'expression de p-Akt et la réponse au BCG.

## **ARTICLE 3**

# **Akt activation correlates with tumor aggressiveness in Tunisian patients with bladder cancer**

**Islem Ben Bahria-Sediki**, Carla Sampaio, Mohamed Chebil, Mohamed Cherif, Rachida Zermani, Soumaya Rammeh, Amel Ben Ammar Gaied, Ali Bettaieb

**Article accepté dans Tumor Biology, 23 Décembre 2015**



# Akt activation correlates with the tumor aggressiveness in Tunisian patients with bladder cancer

Islem Ben Bahria-Sediki<sup>1,2,3</sup> · Carla Sampaio<sup>1,2</sup> · Mohamed Chebil<sup>4</sup> ·  
Mohamed Cherif<sup>4</sup> · Rachida Zermani<sup>4</sup> · Soumaya Rammeh<sup>4</sup> ·  
Amel Ben Ammar El Gaaied<sup>3</sup> · Ali Bettaieb<sup>1,2</sup>

Received: 4 November 2015 / Accepted: 16 December 2015  
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2015

**Abstract** Various studies in western countries found Akt amplification to be a frequent event in human cancers, including bladder, but the correlation with clinicopathological features is controversial. Such studies have not been reported in African populations, including Tunisians. The purpose of this study was to assess expression of the phosphorylated/activated forms of Akt in tumors from Tunisian patients with bladder cancer and to correlate its expression with pathological and clinical parameters of the disease. The study included 72 patients of whom 34 were diagnosed as low- to medium-grade and 35 as high-grade; 30 were muscle stage and 39 non-muscle stage. Primary tumors from these patients, normal adjacent tissues, or bladder cancer cell-lines were analyzed for Ser473 phosphorylated Akt expression by Western blot. Seventy-two percent of primary tumors from patients with bladder cancer had increased levels of p-Akt. The p-Akt levels in patients with high-grade bladder cancer were significantly elevated compared to patients with low- or medium-grade bladder cancer. In invasive carcinoma, the p-Akt level was significantly higher than in superficial non-invasive bladder tumors. Concerning the influence of tobacco on Akt

activation, no significant differences of p-Akt expression were found between non-smoker and smoker patients. Altogether, our results suggest that Akt activation can provide useful prognostic information and that tobacco represents a serious risk factor for recurrence in a cohort of Tunisian patients.

**Keywords** Bladder carcinoma · Akt · Tobacco · Prognosis

## Introduction

Bladder cancer is the second cause of cancer in the Tunisian male. It is more common than prostate cancer, in contrast to the situation encountered in other populations. Bladder cancer is the sixth most common malignancy in Western countries [1] and represents the second most common cause of death among genitourinary tumors, just behind prostate cancer [2]. Tobacco smoking is the most important risk factor [1].

Urothelial cell carcinomas (UCC) represent more than 90 % of bladder tumors and are classified into superficial (Tis, pTa and pT1) and muscle-invasive (T2, T3, or T4) stages. Mostly low-grade, these tumors frequently recur but may, rarely, progress into muscle-invasive tumors [3].

Many molecular mechanisms contribute to tumor initiation and progression of bladder cancer, including gain-of-function mutations in oncogenes, e.g., *H-ras* and *fibroblast growth factor receptor (FGFR)*, or loss-of-function mutations of tumor suppressor genes, e.g., *p53*, *phosphatase and tensin homologue (PTEN)* and *retinoblastoma (Rb1)*. To a lesser extent, Pi3K/Akt signaling pathway alteration is also involved in the pathogenesis of bladder cancer [4].

Akt, also known as protein kinase B (PKB), is a serine/threonine specific protein kinase that plays a crucial function in multiple cellular processes such as glucose metabolism, intracellular signaling pathways associated with cell survival,

✉ Amel Ben Ammar El Gaaied  
amel.benammarelgaaiied@gmail.com

✉ Ali Bettaieb  
ali.bettaieb@u-bourgogne.fr

<sup>1</sup> EPHE, Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, Paris F-75014, France

<sup>2</sup> EA 7269, Université de Bourgogne, Dijon, F-21079 Dijon, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Génétique, Immunologie et Pathologies Humaines, Faculté de Sciences Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

<sup>4</sup> Hôpital Charles Nicolle de Tunis, Tunis, Tunisia

apoptosis, transcription, and proliferation [5]. This kinase exists as three different isoforms: Akt-1, 2, and 3. Although structurally homologous, these differ in the phosphorylation sites required for their activation. Akt activity is regulated by the phosphorylation of serine 473 (Ser473) and threonine 308 (Thr308) [6]. During its activation, Akt is recruited to the plasma membrane where it binds to the PI3K catalyzed products, PI(3, 4, 5), P3 and PI(3,4) P2 exposing both Thr308 and Ser473 residues, which in turn can be phosphorylated by 3-phosphoinositide dependent kinase (PDK1) and the mammalian target of rapamycin complex-2 (mTORC2), respectively. This double phosphorylation results in full activation of Akt [7]. Once Akt is phosphorylated and activated, it phosphorylates many other downstream proteins such as mTOR, GSK3, and IRS-1 [8], thereby playing a key role in multiple cellular processes such as glucose metabolism, apoptosis, cell proliferation, transcription, cell migration, and therapeutic resistance [6]. Many studies suggest that the activation of Akt signaling occurs in numerous human cancers, including gastric adenocarcinomas, breast, ovarian, prostate, pancreatic, and bladder cancers [9–11]. These results support the role of Akt as a potential therapeutic target. Indeed, blocking Akt activation, e.g., by perifosine leads to decreased cell growth and migration of cancer cells [10–13].

Molecular markers such as Ki-67, p53, and the matrix metallo-proteinase complex have been reported to have prognostic significance in bladder cancer and angiogenesis [14]. Recently, it was shown that the Pi3K/Akt/ mTOR pathway correlates with tumor progression and reduced survival in urothelial bladder carcinoma [15]. The aim of our study was to assess the prognostic value of the phosphorylated form of Akt in tumors from bladder cancer patients in Tunisia, bladder cancer being the second cause of cancer in the Tunisian male.

## Materials and methods

### Patients and samples

A total of 72 patients with bladder carcinoma for whom transurethral resection tissue before any treatment was available were followed up in the Urology Department of the Charles Nicolle Hospital (Tunis, Tunisia). Frozen tumor samples but not paraffin blocks were available for this study. Informed consent was obtained from all patients before enrolment in the study. This study is in agreement with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Tunis Pasteur Institute. All patients were from the North of Tunisia, 90.27 % of them were men and 9.72 % were women, and the mean age at diagnosis was  $66.06 \pm 11.04$  years. These patients were also classified according to their tobacco status. The smoker category included current

smokers who smoked daily. The intensity of tobacco use (PY) was defined as the amount of tobacco consumed during the life of patients (1 PY = 7300 cigarettes smoked during 1 year). It was found that 80.55 % (58/72) of patients were current smokers, and 13.88 % (10/72) were non-tobacco consumers (Table 1). Histopathological grading and staging were performed according to the WHO and TNM classification, respectively (Table 1).

### Reagents

Phospho-Akt (Ser473) and Akt polyclonal antibodies were from Cell Signaling Technology. Antibodies against  $\beta$ -actin and GAPDH were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

### Cell culture

The human RT112 and J82 bladder cancer cell lines were purchased from the American Tissue Culture Collection (Manassas, VA). Cells were grown in RPMI supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) (Gibco BRL, Eriny, France) and 2 mmol/L L-glutamine at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. Cells were routinely detached with 0.125 % trypsin and 0.1 % ethylenediamine tetra-acetate (EDTA) and washed once in the culture medium before treatment. Cultures

**Table 1** Characteristics of TCC tumor samples and patients information

Mean age (years)	Range	41–94
Gender	Male	65 (90.27 %)
	Female	7 (9.72 %)
Tumor grade	GI (low grade)	24 (33.33 %)
	GII (medium grade)	10 (13.88 %)
	GIII (high grade)	35 (48.61 %)
	Unknown	3 (4.16 %)
Tumor stage	Superficial pTa, pT1, TIS	39 (54.16 %)
	Infiltrant $\geq$ pT2	30 (41.66 %)
	Unknown	3 (4.16 %)
Smoking history	Current smoker	58 (80.55 %)
	Never smoked	10 (13.88 %)
	Unknown	4 (5.55 %)
Patients	With recurrence	39 (54.16 %)
	Without recurrence	28 (38.88 %)
	With progression	17 (34.58)
	Without progression	22 (56.41)

TCC transitional cell carcinoma

were routinely checked and found to be free from contamination with mycoplasma.

### Immunoblot analysis

Tumors or cells ( $3 \times 10^6$ ) were lysed in 1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mmol/L sodium orthovanadate, 10 mmol/L Tris pH 7.4, and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche) for 30 min at 4 °C. After centrifugation at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C, lysates were harvested and the protein concentration was measured using a Bio-Rad DC protein assay kit. Aliquots containing 30 µg of proteins were incubated in loading buffer: 125 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 10 % β-mercaptoethanol, 4.6 % SDS, 20 % glycerol, and 0.003 % bromophenol blue, separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted onto a nitrocellulose membrane (BioRad). After blocking non-specific binding sites for 1 h with 5 % non-fat milk in 0.1 % Tween 20 in PBS (TPBS), the membrane was incubated overnight at 4 °C with p-Akt, Akt, and anti-GAPDH (Santa Cruz, CA). After three washes in TPBS, the membrane was incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature and washed three times in TPBS. Immunoblots were detected by ChemiDoc.

### Cell viability assay

J82 and RT112 cells ( $2 \times 10^4$ ) were seeded into 96-well plates for 24 h and treated with or without cisplatin (5 µg/mL), in the presence or absence of the inhibitor of Akt, triciribine (10 µM). After 48 h incubation, cell viability was determined with the tetrazolium-based (MTS) assay as recommended by the manufacturers. Assays were performed in triplicate.

### Statistical analysis

Differences between mean values were assessed by a two-tailed test. The Student's two-tailed *t* test was used to determine statistical differences between clinical groups. Results were considered statistically significant only if the *p* value was less than 0.05.

We used GraphPad Prism 6.0 to calculate the odds ratio (OR) value with 95 % confidence intervals (CI). We also used the logistic regression test of GraphPad Prism 6.0 to investigate the impact of smoking and Akt activation on the development and progression of bladder cancer. Survival time was analyzed using Kaplan–Meier curves. Overall survival (OS) was also compared using the log-rank and the Gehan–Wilcoxon tests.

## Results

### Expression of Akt and its phosphorylated form (pAkt) in normal urothelium and in urothelial tumors

Expression patterns of p-Akt and Akt were monitored by Western blot. To the best of our knowledge, this technique has only been used in a very few studies to evaluate p-Akt expression in bladder cancer. Generally, immunohistochemistry is the most used for this analysis. Seventy-two tumors of various stage or grade and seven tumor-adjacent normal tissue samples were examined for Akt phosphorylation using anti-p-Akt (Ser473). Samples were simultaneously probed with anti-Akt to determine the p-Akt/Akt ratio. A representative Western blot of the Akt and p-Akt statuses in tumors and adjacent normal tissues is shown in Fig. 1a. When we compared the p-Akt and Akt ratios, we found that 93 % of primary tumors from patients with bladder cancer had high levels of p-Akt (Fig. 1b). Indeed, p-Akt was significantly higher (mean =  $1.32 \pm 0.68$ ) ( $p < 0.0001$ ) in tumor samples than normal controls (mean =  $0.44 \pm 0.009$ ) (Fig. 1b).

### Correlation of pAkt expression and histological stage and grade of bladder cancer

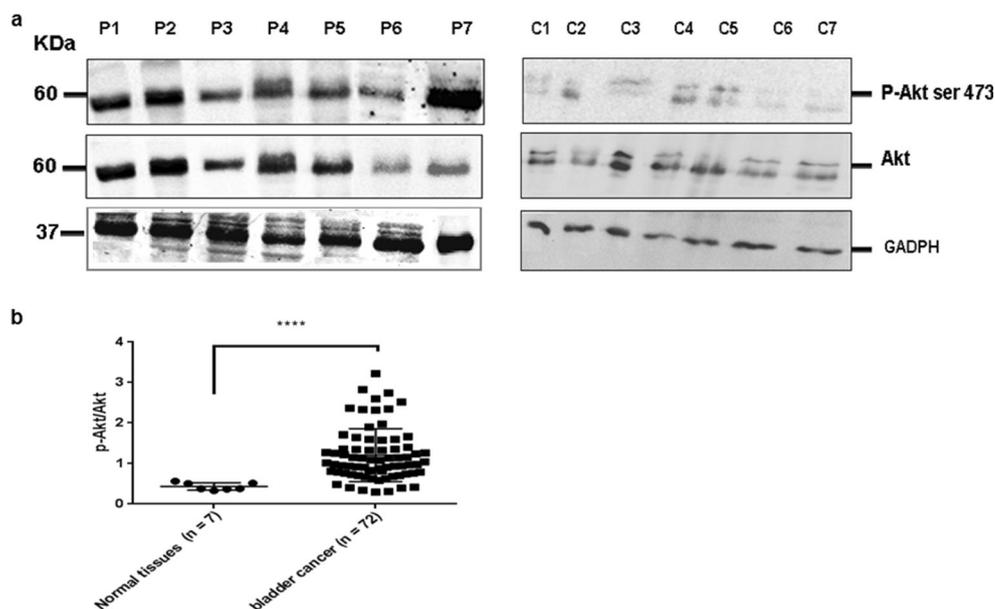
The relationship between p-Akt and its non-phosphorylated form was determined in bladder cancer as a function of the TNM histological stage of the disease. In invasive carcinoma (T2–T4), the level of the p-Akt to Akt ratio was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than in superficial non-invasive bladder tumors (Tis, Ta, and T1) (Fig. 2a). The p-Akt to Akt ratio in patients with high-grade cancer was significantly higher than that in patients with low- and medium-grade bladder cancer ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 2b). We also confirmed the increase of p-Akt level in a cell-line (J82) established from a patient with high-grade bladder cancer, as compared to cells (RT112) from patient with low-grade cancer (Fig. 2c).

We also determined whether Akt inhibition could sensitize bladder cancer cells to cisplatin, a chemotherapy used in the treatment of this disease. No significant difference in cytotoxicity was observed between cells treated with cisplatin alone or combined with the Akt inhibitor triciribine (Fig. 2d). This suggests that targeting of Akt in therapy of bladder cancer may not bring any benefit.

### Correlation of pAkt expression according to recurrence, progression, and patient survival

Progression and recurrence of the disease are two different features. A tumor may recur without a change in its grade or stage, but progression is the evolution of disease towards a more aggressive stage or grade.

