



UNIL | Université de Lausanne  
Faculté de biologie  
et de médecine

Mémoire de Maîtrise en médecine

# **Utilisation de tissus de cancer de vessie archivés en paraffine pour l'analyse de l'expression de gènes immunorégulateurs**

**Étudiant**

Raphaël Golaz

**Tuteur**

Dr. Denise Nardelli Haefliger  
Privat-Doцент, Service d'Urologie, CHUV

**Expert**

Prof. Daniel Speiser  
Ludwig Center for Cancer Research of the University of Lausanne

Lausanne, février 2012

## Table des Matières

Résumé.....	2
Introduction.....	3
Méthodologie.....	6
Résultats.....	9
Discussion.....	21
Abréviations.....	26
Remerciements.....	26
Références bibliographiques.....	26

### 1. RÉSUMÉ

**Introduction :** Le cancer de la vessie est la 4<sup>ème</sup> cause de cancer en Europe, chez l'homme. Dans 70% des cas, le diagnostic initial de cancer transitionnel de la vessie est non-musculo invasif mais jusqu'à 45% progresseront en tumeur musculo-invasive selon des facteurs de risques qui ont été scorés par l'Organisation européenne de recherche sur le traitement du cancer (EORTC). Après résection endoscopique transurétrale vésicale (RTUV) de la tumeur, une instillation intravésicale (ives) d'agents chimiothérapeutiques ou d'immunomodulateurs tel que le Bacille Calmette Guérin (BCG) permet de réduire les récurrences/progressions. Cependant l'utilisation du BCG est limitée aux patients avec un risque de progression haut et intermédiaire au vu des effets secondaires occasionnés. Le système immunitaire joue un rôle certain dans l'évolution d'un processus néoplasique. Toutefois, les cancers adoptent différents mécanismes pour supprimer la réponse antitumorale. La variation de l'environnement immunologique tumoral pourrait avoir une valeur pronostique pour l'évolution naturelle de la maladie. Le but de notre étude est d'utiliser des coupes paraffines archivées de RTUV afin de définir l'environnement immunitaire des carcinomes urothéliaux non musculo-invasifs, en particulier les caractéristiques immunosuppressives, comme prédictif d'un comportement de progression néoplasique.

**Méthodologie :** L'exploration d'une base de données de patients suivis pour le cancer de la vessie au CHUV afin de faire un choix des coupes de RTUV à examiner a été réalisée. Une approche transversale a été abordée en regroupant des patients de stades tumoraux différents ou en évaluant des foyers tumoraux multiples au sein de la vessie d'un même patient à un moment donné (i.e lors d'une même RTUV). Une approche longitudinale a également été adoptée avec comme objectif de comparer, chez le même patient, des tumeurs de stades, de grades et de score de risque de progression de l'EORTC différents au cours du temps. L'ARN des tissus de RTUV fixés au formol et enrobés en paraffine a été extrait et purifié. Un kit d'amplification en temps réel par réaction en chaîne par polymérase (RCP) pour 84 gènes impliqués dans l'anergie des cellules T et la tolérance immunitaire a été utilisé.

**Résultat :** Nous avons réuni les informations cliniques de 157 sujets atteints de tumeur vésicale non musculo-invasive. 35% des sujets ont reçu une chimiothérapie ives et 40 % ont reçu du BCG ives. Les trois-quarts de ces derniers ont reçu un cycle de BCG complet (6 semaines). Néanmoins, 38 % d'entre eux vont tout de même subir une progression de leur cancer. Les scores de progression de l'EORTC ont pu être calculés pour 94 sujets (39% haut risque, 42 % risque intermédiaire et 19% bas risque). 76% des patients à haut risque a été traité avec du BCG ives. Parmi les patients avec un risque intermédiaire de progression, seuls 15 % ont effectivement progressé incluant 2 patients avec des échantillons de RTUV disponibles pour analyse. L'analyse par RCP s'est focalisée sur une approche longitudinale incluant 6 patients suivis sur une longue période avec de multiples RTUV. 29 échantillons ont été sélectionnés, leur ARN purifiés, mais seuls 16 ARN se sont révélés en quantité et qualité suffisante pour être analysé par RCP. L'analyse par RCP quantitative en temps réel a montré des problèmes dans la quantification de l'ADN génomique, ainsi que des gènes domestiques. Ceci a grandement handicapé nos analyses et n'a pas permis la mise en évidence convaincante de gènes immuno-modulateurs associés à la progression du cancer de la vessie.

**Discussion :** Notre analyse du suivi des patients au CHUV montre que les chirurgiens façonnent leur prise en charge durant l'intervention selon des critères adaptés à la situation et tendent ainsi à une stratification des risques permettant un traitement adapté, de la même manière que le permet le score de l'EORTC, en tous cas en ce qui concerne les patients à haut risque de progression. Les nombreux facteurs impliqués dans le cancer de la vessie montrent néanmoins qu'il y aurait des avantages à rationaliser la prise en

charge. L'archivage de tissus fixé au formol et enrobé en paraffine a l'avantage de représenter une source de matériel considérable et de grande valeur pour la recherche. Néanmoins, malgré l'évolution des techniques et la publicité des fabricants, il s'est avéré difficile d'exploiter ce matériel délicat pour en obtenir des résultats convaincants.

## 2. INTRODUCTION

### 2.1. Cancer de la vessie non-musculo-invasif

Le cancer de vessie occupe la 4<sup>ème</sup> et la 14<sup>ème</sup> position par ordre de fréquence, respectivement chez l'homme et la femme. Le ratio hommes : femmes qui développent un cancer de vessie est 4:1. Sa manifestation avant 40 ans est rare, il touche essentiellement les personnes d'âge mûr, particulièrement en mauvais état de santé. La médiane d'âge du diagnostic est de 70 ans, hommes et femmes confondus (1).

Plus de 90% des cancers de vessie sont des carcinomes à cellules transitionnelles, issus de l'urothélium. Cet épithélium recouvre toute la couche interne des voies urinaires, qui s'étendent des pelvis rénaux jusqu'aux urètres en passant par les uretères et la vessie.

Les carcinomes urothéliaux sont connus pour être associés à plusieurs facteurs de risques identifiés et rencontrés dans un nombre important de cas. Le premier facteur de risque de cancer de vessie est le tabagisme, qui augmente le risque de développer un carcinome de l'urothélium par un facteur 4(2)(3). Selon une estimation, 66% des cancers de vessie chez l'homme et 30% chez la femme sont imputable au tabagisme(4). Par ailleurs, plusieurs amines aromatiques notamment utilisées dans la fabrication de colorant, sont des constituants chimiques connus pour augmenter le risque de carcinomes urothéliaux de la vessie(5). Le cyclophosphamide utilisé dans le traitement des lymphomes, des leucémies et de certaines tumeurs solides a également été associé à un risque accru de développer un cancer de vessie (6).

Sur tous les cancers transitionnels de vessie nouvellement diagnostiqués, approximativement 70% présenteront un cancer non-musculo invasif, confinés à la muqueuse : Ta, Cis (confiné à l'urothélium) et T1 (atteignant la lamina propria) selon le système de classification TNM 2009 (Tumeur, Nœud lymphatique, Métastase). En premier lieu, ces tumeurs sont traitées par résection endoscopique trans-urétrale vésicale (RTUV). Au vu du risque considérable de récurrence/progression tumorale, il est d'intérêt de compléter le traitement par une thérapie adjuvante. Une instillation intra-vésicale (ives) chimiothérapeutique unique dans les 24 heures après la RTUV est recommandée par les directives (7)(8). De plus, selon le risque de récurrence/progression, un traitement immunothérapeutique ives adjuvant à raison de 6 instillations hebdomadaires de Bacille Calmette-Guérin (BCG) sera entrepris dans le mois suivant la RTUV (9). Ce dernier, contrairement à l'instillation chimiothérapeutique unique, est associé à un nombre significatif d'effets secondaires tels que cystites sévères, état grippal, granulomes intra-vésicaux et extra-vésicaux pouvant aboutir à une obstruction des voies urinaires et, dans les cas les plus graves, jusqu'à la septicémie et la mort (10)(11). C'est la raison pour laquelle il n'est pas administré systématiquement. Un suivi régulier à long terme est indiqué pour tous les patients.

La difficulté de la prise en charge des cancers transitionnels de vessie non musculo-invasifs réside dans un haut risque de récurrence allant de 30% jusqu'à plus de 80%. De plus, dépendant du profil de risque, jusqu'à 45% des tumeurs progresseront vers une forme musculo-invasive dans les 5 ans après le diagnostic initial (12). Une récurrence/progression pouvant survenir même après plusieurs années, une surveillance coûteuse et à long terme des cancers de vessie non musculo-invasif, est nécessaire (13). Le contrôle des récurrences par la thérapie adjuvante ives a été éprouvé dans de nombreuses études (14)(11). Cependant, il est constaté qu'une proportion significative de patients est traitée inutilement, augmentant le risque de complications et causant des dépenses inutiles (15)(16)(17)(18). L'ensemble de la prise en charge des cancers transitionnels de vessie est donc à l'origine d'un lourd prix à payer économique et humain, contribuant à faire de ce cancer, le plus coûteux de tous les cancers (17).

Dans ce sens, le concept de prise en charge personnalisée et adaptée aux risques individuels peut être une alternative améliorant le pronostic global du cancer de vessie. L'Organisation Européenne pour la recherche et le traitement du Cancer (EORTC) a développé une table de risque afin de prédire le risque individuel de récurrence ou de progression (19). Le système de notation de l'EORTC (Annexe 1) se base sur 6 facteurs cliniques et pathologiques connus pour être des facteurs de pronostic dans les cancers de vessie non musculo-invasifs. Trois de ces variables ont un impact majeur sur la récurrence ; multiplicité des foyers tumoraux, taux de récurrence et taille tumorale. Les trois autres ont plus d'importance sur le pronostic de la progression : les Cis, les grades 3 (classification histopathologique WHO 1973) et les stades T1 (classification TNM 2009) (19)(20)(21)(22). Selon la note obtenue à chacun des 6 facteurs de récurrence/progression, les patients sont divisés en trois groupes de risque : bas, intermédiaire et haut (Annexe 2).

Il est clairement établi qu'une unique instillation chimiothérapeutique ives après une RTUV est efficace dans la réduction de la récurrence (8). Toutefois, ce bénéfice semble limité aux patients avec une tumeur primaire ou solitaire à défaut de ceux avec une tumeur de risque intermédiaire et haut de récurrence (15). La chimiothérapie ives, qui ne connaît que peu d'effets secondaires, ne permet pas de contrôler la progression tumorale (11).

En ce qui concerne les traitements adjuvants à distance de la RTUV, l'immunothérapie ives par instillation de Bacille Calmette-Guérin (BCG) est supérieure à la chimiothérapie dans la prévention de la récurrence mais comporte des risques et les effets secondaires sont fréquents (11)(23). L'immunothérapie est donc plus efficace mais également plus toxique. L'intérêt justifiant l'utilisation du BCG est sa capacité à prévenir ou retarder la progression vers un cancer musculo-invasif (9)(24).

Dans une étude évaluant l'efficacité du système de notation de l'EORTC, 98% des patients inclus se répartissent entre les groupes intermédiaires et hauts de progression (25). Selon les directives pour la prise en charge des cancers de vessie non musculo-invasifs de l'Association Européenne des Urologue (EAU), les groupes de risques intermédiaires et haut de progression devraient bénéficier d'un traitement adjuvant par instillation intra-vésicale de BCG (13). Selon cette recommandation de type A, la presque totalité des patients avec une tumeur non musculo-invasive devrait donc bénéficier d'un traitement adjuvant par instillation intra-vésicale de BCG (i.e prise en charge aspécifique). Cependant, il a été mis en évidence dans une autre étude que, l'intensification de la surveillance et du traitement des cancers de vessie non musculo-invasif n'est pas associée à une amélioration de la survie spécifique au cancer ni à une réduction d'interventions plus invasives (18).

Une difficulté supplémentaire dans la prise en charge des cancers de vessie non musculo-invasifs, réside dans le fait que les patients souffrant d'une tumeur de stade T1 à haut risque de progression, ne bénéficient pas de recommandations propres alors qu'elles sont associées à un taux de progression significativement plus élevé. En effet, il a été démontré qu'un traitement plus invasif, par cystectomie radicale, peut amener un haut taux de guérison pour ces patients et devraient donc être considéré précocement dans la prise en charge (26). Malheureusement, il n'existe pas de critère permettant clairement de définir qui doit bénéficier d'une cystectomie ou pas. La décision d'opter pour un traitement épargnant la vessie plutôt qu'une cystectomie radicale ou vice et versa reste dès lors un défi.

Il est donc évident que, malgré des méthodes de prédictions adaptées aux risques d'un individu ainsi que des principes de précaution envisagés pour les tumeurs de stade T1, il est nécessaire d'élaborer d'autres méthodes diagnostiques permettant de mieux différencier les groupes nécessitant une cystectomie de ceux qui nécessitent un traitement moins invasif ou même un suivi sans traitement (19)(27). Un certain nombre de ces outils existe tels que les profils d'expressions quantitatives de gènes, caractérisation moléculaire dans les urines ou encore l'identification de protéine par immunohistochimie mais aucun n'a suffisamment été validé pour être appliqué en clinique (28)(29)(30).

## **2.2. Immunologie tumorale**

Le développement d'une tumeur au sein d'un organisme est étroitement lié à son système immunitaire. Il

est clairement établi qu'il existe un processus d'immuno-surveillance qui protège l'hôte du processus néoplasique(31)(32). Sur la base de l'expression d'antigènes spécifiques à la tumeur, les cellules effectrices du système immunitaire sont capables d'identifier précisément et d'éliminer des cellules tumorales (33). La réponse immune adaptative influence donc le comportement tumoral et l'infiltration lymphocytaire dans les tumeurs est directement corrélée à une amélioration de la survie (34)(35)(36)(37). Toutefois, il est également admis que le système immunitaire favorise la progression tumorale, notamment en façonnant le phénotype immunogénique de la tumeur au cours de son développement. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe I (permettant la présentation de l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques) est exprimé à la surface des cellules urothéliales chez les sujets sains. Cependant, dans les cancers de vessie, plusieurs classes de CMH ne sont pas exprimées. Cette perte d'expression est directement corrélée à la progression tumorale (38)(39)(40). D'autres mécanismes modulateurs de la réaction immune anti-tumorale sont utilisés par la tumeur. L'activation des lymphocytes T requiert une pléiade d'interactions orchestrée dans un ordre précis : la liaison des récepteurs des cellules T au CMH et son antigène est directement suivi par l'expression d'un signal co-stimulateur crucial. De récentes découvertes ont amené à s'interroger sur la duplicité de ce signal: il peut être stimulateur ou inhibiteur. Il existe 2 grandes familles de molécules co-stimulatrices: la famille TNF/TNFR (CD40/C40L, 4-1BBL/4-1BB, OX40L/OX40, CD70/CD27, LIGHT/HVEM) et la famille B7/CD28 (B7-1,2/CD28, B7-1,2/CTLA-4, PD-L1, 2/PD-1, ICOSL/ICOS, HVEM/BTLA). Les molécules TNF/TNFR ont tendance à activer les cellules T et à induire leur prolifération. La famille des B7/CD28 est hétérogène : CD28 et ICOS sont principalement des activateurs alors que CTLA-4, PD-1 et BTLA sont principalement des molécules co-inhibitrices (41). L'environnement tumoral subit également des troubles de l'homéostasie des cytokines. L'interleukine-2 (IL-2), initiatrice de la prolifération des cellules T, joue un rôle critique pour le maintien de la fonction des lymphocytes T cytotoxiques. La chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2, identifié comme CD25, est seulement exprimée sur les cellules T activées. L'expression constitutive de CD25 sur une cellule T inactive est traductrice d'un phénotype inhibiteur de cellule T régulatrice (cellule Trég) (42). Beaucoup d'autres cytokines immunosuppressives ou impliquées dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale interviennent contre la défense de l'hôte : IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, INF-gamma, FASL.

Les cellules Trég représente un type majeur de population leucocytaire immunosuppressive jouant un rôle clés dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale. Ces cellules sont une sous-population de cellules T CD4+ qui expriment constitutivement CD25 et le facteur de transcription Foxp3. Lorsqu'elles sont actives, elles inhibent la fonction des lymphocytes T spécifiques à la tumeur en produisant des cytokines IL-10 et TGF-beta, en exprimant les molécules co-inhibitrices CTLA-4, PD-1 et PD-L1 et en épuisant l'IL-2 (43)(44). De plus, la production de TGF- $\beta$  par les cellules tumorales peut convertir les cellules T effectrices en cellules Trég qui, à leur tour, suppriment d'autres cellules T effectrices qui infiltrent la tumeur (45).

L'adhésion d'un lymphocyte à sa cible est une condition indispensable à une activité cytotoxique efficace. L'interaction d'adhésion entre les cellules tumorales de la vessie et les lymphocytes infiltrant la tumeur joue un rôle crucial dans la réponse immune anti-tumorale. L'interaction entre LFA-1, une intégrine exprimée par les lymphocytes T, et ICAM-1, un ligand impliqué dans les cancers, est relevé pour son influence dans l'adhésion et l'activation des lymphocytes T spécifiques à la tumeur (46).

Beaucoup d'autres molécules et mécanismes sont impliqués dans ce rôle tumeur-promoteur façonné entre le microenvironnement tumoral et le système immunitaire.