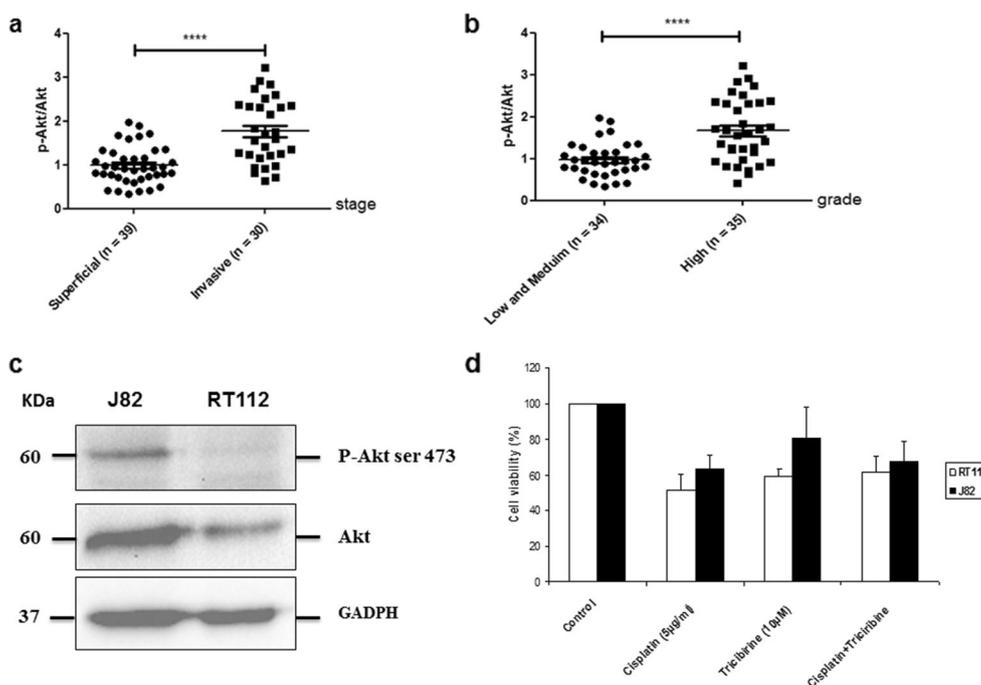
**Fig. 1** Phosphorylated Akt (p-Akt) (ser473) expression in bladder cancer and normal tissues. **a** Western blotting analysis of Akt (ser473) protein expression and Akt in seven bladder tumors (P1-7) and seven adjacent normal tissues (C1-7) from the same patients, GADPH was used as the loading control. **b** Statistical analyses of p-Akt expression between bladder tumors and normal tissues. \*\*\*\* $P < 0.0001$



We tried to verify whether p-Akt is a marker of recurrence or progression, or both. We compared the patients who recurred to those who did not. We also compared patients who had progressed to a more aggressive stage and grade after

recurrence to those patients who did not progress after recurrence.

The p-Akt to Akt ratio in bladder cancer primary tumors that displayed further progression was significantly higher



**Fig. 2** Expression of p-Akt in different clinical stages of bladder cancer. **a** Statistical analyses of p-Akt expression between superficial and invasive histological stage of bladder cancer \*\*\*\* $P < 0.0001$ . **b** Statistical analyses of p-Akt expression between low and high histological grade of bladder cancer \*\*\*\* $P < 0.0001$ . **c** Representative Western blotting analysis of p-Akt (ser473) protein expression in two-bladder cancer cell lines (RT112 and J82) with low and high grade, respectively, normalized

to GADPH. Results are representative of triplicate experiments. **d** RT112 and J82 cells ( $2 \times 10^4$ ) were seeded on a microtiter plate for 24 h after which cells were treated with cisplatin (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and/or the Akt inhibitor triciribine (10  $\mu\text{M}$ ) for 48 h before measurement of cell survival by MTS. Results are representative of two independent experiments performed in triplicate

than that of tumors without progression ( $p=0.0005$ ) (Fig. 3a). No significant differences of p-Akt expression exist between patients with complete remission and those with recurrence without progression or between those with recurrent and non-recurrent disease (Fig. 3b). Hence, we can conclude that p-Akt would be rather associated with progression but not with recurrence and that it could be a marker of aggressiveness.

Next, we analyzed the p-Akt levels in relation to OS of patients with bladder cancer. The low expression of p-Akt correlated with a significant longer OS (Fig. 3c).

### Correlation of p-Akt expression and tobacco consumption of patients with bladder cancer

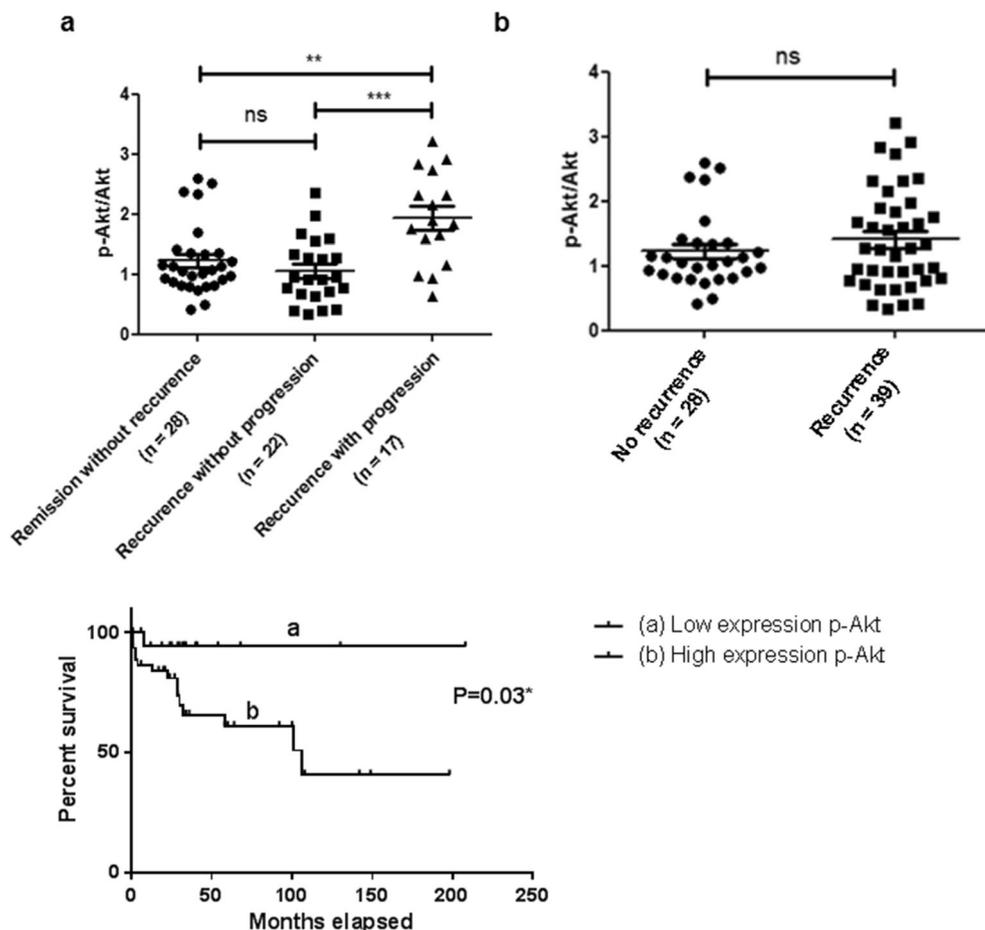
We also determined whether a correlation exists between p-Akt levels and smoking habits in patients with bladder cancer. Of note, our patient cohort included 58 smokers (80.55 %) and 10 with no smoking history. No significant difference in p-Akt expression exists between non-smokers and smokers (Fig. 4a), and no significant difference was observed regarding the intensity of tobacco use (PY) (data not shown).

It has already been shown that smoking is a risk factor for bladder cancer and according to the present results it seems to be associated with recurrence (Fig. 4b), since 66 % of patients who never smoked do not display recurrence while 72 % of smokers show recurrence of their tumor. Taking this into account, we undertook stratification of our sample according to two features: smoking and recurrence, to compare Akt activation. As is shown in Fig. 4d, tumors that underwent recurrence did not show any difference in Akt phosphorylation between smokers and non-smokers. Figure 4c indicate that tumors with no recurrence display significant differences in phosphorylated Akt levels according to the smoking status. Indeed, non-smokers showed greater activation of Akt than smokers.

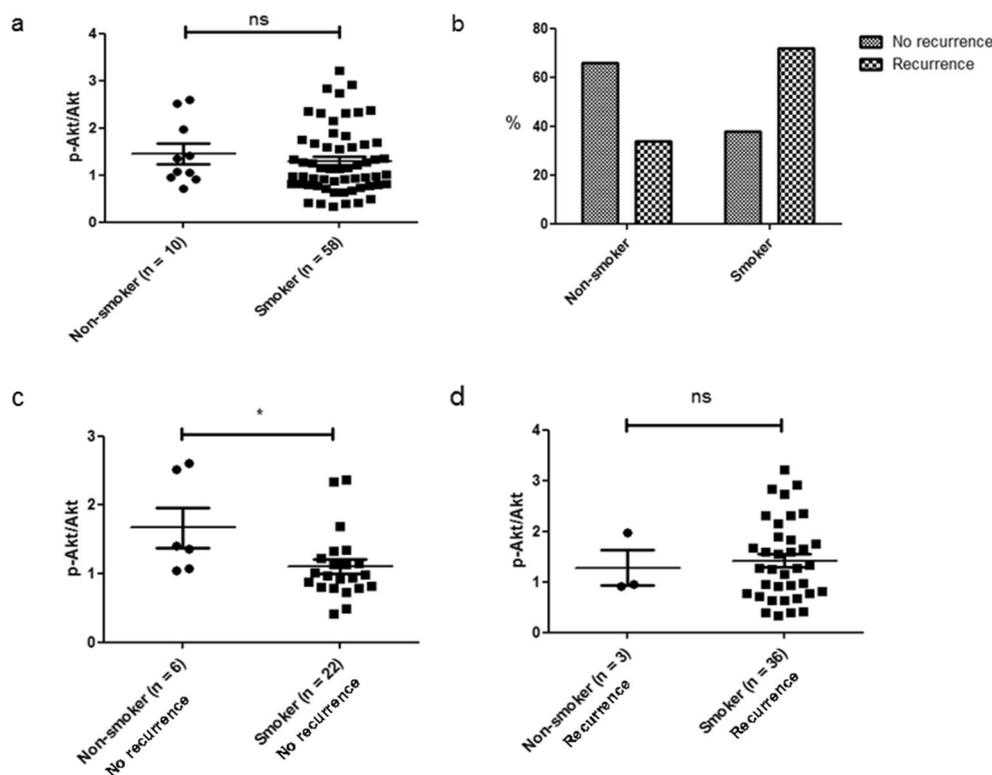
### Discussion

Investigation of the molecular pathways involved in bladder cancer progression and invasion is required to identify novel therapeutic approaches. As the PI3K/Akt pathway dysregulation has been associated with cell growth, survival, motility, invasion, and angiogenesis, leading to metastatic competence and treatment resistance [16], this pathway may merit

**Fig. 3** Overexpression of p-Akt protein in human bladder cancer associates with tumor progression. **a** Correlation of p-Akt expression according to recurrence and progression; statistical analyses of p-Akt expression between patients who had complete remission (1), patients without progression after recurrence (2), and patients with progression after recurrence (3). (1) vs (3)  $**P<0.01$  and (2) vs (3)  $**P<0.001$ . **b** Correlation of p-Akt expression according to recurrence; statistical analyses of p-Akt expression between patients with recurrence vs patients without recurrence. **c** Kaplan–Meir plots for overall survival (OS) for p-Akt expression in patients with primary bladder cancer. Survival curves for 72 patients stratified by p-Akt expression evaluated by Western blotting: (a) represents 21 patients with low p-Akt expression, (b) represents 51 patients with high p-Akt expression



**Fig. 4** Correlation of p-Akt expression and tobacco consumption of patients with bladder cancer. **a** Statistical analyses of p-Akt expression between non-smoker and smoker patients. **b** Percentage of recurrence disease according to tobacco status of patient with bladder cancer. **c, d** Statistical analyses of p-Akt expression and tobacco consumption according to recurrence disease



investigation. The present study is the first to analyze the activation status of the pro-tumorigenic Akt and its correlation with bladder tumor stage, grade, and tobacco addiction in African populations (Tunisian population). Activation of Akt requires phosphorylation at both Thr308 and Ser473 sites and phosphorylation of Ser473 appears to be critical for the regulation of Akt activity, because selective de-phosphorylation of Thr308 does not significantly affect Akt activity. This prompted us to evaluate the level of Akt phosphorylated at Ser473 in a cohort of 72 Tunisian patients with bladder cancer. We opted for the use of Western blotting as a method to evaluate p-Akt expression. This technique is rarely used in such studies. Our results demonstrated higher p-Akt levels in bladder tumors than in normal urothelium tissue. This is consistent with data published by Wu et al. demonstrating high p-Akt expression levels by Western blotting in over half of 20 primary human bladder tumors [17]. In our case, the majority of tumors (over 90 %) had high Akt phosphorylation, at a frequency superior to that observed in other studies, where Akt phosphorylation varied between 50 and 60 % [17, 18]. Either the difference could be due to the small cohort of patients included in these studies or to the technique used to measure p-Akt (immuno-histochemistry was the most used). In addition, variations bound to the ethnic group, or among the ratio of late stage and grade tumors in the samples may play a role. Indeed, our study also indicated that high levels of p-Akt were observed in patients with high-grade and late stage cancer, compared to those with low-grade or early stage of the

disease. Thus, p-Akt could be considered as a significant indicator of high risk of progression in the group of non-muscle-invasive bladder cancer. Although our findings corroborate prior results and conclusions [15], some investigations reported an inverse relationship [19] and others no relationship [9, 18, 20]. However, the overall impression gained from almost all of these studies is that Akt activation occurs over the entire spectrum of bladder cancer. Our findings underline that in addition to sustained Akt activation throughout the neoplastic process, the increase of p-Akt expression corresponded significantly with high-grade and advanced stage disease. However, no association of Akt activation with recurrence of the disease was seen.

Our study also showed no correlation between the p-Akt level and non-smoker or smoker status. Since the smoking status might be a risk factor for recurrence, our results altogether are in agreement with the fact that Akt activation is not related either to smoking or to recurrence. Interestingly, we have shown that among patients who did not show recurrence of their disease, those who never smoked expressed significantly more phosphorylated Akt than smokers. Our results suggest that another risk factor for bladder cancer would be responsible for early Akt upregulation and could be associated with the disease through a different molecular mechanism than tobacco. Further, we can speculate that tobacco could contain some molecules that could affect Akt phosphorylation. Indeed, it has been reported that a derivative of arsenic,

a cytotoxic constituent of tobacco, such as arsenic trioxide, could affect Akt activation [21].

Altogether, our results suggest that the Akt pathway may be important in the progression of some bladder tumors and that pAkt could represent a marker of the aggressiveness of bladder cancer among patients of the Tunisian population.

## Conclusions

We have demonstrated that examining the phosphorylation status of Akt by Western blotting represents an alternative method for objective quantification avoiding false positive or negative results and subjective evaluation. Using this method, we have shown successfully that pAkt (attesting to its activation) is more frequent and exhibits high expression levels in tumors of patients with primary bladder cancer. Furthermore, pAkt expression correlated with clinicopathological characteristics of the disease and can provide useful prognostic information. Our findings that need further investigation, offer a strong argument for the potential use of pAkt as a marker for superficial tumors that are at risk of progression to invasive tumors and for therapeutic targeting of Akt in bladder cancer.

**Acknowledgments** We thank Catherine Paul (Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, EA 7269, Université de Bourgogne, Dijon) for proofreading the paper. This study was supported by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" of Tunisia (Ben Bahria-Sediki); the "Fonds européen de développement régional (FEDER)" no. 2013-0431SGO003S03654 and 2014-9201AAO049S02145 (Sampaio), and the "Région de Bourgogne" (Ben bahria-Sediki, Sampaio, Beltaieb).

**Compliance with ethical standards** Informed consent was obtained from all patients before enrolment in the study. This study is in agreement with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Tunis Pasteur Institute.

## References

1. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. *Lancet*. 2009;374(59685):239–49.
2. Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, et al. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol*. 2003;20(6):327–36.
3. Harty WH. Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (tag3) ladder tumors: 15-year outcome. *J Urol*. 2000;163(1):60–2.
4. McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol Oncol: Semin Original Investig*. 2010;28(4):429–40.
5. Choa TM, Kimb WJ, Moon SK. AKT signaling is involved in fucoidan-induced inhibition of growth and migration of human bladder cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2014;64:344–52.
6. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261–74.
7. Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*. 2002;111(3):293–303.
8. Porta C, Paglino CC, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol*. 2014;4:64–74.
9. Calderaro J, Rebouissou S, Koning DL, Masmoudi A, Hérault A, Dubois T, et al. PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2014;134(8):76–1784.
10. Cheng JQ, Ruggerit B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(8):3636–41.
11. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, et al. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(19):9267–71.
12. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004;9(6):667–76.
13. Sarkar FH, Li Y. Indole-3-carbinol and prostate cancer. *J Nutr*. 2004;134(12):3493–8.
14. Kausch I, Böhle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol*. 2002;4(1):15–29.
15. Sun CH, Chang YH, Pan CC. Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Histopathology*. 2011;58(7):1365–2559.
16. Porta C, Figlin RA. Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt signaling pathway and kidney cancer, and the therapeutic potential of Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt inhibitors. *J Urol*. 2009;182(6):2569–77.
17. Wu X, Obata T, Khan Q, Highshaw RA, De Vere White R, Sweeney C. The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. *BJU Int*. 2004;93(1):143–50.
18. Korkolopoulou P, Levidou G, Trigka EA, Prekete N, Karlou M, Thymara I, et al. A comprehensive immunohistochemical and molecular approach to the PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene/mammalian target of rapamycin) pathway in bladder urothelial carcinoma. *BJU Int*. 2012;110(11):1237–48.
19. Schultz L, Albadine R, Hicks J, Jadallah S, DeMarzo AM, Chen YB, et al. Expression status and prognostic significance of mammalian target of rapamycin pathway members in urothelial carcinoma of urinary bladder after cystectomy. *Cancer*. 2010;116(23):5517–26.
20. Juanpere N, Agell L, Lorenzo M, de Muga S, López-Vilaró L, Murillo R, et al. Mutations in FGFR3 and PIK3CA, singly or combined with RAS and AKT1, are associated with AKT but not with MAPK pathway activation in urothelial bladder cancer. *Hum Pathol*. 2012;43(10):3–82.
21. Zhai B, Jiang X, He C, Zhao D, Ma L, Xu L, et al. Arsenic trioxide potentiates the anti-cancer activities of sorafenib against hepatocellular carcinoma by inhibiting Akt activation. *Tumour Biol*. 2015;36(4):2323–34.

# **Discussion générale**

Notre étude consiste à évaluer l'impact de certains marqueurs biologiques dans le développement du cancer de la vessie en relation avec le tabac dans la population tunisienne où ce cancer pose un problème de santé publique de par l'importance de la fréquence des récurrences qui nécessitent un suivi clinique à long terme et un coût élevé de traitement. Il s'agit d'une étude sur une cohorte collectée auprès de service d'urologie de l'hôpital de Charles Nicolle de Tunis qui accueille une majorité de la population du nord Tunisien. La recherche de marqueurs a été réalisée sur le sérum d'une part et sur des biopsies de tumeurs vésicales de l'autre à partir des mêmes patients.

Cette étude nous a permis de déterminer l'impact de la valeur pronostique des biomarqueurs tumoraux (T-bet, GATA-3, bcl-6, et p-Akt,) et sériques (sFasL, sTRAIL) dans le cancer de la vessie en Tunisie, en fonction des paramètres clinico-pathologiques et la prise de tabac. D'après nos connaissances, ces biomarqueurs pronostiques sont analysés pour la première fois dans le cancer de la vessie dans une population africaine (la population tunisienne).

L'ensemble de ces travaux tournent autour la réponse immunitaire anti-tumorale où la fonction cytotoxique constitue la principale activité effectrice active contre la tumeur. Cette dernière étant sous la dépendance de la régulation par les cellules T CD4, nous avons focalisé sur ces populations à travers leurs marqueurs spécifiques. D'autre part, la fonction cytotoxique passant par l'apoptose, nous avons analysé des marqueurs solubles inducteurs d'apoptose sFasL, sTRAIL. Enfin, les cellules tumorales pouvant résister à l'apoptose, nous avons focalisé, dans la dernière partie de ce travail, sur l'expression de la protéine Akt phosphorylée au niveau tumoral, sachant que l'activation de cette protéine serait pro-tumorale. Auparavant, nous avons établi une analyse épidémiologique de notre cohorte d'étude.

### **Une grande proportion de fumeurs parmi les malades atteints de cancer de la vessie**

Notre cohorte est constituée de 117 malades atteints du cancer de la vessie avec un sexe-ratio de 13.62 et un âge moyen de diagnostic de la maladie de  $66.32 \pm 13.30$  ans. Cette moyenne d'âge n'est pas significativement différente de la moyenne d'âge internationale qui est entre (65 et 70 ans) (Kirkali et al, 2005). Ce résultat exclut l'hypothèse d'un diagnostic tardif de la maladie dans la population tunisienne par rapport aux autres populations.

Sachant que le cancer est une maladie multifactorielle, qui dépend des facteurs biologiques et des facteurs environnementaux, le tabagisme est le facteur étiologique le plus associé à la survenue des tumeurs de la vessie. Les carcinogènes présents dans le tabac, une fois introduits dans l'organisme, nécessitent plusieurs mécanismes afin de les éliminer. Un dérèglement de ces métabolismes, suite à une modification d'une ou de plusieurs activités

enzymatiques, pourrait être associé à une augmentation du risque du cancer de la vessie, un lien entre tabagisme et cancer de la vessie a été prouvé par de nombreuses études datant des années 1970 et 1980. Une étude menée sur 281.394 hommes et 186.134 femmes, a montré encore une fois que le tabagisme est un facteur de risque important pour le cancer de la vessie pour les deux sexes. En effet, les fumeurs actuels ont un risque environ 4 fois plus élevé par rapport aux personnes qui n'ont jamais fumé (Freedman et al, 2011). Dans la population tunisienne, le cancer de la vessie est le premier cancer urologique avant même le cancer de la prostate qui occupe la première place des cancers urologiques dans le monde, des études expliquent cette différence par le tabagisme qui est le facteur environnemental le plus associé à la survenue du cancer de la vessie en Tunisie.

Dans notre cohorte, le tabac semble être un facteur de risque de survenue des tumeurs vésicales avec la présence d'une grande proportion de fumeurs (94/109) vs (15/109) de non-fumeurs. Dans la population tunisienne, la présence d'une grande proportion de fumeurs (plus de 55% des hommes sont des fumeurs) (Fakhfakh et al, 2005) permet d'expliquer la fréquence élevée du cancer vésicale chez les hommes.

L'incidence du cancer de la vessie est aussi liée à l'ancienneté du tabagisme et au nombre de cigarettes fumées par jour (paquet par année : PA). Il existe ainsi un effet dose, c'est-à-dire une accumulation des effets nocifs dans le temps. En effet, parmi nos malades fumeurs (58/94) sont de gros fumeurs (plus de 40 PA) parmi ces gros fumeurs 36.12% ont commencé de fumer très jeune âge.

### **Un risque de récurrence conditionné par le tabagisme**

La classification anatomopathologique TNM a permis de séparer les tumeurs vésicales en deux groupes :

- Les tumeurs superficielles ou non-invasives, représentant 66.36% (73/110) des tumeurs primaires. Cette valeur est plus faible que celles décrites dans la littérature qui estime une fréquence des tumeurs superficielles au moment du premier diagnostic de 70 à 80% (Kirkali et al, 2005).
- Les tumeurs invasives, représentant 33.63% (37/110) des tumeurs primaires. Cette valeur est proche des valeurs décrites dans la littérature (20 à 30%), tout en restant dans les valeurs les plus élevées.

Nous expliquons ces légères différences par rapport aux valeurs rapportées dans la littérature, d'un côté par le faible effectif de notre cohorte, d'un autre côté par certaines ambiguïtés dans l'interprétation des lames histologiques au moment de l'analyse des échantillons par différents médecins anatomopathologistes ou éventuellement par un biais de sélection.

Dans notre travail, nous avons aussi essayé de suivre l'histoire évolutive du cancer de la vessie chez notre cohorte depuis son initiation jusqu'à sa progression. Le taux de récurrence semble être important dans notre population, puisque plus de la moitié des malades rechutent après le traitement. L'importance des fréquences de récurrence reste un problème majeur dans le cancer de la vessie ce qui nécessite une surveillance des patients à vie et un intérêt de chercher des nouvelles thérapies qui limitent la rechute, la résistance aux traitements et qui augmentent les chances de guérison.

Comme décrit dans la littérature, on note aussi que 16.16% des malades récidivent et progressent vers un stade et/ou grade plus agressif avec (24.78%) qui finissent par mourir.

L'ensemble de ces données suggèrent que la population tunisienne est une population à risque pour le cancer de la vessie. La recherche d'un lien entre les facteurs cliniques et les facteurs environnementaux (le tabac et la sévérité de la maladie) est utile à déterminer.

Dans la population Tunisienne, le tabac ne semble pas être un facteur de risque qui affecte le stade ou le grade de la maladie. La répartition des tumeurs superficielles et invasives en fonction du profil tabagique des malades ne montre pas de différences statistiquement significatives. Ceci ne contredit pas le fait que le tabac représente un facteur de risque responsable de 50% des cancers de la vessie (Burger et al, 2013), mais il ne détermine pas le motif anatomopathologique de la maladie. Ce résultat a été déjà observé par (Ouerhani et al, 2009b) sur la population tunisienne, mais semble être en contradiction avec d'autres études sur d'autres populations qui suggèrent que, chez les tabagiques les tumeurs vésicales sont de stade et de grade plus avancés (Thompson et al, 1987).

La récurrence de la maladie peut être liée à certains facteurs génétiques et environnementaux incluant le tabagisme (Chu et al, 2013). Certaines études ont montré un lien entre l'augmentation de la fréquence de récurrence et la continuation de la consommation de tabac après le premier diagnostic de la maladie (Lammers et al, 2011).

L'arrêt du tabac réduit le risque de récurrence. Ainsi, une réduction immédiate du risque de cancer de la vessie a été observée chez les personnes qui ont arrêté de fumer (Lammers et al, 2011).

Les résultats obtenus à partir de notre cohorte ont montré que les fumeurs ont 1.78 fois plus de risque d'avoir une récurrence de leur maladie que le non-fumeur. Cependant, la quantité de tabac fumé ne semble pas un facteur de risque. Ces résultats ont été déjà observés dans plusieurs travaux ; la fréquence de récurrence est beaucoup moins importante chez les non-fumeurs comparée aux malades fumeurs ( $p < 0.001$ ). De plus, les malades qui ont arrêté de fumer depuis plus de 15 ans ont beaucoup moins de risque de récurrence (Ogihara et al, 2015). Cependant d'autres études montrent le contraire, Lee et son équipe ont montré que le tabac n'est pas corrélé à la récurrence ni à la survie des patients atteints du cancer de la vessie (Lee et al, 2012). De plus le tabac ne semble pas affecter la réponse au BCG ou le devenir de la maladie à long terme (Sfakianos et al, 2011).

Dans le présent travail, nous avons essayé de chercher des biomarqueurs de pronostic et de prédire la réponse aux traitements dans le cancer de la vessie sur une cohorte de population tunisienne. Cette voie de recherche a permis selon plusieurs travaux d'améliorer les orientations thérapeutiques contre plusieurs types de cancer ainsi que de guider les cliniciens aux meilleurs choix de traitement.

### **L'infiltration des tumeurs par les T CD4 détermine la présentation de la maladie**

Nous avons choisi d'évaluer l'infiltration tumorale des lymphocytes T et la corrélation de cette signature immunologique avec les paramètres clinico-pathologiques de la maladie.

La rechute et la survenue de métastases constituant la principale cause de décès chez les patients atteints du cancer de la vessie, l'importance des interactions entre cellules tumorales, cellules du microenvironnement et réponses immunitaires au cours des phases d'invasion et de dissémination métastatique rendent ces approches particulièrement attrayantes.

La présence d'infiltrat lymphoïde au niveau de tumeurs d'origine histologique diverse constitue un argument supplémentaire confortant l'hypothèse d'une surveillance immunologique des cancers.

Il apparaît que tous les types de cellules immunitaires sont présents dans les tumeurs humaines : macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, NK, des lymphocytes B, des lymphocytes T incluant des Th ; Th1 et Th2, Th17, Thf, Treg et les CTL (Fridman et al, 2012).

La localisation, la densité et l'orientation fonctionnelle de ces cellules ont été corrélées à l'évolution clinique. En effet, l'augmentation de la survie globale ou de la survie sans récurrence des patients, a pu être corrélée à la densité des lymphocytes infiltrant la tumeur dans certains cancers (Clark et al, 1989). Outre cet aspect quantitatif, la nature de l'infiltrat lymphoïde serait également déterminante dans l'évolution de la maladie. La relation entre le stade de la tumeur, la réponse au traitement et les populations lymphocytaires T intra-tumorales dominantes ou le ratio entre cellules répondeuses et suppressives infiltrant la tumeur, pourrait définir l'état du système immunitaire au cours du développement tumoral et estimer sa valeur pronostique.

Peu de données sont disponibles concernant la corrélation entre l'infiltration tumorale immunologique et le pronostic du cancer de la vessie. Les premières études rapportant un rôle pronostic favorable de l'infiltration tumorale par des lymphocytes T (TILs : Tumor Infiltrating Lymphocytes) dans les cancers de la vessie ont été publiées (Stöber, 1978 et Fujimoto et al, 1983).

Plus récemment, d'autres études ont montré que l'augmentation de cellules TCD8+ intra-tumoral est corrélée à l'augmentation de la survie globale des patients au stade invasif. La présence de cellules TCD8+ est donc considérée comme un marqueur de bon pronostic dans le cancer de la vessie (Sharma et al, 2007). De plus, il a été montré que la présence de cellules Foxp3+ intra-tumorales est corrélée au bon pronostic (Winerdal et al, 2011).

A travers notre étude nous tentons de mieux comprendre l'effet de l'infiltration des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral du cancer de la vessie afin d'estimer la survie globale et la valeur pronostic. L'analyse phénotypique et histologique de la tumeur dans sa totalité avant tout traitement permet de définir des relations entre structure et composition cellulaire de la tumeur. En effet, la prédominance d'une population lymphocytaire avant traitement dans la tumeur, permet de définir sa valeur prédictive.

Nous avons révélé une variation d'expression de trois facteurs de transcription des lymphocytes T (Th1, Th2 et Thf) qui sont respectivement T-bet, GATA-3 et bcl-6 selon les différents profils anatomopathologiques de la maladie, la survie des patients et la réponse au

BCG. Nous avons montré que l'expression de T-bet était plus importante chez les malades à stade invasif et à haut grade et chez les bons répondeurs au BCG, sans aucune valeur pronostique sur la survie. Notre étude a été la première à décrire une valeur pronostique défavorable de l'expression de T-bet. La notion d'une relation positive entre une infiltration tumorale de cellules Th1 et un mauvais pronostic chez des patients porteurs d'un cancer est assez inattendue. En effet, en oncologie fondamentale et clinique, les cellules Th1 sont généralement considérées comme l'une des populations clé du microenvironnement tumoral capable d'induire la réponse immune anti-tumorale et ainsi d'empêcher la croissance et la dissémination tumorale. Initialement, leur présence a systématiquement été associée chez les malades avec un bon pronostic tumoral (Fridman et al, 2012). Cependant, l'expression de T-bet chez l'homme n'est pas uniquement confinée aux cellules Th1 fonctionnelles. T-bet peut également être transitoirement exprimée par des cellules T effectrices activées telles les cellules Th17.

De plus, T-bet est impliqué également dans la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  via les cellules Th1. Dans nos travaux nous avons eu des difficultés à mettre en évidence la présence de l'IFN- $\gamma$  dans les tissus tumoraux de nos patients ; nous expliquons ceci par l'absence de cellules sécrétrices Th1 au niveau des tissus tumoraux du cancer de la vessie, ou liés à des problèmes techniques. Il semblerait donc que T-bet soit sécrété par d'autres cellules immunitaires que les cellules Th1 au niveau tumoral ; cette hypothèse reste à vérifier. Cependant, il n'est pas à exclure la présence au niveau tumoral de cellules Th1 exprimant T-bet mais non fonctionnelles.

### **L'infiltration des tumeurs par les lymphocytes T CD4 détermine la réponse au traitement**

A l'heure actuelle, quelques travaux seulement ont mis en évidence une relation entre le type de traitement administré et l'influence potentielle de celui-ci sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi, dans le cancer du sein, l'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante peut s'accompagner d'une diminution de la densité intra-tumorale en Treg. Dans cette étude, les patientes présentant une réponse anatomopathologique complète après chimiothérapie étaient celles dont le taux de cellules T Foxp3+ au sein de la tumeur était fortement diminué, alors que le taux de cellules CD8+ restait élevé (Ladoire et al, 2008).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une relation entre l'influence de la variation de l'expression de T-bet, GATA-3 et bcl-6 sur la réponse au traitement par le BCG.