Il est donc évident qu'une cellule T peut être modulée, en une forme active ou en une forme inactive, entre autre, par des remaniements de l'environnement tumoral des cytokines, par des altérations de l'équilibre signalétique co-stimulateur et co-inhibiteur, et par des stimulations inhibitrices de cellules Trég.

### 2.3. Buts

Cette étude propose l'analyse de l'environnement immunitaire tumoral vésical. Celui-ci pourrait manifester des changements précoces permettant de prédire les tumeurs qui progresseront en une forme plus invasive. Cette analyse permettrait également la découverte de molécules régulatrices du système immunitaire pouvant être des cibles thérapeutiques. Nous procéderons en caractérisant l'expression par RCP quantitative en temps réel de 84 molécules régulatrices du système immunitaire dans des coupes de tumeurs vésicales à différents stades de la maladie et archivées en paraffine. Il est intéressant de préciser

qu'aucune étude n'a été menée sur autant de marqueurs immunitaires à la fois. Différentes stratégies de sélection de patients à analyser peuvent être entrevues telles qu'une approche transversale en comparant différents groupes de patients ou une approche longitudinale sur l'évolution des stades et grades tumoraux ou du score de risque d'EOTRC au sein d'un même patient. Les données cliniques des patients atteints de tumeur vésicale sont issues de la base de données du Service d'urologie du CHUV et ont permis une analyse rétrospective.

### **3. MÉTHODOLOGIE**

#### **3.1. Population – échantillon tumoral**

Les dossiers des patients sélectionnés, pris en charge pour une RTUV par le Service d'urologie du CHUV entre 1985 et 2010, ont été étudiés de façon rétrospective.

L'étude se limitant au cancer de vessie d'origine transitionnelle, les autres types histologiques ont été écartés. Les carcinomes urothéliaux musculo-invasifs au diagnostic initial n'ont pas été pris en compte.

Chaque sujet a été référencé par l'âge, le genre, la durée du suivi, le stade de la tumeur primaire, le grade de la tumeur primaire, la survenue de récurrence, la survenue de progression, l'instillation ives d'agent chimiothérapeutique et le stade correspondant, l'instillation ives de BCG et le stade correspondant.

Nous avons considéré comme récurrence, toute récurrence de tumeur de stade égal ou inférieur au précédent. De même, toute récurrence ayant pour résultat histopathologique un stade TNM supérieur au précédent a été définie comme progression tumorale (e.g pTa qui progresse en pT1 et/ou CIS, pT1 qui progresse en pT2).

Le nombre de tumeurs, la taille des tumeurs, le taux de récurrence, le stade, la présence de Cis et le grade ont été relevé et le groupe de risque de progression a été calculé selon les tables pronostiques de l'EORTC (Annexes 1 et 2). Le système de classification TNM, édition 2009 sert de référence pour l'évaluation du stade. Le grade histologique repose sur la classification de la World Health Organisation de 1973 (WHO 1973) qui décrit trois grades de différenciation. Tous les sujets présentant deux grades de différenciations dans le même échantillon, ont été traité en prenant en compte le grade le plus élevé.

Plusieurs stratégies de sélection des patients ont été consécutivement examinées. Dans un premier temps, une approche transversale a été abordée en regroupant différents patients ou différents foyers tumoraux au sein de la vessie d'un même patient à un moment donné (i.e lors d'une même RTUV). Dans un deuxième temps, une approche de sélection longitudinale a été adoptée avec comme objectif de comparer, chez le même patient, des tumeurs de stades, de grades et de score de risque de progression de l'EORTC différents (Annexes 6 et 7).

#### **3.2. Extraction de l'acide ribonucléique (ARN) – synthèse de l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) – réaction en chaîne par polymérase (RCP) quantitative**

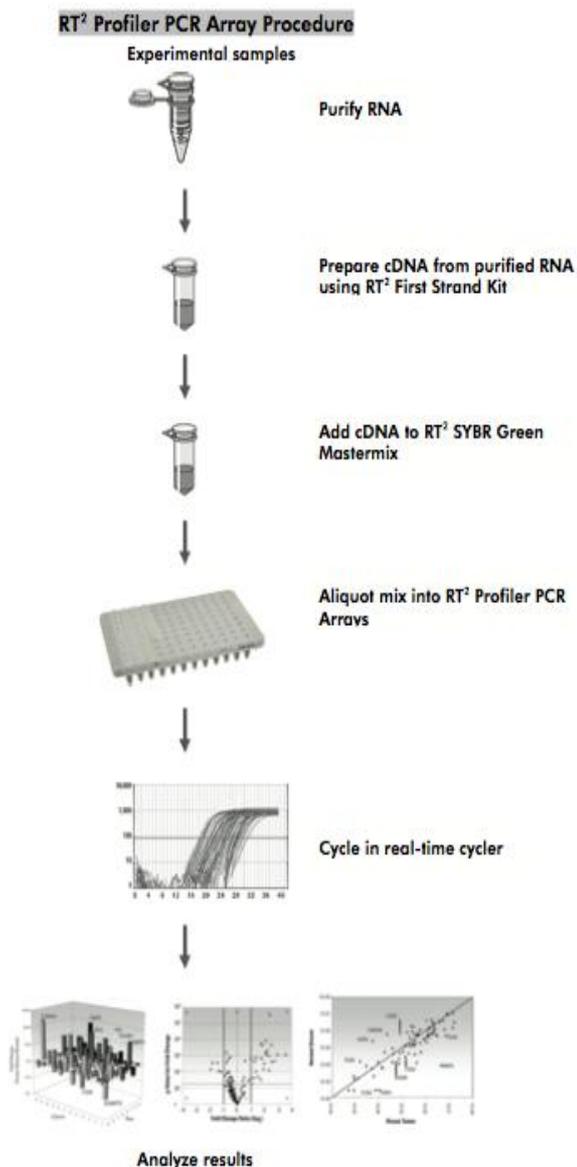
Le matériel tissulaire fixé au formol et enrobé en paraffine, issu de la banque de tissu du Service de Pathologie du CHUV, a été découpé en 5 sections de 10um pour l'analyse de l'ARN. Des coupes ont été prélevées des blocs sectionnés pour effectuer une coloration histochimique de la tumeur. L'ARN a été isolé à l'aide d'un kit de purification (RNeasy FFPE Kit, Qiagen) (voir Figure 1). La concentration et la pureté de l'ARN ont été évaluées premièrement par spectrophotométrie (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific) puis par électrophorèse capillaire et analyse automatisée des électrophérogrammes (Bioanalyser 2100, Agilent). La concentration d'ARN issue des tissus tumoraux, est déterminée par une mesure d'absorbance par spectrophotométrie effectuée à 260 nm. La valeur minimale permettant l'utilisation de l'échantillon pour la synthèse d'ADNc devrait être supérieure à 30 ng/ $\mu$ l. La qualité de l'ARN extrait est évaluée par un ratio mesurant l'interférence par des contaminants. Pour les protéines

absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ARN pur devrait avoir une valeur de 1.8 à 2,0. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A260/A230 devrait être supérieur à 1.7.

Il est attendu de l'ARN provenant de tissus fixés au formol et enrobés en paraffine un important degré de dégradation. Le facteur d'intégrité RIN (RNA Integrity Number ; 10 = intégrité ARN intact, 1 = ARN totalement dégradé) permet de rendre compte de l'étendue de la dégradation. Toutefois, des valeurs  $\leq 4$  ne sont pas informatives et reproductibles (Critical factors for successful molecular analysis of FFPE sample, Qiagen FFPE Brochure 2010 september) et il est recommandé dans ce cas d'utiliser le pic de longueur des fragments d'ARN, déductible de l'électrophérogramme qui se situe entre 25 et 30 secondes pour en évaluer la qualité.

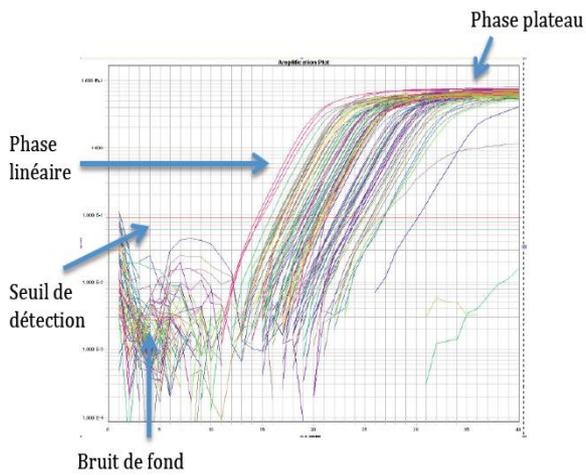
Après préparation de l'ADNc à l'aide d'un kit de synthèse comprenant une pré-amplification spécifique des transcrits d'intérêt (RT2 PreAMP cDNA Synthesis Kit, SABioscience, Qiagen), la quantification de l'expression des gènes par RCP est mesurée en temps réel par la détection d'un signal fluorescent (Applied Biosystems 7900HT, Life Technologies) sur des plaques (384 puits) contenant des primers spécifiques aux gènes d'intérêt (The Human T-cell Anergy and Immune Tolerance RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array, SABioscience, Qiagen).

Les données brutes sont représentées graphiquement sous forme de courbes sigmoïde d'amplifications où l'intensité de la fluorescence est confrontée au nombre de cycles (SDS software v2.2, Life Technologies) (voir Figure 2). La valeur du bruit de fond a été fixée automatiquement et le seuil de détection a été ajusté à une valeur supérieure au bruit de fond et inférieure à la phase plateau de la courbe d'amplification.



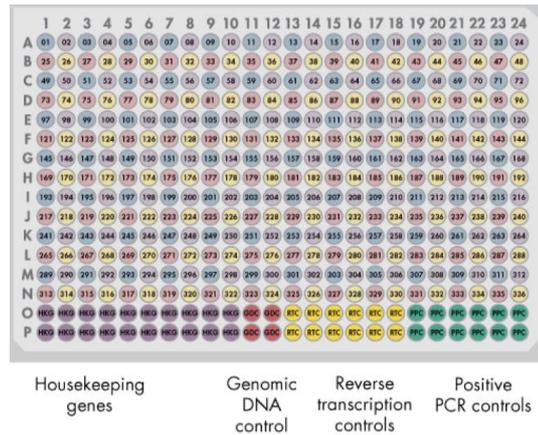
**Figure 1. Procédure de la RCP quantitative en temps réel: de l'échantillon tissulaire à l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt**

Extraction et purification de l'ARN des tissus fixés au formol et enrobés en paraffine. Synthèse et pré-amplification de l'ADNc issu des ARN isolés des échantillons. Expression des gènes relatifs à l'anergie des cellules T et la tolérance immunitaire. Analyse par quantification relative.



**Figure 2. Représentation logarithmique de l'intensité de la fluorescence des puits d'amplification issus de la RCP en temps réel**

Représentation logarithmique du nombre de cycles de RCP (axe x) sur l'intensité du signal fluorescent (axe y). Le bruit de fond (fixé automatiquement) correspond à l'intervalle des premiers signaux fluorescents détectés et le début de la phase linéaire d'amplification. Le seuil de détection est représenté par une barre rouge située au-dessus du bruit de fond et au premier tiers de la phase linéaire, limitée par la phase plateau.



**Figure 3. Plaques (384 puits) contenant des amorces spécifiques aux gènes d'intérêt**

Plaque de 384 puits (4x96) permettant l'analyse simultanée des gènes d'intérêt de 4 échantillons. Les 2 dernières lignes représentent les puits contrôles : en violet, les gènes domestiques ; en rouge, la contamination génomique ; en jaune, l'efficacité de la transcription inverse ; en vert, l'amplification RCP des contrôles positifs.

Un lot de puits de contrôle de réplification détermine la contamination génomique, l'efficacité de la transcription inverse et l'amplification RCP des contrôles positifs (voir Figure 3). L'ensemble permet d'évaluer la validité de l'analyse.

Le niveau d'expression de chaque gène d'intérêt est normalisé à la moyenne de 5 gènes constitutifs ou gènes domestiques, s'exprimant de manière constante dans différentes cellules d'un organisme ( $\beta$ -microglobuline, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB).

L'expression normalisée de chaque gène d'intérêt (voir Table 1) entre deux échantillons tumoraux à différents stades de la maladie est comparée par quantification relative.

Un test d'hypothèse, valeur p obtenue par test t de Student, permet d'évaluer les différences significatives des échantillons comparés.

**Table 1: Panel des gènes impliqués dans l'anergie des cellules T et la tolérance immunitaire (The Human T-cell Anergy and Immune Tolerance RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array)**

Type de cellules	Gènes exprimés <sup>a)</sup>
Cellule T régulatrice	BTLA, CBLB, CD27, CD28, FAS, FOXP3, IL15, IL2, IL2RA, IL4, LAT, TGFB1, TNFRSF14, TNFSF14
Cellule B régulatrice	BTLA, CD27, CD40, CD40LG, FOXP1, FOXP3, HDAC9, IL4
Cytokines, récepteurs et leurs protéines correspondantes	CCL3L1, CCR4, CD40LG, CD70, CSF1, CSF2, FASLG, IFNG, IL10, IL10RA, IL13, IL15, IL17A, IL1A, IL2, IL2RA, IL2RB, IL31, IL4, IL5, IL6, IL7R, LEP, LTA, PRF1, PTGER2, PTGS2, TGFB1, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF8
Membres de la superfamille des TNF et leurs récepteurs	CD40LG, CD70, FAS, FASLG, LTA, TNFRSF10A, TNFRSF4, TNFRSF18, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF8
Régulateurs transcriptionnels	CDK2, CDK4, EGR2, EGR3, EOMES, FOS, FOXP1, FOXP2, FOXP3, GATA3, HDAC9, IFNG, ING4, IRF4, JAK3, JUN, MEF2A, NFATC1, NFATC2, NFATC3, NFKB1, NHLH2, NOTCH1, STAT3, STAT6, TBX21, TGFB1
Autres gènes impliqués dans l'anergie des cellules T	CMA1, CTLA4, DGKA, DGKZ, GZMB, ICAM1, ICOS, ITCH, ITGA1, JAK1, LGALS3, PDCD1, PRKCG, RNF128, SELL

<sup>a)</sup> Description des symboles dans l'annexe 3

## 4. RÉSULTATS

### 4.1. Sélection des sujets

Les sujets ont été sélectionnés au sein de la base de données des patients suivis par le Service d'urologie du CHUV selon différentes approches:

En vue d'une approche transversale, plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin d'évaluer l'influence de l'environnement immunitaire dans le comportement de la tumeur.

1. D'une part, est-ce que l'environnement immunologique de la tumeur entre différents stades présente des différences ?

Nous avons sélectionné 61 sujets selon le stade et le grade de leur tumeur comme suit : pTa G1 n=14 ; pTa G2-3 n=23 ; pT1 G2-3 n=14, pT2 n=10. Les groupes peuvent ainsi être comparés les uns aux autres. Il est à souligner que cette pratique comporte une problématique : on ne sait pas qu'elle sera l'évolution de chaque lésion.

2. Sachant que lors d'une même RTUV, au sein de la vessie d'un même patient, plusieurs lésions de stades/grades différents sont souvent rapportées, est-ce que l'environnement immunologique peut varier d'un foyer tumoral à un autre, indépendamment du contexte général du patient ?

Dans ce but, nous avons sélectionné un groupe de 14 patients avec de multiples foyers tumoraux (selon le rapport d'anatomopathologie correspondant à la même RTUV) pour comparer l'environnement immunitaire des différents foyers. Ainsi, nous cherchons à mettre en évidence si toute la vessie agit de

concert ou si ces lésions évoluent de manière individuelle, laissant supposer l'existence de voies de développement tumorales distinctes.

Un total de 75 sujets a donc été sélectionné dans une approche transversale dans un délai de résection de 2 ans afin d'augmenter les chances d'obtenir des coupes viables pour les analyses.

Ces 2 méthodes comportent le défaut de ne pas prendre en considération l'évolution des tumeurs intégrée à l'histoire de la maladie d'un même patient. D'autre part, ces stratégies ne permettent pas d'évaluer le lien entre l'environnement immunitaire tumoral et la probabilité de récurrence/progression selon l'EORTC. Pour cette raison, nous avons décidé de ne pas seulement prendre en compte le stade tumoral mais également le score de risque de progression selon l'EORTC. Le groupe de risque de progression intermédiaire (EORTC) est particulièrement intéressant à étudier car, 1) un nombre important de patients sont de risque intermédiaire de progression, 2) la probabilité de progression pour ce groupe est de seulement 6%. La résultante de ces 2 points peut être à l'origine d'une part importante des patients sur-traités. Dans cette optique, il est justifié d'étudier l'environnement immunitaire au sein de tumeurs de score de risque intermédiaire de progression. En comparant un lot de patients avec une tumeur de risque de progression intermédiaire subissant effectivement une progression tumorale avec ceux ayant une tumeur de risque de progression intermédiaire n'ayant pas progressé, nous cherchons à mettre en évidence un critère supplémentaire d'évaluation du risque de progression permettant ainsi d'affiner la prise en charge et limiter les traitements invasifs à un certain nombre de patients.