Nous avons montré ainsi que l'expression de T-bet est plus importante chez les bons répondeurs au BCG et peut être considérée comme un marqueur prédictif au traitement par BCG. Ce résultat corrobore les résultats de plusieurs autres études qui ont montré que la réponse à la BCG thérapie dépend de l'infiltration des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral (Askeland et al, 2012, Nunez-Nateras et al, 2014).

Les travaux de Nunez-Nateras et de son équipe, ont montré que le rapport GATA-3+/T-bet+ est plus significatif chez les bons répondeurs au BCG que les mauvais répondeurs ( $P < 0.001$ ), suggérant que les cellules Th2 est un biomarqueur prédictif à la réponse au BCG et que la présence de cellules Th1 à long terme dans le microenvironnement tumoral aboutit à l'échec au traitement par le BCG (Nunez-Nateras et al, 2014).

Cependant, d'autres travaux ont montré l'influence du traitement par le BCG dans l'induction d'une réponse immunitaire Th1 et CD8+ au cours de la régression tumorale, en effet, lorsque le BCG est attaché à l'urothélium vésical, il induit la sécrétion des cytokines et des chimiokines par les cellules tumorales (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ...). Ces dernières permettent le recrutement des cellules phagocytaires (DC, MO...) qui suite à leur activation, induisent la différenciation des cellules TCD4+ naïves en Th1 et/ou Th2. L'effet du BCG dépend de la réponse induite par les cellules Th1, suite à leur sécrétion d'INF- $\gamma$ . Les cellules Th1 permettent également d'activer les cellules cytotoxiques (NK, MO et TCD8+) exerçant ainsi un effet anti-tumoral nécessaire à la destruction de la tumeur (Askeland et al, 2012, Wu et al, 2015).

Nous n'avons pas pu étudier l'impact de l'infiltrat immunologique sur la chimiothérapie vue que tous nos malades traités par chimiothérapie étaient des mauvais répondeurs, cette étude mérite d'être confirmée sur une plus large population.

### **Valeur pronostique du rapport T-bet/GATA-3, GATA-3/bcl-6 et T-bet/bcl-6 au sein de la tumeur**

Nous avons également montré qu'une forte expression de GATA-3 était corrélée à une meilleure survie globale, et sans récurrence ou progression, et associée au stade et au grade tumoral précoce.

GATA-3 est un marqueur de différenciation urothéliale, il joue également un rôle dans la différenciation des tissus adipeux, dans les cellules endothéliales, et dans l'urothélium vésical.

Il est utilisé en immunohistochimie pour le diagnostic afin de distinguer un carcinome urothélial primaire ou métastatique (Higgins et al, 2007).

Une faible expression de GATA-3 est associée à un stade invasif et de haut grade et induit la migration et l'invasion cellulaire du cancer de la vessie impliquée dans la progression tumorale et l'apparition des métastases (Miyamoto et al, 2012, Li et al, 2014). L'ensemble des données publiées dans la littérature suggère donc qu'une forte infiltration en cellules Th2 se traduit par une forte expression de GATA-3 au niveau tumoral, jouant un rôle pronostique favorable dans le cancer vésical. Toutefois, il n'existe actuellement que très peu de données concernant le rôle pronostique de l'infiltrat en lymphocytes Th2 au sein de la tumeur vésicale. Toutefois, nos résultats soulignent l'importance pronostique d'une forte infiltration intra-tumorale en lymphocytes Th2 associée de façon indépendante en analyse multivariée à une meilleure survie globale. Ces résultats confirment le rôle pronostique majeur de l'infiltrat en lymphocytes Th2 au sein de la tumeur primitive des cancers vésicaux. Cependant, notre étude n'aboutit pas à conclure que l'expression de GATA-3 est associée à la présence de cellules Th2 au niveau tumoral. Il reste à évaluer dans le tissu tumoral la présence de cytokines secrétées par les cellules Th2 telle que l'IL4 et IL6.

La capacité des cellules Th folliculaires à infiltrer les tissus tumoraux a été démontrée par la mise en évidence, de la présence de bcl-6, CXCR5, CXCL13 et IL-21 dans plusieurs types de cancers (Rodríguez-Pinilla et al, 2009). Ces études ont montré que bcl-6 est associée à la progression tumorale et à la diminution du taux de survie chez les malades atteints d'un cancer du sein et d'ovaire (Wu et al, 2014, Wang et al, 2015).

Cependant, l'identification des éventuels facteurs de transcriptions indispensables à l'infiltration des cellules Thf dans le microenvironnement tumoral vésical est très peu étudiée. En effet, dans la littérature une seule étude s'est intéressée au rôle de bcl-6 dans les tumeurs vésicales. Cette étude a démontré que l'expression de bcl-6 est limitée à la couche superficielle de la paroi vésicale, et est corrélée au bas grade et au grade moyen (Lin et al, 2003).

Dans notre étude, nous avons montré que l'expression de bcl-6 est associée au stade superficiel et de bas grade et qu'une forte expression de bcl-6 était corrélée à une meilleure survie globale.

Pour permettre de dire que bcl-6 est associé à la présence de cellules Thf, il faut déterminer au niveau tumoral l'expression des marqueurs associés au phénotype de cellules Thf à savoir CXCR5, CXCL13 et IL-21.

La recherche d'une corrélation entre la présence de LT CD4 spécifiques de la tumeur et l'évolution de la maladie a pour objet de définir leur valeur pronostique. Un déséquilibre du rapport Th1/Th2 en faveur de cellules Th2 serait une caractéristique commune des cancers et pourrait résulter soit d'un dysfonctionnement des cellules Th1, soit d'une activation plus spécifique des cellules Th2, ou la combinaison des deux phénomènes. GATA-3 présente une corrélation positive avec l'expression de bcl-6. T-bet présente une corrélation négative avec l'expression de GATA-3 et l'expression de bcl-6.

En conclusion, nous avons pu confirmer qu'une forte expression de GATA-3 et bcl-6 était corrélée au stade et au grade précoce de développement tumoral du cancer de la vessie et à un meilleur pronostic, et de façon inverse, les patients présentant une invasion tumorale présentaient une expression significativement plus forte de T-bet. Cette expression était ainsi corrélée au stade et au grade tardif de développement tumorale et à un mauvais pronostic. Ainsi, la détermination des facteurs de transcription pouvant réguler l'ontogénie de LTCD4, permettrait d'identifier des marqueurs spécifiques et autoriserait des études rétrospectives pour en définir la valeur prédictive et/ou pronostique. En plus, la compréhension du rôle des LT CD4 « helpers » dans le contrôle de la progression tumorale est indispensable au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment des immunothérapies.

### **sFasL : un facteur de bon pronostic dans le cancer de la vessie**

Nous avons également évalué la valeur prédictive d'une part de deux protéines sériques, les ligands de récepteurs de mort Fas et DR4/DR5 ; FasL et TRAIL.

Notre étude est la première à corréler le taux de sFasL et sTRAIL circulants dans le sérum de patients tunisiens (population africaine) aux différents profils anatomopathologiques du cancer de la vessie.

Le dosage de ce marqueur sérique est effectué sur 64 patients, et 52 sujets sains. Nous avons montré la présence de FasL soluble dans le sérum des malades et des témoins avec une concentration moyenne de 737.44 pg/ml chez les malades.

Cette concentration semble être élevée par rapport à la littérature qui détecte une moyenne de concentration de 180 pg/ml chez les patients de population Asiatique (Mizutani et al, 2001). Ce taux élevé de FasL soluble dans notre population peut être expliqué par la méthode de détection qui pourrait être plus sensible que celle utilisée il y a une quinzaine d'années, ou par la différence géographique et ethnique intra population (population africaine vs population asiatique).

Le taux de FasL soluble est donc plus élevé chez les malades atteints du cancer de la vessie que chez les sujets sains. De plus, un taux plus important de cette cytokine a été observé chez les malades à stade superficiel et de bas grade.

Certains résultats rapportés par la littérature concernant la corrélation de sFasL avec le stade et le grade histologique sont contradictoires avec nos résultats, en effet le taux de FasL soluble dans le sérum des malades atteints du cancer de la vessie a été corrélé à la progression de la maladie (Mizutani et al, 2001). Cette discordance peut être expliquée encore une fois par la différence ethno-géographique (population africaine vs population asiatique). La concentration de sFasL pourrait expliquer cette discordance. Il est en effet, probable que de faibles concentrations de sFasL pourraient être anti-apoptotiques, alors que de fortes concentrations comme dans notre étude seraient pro-apoptotiques. Cette discordance a été retrouvée dans d'autres travaux sur d'autres types de cancer. Une étude montre qu'un faible niveau de sFasL est retrouvé chez des patients atteints du cancer de la thyroïde et est corrélé à la récurrence chez ces patients (Owonikoko et al, 2013). Ce travail va dans le même sens que celui de Hoffmann et al, 2002 qui a également observé des niveaux inférieurs de sFasL chez les patients atteints du cancer de la tête et du cou en rechute par rapport aux patients sans rechute de la maladie ou chez les contrôles (Hoffmann et al, 2002). Cependant, d'autres travaux ont rapporté que des niveaux de sFasL élevés sont en corrélation avec les stades avancés de la maladie chez des patients atteints de cancer du sein (Ueno et al, 1999) et des cancers gynécologiques (Konno et al, 2000).

### **sTRAIL : un facteur de bon pronostic dans le cancer de la vessie**

Le dosage de ce marqueur sérique est effectué sur 62 patients et 71 sujets sains. Nos résultats montrent que sTRAIL est présent aussi bien dans le sérum des malades que chez les témoins avec une concentration moyenne de 1998,43 pg/ml.

Nos résultats ne montrent aucune différence entre le taux de TRAIL soluble chez les malades et les sujets sains, cependant cette cytokine avait un taux plus important chez les malades à stade superficiel et de bas grade.

A notre connaissance, il n'existe pas d'études qui ont évalué le taux de TRAIL soluble dans le sérum des malades atteints du cancer de la vessie, cependant deux études ont ciblé la recherche de TRAIL dans les urines des malades. La première a montré le rôle de cette molécule comme marqueur prédictif d'une meilleure réponse au BCG. En effet, le taux de TRAIL soluble chez les bons répondeurs à la BCG thérapie était plus important par rapport aux mauvais répondeurs (Chiu et al, 2013). De plus, la deuxième étude a montré que le taux de TRAIL soluble dans les urines des malades après un traitement à la BCG thérapie est plus élevé chez les bons répondeurs par rapport aux mauvais répondeurs. Ceci expliquerait un rôle cytotoxique de TRAIL après le traitement au BCG (Ludwig et al, 2004). Ces résultats concordent avec les nôtres qui montrent que les bons répondeurs au BCG présentaient des taux plus élevés de sTRAIL que les mauvais répondeurs.

Cependant ces résultats restent à confirmer en augmentant l'effectif de la population des malades et des témoins d'un côté et de l'autre côté en variant les centres du recrutement des malades et des témoins car jusqu'à présent les sujets proviennent tous de l'hôpital Charles Nicolle et du grand Tunis.

### **p-Akt au niveau: un facteur de mauvais pronostic dans le cancer de la vessie**

La valeur prédictive de l'expression cellulaire de la protéine kinase Akt sous sa forme phosphorylée et donc active a été analysé. Akt est une molécule de signalisation impliquée dans la croissance et la division cellulaire, deux mécanismes souvent activés dans le cancer. Cependant, son rôle pro-tumoral n'est pas bien discuté dans le cancer de la vessie, en particulier dans la population africaine.

L'étude de l'expression de p-Akt en fonctions des paramètres clinicopathologiques des patients atteints du cancer de la vessie, a montré une corrélation significative entre le stade, le grade et l'activation d'Akt. De plus, les tumeurs de stade et de grade avancés surexpriment p-Akt. L'expression de p-Akt dans ces tumeurs est également corrélée avec la progression tumorale. On observe que 14.63% des patients qui ont un taux élevé de p-Akt au moment du premier diagnostic ont développé des tumeurs plus agressives après trois ans. L'expression de p-Akt dans le cancer de la vessie semble dépendre du type histologique.

Elle est significativement plus élevée dans les tumeurs à stade infiltrant et à haut grade comparées aux tumeurs de stade superficiel et de bas grade ou de grade moyen (Figure 2a, 2b).

Nos résultats suggèrent que l'activation d'Akt peut être un indicateur de développement et de progression tumorale. En effet, elle semble avoir un rôle pro-tumoral dans notre cohorte, rôle déjà observé dans plusieurs études (Sun et al, 2011, Calderaro et al, 2014).

L'expression de p-Akt peut être de bon pronostic dans certains types de cancer. En effet, une étude réalisée sur 717 patients a montré que l'expression de p-Akt chez les patients atteints de cancer colorectal avec une mutation PI3KCA est associée au bas grade de la maladie et à un pronostic favorable pour les patients (Baba et al, 2011).

### **Corrélation p-Akt et récurrence**

Notre étude n'a pas montré d'association entre l'activation d'Akt et la récurrence de la maladie, il semble que l'activation d'Akt ne soit pas un facteur de risque de la récurrence.

Chez les malades ayant récidivé la phosphorylation d'Akt n'était pas assez élevée, ce qui suggère que d'autres facteurs de risque peuvent être responsables de la récurrence de la maladie.

L'ensemble de ces résultats nous amène à réfléchir à un terrain environnemental prédisposant au cancer de la vessie dans la population tunisienne. Par ailleurs, nous savons, d'après nos données épidémiologiques, que la population étudiée est composée à 80,5% de fumeurs, dont 49.29% sont des gros fumeurs ( $P \geq 40$ ).

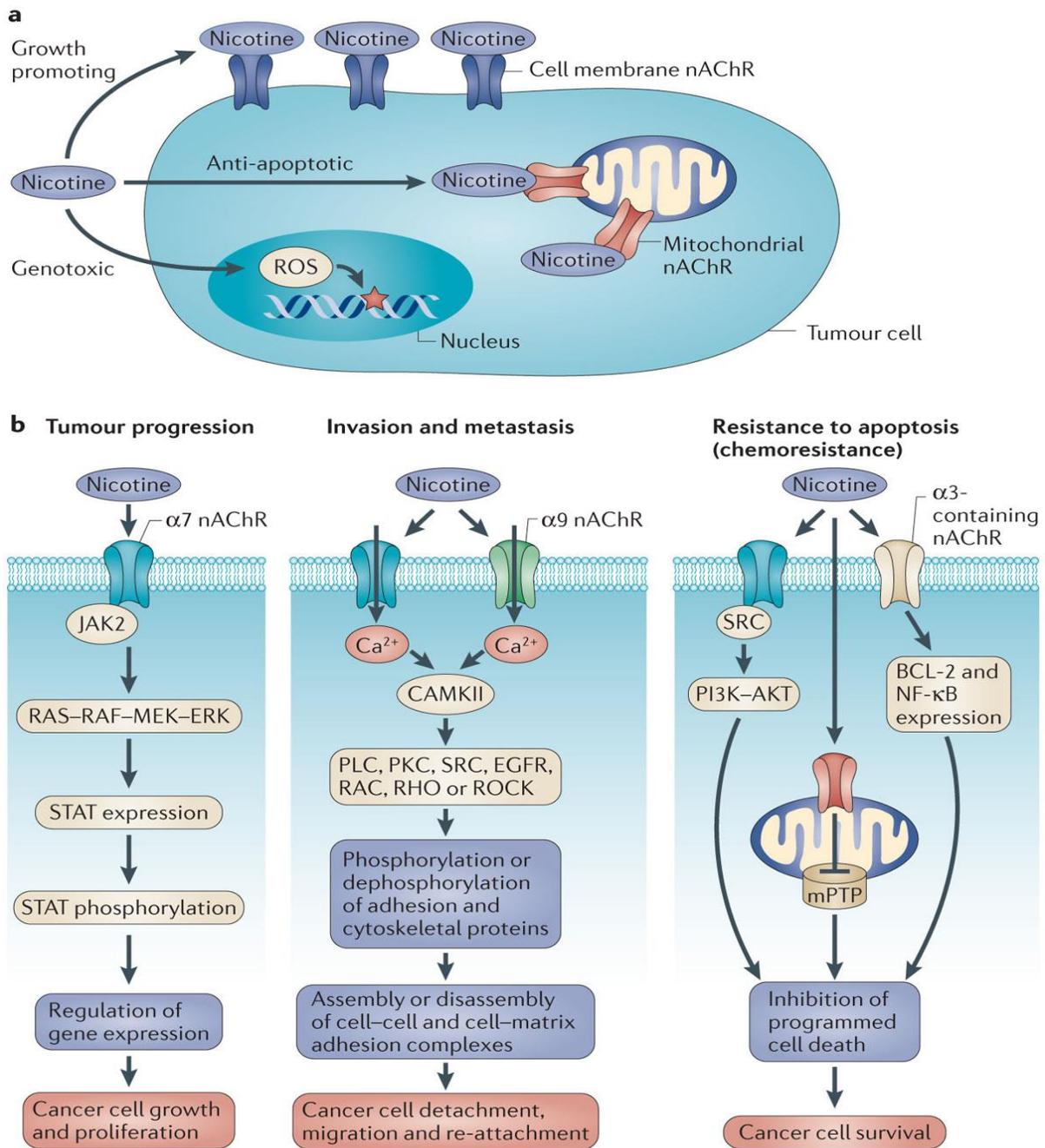
La recherche d'une éventuelle association entre la récurrence de la maladie et la consommation de tabac a été également établie. Nous avons réussi à montrer encore une fois sur une cohorte de faible effectif que le tabac est un facteur de risque de récurrence de la maladie, et que les non-fumeurs ont moins de risque de rechuter comparé aux fumeurs.

D'après nos connaissances, la consommation de tabac induit l'activation des récepteurs de la nicotine. Ces derniers lorsqu'ils sont activés, activent des voies de signalisation ayant un effet tumorigène sur les cellules ; les voies Ras, Raf, MEK, ERK... qui induisent la progression tumorale, les voies de CAMKI (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I) qui induisent l'invasion tumorale et l'apparition des métastases et les voies PI3K/Akt, NF-kB...qui aboutissent à la résistance à l'apoptose, notamment à la chimiorésistance (Figure 24) (Grando et al, 2014). Ceci expliquerait les rechutes élevées chez les fumeurs atteints du cancer de la vessie.

Durant cette étude nous avons également essayé de chercher une corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation d'Akt et la consommation de tabac. En effet, les carcinogènes présents dans le tabac, une fois introduits dans l'organisme, nécessitent l'intervention de plusieurs mécanismes pour les éliminer. Un dérèglement de ces métabolismes, suite à une modification d'une ou de plusieurs activités enzymatiques, pourrait être associé à une augmentation du risque des cancers (Grando et al, 2014, Schaal et al, 2014) notamment le cancer de la vessie (Figure 23) (Yuge et al, 2015).

Nous avons émis l'hypothèse que les carcinogènes du tabac pouvaient jouer un rôle dans la perturbation de la voie PI3K/Akt. Par ailleurs, des études ont montré que la nicotine incluse dans la cigarette induit l'activation d'Akt dans les tissus tumoraux de certains types de cancer, et la résistance à la chimiothérapie, ce qui suggère une interaction de ces deux facteurs dans le développement du cancer (West et al, 2002 et West et al, 2003). Il induit également la migration cellulaire des cellules cancéreuses du poumon par l'activation de la voie PI3K (Yoneyama et al, 2016).

Notre étude n'a pas montré de différences significatives. Le tabac semble être non associé à l'activation d'Akt, cependant des études ont montré le rôle du tabac dans l'activation de certains types de cancer (Tsurutani et al, 2005, Islam et al, 2014). Récemment, il a été montré que la nicotine induit la croissance tumorale des tumeurs vésicales et la résistance à la chimiothérapie par l'activation de la voie Pi3k/Akt/mTOR (Yuge et al, 2015). Nous expliquons cette contradiction par le biais de sélection de notre cohorte qui est constitué d'un pourcentage très élevé de fumeurs.



Nature Reviews | Cancer

**Figure 23 :** Schémas présentant la dérégulation de certaines voies de signalisation suite à l'activation des récepteurs de la nicotine d'après (Grando et al, 2014).

*a. La fixation de la nicotine sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR) exprimés sur la membrane des cellules tumorales entraîne l'initiation de la croissance tumorale, sa fixation sur (nAChR) exprimé sur la membrane mitochondriale aboutit à un effet anti-apoptotiques des cellules tumorales. b. La fixation de la nicotine sur son récepteur permet de déréguler plusieurs voies de signalisation qui aboutissent à la prolifération et la progression des cellules tumorales parmi ces voies on note (NF- $\kappa$ B, PI3K-Akt, JAK/STAT Ras/RAF/MEK/ERK...).*

Un taux élevé d'expression de p-Akt peut permettre la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les malades ayant un taux élevé de p-Akt peuvent être traités par des inhibiteurs d'Akt ou de sa voie, qui inclut mTOR. Plusieurs inhibiteurs de la voie Akt /mTOR sont en cours d'essais cliniques. Au minimum quatre inhibiteurs d'Akt et une dizaine pour mTOR sont en cours d'essai (Lee et al, 2015).

Récemment, des inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 (une voie immunosuppressive impliquée dans l'échappement anti-tumoral) ont donné des résultats probants dans le traitement de certains types de cancers (Sunshine et al, 2015), notamment le cancer de la vessie (Aoun et al, 2015, Hafez et al, 2015, Sundararajan et al, 2015). L'efficacité de ces inhibiteurs dépend de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales. Or cette expression est régulée par plusieurs facteurs y compris Akt. En effet, l'activation de la voie Ak/mTOR induit l'expression de PDL-1 (Carneiro et al, 2015, Lastwika et al, 2016). Ainsi, notre hypothèse est que les patients qui présentent un taux fort de p-Akt pourraient exprimer PD-L1 et seraient donc susceptibles d'être traités avec un anti-PD-L1, ou PD-1 associé ou non à un autre traitement.

**Conclusions  
&  
perspectives**

En Tunisie, le cancer de la vessie fait parti des problèmes majeurs de santé publique. En effet, il est la deuxième cause de mortalité chez l'homme après le cancer de poumon. Malgré, les multiples approches thérapeutiques développées pour combattre ce cancer, la fréquence de récurrence reste encore élevée, la progression de la maladie vers un stade plus agressif est probable et souvent finit par le décès du malade en raison de l'efficacité limitée de ces traitements. Le but du présent projet est de chercher de nouveaux biomarqueurs pronostiques qui aident le clinicien à orienter les thérapies proposées.

Au cours d'une première étape de cette thèse, nous avons étudié l'infiltration des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral du cancer de la vessie. Le présent travail vise à étudier l'importance prédictive de l'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires, pour ce faire, nous avons focalisé sur trois facteurs de transcription des lymphocytes T activés (Th1, Th2 et Tfh) qui sont respectivement T-bet, GATA-3 et bcl-6. L'analyse par qPCR en temps réel, a permis de quantifier l'expression de ces facteurs immunologiques au niveau de tumeurs vésicales. Ainsi :

- Une surexpression de T-bet a été observée au sein de groupe des malades à stade invasif et à haut grade. Paradoxalement, les malades qui expriment fortement T-bet au niveau tumoral répondent mieux au BCG par rapport aux malades qui expriment faiblement T-bet.
- Une surexpression de GATA-3 et bcl-6 a été corrélée au stade superficiel et au bas grade, à une meilleure survie et à une faible prise de tabac.

**En perspectives** à ce travail, il serait très intéressant de déterminer la nature des cellules immunitaires infiltrant la tumeur de la vessie. Il faut déterminer si l'expression de T-bet est associée à l'expression de l'IFN- $\gamma$ , IRF1 et IL-2, des facteurs liés au phénotype Th1. De même on envisage de voir si l'expression de GATA-3 est associée à la présence d'IL-4, IL-5 et IL-13 et que l'expression de bcl-6 est associée à celle de STAT-3. On peut étendre notre étude à la recherche de cellules Th17 en ciblant l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t et des cytokines IL-17A et IL-21. Ainsi, une signature immunologique au sein des tumeurs de la vessie devrait permettre un meilleur pronostic et suivi de la maladie.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés au dosage dans le sérum de FasL et TRAIL sous leur forme soluble et avons montré que :

- Le taux sérique de sFasL est plus élevé chez les malades que les sujets sains avec particulièrement, une surexpression de cette cytokine chez les malades à un stade superficiel et de bas grade.
- Le taux de sTRAIL est plus élevé chez les malades de stade superficiel et de bas grade, sans aucune différence avec les sujets sains ; les patients ayant un taux élevé de sTRAIL sont des bons répondeurs au BCG thérapie.
- Le rôle anti-tumoral de ces deux cytokines solubles a été confirmé sur deux lignées de cancer de la vessie une de bas grade et l'autre de haut grade montrant que le traitement de ces cellules avec le sérum riche en sFasL ou sTRAIL diminue la viabilité cellulaire in vitro.

**En perspectives** à cette deuxième partie nous envisageons de varier les centres de recrutement des malades et des témoins et d'augmenter l'effectif des malades pour apporter des arguments statistiques plus robustes. Nos résultats nous permettent d'envisager de rechercher sur les tumeurs l'expression des récepteurs de mort Fas et DR4/DR5 et de montrer que la présence des ligands et l'expression de ces récepteurs sont corrélées au bas grade et au stade superficiel et peuvent expliquer une meilleure réponse au BCG.

Dans la dernière partie de cette thèse, notre objectif était de chercher des marqueurs de pronostic au niveau des cellules tumorales des malades atteints d'un cancer de la vessie. Pour réaliser cette étude, nous avons focalisé sur la voie de la protéine kinase Akt, dont l'activation est souvent élevée dans différents cancers.

Nous avons montré que :

- Une surexpression d'Akt phosphorylée sur sa sérine 473 au sein des tumeurs comparées au tissu sain adjacent.
- Les malades à stade invasif et à haut grade ont une activation plus importante de p-Akt ceci est confirmé sur des études in vitro et par l'analyse des courbes de survie.
- Les malades qui présentent une expression élevée de p-Akt ont un taux de survie faible.

- La consommation de tabac ne semble pas jouer un rôle dans l'activation d'Akt.
- La consommation de tabac est associée à un haut risque de récurrence.
- Les malades qui expriment fortement p-Akt sont des mauvais répondeurs au BCG.

**En perspectives** à cette partie nous pourrions envisager d'étudier l'expression d'autres protéines de la voie PI3K/Akt/mTOR qui sont impliquées dans le processus de carcinogénèse, ceci nous permettrait de mieux tracer la voie de carcinogénèse urothéliale, ainsi que d'utiliser des inhibiteurs d'Akt en cours de validation clinique en combinaison avec différents traitements de routine y compris le BCG.

# **Références bibliographiques**

- Acikbas I., Keser I., Kilic S., Bagci H., Karpuzoglu G., Luleci G. (2002) Detection of LOH of the RB1 gene in bladder cancers by PCR-RFLP. *Urol Int* 68:189-92.
- Adrian P.M. (1998) Bladder cancer. *BMJ* 317:1366-1369.
- Ajili F., Kaabi B., Darouiche A., Tounsi H., Kourda N., Chebil M., Manai M., Boubaker S. (2012) Prognostic value of Bcl-2 and Bax tumor cell expression in patients with non muscle-invasive bladder cancer receiving bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Ultrastruct Pathol* 36:31-9.
- Algeciras-Schimnich A., Shen L., Barnhart B.C., Murmann A.E., Burkhardt J.K., Peter M.E. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22: 207-220.
- Althausen A.F., Prout G.R., Jr., Daly J.J. (1976) Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol* 116:575-80.
- Altomare D.A., Lyons G.E., Mitsuuchi Y., Cheng J.Q., Testa J.R. (1998) Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* 16:2407-11.
- An Y., Li H., Wang K.J., Liu X.H., Qiu M.X., Liao Y., Huang J.L., Wang X.S. Meta-analysis of the relationship between slow acetylation of N-acetyl transferase 2 and the risk of bladder cancer. *Genet Mol Res* 14:16896-904.
- Anetor J.I., Wanibuchi H., Fukushima S. (2007) Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence. *Asian Pac J Cancer Prev* 8:13-23.
- Aoun F., Kourie H.R., Sideris S., Roumeguere T., Velthoven R., Gil T. Checkpoint inhibitors in bladder and renal cancers: results and perspectives. *Immunotherapy* 7:1259-71.
- Arikan O., Yyldyrym A., Ysbilen B., Canakci C., Atys G., Gurbuz C., Erol B., Ysman F.K., Ozkanli S., Caskurlu T. (2015) Clinical significance of serum and urinary HER2/neu protein levels in primary non-muscle invasive bladder cancer. *Int Braz J Urol* 41:1080-7.
- Asch-Kendrick R., Cimino-Mathews A. (2016) The role of GATA3 in breast carcinomas: a review. *Hum Pathol* 48:37-47.
- Ashkenazi A., Pai R.C., Fong S., Leung S., Lawrence D.A., Marsters S.A., Blackie C., Chang L., McMurtrey A.E., Hebert A., DeForge L., Koumenis I.L., Lewis D., Harris L., Bussiere J., Koeppen H., Shahrokh Z., Schwall R.H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104:155-62.
- Askeland E.J., Newton M.R., O'Donnell M.A., Luo Y. (2012) Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol* 2012:181987.

- Atreya I., Schimanski C.C., Becker C., Wirtz S., Dornhoff H., Schnurer E., Berger M.R., Galle P.R., Herr W., Neurath M.F. (2007) The T-box transcription factor eomesodermin controls CD8 T cell activity and lymph node metastasis in human colorectal cancer.
- Aveyard P., Adab P., Cheng K.K., Wallace D.M., Hey K., Murphy M.F. (2002) Does smoking status influence the prognosis of bladder cancer? A systematic review. *BJU Int* 90:228-39.
- Baba Y., Noshō K., Shima K., Hayashi M., Meyerhardt J.A., Chan A.T., Giovannucci E., Fuchs C.S., Ogino S. (2011) Phosphorylated AKT expression is associated with PIK3CA mutation, low stage, and favorable outcome in 717 colorectal cancers. *Cancer* 117:1399-408.
- Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R., Kaasinen E., Bohle A., Palou-Redorta J., Roupret M. (2011) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol* 59:997-1008.
- Babjuk M., Burger M., Zigeuner R., Shariat S.F., van Rhijn B.W., Comperat E., Sylvester R.J., Kaasinen E., Bohle A., Palou Redorta J., Roupret M. (2013) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 64:639-53.
- Bacus S.S., Altomare D.A., Lyass L., Chin D.M., Farrell M.P., Gurova K., Gudkov A., Testa J.R. (2002) AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival. *Oncogene* 21:3532-40.
- Baharlou R., Khezri A., Razmkhah M., Habibagahi M., Hosseini A., Ghaderi A., Jaberipour M. (2015) Increased interleukin-17 transcripts in peripheral blood mononuclear cells, a link between T-helper 17 and proinflammatory responses in bladder cancer. *Iran Red Crescent Med J* 17:e9244.
- Billerey C., Chopin D., Aubriot-Lorton M.H., Ricol D., Gil Diez de Medina S., Van Rhijn B., Bralet M.P., Lefrere-Belda M.A., Lahaye J.B., Abbou C.C., Bonaventure J., Zafrani E.S., van der Kwast T., Thiery J.P., Radvanyi F. (2001) Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 158:1955-9.
- Bos P.D., Zhang X.H., Nadal C., Shu W., Gomis R.R., Nguyen D.X., Minn A.J., van de Vijver M.J., Gerald W.L., Foekens J.A., Massagué J. (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459:1005-9.
- Burger M., Catto J.W., Dalbagni G., Grossman H.B., Herr H., Karakiewicz P., Kassouf W., Kiemeny L.A., La Vecchia C., Shariat S., Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 63:234-41.
- Burnet F.M. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27.