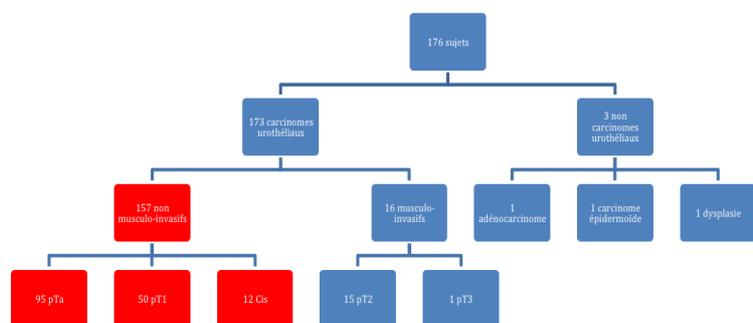
Nous avons donc inclus 101 sujets de plus afin d'étudier les score de risque de l'EORTC et l'évolution dans le temps. Pour ce faire, nous avons augmenté le nombre d'années depuis la résection, ainsi qu'inclus des patients ayant subi une cystectomie après une RTUV ayant mis en évidence une récurrence/progression, justifiant un traitement invasif.

Cette dernière stratégie s'est avérée limitée par le nombre restreint de sujets que nous avons pu identifier dans la base de données. En effet, parmi les 39 sujets de risque de progression intermédiaire, seuls 6 sujets ont réellement expérimenté une progression tumorale. Parmi ces 6 sujets, 2 sujets ont été mis en évidence plus tard dans nos recherches (ils font donc partie de l'étude longitudinale mais n'ont pas eu d'analyse par RCP en temps réel), un sujet n'avait pas de dossier d'archive permettant de réunir les informations nécessaires, un sujet avait un profil d'évolution tumorale restreinte et les 2 derniers cas, qui se sont avérés valables, ont été gardés pour l'analyse longitudinale expliquée ci-dessous.

De ce fait, nous avons décidé, plus globalement, de suivre longitudinalement des patients avec des tumeurs ayant progressé de score de risque de progression afin de déterminer si nous pouvions mettre en évidence des gènes « immunitaires » caractéristiques d'une progression. Dans ce dernier cas nous avons envisagé plusieurs analyses possibles, recouvrant, du moins partiellement, ce qui avait été envisagé dans les stratégies précédentes.

## 4.2. Général

Durant la période de 1985 à 2010, nous avons sélectionné 176 cas parmi l'ensemble des sujets ayant subi une RTUV au sein de Service d'urologie du CHUV. Parmi les 176 cas, 173 ont rapporté un diagnostic de carcinome urothélial. Trois autres diagnostics ont été mis en évidence: un adénocarcinome, un carcinome épidermoïde, une dysplasie. Ces 3 sujets ont été exclus de l'étude.



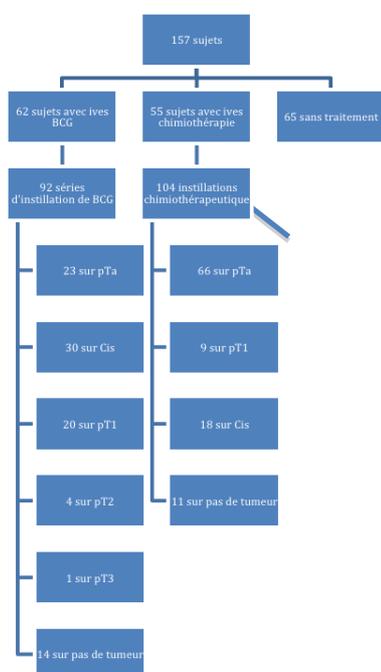
**Figure 4. Répartitions des sujets de l'étude**

Répartition des 176 sujets selon le type tumoral, le caractère musculo-invasif ou pas et le stade tumoral.

Parmi les 173 sujets ayant un carcinome urothélial, le diagnostic initial lors de la première RTUV met en évidence 157 sujets avec une tumeur non-musculo invasive soit 90% des tumeurs. Les 10% (n=16 : pT2, n=15 ; pT3, n=1) restant correspondent aux tumeurs musculo-invasives qui ont été exclues de nos analyses. Parmi les tumeurs non musculo-invasives, 60% (n=95) sont de stade pTa lors de la première RTUV, 32% sont de stade pT1 (n=50) et 8% sont des Cis (n=12) (voir Figure 4). Dans le cas où différents stades tumoraux sont mis en évidence dans la même RTUV, le stade le plus élevé a été pris en considération (Cis > pT1 > pTa).

L'étude comprend donc 157 sujets dont les données sont analysées ci-dessous.

Sur les 157 sujets atteints de tumeurs non musculo-invasives au diagnostic initial (lors de la première RTUV), la moyenne d'âge au diagnostic est de 66 ans (extrêmes 18-91 ans). Le ratio hommes/femmes est de 3.13 (hommes=119 ; femmes=38). Le suivi des patients est d'une durée moyenne de 3 ans et 10 mois (médiane 3 ans et 2 mois ; extrêmes 0-24 ans, 0 étant les cas où nous n'avons pas d'autre élément qu'une seule RTUV. Ce qui peut correspondre à une perte de suivi : patients consultant chez un urologue de ville, dans un autre hôpital, dans une autre région). Le nombre moyen de RTUV par patient au cours du suivi est de 4 (extrêmes 1-15).



### 4.3. Traitement ives

Parmi l'ensemble des 157 sujets de l'étude, 62 sujets ont reçu un ou plusieurs cycles d'instillations ives de BCG, 55 sujets ont reçu une ou plusieurs instillations ives chimiothérapeutique, parmi eux, 26 sujets ont reçu les deux modalités de traitement. Enfin, 65 sujets n'ont reçu aucun traitement. La Figure 5 illustre la répartition des différentes modalités de traitement.

**Figure 5. Répartitions des différentes modalités de traitement**

Répartition des 157 sujets de l'étude en fonction du traitement reçu et de la répartition des stades tumoraux.

#### 4.3.1. Instillation ives chimiothérapeutique

Parmi les 157 sujets atteints de tumeur non musculo-invasive lors de la première RTUV, 35% (n=55) ont eu au moins une unique instillation chimiothérapeutique ives post RTUV.

Ces 55 sujets ont eu en moyenne 2 instillations ives chimiothérapeutiques au cours du suivi (extrêmes 1-8) avec un total de 104 instillations ives chimiothérapeutiques (voir Figure 5).

La répartition des instillations chimiothérapeutiques ives en fonction du résultat anatomo-pathologique est illustrée dans la figure 6. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de tumeur de stade pTa (n=284), 23% (n=66) ont été suivie d'une chimiothérapie ives. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de tumeur de stade pT1 (n=88), 10% (n=9) ont été suivie de chimiothérapie ives. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de tumeur de stade Cis (n=48), 38% (n=18) ont été suivie de chimiothérapie ives. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de tumeur de stade pT2 ou pT3 (n=30), aucune n'a été suivie de chimiothérapie ives. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique négatif (n=166), 7% (n=11) ont été suivie de chimiothérapie ives. A noter que pour les RTUV négatives, il ne s'agit pas de cas de reprise de cicatrice (i.e. RTUV pratiquée un mois après une première RTUV positive, comme examen de contrôle de la cicatrice de la première RTUV).

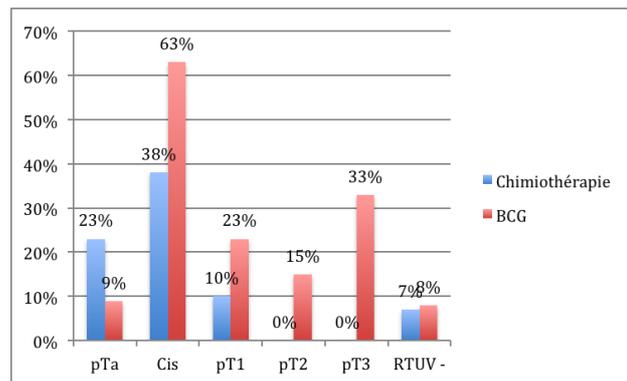


Figure 6. Traitement en fonction des stades

Taux d'instillation chimiothérapeutique ives et d'instillation ives de BCG en fonction des stades tumoraux.

Il nous est paru intéressant de corrélér, au cours des années, le nombre de RTUV avec un résultat pathologique (critère d'indication à la chimiothérapie ives) avec le nombre de traitements de chimiothérapie ives effectivement entrepris afin d'évaluer si la prise en charge thérapeutique a évolué au cours des années (voir Figure 7 et Annexe 4). On peut noter une variation de la proportion des chimiothérapies ives au cours des ans.

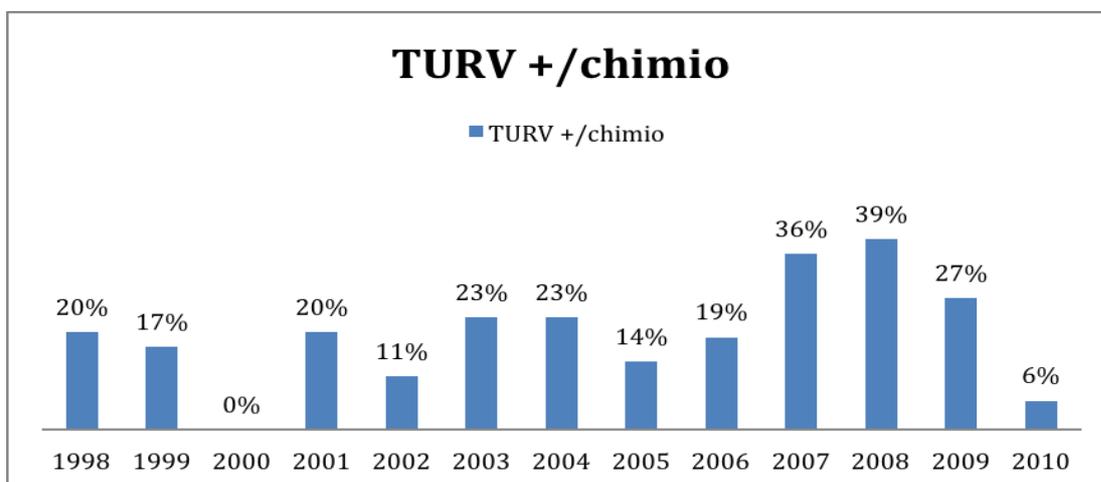


Figure 7. Illustration de la proportion (en pourcent) de chimiothérapies ives pratiquées en fonction des RTUV positives, au cours des ans. Pour la répartition détaillée en chiffres, voir annexe 4.

#### 4.3.2. Instillation ives de BCG

Parmi l'ensemble des sujets, 40% (n=62) ont eu au moins une série de 6 instillations hebdomadaires ives de BCG.

Ces 62 sujets ont eu en moyenne 1.5 séries de 6 instillations hebdomadaires ives de BCG au cours du suivi (valeurs extrêmes 1-6) correspondant à un total de 95 séries (voir Figure 5).

La répartition des instillations ives de BCG en fonction du résultat anatomo-pathologique est illustrée dans la figure 6. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de tumeur de stade pTa (n= 284), 9% (n=23) ont été suivie d'un traitement par BCG (voir Figure 6). Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de Cis (n= 48), 63% (n=30) ont été suivie d'un traitement par BCG. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de tumeur de stade pT1 (n=

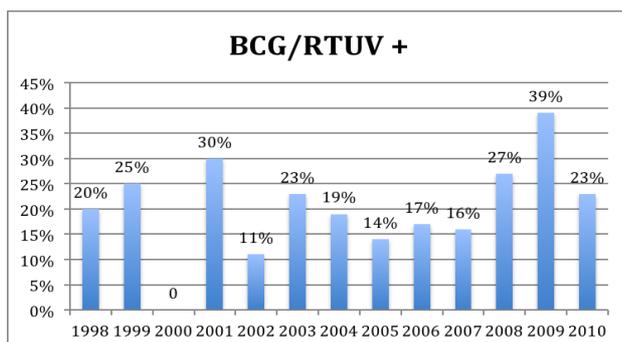
88), 23% (n=20) ont été suivie d'un traitement par BCG. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de tumeur de stade pT2 (n= 27), 15% (n=4) ont été suivie d'un traitement par BCG. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique de tumeur de stade pT3 (n= 3), 33% (n=1) ont été suivie d'un traitement par BCG. Parmi l'ensemble des RTUV rapportant un résultat anatomopathologique négatif (n= 166), 8% (n=14) ont été suivie d'un traitement par BCG. A noter que pour les RTUV négatives, il ne s'agit pas de cas de reprise de cicatrice (i.e. RTUV pratiquée un mois après une première RTUV positive, comme examen de contrôle de la cicatrice de la première RTUV).

Parmi l'ensemble des séries d'instillations hebdomadaires ives de BCG (n=95), 79% (n=75) sont des cycles complets de 6 instillations ives de BCG, 1% (n=1) est un cycle de seulement 5 instillations, 9% (n=8) sont des cycles de seulement 4 instillations, 2% (n=2) sont des cycles de seulement 3 instillations, 4% (n=4) sont des cycles de seulement 2 instillations, 3% (n=3) sont des cycles d'une seule instillation. Enfin, dans 2% des cas (n=2), le nombre d'instillations reçues n'est pas connu.

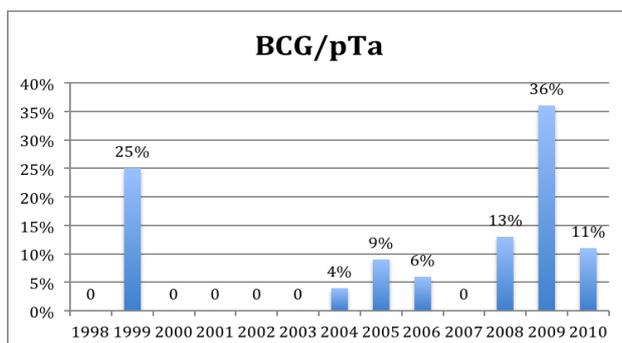
Il nous est paru intéressant de corrélér, au cours des années, la distribution des différents stades de tumeurs (l'indication à une instillation ives de BCG se décide, entre autre, en fonction du stade de la tumeur) avec le nombre d'instillations ives de BCG effectivement entreprises afin d'évaluer si la prise en charge thérapeutique a évolué au cours des années (voir Figure 8 et Annexe 5).

**Figure 8. Répartition des instillations de BCG en fonction des stades, au cours des ans**

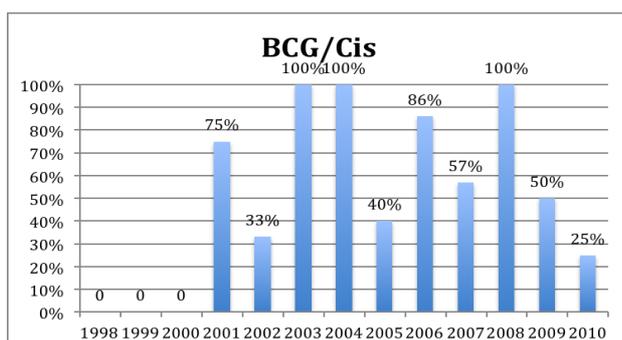
Illustration de la proportion (en pourcent) d'instillation ives de BCG en fonction des différents stades de tumeur, au cours des ans.



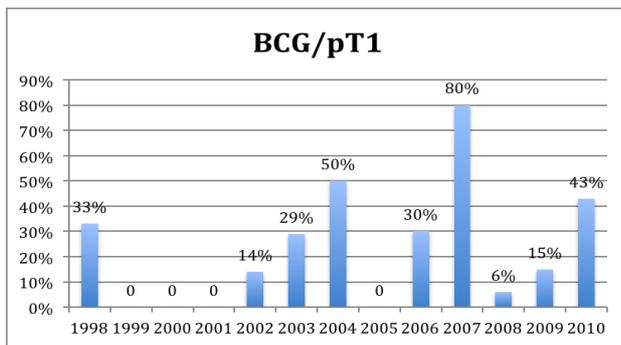
La figure 8A illustre la proportion d'instillations ives de BCG par rapport à l'ensemble des RTUV rapportant un résultat histopathologique positif au cours des ans. Pour la répartition détaillée en chiffres, voir annexe 5.



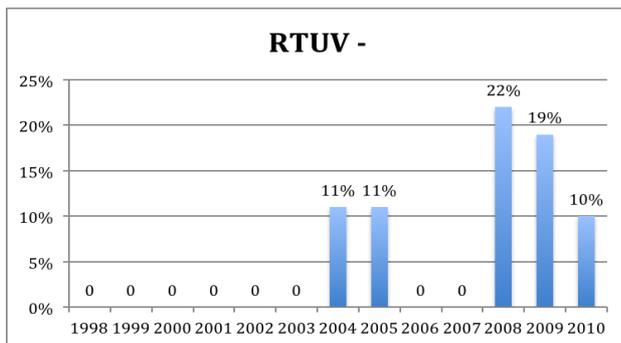
La figure 8B illustre la proportion d'instillations ives de BCG par rapport à l'ensemble des RTUV rapportant une tumeur de stade pTa au cours des ans. Pour la répartition détaillée en chiffres, voir annexe 5.



La figure 8C illustre la proportion d'instillations ives de BCG par rapport à l'ensemble des RTUV rapportant un Cis au cours des ans. Pour la répartition détaillée en chiffres, voir annexe 5.



La figure 8D illustre la proportion d'instillations ives de BCG par rapport à l'ensemble des RTUV rapportant une tumeur de stade pT1 au cours des ans. Pour la répartition détaillée en chiffres, voir annexe 5.