- Byun S.J., Kim J.H., Oh Y.K., Kim B.H. (2015) Concurrent chemoradiotherapy improves survival outcome in muscle-invasive bladder cancer. *Radiat Oncol J* 33:294-300.
- Calderaro J., Rebouissou S., de Koning L., Masmoudi A., Herault A., Dubois T., Maille P., Soyeux P., Sibony M., de la Taille A., Vordos D., Leuret T., Radvanyi F., Allory Y. PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis. *Int J Cancer* 134:1776-84.
- Carbo A., Hontecillas R., Andrew T., Eden K., Mei Y., Hoops S., Bassaganya-Riera J. (2014) Computational modeling of heterogeneity and function of CD4+ T cells. *Front Cell Dev Biol* 2:31.
- Carneiro B.A., Meeks J.J., Kuzel T.M., Scaranti M., Abdulkadir S.A., Giles F.J. (2015) Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treat Rev* 41:170-8.
- Carreon T., Hein M.J., Hanley K.W., Viet S.M., Ruder A.M. Bladder cancer incidence among workers exposed to o-toluidine, aniline and nitrobenzene at a rubber chemical manufacturing plant. *Occup Environ Med* 71:175-82.
- Carreras J., Lopez-Guillermo A., Roncador G., Villamor N., Colomo L., Martinez A., Hamoudi R., Howat W.J., Montserrat E., Campo E. (2009) High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 27:1470-6.
- Chaudhary K.S., Lu Q.L., Abel P.D., Khandan-Nia N., Shoma A.M., el Baz M., Stamp G.W., Lalani E.N. (1997) Expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in schistosomiasis-associated transitional and squamous cell carcinoma of urinary bladder. *Br J Urol* 79:78-84.
- Chirila D.N., Popp R., Vesa S., Balacescu O., Coman I., Constantea N.A., Ciuce C. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Genetic Variants in Multiple Urologic Cancers. *Chirurgia (Bucur)* 110:254-61.
- Chopin D., Saint F., Gattegno B. (2001) [Endovesical immunotherapy: Calmette-Guerin bacillus]. *Prog Urol* 11:1067-115.
- Chu H., Wang M., Zhang Z. Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility. *J Biomed Res* 27:170-8.
- Clark W.H., Elder D.E., Guerry D., Braitman L.E., Trock B.J., Schultz D., Synnestvedt M., Halpern A.C. (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81:1893-904.
- Coutte L., Dreyer C., Sablin M.P., Faivre S., Raymond E. [PI3K-AKT-mTOR pathway and cancer]. *Bull Cancer* 99:173-80.
- Dai Q.S., Hua R.X., Zeng R.F., Long J.T., Peng Z.W. (2014) XPC gene polymorphisms contribute to bladder cancer susceptibility: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35:447-53

- de Aquino M.T., Malhotra A., Mishra M.K., Shanker A.(2015) Challenges and future perspectives of T cell immunotherapy in cancer. *Immunol Lett.* 166:117-33.
- Debatin K.M. (1994) APO-1 (CD95) and Bcl-2: determinants of cell death in the human thymus. *Res Immunol* 145:146-51; discussion 155-8.
- Dong L.Q., and Liu F. (2005) PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 289:187-196.
- Dreyer C., Sablin M.P., Faivre S., Raymond E. (2009) [Topics in mTOR pathway and its inhibitors]. *Bull Cancer* 96:87-94.
- Duan S., Cermak L., Pagan J.K., Rossi M., Martinengo C., di Celle P.F., Chapuy B., Shipp M., Chiarle R., Pagano M. (2012) FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. *Nature* 481:90-3.
- Dydensborg A.B., Rose A.A., Wilson B.J., Grote D., Paquet M., Giguere V., Siegel P.M., Bouchard M. (2009) GATA3 inhibits breast cancer growth and pulmonary breast cancer metastasis. *Oncogene* 28:2634-42.
- Ecke T.H., Schlechte H.H., Schulze G., Lenk S.V., Loening S.A. (2005) Four tumour markers for urinary bladder cancer--tissue polypeptide antigen (TPA), HER-2/neu (ERB B2), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and TP53 mutation. *Anticancer Res* 25:635-41.
- Eissa S., Badr S., Elhamid S.A., Helmy A.S., Nour M., Esmat M. The value of combined use of survivin mRNA and matrix metalloproteinase 2 and 9 for bladder cancer detection in voided urine. *Dis Markers* 34:57-62.
- Espinosa V., Rivera A. (2012) Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine* 58:100-6.
- Eyerich S., Eyerich K., Pennino D., Carbone T., Nasorri F., Pallotta S., Cianfarani F., Odorisio T., Traidl-Hoffmann C., Behrendt H., Durham S.R., Schmidt-Weber C.B., Cavani A. (2009) Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119:3573-85.
- Fakhfakh R., Hsairi M., Achour N. (2005) Epidemiology and prevention of tobacco use in Tunisia: a review. *Prev Med* 40:652-7.
- Faraj S.F., Munari E., Guner G., Taube J., Anders R., Hicks J., Meeker A., Schoenberg M., Bivalacqua T., Drake C., Netto G.J. (2015) Assessment of tumoral PD-L1 expression and intratumoral CD8+ T cells in urothelial carcinoma. *Urology* 85:703 e1-6.
- Faustman D.L., Davis M. TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine. *Front Immunol* 4:478.

- Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di Ilio C., De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 4:330-49.
- Feng W., Li Y., Shen L., Cai X.W., Zhu Z.F., Chang J.H., Xiang J.Q., Zhang Y.W., Chen H.Q., Fu X.L. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with completely resected stage IIIA(N2) non-small cell lung cancer. *Oncotarget*.
- Felix A.S., Soliman A.S., Khaled H., Zaghloul M.S., Banerjee M., El-Baradie M., El-Kalawy M., Abd-Elsayed A.A., Ismail K., Hablas A., Seifeldin I.A., Ramadan M., Wilson M.L. (2008) The changing patterns of bladder cancer in Egypt over the past 26 years. *Cancer Causes Control* 19:421-9.
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., and Parkin D.M. (2010) GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase.
- Finnberg N., Klein-Szanto A.J., El-Deiry W.S. (2008) TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *J Clin Invest* 118:111-23.
- Fischer S., Gisselbrecht S. (1998) Inhibition de l'apoptose : une des fonctions de la kinase Akt/PKB. *Hématologie* 4.
- Franke T.F., Tartof K.D., Tschlis P.N. (1994) The SH2-like Akt homology (AH) domain of c-akt is present in multiple copies in the genome of vertebrate and invertebrate eucaryotes. Cloning and characterization of the *Drosophila melanogaster* c-akt homolog Dakt1. *Oncogene* 9:141-8.
- Freedman N.D., Silverman D.T., Hollenbeck A.R., Schatzkin A., Abnet C.C. (2011) Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 306:737-45.
- Fridman W.H., Pages F., Sautes-Fridman C., Galon J. (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12:298-306.
- Fujimoto Y., Hasegawa Y., Kato N., Sakai S., Kuriyama M., Kawada Y., Nishiura T., Takeuchi T., Isogai K. (1983) The study of infiltrating lymphocytes in the tissues of bladder carcinoma. *Hinyokika Kyo* 29:1037-45.
- Gandhi R., Laroni A., Weiner H.L. (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221:7-14.
- Garcia A.J., Tom C., Guemes M., Polanco G., Mayorga M.E., Wend K., Miranda-Carboni G.A., Krum S.A. ERalpha signaling regulates MMP3 expression to induce FasL cleavage and osteoclast apoptosis. *J Bone Miner Res* 28:283-90.
- Garofalo R.S., Orena S.J., Rafidi K., Torchia A.J., Stock J.L., Hildebrandt A.L., Coskran T., Black S.C., Brees D.J., Wicks J.R., McNeish J.D., Coleman K.G. (2003) Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112:197-208.

- Gasser S., Orsulic S., Brown E.J., Raulet D.H. (2005) The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436:1186-90.
- Grando S.A. (2014) Connections of nicotine to cancer. *Nat Rev Cancer* 14:419-29.
- Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R., Ferguson T.A. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270:1189-92.
- Grosse-Wilde A., Voloshanenko O., Bailey S.L., Longton G.M., Schaefer U., Csernok A.I., Schutz G., Greiner E.F., Kemp C.J., Walczak H. (2008) TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *J Clin Invest* 118:100-10.
- Hafez N., Petrylak D.P. (2015) Could PD-L1 prove to be an effective therapeutic target for bladder cancer? *Immunotherapy* 7:1-2.
- Haribhai D., Lin W., Relland L.M., Truong N., Williams C.B, Chatila T.A. (2007) Regulatory T Cells Dynamically Control the Primary Immune Response to Foreign Antigen. *J Immunol* 178:2961-2972.
- Hayakawa Y., Screpanti V., Yagita H., Grandien A., Ljunggren H.G., Smyth M.J., Chambers B.J. (2004) NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* 172:123-9.
- Hernandez S., Lopez-Knowles E., Lloreta J., Kogevinas M., Jaramillo R., Amoros A., Tardon A., Garcia-Closas R., Serra C., Carrato A., Malats N., Real F.X. (2005) FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin Cancer Res* 11:5444-50.
- Herr H.W., Jakse G., Sheinfeld J. (1990) The T1 bladder tumor. *Semin Urol* 8:254-61.
- Higgins J.P., Kaygusuz G., Wang L., Montgomery K., Mason V., Zhu S.X., Marinelli R.J., Presti J.C., Jr., van de Rijn M., Brooks J.D. (2007) Placental S100 (S100P) and GATA3: markers for transitional epithelium and urothelial carcinoma discovered by complementary DNA microarray. *Am J Surg Pathol* 31:673-80.
- Hirahara K., Ghoreschi K., Laurence A., Yang X.P., Kanno Y., O'Shea J.J. (2010) Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:425-34.
- Hoffmann T.K., Dworacki G., Tsukihiro T., Meidenbauer N., Gooding W., Johnson J.T., Whiteside T.L. (2002) Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 8:2553-62.
- Holmang S., Hedelin H., Anderstrom C., Holmberg E., Busch C., Johansson S.L. (1999) Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol* 162:702-7.

- Huang J., Yang Y., Yang J., Li X. Regenerating gene family member 4 promotes growth and migration of gastric cancer through protein kinase B pathway. *Int J Clin Exp Med* 7:3037-44.
- Idriss H.T., Naismith J.H. (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50:184-95.
- Igney F.H., Krammer P.H. (2005) Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother* 54:1127-36.
- Islam M.R., Ellis I.R., Macluskey M., Cochrane L., Jones S.J. (2014) Activation of Akt at T308 and S473 in alcohol, tobacco and HPV-induced HNSCC: is there evidence to support a prognostic or diagnostic role? *Exp Hematol Oncol* 3:25.
- Ivanova E.A., Orekhov A.N. (2015) T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *Biomed Res Int* 2015:327470.
- Jacquelot N., Roberti M.P., Enot D.P., Rusakiewicz S., Semeraro M., Jegou S., Flores C., Chen L., Kwon B.S., Borg C., Weide B., Aubin F., Dalle S., Kohrt H., Ayyoub M., Kroemer G., Marabelle A., Cavalcanti A., Eggermont A., Zitvogel L. (2016) Immunophenotyping of stage III melanoma reveals parameters associated with patient prognosis. *J Invest Dermatol*.
- Josefowicz S.Z., Rudensky A. (2009) Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616-25.
- Kantor A.F., Hartge P., Hoover R.N., Fraumeni J.F.Jr. (1988) Epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder. *Cancer Res* 48:3853-5.
- Karam J.A., Lotan Y., Ashfaq R., Sagalowsky A.I., Shariat S.F. (2007) Survivin expression in patients with non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* 70:482-6.
- Kiemeny L.A., Witjes J.A., Heijbroek R.P., Debruyne F.M., Verbeek A.L. (1994) Dysplasia in normal-looking urothelium increases the risk of tumour progression in primary superficial bladder cancer. *Eur J Cancer* 30A:1621-5.
- Kirkali Z., Chan T., Manoharan M., Algaba F., Busch C., Cheng L., Kiemeny L., Kriegmair M., Montironi R., Murphy W.M., Sesterhenn I.A., Tachibana M., Weider J. (2005) Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 66:4-34.
- Knoops L., Renauld J.C. (2004) IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis. *Growth Factors* 22:207-15.
- Koebel C.M., Vermi W., Swann J.B., *et al.* (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450: 903-7.

- Konno R., Takano T., Sato S., Yajima A. (2000) Serum soluble fas level as a prognostic factor in patients with gynecological malignancies. *Clin Cancer Res* 6:3576-80.
- Krammer P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-95.
- Kuper H., Boffetta P., Adami H.O. (2002) Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med* 252:206-24.
- Kurth K., Denis L., Sylvester R., de Pauw M. (1992) The natural history and the prognosis of treated superficial bladder cancer. EORTC GU Group. *Prog Clin Biol Res* 378:1-7.
- Ladoire S., Arnould L., Apetoh L., Coudert B., Martin F., Chauffert B., Fumoleau P., Ghiringhelli F. (2008) Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 14:2413-20.
- Lammers R.J.M., Witjes W.P.J., Hendricksen K., Caris C.T.M., Janzing-Pastors M.H.C., Witjes J.A. (2011) Smoking Status Is a Risk Factor for Recurrence After Transurethral Resection of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer . *EUROPEAN UROLOGY* 60 :713-720.
- Lastwika K.J., Wilson W., 3rd, Li Q.K., Norris J., Xu H., Ghazarian S.R., Kitagawa H., Kawabata S., Taube J.M., Yao S., Liu L.N., Gills J.J., Dennis P.A. Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT-mTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 76:227-38.
- Lavrik I., Golks A., Krammer P.H. (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118:265-7.
- Lee C., Kim K.H., You D., Jeong I.G., Hong B., Hong J.H., Ahn H., Kim C.S. Smoking and survival after radical cystectomy for bladder cancer. *Urology* 80:1307-12.
- Lee J.J., Loh K., Yap Y.S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med* 12:342-54.
- Lemke J., von Karstedt S., Zinngrebe J., Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ* 21:1350-64.
- Li Q., Peng J., Li X.H., Liu T., Liang Q.C., Zhang G.Y. Clinical significance of Fas and FasL protein expression in gastric carcinoma and local lymph node tissues. *World J Gastroenterol* 16:1274-8.
- Li Y., Ishiguro H., Kawahara T., Kashiwagi E., Izumi K., Miyamoto H. (2014) Loss of GATA3 in bladder cancer promotes cell migration and invasion. *Cancer Biol Ther* 15:428-35.

- Lin Z., Kim H., Park H., Kim Y., Cheon J., Kim I. (2003) The expression of bcl-2 and bcl-6 protein in normal and malignant transitional epithelium. *Urol Res* 31:272-5.
- Lu Y., Hong S., Li H., Park J., Hong B., Wang L., Zheng Y., Liu Z., Xu J., He J., Yang J., Qian J., Yi Q. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest* 122:4160-71.
- Ludwig A.T., Moore J.M., Luo Y., Chen X., Saltsgaver N.A., O'Donnell M.A., Griffith T.S. (2004) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for Bacillus Calmette-Guerin-induced antitumor activity. *Cancer Res* 64:3386-90.
- Ma C.S., Deenick E.K., Batten M., Tangye S.G. (2012) The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 209:1241-53.
- Ma J.C., Zhang Q.C. (2015) [Role of TRAIL in the treatment of prostate cancer: An update]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 21:941-4.
- MacLennan G.T., Kirkali Z., Cheng L. (2007) Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol* 51:889-97; discussion 897-8.
- Mahdavifar N., Ghoncheh M., Pakzad R., Momenimovahed Z., Salehiniya H. (2016) Epidemiology, Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with the Development Index in the World. *Asian Pac J Cancer Prev* 17:381-6.
- Maher S., Toomey D., Condrón C., Bouchier-Hayes D. (2002) Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 80:131-7.
- Mahmoud S., Lee A., Ellis I., Green A. CD8(+) T lymphocytes infiltrating breast cancer: A promising new prognostic marker? *Oncoimmunology* 1:364-365.
- Malats N., Real F.X. (2015) Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 29:177-89.
- Malleter M., Tauzin S., Bessedé A., Castellano R., Goubard A., Godey F., Leveque J., Jezequel P., Campion L., Campone M., Ducret T., MacGrogan G., Debure L., Collette Y., Vacher P., Legembre P. (2013) CD95L cell surface cleavage triggers a pro-metastatic signaling pathway in triple negative breast cancer. *American Association for Cancer Research* doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1794.
- Martinache G., Zerbib M., Descazeaud A., Debre B., Peyromaure M. (2008) [PTa bladder tumours: prognostic factors of recurrence and progression]. *Prog Urol* 18:35-40.
- Martinez G.J., Nurieva R.I., Yang X.O., Dong C. (2008) Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1143:188-211.

- Meliker J.R., Slotnick M.J., Avruskin G.A., Kaufmann A., Fedewa S.A., Goovaerts P., Jacquez G.J., Nriagu J.O. (2007) Individual lifetime exposure to inorganic arsenic using a space-time information system. *Int Arch Occup Environ Health* 80:184-97.
- Merino D., Lalaoui N., Morizot A., Schneider P., Solary E., Micheau O. (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26:7046-55.
- Micheau O., Tschopp J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-90.
- Mittal D., Gubin M.M., Schreiber R.D., Smyth M.J. (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27:16-25.
- Miyamoto H., Izumi K., Yao J.L., Li Y., Yang Q., McMahon L.A., Gonzalez-Roibon N., Hicks D.G., Tacha D., Netto G.J. (2012) GATA binding protein 3 is down-regulated in bladder cancer yet strong expression is an independent predictor of poor prognosis in invasive tumor. *Hum Pathol* 43:2033-40.
- Mizutani Y., Hongo F., Sato N., Ogawa O., Yoshida O., Miki T. (2001) Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. *Cancer* 92:287-93.
- Morales A., Eidinger D., Bruce A.W. (1976) Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116:180-3.
- Mori E., Thomas M., Motoki K., Nakazawa K., Tahara T., Tomizuka K., Ishida I., Kataoka S. (2004) Human normal hepatocytes are susceptible to apoptosis signal mediated by both TRAIL-R1 and TRAIL-R2 *Cell Death and Differentiation* 11: 203-207.
- Muenst S., Laubli H., Soysal S.D., Zippelius A., Tzankov A., Hoeller S. (2016) The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *the Journal of Internal Medicine* doi: 10.1111/joim.12470.
- Nakamura J.L., Karlsson A., Arvold N.D., Gottschalk A.R., Pieper R.O., Stokoe D., Haas-Kogan D.A. (2005) PKB/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 71:215-222.
- Nesi G., Nobili S., Cai T., Caini S., Santi R. (2015) Chronic inflammation in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch* 467:623-633.
- Neuzillet Y., Roupret M., Wallerand H., Pignot G., Larre S., Irani J., Davin J.L., Moreau J.L., Soulie M., Pfister C. [Diagnosis and management of adverse events occurring during BCG therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): review of the Cancer Committee of the French Association of Urology]. *Prog Urol* 22:989-98.

- Nunez-Nateras R., Castle E.P., Protheroe C.A., Stanton M.L., Ocal T.I., Ferrigni E.N., Ochkur S.I., Jacobsen E.A., Hou Y.X., Andrews P.E., Colby T.V., Lee N.A., Lee J.J. Predicting response to bacillus Calmette-Guerin (BCG) in patients with carcinoma in situ of the bladder. *Urol Oncol* 32:45 e23-30.
- O'Connell J., O'Sullivan G.C., Collins J.K., Shanahan F. (1996) The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184:1075-82.
- O'Connell J., Bennett M.W., O'Sullivan G.C., O'Callaghan J., Collins J.K., Shanahan F. (1999) Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:457-63.
- Ogihara K., Kikuchi E., Yuge K., Ito Y., Tanaka N., Matsumoto K., Miyajima A., Asakura H., Oya M. (2015) Refraining from Smoking for 15 Years or More Reduced the Risk of Tumor Recurrence in Non-muscle Invasive Bladder Cancer Patients. *Ann Surg Oncol*.
- Okroj M., Österborg A., Blom A.M. (2013) Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer Treat Rev* 39:632-9.
- O'Reilly L.A., Tai L., et al. (2009) Membrane-bound fas ligand only is essential for fas-induced apoptosis. *Nature* 461:659-663.
- Orlinick J.R., Vaishnav A.K., Elkon K.B. (1999) Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol* 18:293-308.
- Ouerhani S., Rouissi K., Marrakchi R., Ben Slama M.R., Sfaxi M., Chebil M., ElGaaied A.B. (2009a) Combined effect of NAT2, MTR and MTHFR genotypes and tobacco on bladder cancer susceptibility in Tunisian population. *Cancer Detect Prev* 32:395-402.
- Ouerhani S., Rouissi K., Kourda N., Marrakchi R., Bougatef K., Riadh Ben Slama M., Sfaxi M., Chebil M., Ben Jilani S., Benammar Elgaaied A. (2009b) Combined analysis of smoking, TP53, and FGFR3 mutations in Tunisian patients with invasive and superficial high-grade bladder tumors. *Cancer Invest* 27:998-1007.
- Ouyang W., Lohning M., Gao Z., Assenmacher M., Ranganath S., Radbruch A., Murphy K.M. (2000) Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12:27-37.
- Owonikoko T.K., Hossain M.S., Bhimani C., Chen Z., Kim S., Ramalingam S.S., Sun S.Y., Shin D.M., Waller E.K., Khuri F.R. Soluble FAS ligand as a biomarker of disease recurrence in differentiated thyroid cancer. *Cancer* 119:1503-11.
- Patnaik A., Ricart A., Cooper J., Papadopoulos K., Beeram M., Mita C., et al. (2007) A phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of sorafenib (S), a multi-targeted kinase inhibitor in combination with temsirolimus (T), an mTOR inhibitor in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 25: 3512–3512.

- Petrovich Z., Jozsef G., Brady L.W. (2001) Radiotherapy for carcinoma of the bladder: a review. *Am J Clin Oncol* 24:1-9.
- Peyvandi S., Buart S., Samah B., Vétizou M., Zhang Y., Durrieu L., Polrot M., Chouaib S., Benihoud K., Louache F., Karray S. (2015) Fas Ligand Deficiency Impairs Tumor Immunity by Promoting an Accumulation of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res* 75:4292-301.
- Pichon M.F. (2004) Role of tumoral markers in the biological behaviour of solid tumours. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 19:241–249.
- Pinto A.E., Andre S., Silva G., Vieira S., Santos A.C., Dias S., Soares J. (2009) BCL-6 oncoprotein in breast cancer: loss of expression in disease progression. *Pathobiology* 76:235-42.
- Pira E., Piolatto G., Negri E., Romano C., Boffetta P., Lipworth L., McLaughlin J.K., La Vecchia C. (2010) Bladder cancer mortality of workers exposed to aromatic amines: a 58-year follow-up. *J Natl Cancer Inst* 102:1096-9.
- Platonova S., Cherfils-Vicini J., Damotte D., Crozet L., Vieillard V., Validire P., Andre P., Dieu-Nosjean M.C., Alifano M., Regnard J.F., Fridman W.H., Sautes-Fridman C., Cremer I. (2011) Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 71:5412-22.
- Ploeg M., Aben K.K., Kiemeny L.A. (2009) The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 27:289-93.
- Porten S.P., Leapman M.S., Greene K.L. (2015) Intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer. *Indian J Urol* 31:297-303.
- Qian C.N., Furge K.A., Knol J., Huang D., Chen J., Dykema K.J., Kort E.J., Massie A., Khoo S.K., Vanden Beldt K., Resau J.H., Anema J., Kahnoski R.J., Morreau H., Camparo P., Comperat E., Sibony M., Denoux Y., Molinie V., Vieillefond A., Eng C., Williams B.O., Teh B.T. (2009) Activation of the PI3K/AKT pathway induces urothelial carcinoma of the renal pelvis: identification in human tumors and confirmation in animal models. *Cancer Res* 69:8256-64.
- Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. (2014) The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. *Nat Rev Urol* 11:153-62.
- Risch A., Wallace D.M., Bathers S., Sim E. (1995) Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum Mol Genet* 4:231-6.
- Rodriguez Pinilla S.M., Roncador G., Rodriguez-Peralto J.L., Mollejo M., Garcia J.F., Montes-Moreno S., Camacho F.I., Ortiz P., Limeres-Gonzalez M.A., Torres A., Campo E., Navarro-Conde P., Piris M.A. (2009) Primary cutaneous CD4+ small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma expresses follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol* 33:81-90.

- Rouissi K., Ouerhani S., Marrakchi R., Ben Slama M.R., Sfaxi M., Ayed M., Chebil M., El Gaaied A.B. (2009) Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genet Cytogenet* 190:101-7.
- Rouissi K., Ouerhani S., Hamrita B., Bougatef K., Marrakchi R., Cherif M., Ben Slama M.R., Bouzouita M., Chebil M., Ben Ammar Elgaaied A. (2011a) Smoking and polymorphisms in xenobiotic metabolism and DNA repair genes are additive risk factors affecting bladder cancer in Northern Tunisia. *Pathol Oncol Res* 17:879-86.
- Rouissi K., Bahria I.B., Bougatef K., Marrakchi R., Stambouli N., Hamdi K., Cherif M., Ben Slama M.R., Sfaxi M., Othman F.B., Chebil M., Elgaaied A.B., Ouerhani S. (2011b) The effect of tobacco, XPC, ERCC2 and ERCC5 genetic variants in bladder cancer development. *BMC Cancer* 11:101.
- Roychoudhuri R., Eil R.L., Restifo N.P. (2015) The interplay of effector and regulatory T cells in cancer. *Current Opinion in Immunology* 33, 101-111.
- Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-101.
- Sarris E.G., Saif M.W., Syrigos K.N. (2012) The Biological Role of PI3K Pathway in Lung Cancer. *Pharmaceuticals* 5:1236-1264.
- Sauter G.A.F., Amin M. (2004) Tumours of the urinary system: non invasiveurothelialneoplasias. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon, France: IRAC press.
- Savic-Radojevic A., Djukic T., Simic T., Pljesa-Ercegovac M., Dragicevic D., Pekmezovic T., Cekerevac M., Santric V., Matic M. (2013) GSTM1-null and GSTA1-low activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage in bladder cancer. *Redox Rep* 18:1-7.
- Scarpato K.R., Morgans A.K., Moses K.A. (2015) Optimal management of muscle-invasive bladder cancer - a review. *Res Rep Urol* 7:143-51.
- Schaal C., Chellappan S.P. (2014) Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Mol Cancer Res* 12:14-23.
- Schneider P., Holler N., Bodmer J.L., Hahne M., Frei K., Fontana A., Tschopp J. (1998) Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187:1205-13.
- Schneider P., Bodmer J.L., Holler N., Mattmann C., Scuderi P., Terskikh A., Peitsch M.C., Tschopp J. (1997) Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem* 272:18827-33.

- Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565-70.
- Schuhmacher-Wolz U., Dieter H.H., Klein D., Schneider K. (2009) Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects. *Crit Rev Toxicol* 39:271-98.
- Schulte M., Reiss K., Lettau M., Maretzky T., Ludwig A., Hartmann D., de Strooper B., Janssen O., Saftig P. (2007) ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ* 14:1040-9.
- Sconocchia G., Eppenberger S., Spagnoli G.C., Tornillo L., Drosler R., Caratelli S., Ferrelli F., Coppola A., Arriga R., Lauro D., Iezzi G., Terracciano L., Ferrone S. (2014) NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncoimmunology* 3:e952197.
- Secchiero P., Gonelli A., Carnevale E., Milani D., Pandolfi A., Zella D., Zauli G. (2003) TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation* 107:2250-6.
- Sfakianos J.P., Shariat S.F., Favaretto R.L., Rioja J., Herr H.W. Impact of smoking on outcomes after intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for urothelial carcinoma not invading muscle of the bladder. *BJU Int* 108:526-30.
- Shariat S.F., Ashfaq R., Karakiewicz P.I., Saeedi O., Sagalowsky A.I., Lotan Y. (2007) Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* 109:1106-13.
- Sharma P., Shen Y., Wen S., Yamada S., Jungbluth A.A., Gnjatic S., Bajorin D.F., Reuter V.E., Herr H., Old L.J., Sato E. (2007) CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3967-72.
- Snowdon J., Boag S., Feilotter H., Izard J., Siemens D.R. A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *Can Urol Assoc J* 7:28-32.
- Soussi T., Beroud C. (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1:233-40.
- Spierings D.C., de Vries E.G., Vellenga E., van den Heuvel F.A., Koornstra J.J., Wesseling J., Hollema H., de Jong S. (2004) Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52:821-31.
- Stober U. (1978) [Influence of T-lymphocytes in bladder cancer on appearance and infiltration of recurrences (author's transl)]. *Urologe A* 17:296-302.

- Strand S., Hofmann W.J., Hug H., Muller M., Otto G., Strand D., Mariani S.M., Stremmel W., Krammer P.H., Galle P.R. (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2:1361-6.
- Stuckey D.W., Shah K. (2013) TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. *Trends Mol Med* 19:685-94.
- Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169-78.
- Suh J.H., Won K.Y., Kim G.Y., Bae G.E., Lim S.J., Sung J.Y., Park Y.K., Kim Y.W., Lee J. (2015) Expression of tumoral FOXP3 in gastric adenocarcinoma is associated with favorable clinicopathological variables and related with Hippo pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 8:14608-18.
- Sun C.H., Chang Y.H., Pan C.C. Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Histopathology* 58:1054-63.
- Sundararajan S., Vogelzang N.J. (2015) Anti-PD-1 and PD-L1 therapy for bladder cancer: what is on the horizon? *Future Oncol* 11:2299-306.
- Sunshine J., Taube J.M. (2015) PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 23:32-8.
- Sylvester R.J., van der Meijden A.P., Oosterlinck W., Witjes J.A., Bouffieux C., Denis L., Newling D.W., Kurth K. (2006) Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 49:466-5; discussion 475-7.
- Takahashi T., Tanaka M., Inazawa J., Abe T., Suda T., Nagata S. (1994) Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 6:1567-74.
- Takeda K., Cretney E., Hayakawa Y., Ota T., Akiba H., Ogasawara K., Yagita H., Kinoshita K., Okumura K., Smyth M.J. (2005) TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* 105:2082-9.
- Tanaka M., Itai T., Adachi M., Nagata S. (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4:31-6.
- Teng M.W.L., Galon J., Fridman W.H., Smyth M.J. (2015) From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest* 125:3338-3346.

- Teng M.W., Vesely M.D., Duret H., McLaughlin N., Towne J.E., Schreiber R.D., Smyth M.J. (2007) Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res* 72:3987-96.
- Thompson I.M., Peek M., Rodriguez F.R. (1987) The impact of cigarette smoking on stage, grade and number of recurrences of transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 137:401-3.
- Torre L.A., Freddie Bray F., Siegel R.L., Ferly J., Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015) Global Cancer Statistics, 2012 *CA CANCER J CLIN* 65:87–108.
- Tosolini M., Kirilovsky A., Mlecnik B., Fredriksen T., Mauger S., Bindea G., Berger A., Bruneval P., Fridman W.H., Pages F., Galon J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 71:1263-71.
- Trifari S., Kaplan C.D., Tran E.H., Crellin N.K., Spits H. (2009) Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 10:864-71.
- Tsurutani J., Castillo S.S., Brognard J., Granville C.A., Zhang C., Gills J.J., Sayyah J., Dennis P.A. (2005) Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis* 26:1182-95.
- Ueno T., Toi M., Tominaga T. (1999) Circulating soluble Fas concentration in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 5:3529-33.
- Utz D.C., Hanash K.A., Farrow G.M. (1970) The plight of the patient with carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 103:160-4.
- Van der Meijden A.P. (1998) Bladder cancer. *BMJ* 317:1366-9.
- Volanis D., Kadiyska T., Galanis A., Delakas D., Logotheti S., Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol Lett* 193:131-7.
- Volpert O.V., Fong T., Koch A.E., Peterson J.D., Waltenbaugh C., Tepper R.I., Bouck N.P. (1998) Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med* 188:1039-46.
- Wajant H., Gerspach J., Pfizenmaier K. Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett* 332:163-74.
- Walleranda H., Robert G., Bernharda J.C., Ravaud A., Ferrière J.M. (2008) Les thérapies ciblées du cancer de vessie localement avancé et/ou métastatique Targeted therapy for locally advanced and/or metastatic bladder cancer. *Progrès en urologie* 18 :407-417.
- Wallerand H. (2009) [Intravesical chemotherapy and bladder cancer]. *Prog Urol* 19:868-71.