La figure 8E illustre la proportion d'instillations ives de BCG par rapport à l'ensemble des RTUV négatives au cours des ans. Pour la répartition détaillée en chiffres, voir annexe 5.

Parmi les 62 sujets traités par BCG, nous avons comparé le taux de récurrence et progression en différenciant l'application d'un cycle complet de 6 instillations hebdomadaires ives de BCG, à l'administration de cycles incomplets (moins de 6 instillations). Nous n'avons pas pris en considération les 2 cas où l'information sur le nombre d'instillations n'est pas connue.

Sur les 60 sujets étudiés, 77% (n=46) n'ont reçu que les cycles complets de BCG et 23% (n=14) ont reçu au moins un cycle de BCG incomplet. Parmi les 46 sujets ayant reçu un traitement complet, 19% (n=9) n'ont pas subi de progression ni de récurrence de leur tumeur, 46% (n=21) ont subi une récurrence de leur tumeur et 35% (n=16) ont subi une progression.

Parmi les 14 sujets ayant reçu un traitement incomplet, seuls 7% (n=1) n'ont pas subi de progression ni de récurrence de leur tumeur, alors que 36% (n=5) ont subi une récurrence de leur tumeur et 57% (n=8) ont subi une progression.

#### 4.4. Récurrence

Sur 157 sujets avec une tumeur non musculo-invasive à la première RTUV, 45% (n=70) vont subir une récurrence. Parmi les stades initialement pTa, 45% (n=42) auront au moins un épisode de récurrence, 50% (n=25) pour les pT1 et 25% (n=3) pour les Cis (voir figure 9). 52% (n=22) des sujets avec une tumeur récurrente de stade initial pTa auront reçu une chimiothérapie unique ives post RTUV, 36% (n=9) dans le groupe des sujets avec une tumeur de stade initial pT1 et 67% (n=2) dans le groupe des sujets avec une tumeur de stade initial Cis.

L'instillation intra-vésicale de BCG concerne 14% (n=6) des sujets avec une tumeur récurrente de stade initial pTa, 76% (n=19) des sujets avec une tumeur de stade initial pT1 et 100% (n=3) des sujets avec une tumeur de stade initial.

Un traitement combiné d'instillation ives de BCG et chimiothérapie a été administré à 9% (n=4) des sujets avec une tumeur récurrente de stade initial pTa, 20% (n=5) des sujets avec une tumeur de stade initial pT1 et 66% (n=2) des sujets avec une tumeur de stade initial.

#### 4.5. Progression

Sur les 157 sujets ayant un cancer non musculo-invasif à la première RTUV, 28% (n=44) vont expérimenter une progression tumorale dont 54% (n=24) sont des tumeurs ayant présentés un stade pTa au diagnostic initial, 36% (n=16) un stade pT1 et 9% (n=4) un Cis (voir Figure 9). L'instillation ives de BCG a été administrée à 62% (n=15) des sujets du groupe des tumeurs de stade initial pTa avec progression, 44% (n=7) des sujets du groupe des tumeurs de stade initial pT1 avec progression et 50% (n=2) des sujets avec une tumeur de stade initial Cis avec progression.

Lors de l'intervention, le chirurgien peut voir une lésion et savoir donc qu'il y a récurrence mais par contre il ne sait pas s'il s'agit ou pas d'une progression. Etant donné que l'instillation chimiothérapeutique se fait lors de l'intervention, le chirurgien ne sait pas s'il administre une instillation chimiothérapeutique sur une récurrence ou une progression. Par contre, à postériori, nous pouvons estimer l'importance du traitement chimiothérapeutique en le comparant à la progression (voir Figure 9). L'instillation ives chimiothérapeutique a été administrée à 42% (n=10) des sujets du groupe des tumeurs de stade initial pTa avec progression, 37% (n=6) des sujets du groupe des tumeurs de stade initial pT1 avec progression et 50% (n=2) des sujets avec une tumeur de stade initial Cis avec progression.

Un traitement combiné de BCG et de chimiothérapie ives a été administré à 42% (n=10) des sujets du groupe des tumeurs de stade initial pTa avec progression, 31% (n=5) des sujets du groupe des tumeurs de stade initial pT1 avec progression et aucun des sujets avec une tumeur de stade initial Cis avec progression.

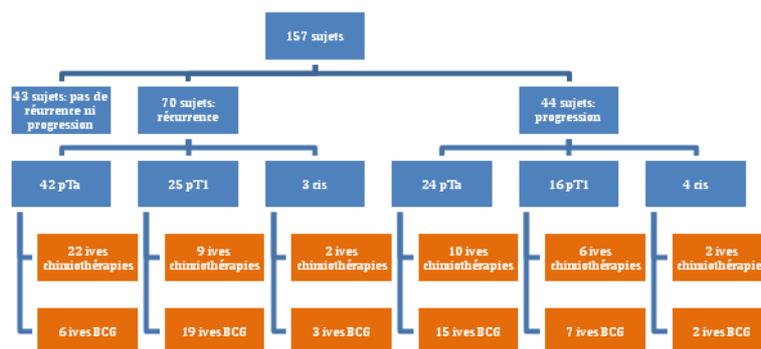


Figure 9. Répartition des progressions et récurrences au sein de l'étude

Répartition des 157 sujets de l'étude en fonction de l'évolution clinique (récurrence, progression ou ni progression ni récurrence), du stade tumoral et du traitement administré.

#### 4.6. Score de risque EORCT

Le calcul du score de l'EORTC nécessite un certain nombre d'informations cliniques et histopathologiques (Annexe 1). Malheureusement, l'ensemble de ces informations n'a pu être réuni que pour 94 sujets sur les 157 cas. Pour les cas restants, les informations étaient absentes ou incertaines. Avant de procéder à l'analyse des 94 sujets pour lesquels un score de risque de l'EORTC a été calculé, nous nous sommes assurés que ce groupe est représentatif de l'ensemble des 157 sujets en terme d'âge, de sexe, de répartition des stades tumoraux et de taux de récurrence et progression.

Sur les 94 sujets dont le facteur de risque de progression de l'EORTC a été étudié sur la tumeur primaire, 39% (n= 37) appartiennent au groupe de risque élevé, 42% (n=39) appartiennent au groupe de risque intermédiaire et 19% (n=18) appartiennent au groupe de risque faible (voir Figure 10).

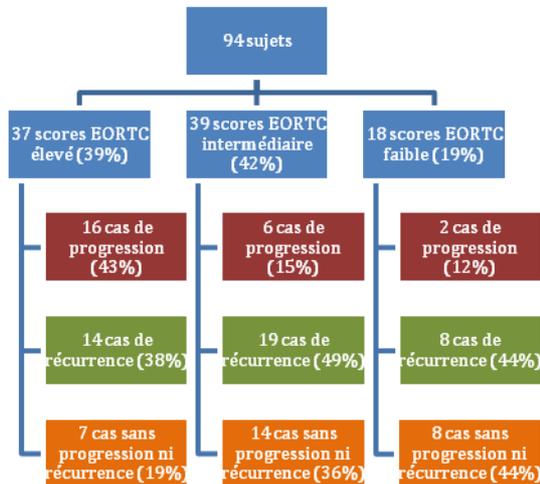
Parmi les 37 sujets avec une tumeur de risque élevé, 76% (n=28) ont reçu une série d'instillation ives de BCG. D'autre part, parmi ces sujets, 38% (n=14) subiront une récurrence, 43% (n=16) une progression et 19% (n=7) ne subiront ni progression ni récurrence.

Parmi les 39 sujets avec une tumeur de risque intermédiaire, 21% (n=8) ont reçu une instillation ives de BCG. D'autre part, parmi ces sujets, 49 % (n=19) subiront une récurrence, 15% (n=6) une progression et 36% (n=14) ne subiront ni progression ni récurrence.

Parmi les 18 sujets avec une tumeur de risque faible, 17% (n=3) ont reçu une instillation ives de BCG.

D'autre part, parmi ces sujets, 44% (n=8) subiront une récurrence, 12% (n=2) subira une progression et 44% (n=8) ne souffrira ni de progression ni de récurrence.

Sur 12 sujets avec un risque de progression intermédiaire évalué lors de la tumeur primaire, 2 (17%) sont devenu des hauts risques et 10 (83%) n'ont pas vu leur risque évoluer. Sur 7 sujets avec un risque de progression haut évalué lors de la tumeur primaire, 1(14%) a régressé et est devenu un bas risque, 6 (86%) sont resté des hauts risques.



**Figure 10. Score de risque de l'EORTC et évolution de la maladie**

Répartition des 94 sujets, pour lesquels un score de risque de l'EORTC a été calculé, en fonction du score et de l'évolution clinique (progression, récurrence ou sans progression ni récurrence).

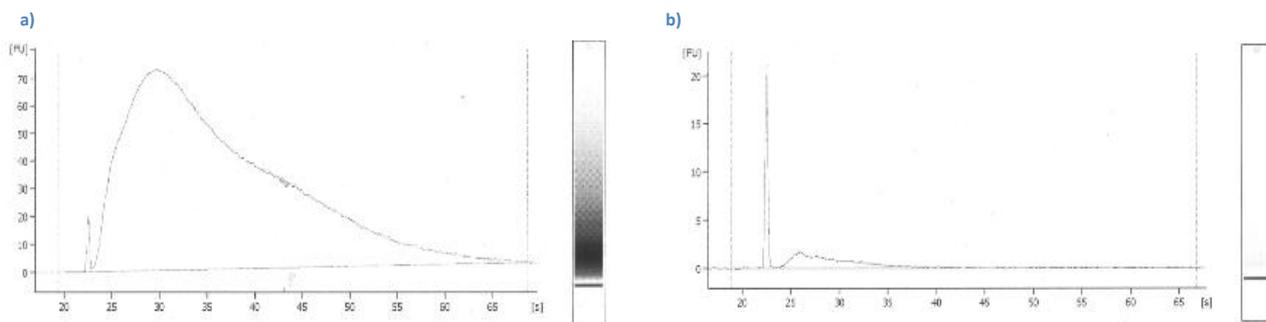
#### 4.7. Analyse longitudinale

6 patients ont été sélectionnés dans une approche longitudinale. Ce groupe ne contient qu'une seule femme. Ces patients ont été suivis entre juin 2004 et octobre 2010 avec un suivi moyen de 64 mois (extrêmes 26-100). Les sujets ont subi en moyenne 7 RTUV par patient (extrêmes 4-16). Parmi l'ensemble des TURV pratiquées, seule une partie des échantillons ont été sélectionnés sur la base du stade de la tumeur mise en évidence. Les scores de risque de progression de l'EORTC ont été calculés pour l'ensemble des échantillons tumoraux sélectionnés. L'évolution de la maladie et les détails des différents prélèvements sont exposés dans la Table 2 et les Annexes 6 et 7. Un total de 29 échantillons est examiné pour l'analyse par RCP en temps réels.

#### 4.8. RCP en temps réels

L'ARN a été purifié à partir de 29 échantillons de coupes fixées au formol et enrobées en paraffine, 7 ont été retirés car la concentration d'ARN obtenue était largement en dessous du minimum utilisable. Donc seulement 22 échantillons ont pu être utilisés pour la suite de l'étude. La médiane des concentrations d'ARN après élimination des 7 échantillons est 72.24 ng/μl (moyenne 282.49 ; extrêmes 21.1-1109.15). Les ratio A260/A280 et A260/A230 ont une moyenne de 1.92 (extrêmes 1.5–2.09) et 1.86 (extrêmes 0.74–2.6) respectivement (Annexe 8).

Les ARN purifiés ont ensuite été analysés par électrophorèse capillaire afin d'obtenir une nouvelle mesure de la concentration et une répartition de la longueur des fragments. Sur les 22 ARN, 4 ont été écartés de l'étude, 2 ont une concentration inférieure à la minimale acceptable (de plus l'un des 2 était dépourvu de pic de longueur de fragments d'ARN), 1 avait une concentration acceptable mais était dépourvu de pic de longueur de fragment d'ARN, enfin le dernier avait une concentration tout juste acceptable mais était dépourvu de pic de longueur de fragments acceptable (voir Figure 11). La concentration moyenne des 18 échantillons retenus est 89 ng/μl (médiane 336 ; extrêmes 23-1211) (Annexe 8).



**Figure 11. électrophorèse capillaire des échantillons 29 (a) et 22 (b)**

Temps de migration de l'ARN en seconde (axe x) sur l'intensité du signal fluorescent (axe y). Le premier pic représente l'étalonnage (a) et (b). L'électrophérogramme de l'échantillon 29 montre un deuxième pic, en forme de cloche, qui se situe entre 25 et 35 secondes et qui traduit la présence d'ARN fragmenté (a). Ce que l'on ne retrouve pas dans l'échantillon 22 (b).

Le RIN (RNA Integrity Number) moyen des 18 échantillons est 2.24 (extrêmes 1.1–2.6) (Annexe 8).

Nous avons analysé l'ancienneté des coupes afin d'essayer d'expliquer les différences de quantité d'ARN obtenue nous ayant amené à éliminer 11 échantillons. Parmi les échantillons éliminés, la date de prélèvement moyenne est 05.08.2006 (médiane 28.03.2006 ; extrêmes 31.04.2004–19.02.2009). Parmi les échantillons non éliminés, la date de prélèvement moyenne est 12.03.2006 (médiane 21.01.2006 ; extrêmes 07.01.2003–19.02.2009). La date de prélèvement ne semble donc pas être à l'origine de la faible quantité d'ARN dans les échantillons éliminés.

Nous avons analysé 16 ARN différents (2 échantillons supplémentaires ont été éliminés : car l'un deux était un échantillon sans tumeur et l'autre n'était oncologiquement pas relevant pour l'inclure dans notre étude). Parmi eux, 4 ont été analysés en duplicat dans des expériences indépendantes et 2 de ces 4 ont été ré-analysés (triplicats) après une nouvelle étape de purification de l'ARN en utilisant un kit de DNases supplémentaire. Nous avons donc au total analysés 22 échantillons par RCP.

Sur les 16 ARN analysés principalement seulement 5 sont validés par le contrôle de contamination d'ADN génomique (Cycle seuil  $\geq 30$ ). Afin d'évaluer la reproductibilité de la méthode, nous avons analysé en duplicat 3 des 5 échantillons ayant été validé par le contrôle de contamination d'ADN génomique. Les duplicats sont issus du même échantillon de synthèse d'ADNc que ceux utilisés pour la première analyse. Étonnamment, les échantillons dupliqués 5, 7 et 9 qui ont été validé lors de la première analyse (moyenne des cycles seuils 33; extrêmes 30–35), ont des valeurs de cycle seuil largement inférieur avec une moyenne des cycles seuils à 22 (extrêmes 20–26) (Annexe 9).

Nous avons procédé, pour les échantillons 5 et 9 à une nouvelle étape de purification de l'ARN en utilisant un kit de DNases supplémentaire. Malgré cette étape supplémentaire, le contrôle de contamination d'ADN génomique ne permet pas de valider les échantillons nouvellement purifiés (cycles seuils 25 et 28, respectivement).

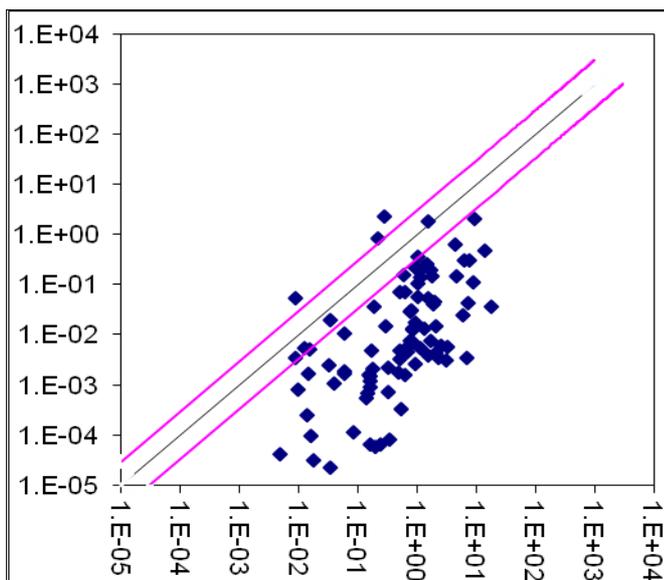
Etrangement, nous constatons dans ces échantillons répliqués 5, 7 et 9 une excellente conservation de l'expression des gènes domestiques (échantillon 5 = 17.21, 17.4, 17.63, échantillon 7 = 15.7, 15.67, échantillon 9 = 15.6, 15.6, 16.2). Cela exprime une certaine cohérence et reproductibilité de l'expérience.

La totalité des 22 échantillons ont un contrôle de transcription inverse dans la norme ( $\Delta$ Cycle seuil  $\leq 7$ ) avec une moyenne de 4 cycles seuils (extrêmes 3.94–6.95). La moyenne de l'amplification RCP des contrôles positifs est de 18 cycles seuils (extrêmes 17.34–17.69), respectant les critères de qualité imposés (Cycle seuil  $20 \pm 2$  et/ou pas plus de deux cycles seuils de différence entre les échantillons comparés).