- Wallerand H., Cai Y., Wainberg Z.A., Garraway I., Lascombe I., Nicolle G., Thiery J.P., Bittard H., Radvanyi F., Reiter R.R. Phospho-Akt pathway activation and inhibition depends on N-cadherin or phospho-EGFR expression in invasive human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol* 28:180-8.
- Wang Y.Q., Xu M.D., Weng W.W., Wei P., Yang Y.S., Du X. (2015) BCL6 is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in ovarian cancer. *Am J Cancer Res* 5:255-66.
- Ward E., Carpenter A., Markowitz S., Roberts D., Halperin W. (1991) Excess number of bladder cancers in workers exposed to ortho-toluidine and aniline. *J Natl Cancer Inst* 83:501-6.
- Ward E.M., Sabbioni G., DeBord D.G., Teass A.W., Brown K.K., Talaska G.G., Roberts D.R., Ruder A.M., Streicher R.P. (1996) Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. *J Natl Cancer Inst* 88:1046-52.
- West K.A., Castillo S.S., Dennis P.A. (2002) Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 5:234-48.
- West K.A., Brognard J., Clark A.S., Linnoila IR, Yang X., Swain S.M., Harris C., Belinsky S., Dennis P.A. (2003) Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 111:81-90.
- Winerdal M.E., Marits P., Winerdal M., Hasan M., Rosenblatt R., Tolf A., Selling K., Sherif A., Winqvist O. (2011) FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int* 108:1672-8.
- Willingham S.B., Volkmer J.P., Gentles A.J., Sahoo D., Dalerba P., Mitra S.S et al. (2012) The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:6662-7.
- Wong R.S.Y. (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 30:87.
- Wu Q., Liu X., Yan H., He Y.H., Ye S., Cheng X.W., Zhu G.L., Wu W.Y., Wang X.N., Kong X.J., Xu X.C., Lobie P.E., Zhu T., Wu Z.S. B-cell lymphoma 6 protein stimulates oncogenicity of human breast cancer cells. *BMC Cancer* 14:418.
- Wu X., Obata T., Khan Q., Highshaw R.A., De Vere White R., Sweeney C. (2004) The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. *BJU Int* 93:143-50.

- Wu Y., Enting D., Rudman S., Chowdhury S. Immunotherapy for urothelial cancer: from BCG to checkpoint inhibitors and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther* 15:509-23.
- Xia Z., Zhang N., Ding D. (2014) Proliferation and migration of hepatoblastoma cells are mediated by IRS-4 via PI3K/Akt pathways. *Int J Clin Exp Med* 7:3763-3769.
- Xu J., Zhou J.Y., Wei W.Z., Wu G.S. (2010) Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells. *PLoS One* 5:e10226.
- Yang Y. (2015) Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer *J Clin Invest* 125:3335-7.
- Yang Z.Z., Tschopp O., Baudry A., Dümmler B., Hynx D., Hemmings B.A. (2004) "Physiological functions of protein kinase B/Akt". *Biochem. Soc. Trans* 32:350–354.
- Yoneyama R., Aoshiba K., Furukawa K., Saito M., Kataba H., Nakamura H., Ikeda N. (2016) Nicotine enhances hepatocyte growth factor-mediated lung cancer cell migration by activating the alpha7 nicotine acetylcholine receptor and phosphoinositide kinase-3-dependent pathway. *Oncol Lett* 11:673-677.
- Yoon N.K., Maresh E.L., Shen D., Elshimali Y., Apple S., Horvath S., Mah V., Bose S., Chia D., Chang H.R., Goodglick L. (2010) Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol* 41:1794-801.
- Yoshii M., Tanaka H., Ohira M., Muguruma K., Iwauchi T., Lee T., Sakurai K., Kubo N., Yashiro M., Sawada T., Hirakawa K. (2012) Expression of Forkhead box P3 in tumour cells causes immunoregulatory function of signet ring cell carcinoma of the stomach. *Br J Cancer* 106:1668-74.
- Yuan T.L, Cantley L.C. (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27: 5497–5510.
- Yuge K., Kikuchi E., Hagiwara M., Yasumizu Y., Tanaka N., Kosaka T., Miyajima A., Oya M. (2015) Nicotine Induces Tumor Growth and Chemoresistance through Activation of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther* 14:2112-20.
- Zeegers M.P., Kellen E., Buntinx F., van den Brandt P.A. (2004) The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 21:392-401.
- Zeng Z., Sarbassov dos D., Samudio I.J., Yee K.W., Munsell M.F., Ellen Jackson C., Giles F.J., Sabatini D.M., Andreeff M., Konopleva M. (2007) Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 109:3509-12.

- Zhi Y., Yu J., Liu Y., Wei Q., Yuan F., Zhou X., Song B., Chen Z., Yang J. (2012) Interaction between polymorphisms of DNA repair genes significantly modulated bladder cancer risk. *Int J Med Sci* 9:498-505.
- Zhou X., Zhang G., Tian Y. (2015) p53 Status correlates with the risk of recurrence in non-muscle invasive bladder cancers treated with Bacillus Calmette-Guerin: a meta-analysis. *PLoS One* 10:e0119476.
- Zhu Z., Zhang J., Jiang W., Zhang X., Li Y., Xu X. (2015) Risks on N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 8:3715-20.
- Zou W., Restifo N.P. (2010) TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10: 248-256.

Résumé : [en français / 1700 caractères maximum, espaces compris]

Le cancer de la vessie occupe en Tunisie la deuxième place de l'ensemble des cancers chez l'homme. Ce cancer représente un vrai problème de santé publique, avec une surveillance et suivi clinique à long terme en raison de l'importance des fréquences de récurrences et une mortalité due principalement aux rechutes par métastase. Les approches thérapeutiques conventionnelles de ce cancer basées sur la chimiothérapie, restent trop souvent inefficaces. L'immunothérapie a été développée depuis plusieurs années, le BCG est utilisé comme traitement adjuvant dans les cancers superficiels de la vessie mais son efficacité reste limitée à cause de la fréquence des mauvais répondeurs. Les recherches moléculaires ont permis d'identifier un ensemble de systèmes responsables de l'adhésion intercellulaire et de l'interaction entre la cellule cancéreuse et la matrice extracellulaire qui sont modulés par l'état cancéreux et fournissent d'autres marqueurs tumoraux potentiels. Bien que les recherches aient permis d'accumuler une quantité importante d'information sur les molécules exprimées au niveau de cancer de la vessie, et sur les différents **types** de marqueurs biologiques qui peuvent servir dans le pronostic, aucun marqueur tumoral n'est utilisé à ce jour pour le pronostic du cancer de la vessie.

L'objectif de cette thèse est donc la recherche de marqueurs sérologiques et moléculaires à valeur pronostique dans le cancer de la vessie.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié l'infiltration des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral du cancer de la vessie. Elle a focalisé sur trois facteurs de transcriptions des lymphocytes T activés (Th1, Th2 et Thf) qui sont respectivement T-bet, GATA-3 et bcl-6. L'analyse par qPCR en temps réel, a permis de quantifier l'expression de ces facteurs immunologiques, cette expression a été analysée en fonction des données clinico-pathologiques des malades et de la survie globale des patients.

Une surexpression de T-bet a été observée au sein de groupe des malades à stade invasif et de haut grade, cependant, la surexpression de GATA-3 et bcl-6 a été corrélée au stade superficiel et de bas grade. La survie a été corrélée avec le groupe des malades sans histoires de récurrence ou progression et avec la surexpression de bcl-6 et GATA-3. Selon le statut tabagique, nous avons trouvé des associations significatives entre l'expression de ces gènes et l'intensité de la consommation du tabac.

En effet, les gros fumeurs expriment moins GATA-3 et bcl-6. Cependant les malades qui expriment fortement T-bet au niveau tumoral répondent mieux au traitement BCG par rapport aux malades qui expriment faiblement T-bet.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons visé la détection de certaines protéines solubles dans le sérum des malades atteints du cancer de la vessie, en utilisant comme technique le dosage ELISA, et évalué leur utilité en tant que marqueurs pronostiques pour assurer le suivi des patients. Pour réaliser cette étude, deux voies de la famille du TNF, la voie Fas /FasL et la voie TRAIL/TRAIL-Rs, ont été étudiées en focalisant sur le rôle de leur ligand sous leur forme soluble. Cette étude est réalisée sur des sérums de différents stades et grades, prélevés chez 64 patients atteints d'un cancer de la vessie.

L'analyse statistique montre qu'une surexpression de sFasL (FasL soluble) chez les malades par rapport aux sujets sains, ainsi qu'une surexpression de cette cytokine chez les malades à un stade superficiel et de bas grade. Concernant sTRAIL (TRAIL soluble) un taux plus élevé a été détecté chez les malades de stade superficiel et de bas grade, sans aucune différence avec les sujets sains. Le rôle anti-tumoral de ces deux cytokines solubles a été confirmé sur deux lignées de cancer de la vessie une de bas grade et l'autre de haut grade montrant que le traitement de ces cellules avec le sérum riche en sFasL ou sTRAIL diminue la viabilité cellulaire in vitro.

Dans la troisième partie de cette thèse, l'objectif était tester l'activation d'une protéine Kinase connue pour son rôle pro-tumoral dans plusieurs cancers « Akt Ser473 ». L'expression de ce marqueur a été analysée en fonction des données clinico-pathologiques, épidémiologiques et de survie globale des patients.

Cette étude a été réalisée sur des biopsies de différents stades et grades, prélevées chez 72 patients atteints d'un cancer de la vessie ainsi que sur 7 biopsies de tissu sain adjacent.

L'analyse par western blot a montré une surexpression de p-Akt Ser473 au sein des tumeurs comparées au tissu sain adjacent, en plus d'une variation de l'expression de la protéine p-Akt entre les différents malades, cette variation étant en fonction du stade et du grade anatomopathologique. En effet, les malades à stade invasif et de haut grade ont une activation plus importante d'Akt, ceci est confirmé sur des études in vitro et par l'analyse des courbes de survie, les malades qui présentent une expression élevée de p-Akt ont un taux de survie faible. En plus nous avons souligné que la consommation de tabac ne semble pas jouer un rôle dans l'activation d'Akt alors qu'elle est associée à un haut risque de récurrence.

Ainsi l'ensemble de ces résultats a permis d'estimer la valeur pronostique de certains marqueurs biologiques : L'expression T-bet, GATA-3 et bcl-6 dans les tumeurs a été corrélée avec des paramètres pathologiques montrant l'importance prédictive de l'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires. La surexpression de sFasL et sTRAIL dans le sérum semble de bon pronostic, alors que celle de p-Akt est de mauvais pronostic. Dans les deux cas, ces pronostics sont confirmés in vitro et in vivo.

Title : [Title of thesis in English]

Research of prognostic biomarkers in Tunisian patients with bladder cancer

Abstract : [in English / limited to 1700 characters including spaces]

Bladder cancer is the ninth most common cancer in the world; it is the second most common urogenital cancer in men after prostate cancer, with a high recurrence rate, a significant proportion of patients die because of recurrence even after receiving standard treatment. In addition, around (20-30%) of patients with bladder cancer have muscle-invasive disease, and either present with or later develop metastasis. the need for expensive continuous surveillance.

In this thesis we try to search some candidate biomarkers with potential clinical value. Their use for cancer staging and personalization of therapy at the time of diagnosis in order to identify a better treatment could improve patient care.

The aim of this first part of our study was to investigate the clinical significance of three immune cell-related transcription factors, T-bet, GATA-3 and bcl-6 in bladder cancer in Tunisian patients. The expression of these genes was assessed using RT-qPCR in 65 bladder cancer patients with 32 diagnosed as low and medium grade, 31 as high grade, 25 as muscle invasive stage and 39 as non-muscle invasive stage and were statistically correlated according to the grade, the stage, tobacco consumption, BCG response and the severity of the disease. We found that T-bet levels in patients with high-grade bladder cancer were significantly elevated compared to patients with low- or medium-grade bladder cancer. In invasive carcinoma, the T-bet levels were significantly higher than in superficial non-invasive bladder tumors. However, T-bet is predictive of response to BCG.

Its expression is high in good responders to BCG. On the contrary, the expression of GATA-3 and bcl-6 in non-invasive carcinoma and in patients with low and medium grade was

significantly higher than in invasive bladder tumors and in patients with high-grade bladder carcinoma.

In addition, heavy smokers, which tumors express low levels of GATA-3 and bcl-6, are poor responders to BCG.

Our study indicates that the search for the expression of three transcription factors in tumors can be used to give a prognosis value and to predict response to BCG in patients with bladder cancer.

We furthermore studied the effects of activation of Soluble FasL and TRAIL molecule in bladder cancer cells. The objective of this study was to investigate the prognostic value of sFasL and sTRAIL in the serum of patients with bladder cancer. The levels of (sFasL) and (sTRAIL) in the serum of 64 patients with bladder cancer and 72 healthy donors were determined using ELISA assay. Cytotoxicity of sFasL and sTRAIL was examined using the MTS assay. Death receptor protein expression was analyzed by Western blot. We demonstrate that the mean serum level of sFasL was higher in patients than in normal donors, whereas no difference was seen between sTRAIL from patients and controls. However, this statement must be nuanced according to the stage of the cancer. sFasL was only higher than in sera of healthy donors where patients had superficial stage or low- and medium-grade cancer, or no recurrence. No difference exists between controls and patients with invasive stage, high-grade or recurrent cancer. sTRAIL was significantly lower in sera from patients with invasive and high-grade bladder carcinoma than in controls but there were no statistical differences between controls and patients with superficial stage, low- and medium-grade cancer or no recurrence. The serum levels of sFasL and sTRAIL in patients with superficial non-invasive bladder tumors or low- and medium-grade cancers was higher than for invasive carcinomas and high-grade cancers. In addition, sFasL and sTRAIL from several patients exhibited cytotoxic effects on two established bladder cancer cell lines. So our data suggest that elevated levels of bioactive sFasL and sTRAIL in the serum might be associated with a good prognosis in patients of the Tunisian population with bladder cancer.

In The part of this thesis, we purpose to assess expression of the phosphorylated/activated forms of Akt in tumors from Tunisian patients with bladder cancer and to correlate its expression with pathological and clinical parameters of the disease. The study included 72 patients of whom 34 were diagnosed as low- to medium-grade and 35 as high-grade; 30 were muscle stage and 39 non- muscle stage. Primary tumors from these patients, normal

adjacent tissues, or bladder cancer cell-lines were analyzed for Ser473 phosphorylated Akt expression by Western blot.

Seventy-two percent of primary tumors from patients with bladder cancer had increased levels of p-Akt. The p-Akt levels in patients with high grade bladder cancer were significantly elevated compared to patients with low- or medium-grade bladder cancer. In invasive carcinoma, the p-Akt level was significantly higher than in superficial non-invasive bladder tumors. Concerning the influence of tobacco on Akt activation, no significant differences of p-Akt expression were found between non-smoker and smoker patients. Altogether, our results suggest that Akt activation can provide useful prognostic information and that tobacco represents a serious risk factor for recurrence in a cohort of Tunisian patients.

Mots-clés : [en français]

- |                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| 1-Cancer de la vessie    | 4-Tabac          |
| 2-Marqueurs pronostiques | 5- sFasL, sTRAIL |
| 3-T-bet, GATA-3, Bcl-6   | 6- p-Akt ser 473 |

Keywords: [in English]

- |                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| 1- bladder cancer       | 4- smoking        |
| 2- prognosis            | 5- sFasL , sTRAIL |
| 3 -T-bet, GATA-3, Bcl-6 | 6- p-Akt ser 473  |