Concernant les gènes domestiques, nous constatons une grande variabilité. Sur les 22 échantillons, la moyenne de cycles seuil est de 19.6, la médiane est de 17.5 (extrêmes 15.4–30.7) (Annexe 10). Nous constatons que le profil d'expression des gènes domestiques exprime des valeurs de 2 ordres de grandeur:

1. Les échantillons 2, 4, 5, 7, 9, 10, 23 et 27 forment un premier groupe avec une moyenne des cycles seuils à 16.3, une médiane à 16.1 et des valeurs extrêmes à 15.4 – 17.63.
2. Les échantillons 12, 13, 14, 15, 25 et 29 forment un deuxième groupe avec une moyenne des cycles seuils à 23.4, une médiane à 23.8 et des valeurs extrêmes à 21.6 – 24.9.

L'écart d'expression des gènes domestiques entre 2 séries doit être le plus faible possible pour permettre une comparaison. Dans notre cas, nos données montrent un écart significatif entre les gènes domestiques du groupe 1 - exprimant une moyenne de 16 cycles seuils - et ceux du groupe 2 - exprimant une moyenne de 23 cycles seuils - alors que globalement les gènes d'intérêt de ces 2 groupes expriment une moyenne similaires de 23.3 cycles seuils. Ceci rend évidemment invalide toute comparaison « normalisée » entre ces deux groupes d'échantillons (voir Figure 12).



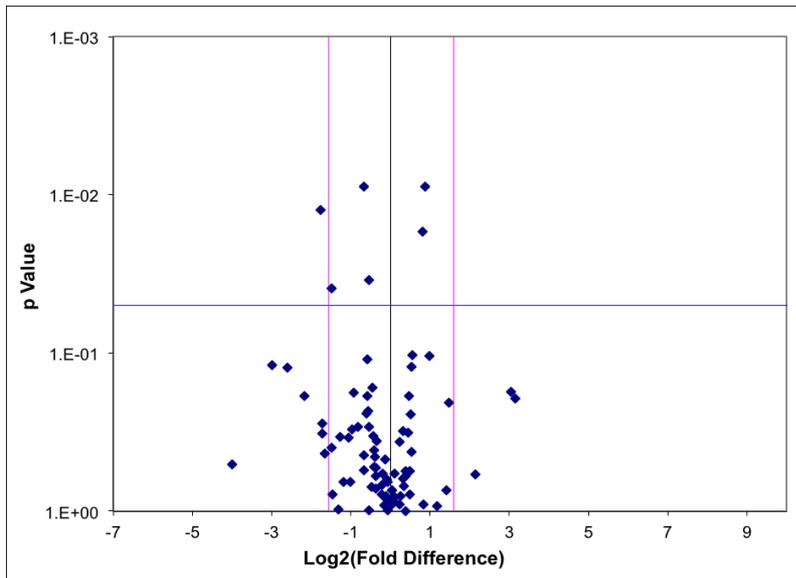
**Figure 12. Scatter plot groupes 1 versus 2 :**

Chaque losange violet désigne la moyenne du niveau d'expression normalisé ( $2^{-\Delta Ct}$ ) d'un gène dans les échantillons du groupe 2 (axe x) versus les échantillons du groupe 1 (axe y). La ligne noire indique des niveaux d'expression identiques entre les échantillons du groupe 1 et du groupe 2. Les lignes roses indiquent un seuil de changement d'expression des gènes de 3 fois entre les groupes 1 et 2. L'ensemble des échantillons du groupe 1 présente une moyenne de cycles seuils des gènes d'intérêt à 23.6, et des gènes domestiques à 16.1, alors que l'ensemble des échantillons du groupe 2 présente une moyenne de cycles seuils des gènes d'intérêt à 24.6, et des gènes domestiques à 23.4.

Qiagen n'a pas pu nous fournir d'explication concernant nos résultats, que ce soit concernant l'ADN génomique ou le manque de corrélation entre les gènes domestiques et les gènes d'intérêts dans certains de nos échantillons. Nous avons donc décidé d'une part de ne pas tenir compte des résultats concernant des contaminations éventuelles par de l'ADN génomique et d'autre part de restreindre nos analyses aux échantillons ayant un niveau d'expression des gènes domestiques comparable entre eux (i.e. au sein du groupe 1 ou au sein du groupe 2). Le résultat des différentes comparaisons a été analysé par Vulcano plot afin de définir les gènes qui présentent des différences d'expression significatives ( $p < 0.05$ ) pour une augmentation (ou diminution) donnée (dans notre cas nous avons choisi : 3 fois). Cette analyse tient compte de la variabilité des échantillons (par exemple la comparaison de duplicats, triplicats ou le cumul de données de différents échantillons) qui repose sur les écarts-types entre les données comparées.

Les échantillons 1 et 3 ont une expression de gènes domestiques avec des valeurs extrêmes de cycles seuils à 21.3 – 30.7 (moyenne 26.4 ; médiane 27.1). Ces écarts sont trop larges pour permettre une comparaison entre eux et une comparaison avec les groupes 1 et 2.

En fonction des échantillons comparables (voir Table 2), nous avons procédé à plusieurs types de comparaisons en fonction des sujets, des stades et des RTUV (voir Figure 13 ci-dessous et les Figures dans Annexe 11) :



**Figure 13. Exemple de Vulcano Plot f (i)**

Chaque losange violet dans le Vulcano plot désigne pour un gène, la différence d'expression ( $\log_2$ , axe x) entre les 2 groupes d'échantillons comparés versus la valeur p issue du test t de Student (axe y). La ligne noire indique des changements d'expression d'une fois. Les lignes roses indiquent un seuil de changement d'expression des gènes de 3 fois. La ligne bleu indique le seuil de la valeur p choisie (ici  $p < 0.05$ ).

Ce Vulcano plot montre la comparaison des échantillons 4 (stade pTa GIII Cis) et 5 (stade pTa GIII), 5 duplicat, 5 triplicat avec les échantillons 9 (stade pTa GII), 9 duplicat, 9 triplicat, 10 (stade pTa GII) et 23 (stade pTa GII).

Un gène sous-exprimé est mis en évidence dans les échantillons 4 et 5 : CD27. (voir sous f) i) dans le texte.

**Table 2. Résumé des échantillons comparés**

Date de prélèvement t <sup>a)</sup>	n° échantillon	n° patient	Stade tumoral
20.04.07	2	1	pT1
31.08.04	4	2	pTa/Cis
	5	2	pTa
21.01.06	7	2	pT1
	9	2	pTa
	10	2	pTa
02.03.04	12	3	pTa
21.10.05	13	3	pT1
09.05.03	14	4	pTa
	15	4	pT1
12.11.04	23	6	pTa
25.05.07	25	6	pT1 + Cis
10.08.07	27	6	pT1
25.04.08	29	6	pT2

<sup>a)</sup> La date de prélèvement correspond à la date de la RTUV

- Afin de savoir si l'environnement immunitaire d'un même patient lors de la même RTUV diffère d'une lésion à l'autre, nous avons comparé les échantillons de différentes lésions (i.e multiples foyers) au sein du même patient et lors de la même RTUV. Il s'agit donc d'une comparaison transversale de l'échantillon 9 (stade pTa GII) avec l'échantillon 7 (stade pT1 GII). Le résultat du vulcano plot ( $p < 0.05$ ) montre 9 gènes surexprimés (voir Figure 1 dans Annexe 11) dans l'échantillon 9: CD27, CMA1, TNFSF14, LTA, PTGS2, ITGA1, IRF4, IL5, IL6.
- Afin de savoir si l'environnement immunitaire d'une lésion chez un même patient diffère de la même lésion ayant fait une récurrence mais pas de progression lors de la RTUV suivante, nous avons comparé chez un même sujet les échantillons d'une lésion avec une lésion récurrente (donc de même stade) au prélèvement suivant. Il s'agit donc d'une comparaison longitudinale. Ceci

correspond à la comparaison de l'échantillon 5 (stade pTa GIII) avec l'échantillon 9 (stade pTa GII). Au résultat, 2 gènes surexprimés ont été mis en évidence dans l'échantillon 5 : FOXP2 et CTLA4 (voir Figure 2 dans Annexe 11).

- c) Afin de savoir si l'environnement immunitaire d'une lésion chez un même patient diffère d'une lésion ayant fait une progression lors de la RTUV suivante, nous avons comparé chez un même sujet une lésion avec une lésion ayant progressé au prélèvement suivant. Il s'agit donc d'une évaluation longitudinale. Ceci correspond à la comparaison de l'échantillon 5 (stade pTa GIII) avec l'échantillon 7 (stade pT1 GIII). Au résultat, 7 gènes surexprimés ont été mis en évidence dans l'échantillon 5 : LAT, TNFRSF18, PTGER2, FOS, ITGA1, EGR2, FOXP2 (voir Figure 3 dans Annexe 11).
- d) Afin de savoir si l'environnement immunitaire diffère entre les lésions d'un même patient entre 2 visites, quelque soit la lésion, nous avons comparé les échantillons des lésions de tous stades confondus entre 2 RTUV. Il s'agit donc d'une comparaison longitudinale. Ceci correspond à la comparaison des échantillons 4 (stade pTa GIII Cis) et 5 (stade pTa GIII) avec les échantillons 7 (stade pT1 GIII), 9 (stade pTa GII) et 10 (stade pTa GII). A noter que les échantillons 7, 9 et 10 correspondent à une progression. Au résultat, aucune différence significative d'expression des gènes n'a pu être mise en évidence (voir Figure 4 dans Annexe 11).
- e) Afin de savoir si l'environnement immunitaire entre les lésions de différents patients diffère entre une première RTUV avec une tumeur de stade pTa GI/GII et une autre RTUV avec une tumeur de stade pT1 GII, nous avons comparé les échantillons de lésions de stade pTa GI/GII lors de premières RTUV avec des échantillons de lésions de stade pT1 GII/III lors d'autres RTUV. Il s'agit donc d'une comparaison longitudinale. Ceci correspond à la comparaison des échantillons 12 (pTa GII) et 14 (pTa GII) avec les échantillons 13 (stade pT1 GII) et 15 (stade pT1 GIII). Au résultat, 2 gènes sous-exprimés ont été mis en évidence dans les échantillons 12 et 14 : CDK4 et CDK2 (voir Figure 5 dans Annexe 11).
- f) Afin de savoir si l'environnement immunitaire diffère d'un stade à l'autre, nous avons comparé les lésions de différents stades, sans prendre en compte les sujets ou les RTUV. Il s'agit donc d'une comparaison transversale. Cette approche permet d'exploiter nos données de manière transversale et d'inclure plus d'échantillons différents.
  - (i) pTa GIII-GIII Cis versus pTa GII  
Comparaison des échantillons 4 (stade pTa GIII Cis) et 5 (stade pTa GIII), 5 duplicat, 5 triplicat avec les échantillons 9 (stade pTa GII), 9 duplicat, 9 triplicat, 10 (stade pTa GII) et 23 (stade pTa GII). Au résultat, un gène sous-exprimé a été mis en évidence dans les échantillons 4 et 5 : CD27 (voir Figure 13).
  - ii) pTa GII versus pT1 GII-GIII  
Comparaison des échantillons 9 (stade pTa GII), 9 duplicat, 9 triplicat, 10 (stade pTa GII) et 23 (stade pTa GII) avec les échantillons 2 (pT1 GII), 7 (pT1 GIII), 7 duplicat et 27 (stade pT1 GII). Au résultat, un gène surexprimé a été mis en évidence dans les échantillons 9, 10 et 23 : IL5. (voir Figure 7 dans Annexe 11).
  - iii) pTa GIII-GIII Cis versus pT1GIII  
Comparaison des échantillons 4 (stade pTa GIII Cis), 5 (stade pTa GIII), 5 duplicat, 5 triplicat avec les échantillons 2 (stade pT1 GII), 7 (stade pT1 GIII), 7 duplicat et 27 (stade pT1 GII). Au résultat, 3 gènes surexprimés ont été mis en évidence dans les échantillons 4 et 5 : FOS, ERG2, CMA1 (voir Figure 8 dans Annexe 11).

Formellement il n'est pas juste de considérer les duplicats et triplicats d'un même échantillon comme indépendants (comme s'ils venaient de tumeurs différentes). Pour cette raison, nous avons refait les comparaisons en prenant la moyenne des échantillons 5, 9 (avec duplicat et triplicat) et 7 (avec duplicat) mais nous avons obtenu exactement les mêmes résultats. Comparer les échantillons dupliqués et tripliqués de manière indépendante ne semble donc pas mettre de biais.

La synthèse de ces comparaisons est illustrée dans la table 3 ci-dessous.

**Table 3 Comparaison de l'expression des gènes d'intérêt entre différents échantillons**

Type de comparaison	échantillons comparés	expression des gènes
<b>pTa versus pT1</b>	échantillons où les gènes sont <b>surexprimés</b> / <b>sousexprimés</b>	
a, même patient et même RTUV	<b>9</b> vs 7	CD27, CMA1, TNFSF14, LTA, PTGS2, ITGA1, IRF4, IL5, IL6
c, même patient, progression entre 2 RTUV	<b>5</b> vs 7	FOXP2, CTLA4
e, différents patients, progression entre 2 RTUV	<b>12, 14</b> vs 13, 15	CDK4 et CDK2
fii, différents patients	<b>9, 9d, 9t, 10, 23</b> vs 2, 7, 7d, 27	IL5
fiii, différents patients	<b>4, 5, 5d, 5t</b> vs 2, 7, 7d, 27	FOS, ERG2, CMA1
<b>pTa versus pTa</b>		
b, même patient, récurrence entre 2 RTUV	<b>5</b> vs 9	FOXP2 et CTLA4
fi, différents patients	<b>5, 5d, 5t, 4</b> vs 9, 9d, 9t, 10, 23	CD27
<b>Une RTUV versus une autre RTUV (quelque soit la lésion)</b>		
d, même patient, évolution entre 2 RTUV	4, 5 vs 7, 9, 10	aucun gène

## 5. DISCUSSION

De bon sens, il est attendu d'une RTUV optimale une éradication des tumeurs de vessie non-musculo-invasives. La variation élevée du taux de récurrences de ce cancer semble indiquer que les RTUV sont pour la plupart incomplètes ou subissent des récurrences (46). Il est donc légitime et nécessaire de compléter la RTUV par une étape supplémentaire et systématique se traduisant, dans les recommandations, par une chimiothérapie ives post-RTUV chez tous les patients. Nos données montrent que sur les 157 sujets de l'étude avec un cancer de vessie non-musculo-invasif, seuls 55 sujets (35%) ont effectivement reçu une chimiothérapie ives. Plusieurs récentes études questionnent cette systématique absolue de traitement de toutes les lésions. Gudjónsson et al. démontrent dans une étude prospective randomisée multicentrique que la chimiothérapie ives post-RTUV ne serait bénéfique que pour des tumeurs primaires et solitaires, ce que l'on retrouve chez les patients à bas risque de récurrence. En comparaison, elle ne serait pas bénéfique pour les tumeurs de risque de récurrence intermédiaire et élevé (15)(47). Il serait donc profitable de faire des instillations ives chimiothérapeutiques en cas de tumeurs unique de stade pTa et, plus discutable en cas de tumeurs de stade plus avancé et/ou multi-focales. Nos données montrent que les Cis, des tumeurs à fort potentiel de progression, bénéficient du taux le plus élevé de chimiothérapie ives

post-RTUV. Il est intéressant de rappeler que l'instillation ives chimiothérapeutique se fait lors de l'intervention, immédiatement après la RTUV. Comme il n'est pas pratiqué d'examen extemporané pour ce type d'intervention, le chirurgien ne sait pas, à l'œil, quel stade/grade il traite et ne peut donc pas juger de la pertinence d'une chimiothérapie ives ou non. L'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), en collaboration avec le Service d'urologie du CHUV, a exploité une technique de diagnostic photodynamique permettant de mettre en évidence des lésions planes (i.e Cis, de haut risque de progression), indécélable par le chirurgien lors de cystoscopie standard à la lumière blanche (48)(49). Cet outil explique possiblement le fait que, dans notre étude, 38% des tumeurs Cis sont traitées par chimiothérapie ives. Le chirurgien traite donc plus une tumeur à fort potentiel de progression que des tumeurs de stade pTa, pT1 (à priori de risque de récurrence plus modéré) qui ne sont traités qu'à 23% et 10%, respectivement. Au vu des résultats de l'étude de Gudjónsson et al., la proportion de traitement par instillation ives chimiothérapeutique plus grande pour le stade Cis que les stades pTa et pT1, pratiquée au CHUV, est discutable.

Nos données montrent une augmentation, au cours des années et plus particulièrement à partir du milieu de la première décennie des années 2000, du taux de RTUV positives traitées par chimiothérapie ives. Ceci corrèle avec la publication d'une méta-analyse de 7 essais randomisés démontrant l'efficacité de la chimiothérapie ives post-RTUV dans la réduction des récurrences (8). Les instillations ives de BCG ne montrent pas d'évolution dans le temps.

Contrairement à la chimiothérapie ives, la décision de procéder à un cycle d'instillation de BCG se fait à distance de la RTUV, en s'appuyant sur le résultat anatomopathologique. Les recommandations montrent la supériorité du BCG contre la récurrence. Le BCG bénéficie d'un avantage supplémentaire dans la réduction de la progression. Nos données montrent que 63% des Cis, tumeur à haut risque de progression, sont traités par BCG, et de manière dégressive pour les stades pTa et pT1.

Globalement, pour les deux modalités de traitement, on peut se demander pourquoi les recommandations issues des méta-analyses ne sont pas systématiquement suivies pour les décisions thérapeutiques. Il semble persister un flou dans la conduite thérapeutique des tumeurs de la vessie.

Le CHUV n'applique pas formellement la stratification du risque de l'EORTC préconisé par l'EAU. Pourtant, en calculant rétrospectivement le score de risque de progression de l'EORTC, on note que dans notre étude, 76% des patients avec une tumeur de risque élevé ont effectivement reçu du BCG ives contre 21% pour le risque intermédiaire et 17% pour le risque faible (i. e. gradient qui respecte la prise en charge que l'on aurait eu en se basant, dès le début de la prise en charge, sur le score de risque de l'EORTC). Nous supposons que les chirurgiens façonnent leur prise en charge durant l'intervention selon des critères adaptés à la situation et tendent ainsi à une stratification des risques permettant un traitement adapté, de la même manière que le permet le score de l'EORTC, en tout cas en ce qui concerne les patients à haut risque de progression.

Nous l'avons vu, une RTUV incomplète est un risque évident de récurrence tumorale. La RTUV étant une technique nécessitant l'apprentissage et un « coup de main » à appréhender, elle est donc opérateur-dépendante. Dans un lieu comme le CHUV, centre universitaire formant en permanence de nouveaux urologues, cette donnée ne peut être ignorée. Et le principe de la RTUV de pointe éradiquant la tumeur, ne peut donc être envisagé de manière raisonnable.

Lorsqu'on corrèle rétrospectivement la proportion de progression et récurrence au score de risque de l'EORCT dans notre étude, on se rend bien compte de l'efficacité d'une telle classification et donc de l'intérêt de stratifier le risque. L'application du score de l'EORTC est relativement récente (elle a été introduite en 2008 dans les recommandations de l'EAU) mais semble être une valeur prometteuse comme base décisionnelle et rationnelle pour le traitement du cancer de la vessie (25).

L'archivage de tissus FFPE à l'avantage de représenter une source de matériel considérable et de grande valeur pour la recherche. L'exploitation de ces données est toutefois délicate et la qualité médiocre de l'ARN dû au processus de fixation et d'embaumement limite leur utilisation. Nos données montrent des quantités et concentrations d'ARN trop faibles pour être exploitées pour 11 des 29 échantillons examinés. L'analyse des dates des prélèvements semble infirmer la cause de l'ancienneté des tissus pour expliquer l'obtention de quantités d'ARN insuffisantes. Le protocole de prélèvement, de préparation et de stockage des tissus pourrait, dans notre étude, être à l'origine des faibles quantités/concentrations obtenues. En effet, nous ne pouvons certifier que chaque étape de l'archivage des coupes de tissus prélevé a été établi de la manière la plus optimale: prélèvement de la pièce de résection en salle d'opération, quantité de tissu inclus dans l'échantillon, type et temps de fixation à la formalin, température de la paraffine lors de l'imprégnation, lieu et température de stockage. Une dégradation accélérée du matériel génétique peut survenir à chacune de ces étapes si elles ne sont pas correctement respectées.

L'utilisation d'un kit d'amplification commercial, comme celui utilisé ici, devrait avoir l'avantage de réduire les erreurs spécifiques à l'amplification et quantification des transcrits d'ARN par RCP, puisque les diverses amorces utilisées ont été validées. Néanmoins, toutes variations dans la quantité ou la qualité du matériel de base des échantillons (taille du tissu par rapport à la paraffine, intégrité de l'ARN purifié, autres) ou des variations inhérentes aux divers pipetages effectués peuvent être à l'origine de variations dans la quantification des gènes. Ceci est d'autant plus relevant lorsque les échantillons proviennent de différents individus, différents tissus et à différents moments. Ces variations traduiront de fausses interprétations des profils d'expressions dérivés du gène d'intérêt. Afin de compenser les variations échantillon-échantillon, série-série de la RCP, une normalisation du gène d'intérêt est essentielle. Un gène domestique stable, indépendant des conditions et du déroulement de l'expérience avec un cycle seuil similaire pour chaque échantillon, est donc souvent utilisé comme gène de référence. Son expression, alors considérée comme constante est utilisée pour une quantification relative du gène d'intérêt. Cependant, la qualité des données normalisées des gènes d'intérêt ne peut être plus performante que la qualité de l'expression du gène domestique lui-même. Dans ce sens, toute variation du gène domestique masquera les réels changements et produira des artefacts. Cependant, 3 des gènes domestiques utilisés dans le kit de Qiagen avaient déjà précédemment été démontrés comme exprimés de manière stable dans les cancers de vessie (50)(51).

L'écart d'expression des gènes domestiques entre 2 séries doit être le plus faible possible pour permettre une comparaison. Dans notre cas, nos données montrent un écart significatif entre les gènes domestiques du groupe 1 -exprimant une moyenne de 16 cycles seuils- et ceux du groupe 2 -exprimant une moyenne de 23 cycles seuils- alors que globalement les gènes d'intérêt de ces 2 groupes expriment une moyenne similaires de 23.3 cycles seuils. Ceci rend évidemment invalide toute comparaison « normalisée » entre ces deux groupes d'échantillons.

On pourrait penser que les gènes domestiques avec des cycles seuils entre 21 et 23 (expression la plus faible) seraient liés à des échantillons d'ARN particulièrement dégradés raison pour laquelle on ne pourrait amplifier que très peu d'ARN. Mais cette théorie n'est pas valable car l'expression des gènes d'intérêt est globalement identique entre les deux groupes. Les moyennes des écarts types des gènes d'intérêt sont similaires entre les groupes 1 et 2 (2.07 pour le groupe 1 et 2.23 pour le groupe 2) alors que les moyennes des écarts types des gènes domestiques sont différentes entre les groupes 1 et 2 (0.89 pour le groupe 1 et 1.54 pour le groupe 2) ce qui tend à démontrer l'incohérence intrinsèque de l'expression des gènes domestiques dans ces expériences.

Lorsque l'on compare les gènes domestiques des échantillons dupliqués/tripliqués avec l'échantillon primaire, nos données expriment une bonne stabilité et reproductivité de l'expression des gènes domestiques alors que l'expression du contrôle de contamination d'ADN génomique est très variable entre les échantillons répliqués. La différence entre la moyenne des cycles seuils d'ADN génomique dans

échantillons primaires 5, 7 et 9 et la moyenne dans les échantillons dupliqués respectifs, est de 11 cycles seuils. Il faut souligner que 3.3 cycles seuils correspondent à une augmentation d'ADN génomique de 10 fois (une augmentation de 6.6 cycles seuils correspond à une augmentation d'ADN génomique de 100 fois) et de la même manière, une différence de 11 cycles seuils correspondrait à une augmentation d'ADN génomique de presque 100'000 fois, ce qui est hautement improbable. De plus, il faut remarquer que les cycles seuils des gènes domestiques ainsi que globalement des autres gènes n'ont eux pas montré des variations similaires dans ces mêmes échantillons.

Afin d'écartier une cause liée à une éventuelle série de lots de kits défectueux nous avons comparé l'expression d'ADN génomique issu d'une autre série de lots. Les analyses ont, par ailleurs, été menées par 2 expérimentateurs qui aboutissent à la même variabilité d'ADN génomique à travers les échantillons. Nous avons également procédé à une nouvelle purification de l'ARN, en prenant d'avantage de précaution à éliminer des sources potentielles de contaminants génomiques et en procédant à une nouvelle étape de purification par DNAases. Aucune de ces investigations n'a permis de mettre en évidence un lien de causalité à ces variations disparates du test de contrôle d'ADN génomique. Nos données impliquant une étape de DNAases supplémentaire montrent même un test de contrôle d'ADN génomique traduisant étrangement une augmentation de la contamination génomique.

Qiagen n'ayant pu nous fournir d'explications valables concernant ces divers problèmes, nous avons tout de même tenté quelques comparaisons en espérant que nos données soient exploitables.

L'une des questions était de savoir si l'environnement immunitaire des lésions d'un même patient au même moment (comparaison « a ») diffère plus (ou moins) que si l'on compare des lésions de stade identique lors d'une récurrence (comparaison « b »). On constate ici qu'il y a plus de différence entre les stades tumoraux qu'entre les lésions qui récurrent au même stade.

Pour la comparaison « c », la question était de mettre en valeur les différences dans l'environnement immunitaire lors de progression. On s'attendrait à voir des différences similaires à la comparaison « a » (ou éventuellement encore plus de différences puisque les échantillons ont été prélevés à plusieurs moments au cours de la maladie). Or, on constate que ce sont moins et des gènes différents qui sont affectés. La comparaison « e » est semblable à la comparaison « c » mais pour 2 sujets différents. On s'attendrait donc un résultat similaire. A nouveau ici, d'autres gènes sont mis en évidence.

Il en est de même pour les différentes comparaisons « f » qui mettent à chaque comparaison d'autres gènes en évidence sans aucune relation.

La comparaison « d », met en évidence que la prise en considération de plusieurs échantillons (5 échantillons contre seulement 2 pour les comparaisons « a », « b » et « c ») semble suggérer qu'il n'y a pas de différences des gènes immunitaires si on considère la vessie dans son entier, entre 2 visites.

La cause à cela peut être que la technique que nous avons utilisée n'est pas concluante et/ou que la quantité de données est insuffisante pour que les différences observées, bien que significatives, aient une relevance biologique ou médicale.

L'utilisation du kit commercial de Qiagen s'est avérée problématique de part les difficultés à évaluer objectivement de la relevance d'éventuelles contaminations d'ADN génomique ou de la variation paradoxale de l'expression des gènes domestiques. En effet, de par la nature du kit lui-même (mix de pré-amplification contenant tout les 90 primers nécessaires pour une pré-amplification des gènes d'intérêt, des gènes domestiques et de l'éventuel ADN génomique, ainsi que des plaques 384 puits contenant déjà les primers nécessaires à la RCP finale), aucun contrôle hors ceux intégrés dans le kit n'a été possible. Ceci nous a grandement handicapés pour mener à bien nos analyses, nous privant d'une bonne partie des comparaisons que nous aurions voulu faire.

L'analyse des caractéristiques immunosuppressives du cancer de la vessie par RCP quantitative en temps réel, de nos données, ne nous a pas permis pas de mettre en valeur un/des gène(s) plus particulièrement. De plus, au vu du nombre d'échantillons inclus, une interprétation de ces gènes sur- ou sous-exprimés n'aurait pas de valeur significative. Les gènes mis en évidence sont disparates et sans relation d'une comparaison à l'autre. Une analyse basée sur la progression des risques intermédiaires s'avère limitée.

Effectivement, dans notre étude seul 15% ont progressé, incluant 2 patients avec des échantillons de RTUV disponibles pour analyse. Une étude ultérieure devrait donc soit se faire dans un centre beaucoup plus grand que le CHUV soit en collaboration multicentrique pour obtenir un nombre satisfaisant d'échantillons ou se faire sur d'autres types critères que la progression des tumeurs de risque intermédiaire.

Le cancer de la vessie nécessite un suivi au long cours car le risque de récurrence/progression perdure longtemps. Ce pose alors la problématique du suivi des patients dont une partie nous échappe car ils ne sont pas suivis entièrement au CHUV ou réalisent après un séjour hospitalier l'entier du suivi chez un urologue de ville.

Malgré que le Service d'urologie du CHUV n'exploite pas l'évaluation du risque de progression de l'EORTC préconisée par l'EAU, nos données montrent une certaine cohérence clinique et chirurgicale. La prise en charge opérateur-dépendante du CHUV, qui existe depuis bien avant la mise sur pied des tables de score de l'EORTC, prend également en compte, de manière sous-jacente, l'évaluation des risques de progression.

Toutefois, le CHUV n'applique pas les recommandations thérapeutiques systématiques préconisant de traiter tous les cancers de vessie par une chimiothérapie ives, pour la prévention de la récurrence.

Il serait intéressant de mener à bien une étude clinique comparant la pratique du CHUV à une utilisation du score de risque de récurrence/progression systématique.

Les nombreux facteurs impliqués dans le cancer de la vessie (i.e risques de récurrences/progression, site de la lésion lors de la récidives/progression, traitement ives opérateur/hôpital/pays-dépendant) montrent qu'il y a un clair besoin de rationaliser la prise en charge.

## 6. ABRÉVIATIONS

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire

**ADNg** : acide désoxyribonucléique génomique

**ARN** : acide ribonucléique

**BCG** : bacille Calmette-Guérin

**Cis** : carcinome in situ

**CT** : Cycle reshold, cycle seuil

**CHUV** : Centre Hospitalier Universitaire Vaudois

**EAU** : European Association of Urology, Association Européenne d'Urologie

**EORTC** : European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Organisation européenne de recherche sur le traitement du cancer

**FFPE** : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, fixé au formol et enrobé à la paraffine

**Ives** : intra-vésical

**RIN** : RNA integrity number, valeur d'intégrité de l'ARN

**RTUV** : résection trans-urétrale vésicale

**RT-PCR** : Real time polymerase chain reaction, réaction en chaîne par polymérase

**TNM** : Tumeur Nœud lymphatiques Métastases

**WHO** : World Health Organization, organisation mondiale de la santé

## 7. REMERCIEMENTS

**Dr. Denise Nardelli Haefliger**, Privat-Doctent, Service d'Urologie, CHUV.

**Prof. Daniel Speiser**, Ludwig Center for Cancer Research of the University of Lausanne.

**Martine Bobst**, technicienne en laboratoire, Service d'Urologie, CHUV.

**Unité de Recherche en Urologie**, Service d'Urologie, CHUV.

## 8. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46(4):765–81.
2. Locke JR, Hill DE, Walzer Y. Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J. Urol*. 1985 juin;133(6):1034–5.
3. Murta-Nascimento C, Schmitz-Dräger BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX, et al. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J Urol*. 2007 juin;25(3):285–95.
4. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int. J. Cancer*. 2000 avr 15;86(2):289–94.
5. Vineis P, Pirastu R. Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control*. 1997 mai;8(3):346–55.
6. Vlaovic P, Jewett MAS. Cyclophosphamide-induced bladder cancer. *Can J Urol*. 1999 avr;6(2):745–8.
7. Solsona E, Iborra I, Ricós JV, Monrós JL, Casanova J, Dumont R. Effectiveness of a single immediate mitomycin C instillation in patients with low risk superficial bladder cancer: short and long-term followup. *J. Urol*. 1999 avr;161(4):1120–3.

8. Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden APM. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J. Urol.* 2004 juin;171(6 Pt 1):2186–2190, quiz 2435.
9. Sylvester RJ, van der MEIJDEN APM, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J. Urol.* 2002 nov;168(5):1964–70.
10. Koya MP, Simon MA, Soloway MS. Complications of intravesical therapy for urothelial cancer of the bladder. *J. Urol.* 2006 juin;175(6):2004–10.
11. Böhle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J. Urol.* 2003 janv;169(1):90–5.
12. van Rhijn BWG, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, et al. Recurrence and Progression of Disease in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: From Epidemiology to Treatment Strategy. *European Urology.* 2009 sept;56(3):430–42.
13. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur. Urol.* 2008 août;54(2):303–14.
14. Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, et al. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int.* 2001 août;88(3):209–16.
15. Gudjónsson S, Adell L, Merdasa F, Olsson R, Larsson B, Davidsson T, et al. Should all patients with non-muscle-invasive bladder cancer receive early intravesical chemotherapy after transurethral resection? The results of a prospective randomised multicentre study. *Eur. Urol.* 2009 avr;55(4):773–80.
16. Herr HW. Is maintenance Bacillus Calmette-Guérin really necessary? *Eur. Urol.* 2008 nov;54(5):971–3.
17. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World Journal of Urology.* 2009 mars 7;27(3):295–300.
18. Hollenbeck BK, Ye Z, Dunn RL, Montie JE, Birkmeyer JD. Provider treatment intensity and outcomes for patients with early-stage bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009 avr 15;101(8):571–80.
19. Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. 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.* 2006 mars;49(3):466–465; discussion 475–477.
20. Kurth KH, Denis L, Bouffieux C, Sylvester R, Debruyne FM, Pavone-Macaluso M, et al. Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumours. *Eur. J. Cancer.* 1995 oct;31A(11):1840–6.
21. Kurth K-H, Sylvester RJ. Prognostic Factors in Non-Muscle-Invasive Bladder Tumors. *European Urology Supplements.* 2007 août;6(14):789–99.
22. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodríguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J. Urol.* 2000 janv;163(1):73–8.

23. Sylvester RJ, van der Meijden APM, Witjes JA, Kurth K. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J. Urol.* 2005 juill;174(1):86–91; discussion 91–92.
24. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, et al. Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J. Urol.* 2000 avr;163(4):1124–9.
25. Seo KW, Kim BH, Park CH, Kim CI, Chang HS. The Efficacy of the EORTC Scoring System and Risk Tables for the Prediction of Recurrence and Progression of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer after Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Instillation. *Korean Journal of Urology.* 2010;51(3):165.
26. Stein JP, Penson DF. Invasive T1 bladder cancer: indications and rationale for radical cystectomy. *BJU Int.* 2008 août;102(3):270–5.
27. Bryan RT, Wallace DMA. « Superficial » bladder cancer - time to uncouple pT1 tumours from pTa tumours. *BJU Int.* 2002 déc;90(9):846–52.
28. Birkhahn M, Mitra AP, Williams AJ, Lam G, Ye W, Datar RH, et al. Predicting Recurrence and Progression of Noninvasive Papillary Bladder Cancer at Initial Presentation Based on Quantitative Gene Expression Profiles. *European Urology.* 2010 janv;57(1):12–20.
29. Konety BR. Molecular markers in bladder cancer: a critical appraisal. *Urol. Oncol.* 2006 août;24(4):326–37.
30. van der Aa MNM, van Leenders GJLH, Steyerberg EW, van Rhijn BW, Jöbsis AC, Zwarthoff EC, et al. A new system for substaging pT1 papillary bladder cancer: a prognostic evaluation. *Hum. Pathol.* 2005 sept;36(9):981–6.
31. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1–27.
32. Thomas L. In: Discussion of Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. P.B. Hoeber. New York: H. S. Lawrence; 1959.
33. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001 avr 26;410(6832):1107–11.
34. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006 sept 29;313(5795):1960–4.
35. 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 mars 6;104(10):3967–72.
36. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression. *JNCI Journal of the National Cancer Institute.* 1989 déc 20;81(24):1893–904.
37. 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 déc 20;102(51):18538–43.

38. Romero JM, Jiménez P, Cabrera T, Cózar JM, Pedrinaci S, Tallada M, et al. Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int. J. Cancer*. 2005 févr 10;113(4):605–10.
39. Cathro HP, Smolkin ME, Theodorescu D, Jo VY, Ferrone S, Frierson HF Jr. Relationship between HLA class I antigen processing machinery component expression and the clinicopathologic characteristics of bladder carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010 mars;59(3):465–72.
40. Cabrera T, Pedrajas G, Cozar JM, Garrido A, Vicente J, Tallada M, et al. HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens*. 2003 oct;62(4):324–7.
41. Inman BA, Frigola X, Dong H, Kwon ED. Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 févr;7(1):15–30.
42. Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J. Clin. Immunol.* 2008 nov;28(6):635–9.
43. Loskog A, Ninalga C, Paul-Wetterberg G, de la Torre M, Malmström P-U, Tötterman TH. Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines. *J. Urol.* 2007 janv;177(1):353–8.
44. Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, Farmer SA, Lohse CM, Kuntz SM, et al. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin. Cancer Res.* 2008 août 1;14(15):4800–8.
45. D’Orazio TJ, Niederkorn JY. A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. *J. Immunol.* 1998 mars 1;160(5):2089–98.
46. Brausi M, Collette L, Kurth K, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur. Urol.* 2002 mai;41(5):523–31.
47. Berrum-Svennung I, Granfors T, Jahnsen S, Boman H, Holmäng S. A single instillation of epirubicin after transurethral resection of bladder tumors prevents only small recurrences. *J. Urol.* 2008 janv;179(1):101–105; discussion 105–106.
48. Jichlinski P, Mizeret J, Forrer M, Wagnière G, Van den Bergh H, Schmidlin F, et al. [Superficial bladder tumors. Pathological and clinical review and presentation of a new diagnostic method: fluorescence photodetection of transitional epithelial carcinomas based on protoporphyrin IX induction with delta-aminolevulinic acid (5-ALA)]. *Rev Med Suisse Romande*. 1995 mars;115(3):233–7.
49. Kausch I, Sommerauer M, Montorsi F, Stenzl A, Jacqmin D, Jichlinski P, et al. [Fluorescence diagnosis in patients with non-muscle invasive bladder cancer: results of a metaanalysis]. *Aktuelle Urol.* 2010 mai;41(3):171–7.
50. Ohl F, Jung M, Radonić A, Sachs M, Loening SA, Jung K. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J. Urol.* 2006 mai;175(5):1915–20.
51. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab. Invest.* 2005 janv;85(1):154–9.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Système de notation de l'EORTC

Factor	Recurrence	Progression
Number of Tumors		
Single	0	0
2-7	3	3
≥ 8	6	3
Tumor diameter		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
Prior recurrence rate		
Primary	0	0
≤ 1 recurrence / year	2	2
> 1 recurrence / year	4	2
Category		
Ta	0	0
T1	1	4
Concomitant CIS		
No	0	0
Yes	1	6
Grade (1973 WHO)		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
<b>Total score</b>	<b>0-17</b>	<b>0-23</b>

## Annexe 2 : Groupes de risque de l'EORTC

Recurrence score	Probability of recurrence at 1 year	Probability of recurrence at 1 year (95% CI)	Probability of recurrence at 5 years	Probability of recurrence at 5 years (95% CI)	Recurrence risk group
	%	(95% CI)	%	(95% CI)	
0	15	(10-19)	31	(24-37)	Low risk
1-4	24	(21-26)	46	(42-49)	Intermediate risk
5-9	38	(35-41)	62	(58-65)	Intermediate risk
10-17	61	(55-67)	78	(73-84)	High risk
Progression score	Probability of progression at 1 year	Probability of progression at 1 year (95% CI)	Probability of progression at 5 years	Probability of progression at 5 years (95% CI)	Progression risk group
	%	(95% CI)	%	(95% CI)	
0	0.2	(0-0.7)	0.8	(0-1.7)	Low risk
2-6	1	(0.4-1.6)	6	(5-8)	Intermediate risk
7-13	5	(4-7)	17	(14-20)	High risk
14-23	17	(10-24)	45	(35-55)	High risk

### Annexe 3 : Symboles et description

Symbole	Description	Symbole	Description
BTLA	B and T lymphocyte associated	ITCH	Itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)
CBLB	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	ITGA1	Integrin, alpha 1
CCL3L1	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	JAK1	Janus kinase 1
CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	JAK3	Janus kinase 3
CD27	CD27 molecule	JUN	Jun oncogene
CD28	CD28 molecule	LAT	Linker for activation of T cells
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	LEP	Leptin
CD40LG	CD40 ligand	LGALS3	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3
CD70	CD70 molecule	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	MEF2A	Myocyte enhancer factor 2A
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	NFATC1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
CMA1	Chymase 1, mast cell	NFATC2	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2
CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	NFATC3	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	NHLH2	Nescient helix loop helix 2
DGKA	Diacylglycerol kinase, alpha 80kDa	NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
DGKZ	Diacylglycerol kinase, zeta 104kDa	PDCD1	Programmed cell death 1
EGR2	Early growth response 2	PRF1	Perforin 1 (pore forming protein)
EGR3	Early growth response 3	PRKCG	Protein kinase C, gamma
EOMES	Eomesodermin homolog (Xenopus laevis)	PTGER2	Prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	RNF128	Ring finger protein 128
FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	SELL	Selectin L
FOXP1	Forkhead box P1	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
FOXP2	Forkhead box P2	STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced
FOXP3	Forkhead box P3	TBX21	T-box 21
GATA3	GATA binding protein 3	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
GZMB	Granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a

Symbole	Description	Symbole	Description
HDAC9	Histone deacetylase 9	TNFRSF14	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	TNFRSF18	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18
ICOS	Inducible T-cell co-stimulator	TNFRSF4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
IFNG	Interferon, gamma	TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
IL10	Interleukin 10	TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
IL10RA	Interleukin 10 receptor, alpha	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
IL13	Interleukin 13	TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
IL15	Interleukin 15	TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
IL17A	Interleukin 17A	B2M	Beta-2-microglobulin
IL1A	Interleukin 1, alpha	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IL2	Interleukin 2	RPL13A	Ribosomal protein L13a
IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IL2RB	Interleukin 2 receptor, beta	ACTB	Actin, beta
IL31	Interleukin 31	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
IL4	Interleukin 4	RTC	Reverse Transcription Control
IL5	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)	RTC	Reverse Transcription Control
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	RTC	Reverse Transcription Control
IL7R	Interleukin 7 receptor	PPC	Positive PCR Control
ING4	Inhibitor of growth family, member 4	PPC	Positive PCR Control
IRF4	Interferon regulatory factor 4	PPC	Positive PCR Control

**Annexes 4 : Répartition des chimiothérapies ives pratiquées en fonction des RTUV positives au cours des ans**

Année	RTUV positives	Chimiothérapies ives pratiquées	Proportion en %
1998	10	2	20%
1999	12	2	17%
2000	6	0	0%
2001	10	2	20%
2002	18	2	11%
2003	26	6	23%
2004	31	7	23%
2005	50	7	14%
2006	69	13	19%
2007	56	20	36%
2008	71	28	39%
2009	49	13	27%
2010	31	2	6%

**Annexe 5 : Répartition des BCG ives pratiqués en fonction des stades tumoraux au cours des ans**

Année	Total des RTUV positives		pTa		Cis		pT1		RTUV négatives	
	BCG pratiqués / RTUV positives	Proportion en %	BCG pratiqués / RTUV pTa	Proportion en %	BCG pratiqués / RTUV Cis	Proportion en %	BCG pratiqués / RTUV pT1	Proportion en %	BCG pratiqués / RTUV négatives	Proportion en %
1998	2/10	20%	0/4	0	0/2	0	1/3	33%	0/1	0
1999	3/12	25%	2/8	25%	0/0	0	0/1	0	0/4	0
2000	0/6	0	0/5	0	0/1	0	0/0	0	0/0	0
2001	3/10	30%	0/3	0	3/4	75%	0/2	0	0/2	0
2002	2/18	11%	0/7	0	1/3	33%	1/7	14%	0/5	0
2003	6/26	23%	0/14	0	4/4	100%	2/7	29%	0/8	0
2004	6/31	19%	1/24	4%	1/1	100%	3/6	50%	1/9	11%
2005	7/50	14%	3/33	9%	2/5	40%	0/9	0	2/18	11%
2006	12/69	17%	3/50	6%	6/7	86%	3/10	30%	0/29	0
2007	9/56	16%	0/40	0	4/7	57%	4/5	80%	0/28	0
2008	19/71	27%	6/45	13%	6/6	100%	1/16	6%	5/23	22%
2009	19/49	39%	9/25	36%	2/4	50%	2/13	15%	5/26	19%
2010	7/31	23%	2/18	11%	1/4	25%	3/7	43%	1/10	10%

## Annexe 6 : Etude longitudinale : données cliniques

Patient n°/sexe/année de naissance	1/f/1952	2/m/1940	3/m/1944	4/m/1957	5/m/1939	6/m/1926
Date de diagnostic	26.05.06	25.06.02	02.03.04	30.04.03	28.06.05	12.11.04
Intervalle diagnostic - première récurrence	2mois	7mois				19 mois
Intervalle diagnostic - première progression	11mois		19mois	68mois	9mois	30 mois
Durée du suivi	51mois	100mois	74mois	88mois	26mois	47mois (dernier: décès à cause de la tumeur)
Nombre de RTUV pratiquées	4	16	4	4	5	7
Nombre de RTUV positives	3	10	2	3	4	5
cystectomie/date				19.02.09	02.08.07	
Date dernière RTUV	19.06.07	26.10.10	15.03.06	09.01.09	22.05.07	25.04.08
Résultat dernière RTUV	pas de tumeur	Cis	CUS OK	pT1 GIII	pTa GII Cis	pT2 GIII
Date dernière cytologie	11.08.10	28.05.10	26.04.10	18.08.10	22.05.07	05.12.07
Résultat dernière cytologie	Normal	II	Normal	Normal	II	atypia
n° échantillon	1,2	3 à 11	12,13	14 à 17	18 à 22	23 à 29

## Annexe 7: Etude longitudinale: Echantillons

n° échantillon	Date de prélèvement	Stade	Grade	Traitement	EORTC risque	EORTC score
1	26.05.06	pTa	GIII	BCG	élevé +	11
2	20.04.07	pT1	GII	BCG	intermédiaire	6
3	07.01.03	pTa/Cis	GIII	BCG + chimio	élevé ++	16
4	31.08.04	pTa/Cis	GIII	BCG	élevé ++	14
5	31.08.04	pTa	GIII	BCG		
6	31.08.04	rien		BCG		
7	21.01.06	pT1	GIII	BCG	élevé+	9
8	21.01.06	pTa	GII	BCG		
9	21.01.06	pTa	GII	BCG		
10	21.01.06	pTa	GII	BCG		
11	21.01.06	pTa	GII	BCG		
12	02.03.04	pTa	GII		intermédiaire	2
13	21.10.05	pT1	GII		intermédiaire	6
14	09.05.03	pTa	GII		intermédiaire	2
15	09.01.09	pT1	GIII		élevé+	14
16	19.02.09	pT1	GIII	cystectomie	pas EORTC	
17	19.02.09	rien		cystectomie	pas EORTC	
18	28.06.05	pTa	GI		faible	0
19	28.03.06	Cis		BCG (1 dose)	élevé+	11
20	28.03.06	Cis		BCG (1 dose)		
21	22.05.07	pTa	GI		élevé+	11
22	22.05.07	Cis				
23	12.11.04	pTa	GII		faible	0
24	30.06.06	pTa	GIII	BCG	élevé +	7
25	25.05.07	pT1 + Cis	GIII		élevé ++	21
26	25.05.07	pTa	GIII			
27	10.08.07	pT1	GII	BCG	élevé ++	15
28	10.08.07	Cis		BCG		
29	25.04.08	pT2	GIII		pas de score sur musculo-invasif	

## Annexe 8: Nano Drop et Agilent

échantillon n°	Nano Drop			Agilent		Echantillon
	Concentration : ng/ul	260/280	260/230	Concentration: ng/ul (volume final : ul)	RIN	Date de prélèvement
1	856.04	1.89	1.89	570 (1)	2.2	26.05.06
2	26.88	1.9	1.99	29 (8)	2.4	20.04.07
3	41.4	1.81	1.24	38 (8)	2.5	07.01.03
4	36.29	2	1.6	37 (8)	2.5	31.08.04
5	58.55	1.98	1.95	63 (8)	1.6	31.08.04
6	8.03	1.79	0.83			31.08.04
7	69.42	1.56	0.84	23 (8)	2.5	21.01.06
8	5.09	2.46	0.86			21.01.06
9	61.6	2.06	1.99	72 (8)	2.5	21.01.06
10	48.76	1.94	1.6	51 (8)	2.5	21.01.06
11	1.18	1.06	0.52			21.01.06
12	1109.15	1.88	1.6	1014 (0.5)	2.1	02.03.04
13	88.58	1.92	1.81	85 (7)	2.6	21.10.05
14	364.96	1.9	2.11	413 (1.5)	1.1	09.05.03
15	897.59	1.88	1.95	611 (1)	N/A	09.01.09
16	29.8	2.04	2.04	57.9	N/A	19.02.09
17	546.55	1.92	2.24	778 (1)	2	19.02.09
18	6.65	1.94	3.62			28.06.05
19	6.63	1.85	1.6			28.03.06
20	8.04	2.04	2			28.03.06
21	12.22	2.06	1.81			22.05.07
22	75.06	1.5	0.74	13	1	22.05.07
23	645.02	2.05	2.14	690 (1)	2.4	02.03.04
24	21.1	2.05	2.6	25	2.1	21.10.05
25	154.09	1.99	1.99	188 (3)	2.5	09.05.03
26	24.3	2.09	2.41	30	1.7	09.01.09
27	91.57	1.94	1.54	93 (5)	2.4	10.08.07
28	62.05	2.08	2.35	82 (7)	2.4	10.08.07
29	906.12	1.92	2.24	1211 (0.5)	1.9	25.04.08

### Remarque :

Orange : échantillons éliminés sur Nano Drop

Rouge: échantillons éliminés sur Agilent

## Annexe 9 : Rapport du contrôle de qualité

exp_sample (tot=22)	$\Delta C_t$ (AVG RTC - AVG PPC)	RT Efficiency	$C_t$ (GDC)	Genomic DNA:	Average $C_t$ (PPC)	Date of sampling
sample1	4.37	pass	33.29	pass	17.48	26.05.06
sample1d	3.5	pass	17.23	inquiry	17.54	26.05.06
sample2	4.5	pass	27.64	inquiry	17.41	20.04.07
sample3	4.13	pass	35	pass	17.52	07.01.03
sample4	4.07	pass	26.55	inquiry	17.43	31.08.04
sample5	4.09	pass	34.45	pass	17.45	31.08.04
sample5d	4.24	pass	19.77	inquiry	17.51	31.08.04
sample5t	6.95	pass	25.46	inquiry	17.44	31.08.04
sample7	4.21	pass	35	pass	17.59	21.01.06
sample7d	4.78	pass	26.26	inquiry	17.44	21.01.06
sample9	4.15	pass	30.44	pass	17.34	21.01.06
sample9d	4.21	pass	21	inquiry	17.52	21.01.06
sample9t	3.15	pass	28.35	validate	17.6	21.01.06
sample10	3.65	pass	19	inquiry	17.4	21.01.06
sample12	3.27	pass	20.63	inquiry	17.61	02.03.04
sample13	3.77	pass	19.67	inquiry	17.4	21.10.05
sample14	3.81	pass	22.19	inquiry	17.69	09.05.03
sample15	3.42	pass	21.72	inquiry	17.39	09.01.09
sample23	3.67	pass	22.46	inquiry	17.61	02.03.04
sample25	3.6	pass	22.27	inquiry	17.63	09.05.03
sample27	3.14	pass	23.65	inquiry	17.61	10.08.07
sample29	2.86	pass	19.87	inquiry	17.67	25.04.08

**Annexe 10 : Moyenne d'expression des gènes domestiques et date de prélèvement des échantillons**

Echantillon	Moyenne d'expression des gènes domestiques (b2-microglobuline, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB)	Date of sampling
sample1	30.7	26.05.06
sample_d	21.3	26.05.06
sample2	16.1	20.04.07
sample3	27.1	07.01.03
sample4	17.6	31.08.04
sample5	17.2	31.08.04
sample5_d	17.4	31.08.04
sample5_t	17.6	31.08.04
sample7	15.7	21.01.06
sample7_d	15.7	21.01.06
sample9	15.6	21.01.06
sample9_d	15.6	21.01.06
sample9_t	16.2	21.01.06
sample10	15.8	21.01.06
sample12	21.6	02.03.04
sample13	23.6	21.10.05
sample14	24.7	09.05.03
sample15	24.9	09.01.09
sample23	16.6	02.03.04
sample25	23.8	09.05.03
sample27	15.4	10.08.07
sample29	21.8	25.04.08

Annexe 11 : Vulcano Plot des différentes comparaisons

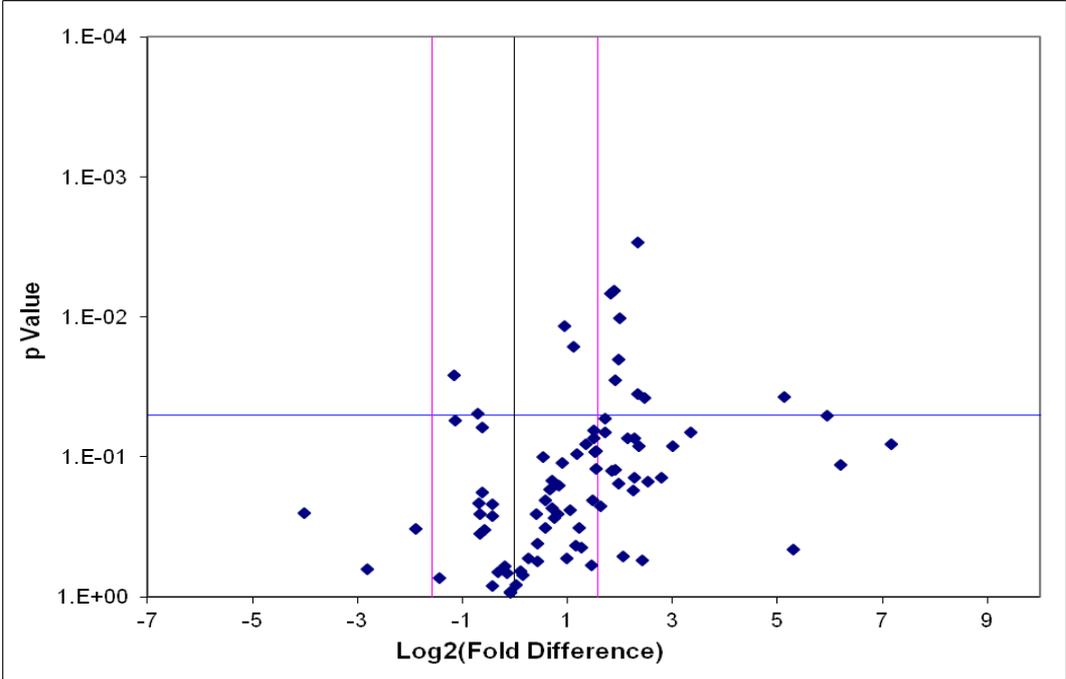


Figure 1: 9 vs 7

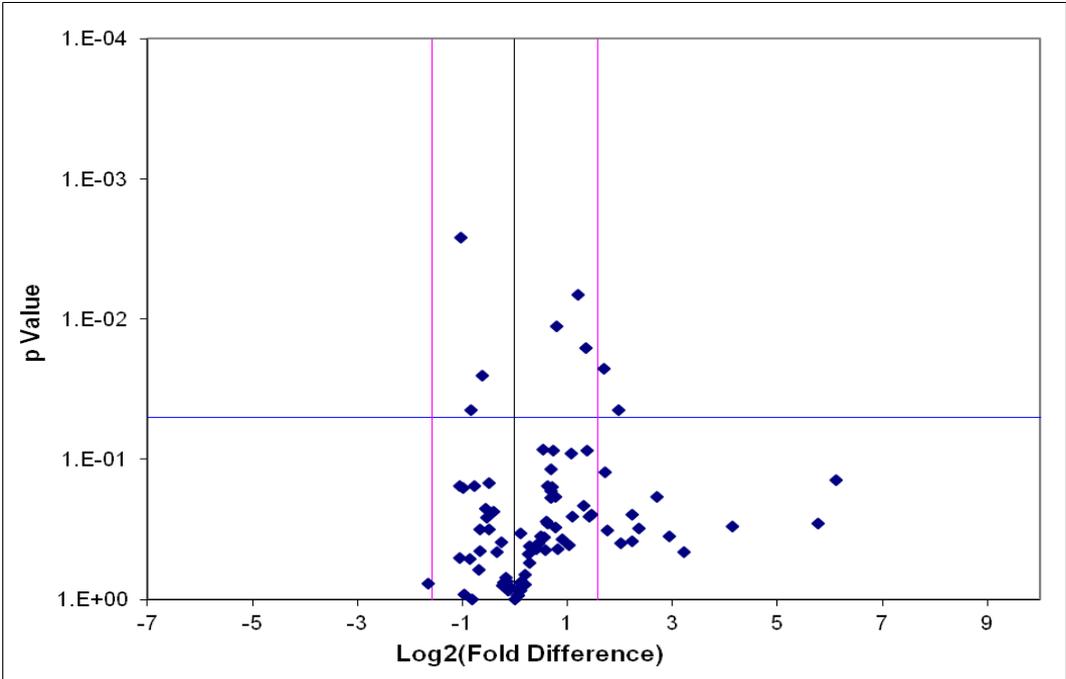


Figure 2: 5 vs 9

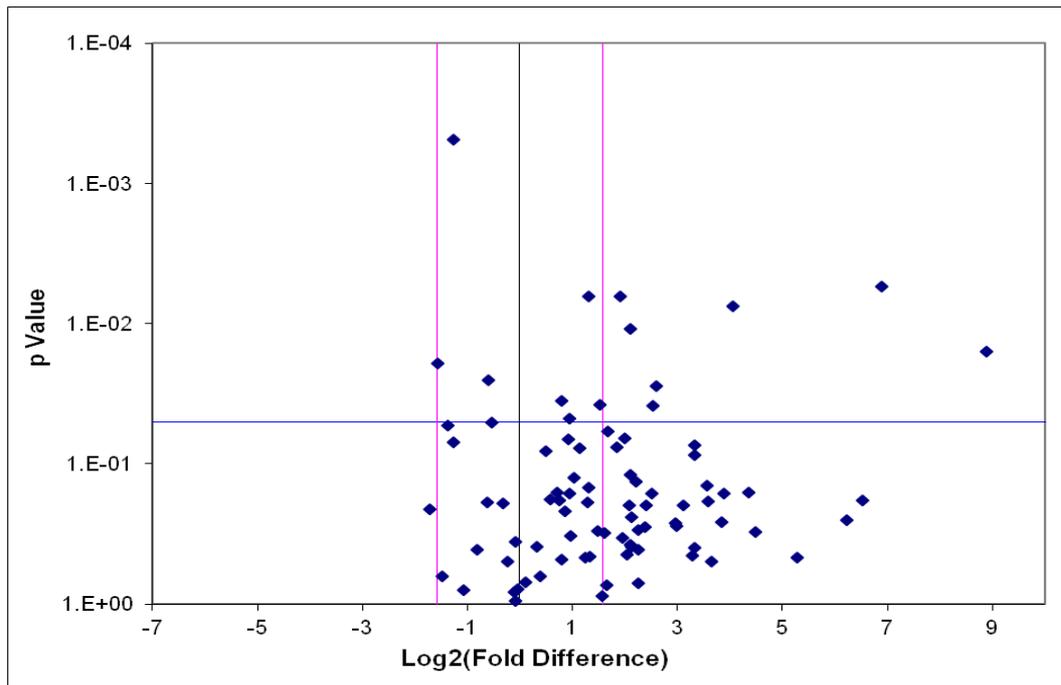


Figure 3 : 5 vs 7

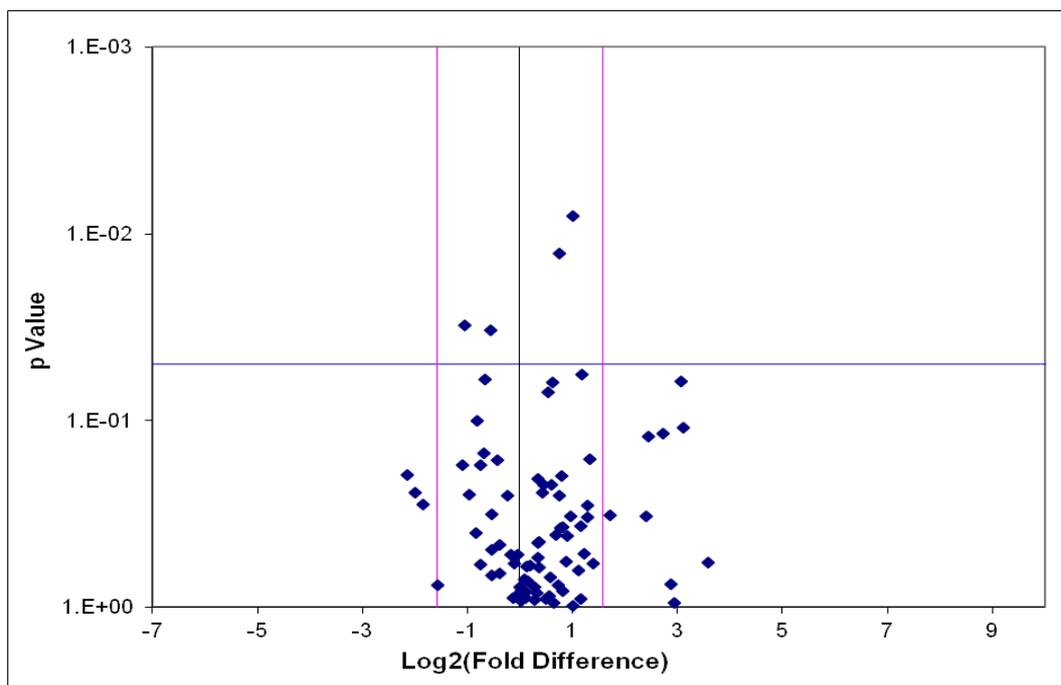


Figure 4: 4, 5 vs 7, 9, 10

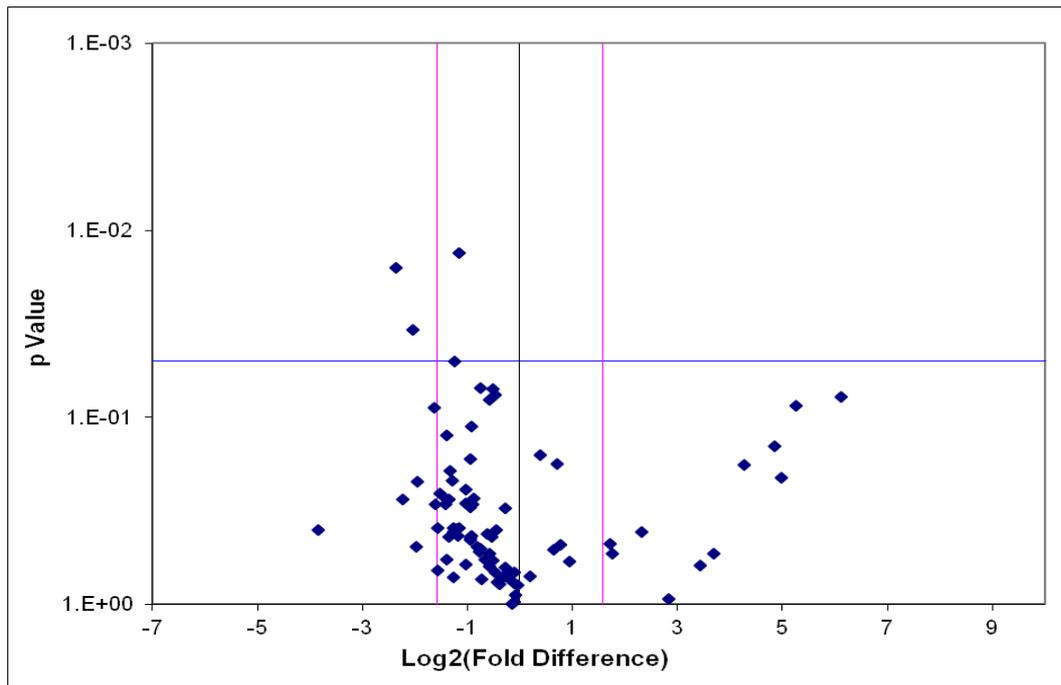


Figure 5: 12, 14 vs 13, 15

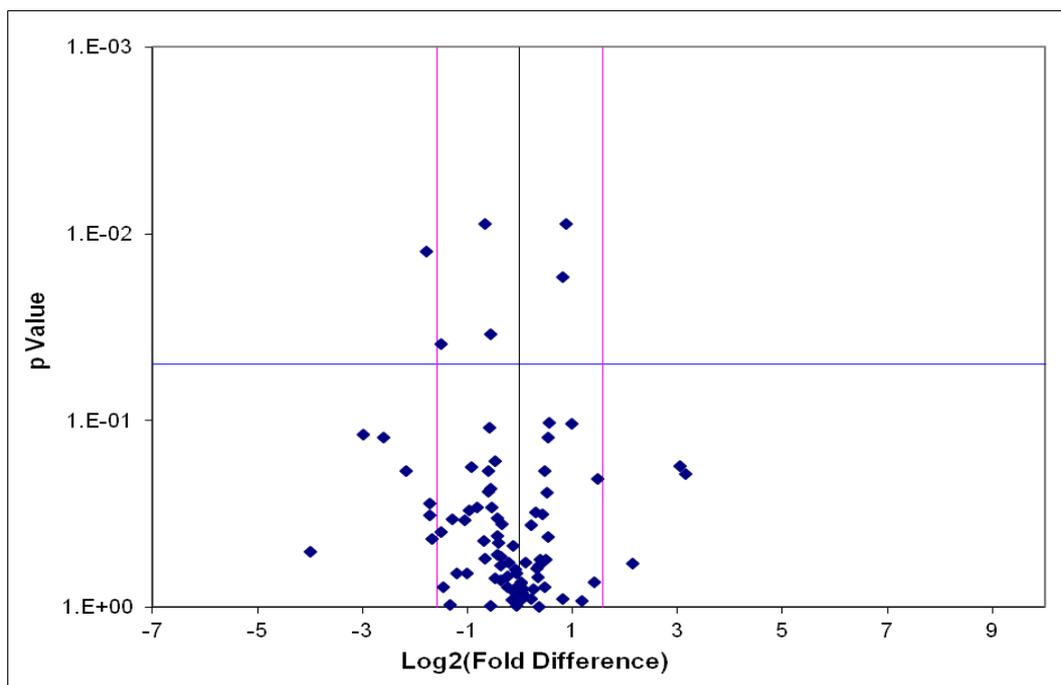


Figure 6: 4, 5 vs 9, 10, 23

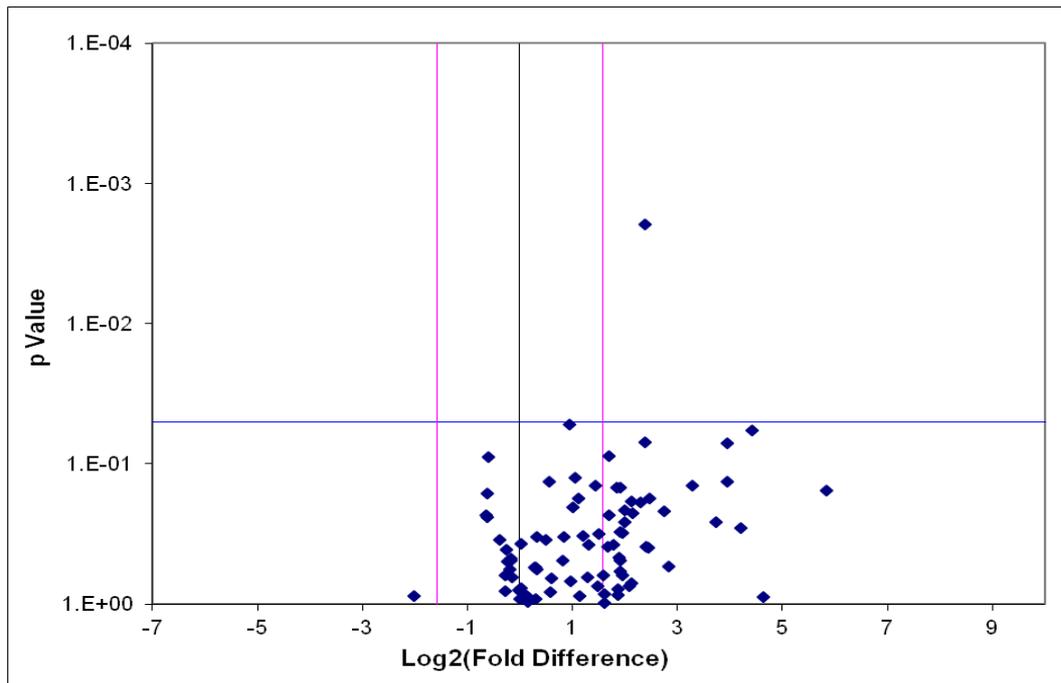


Figure 7: 9, 10, 23 vs 2, 7, 27

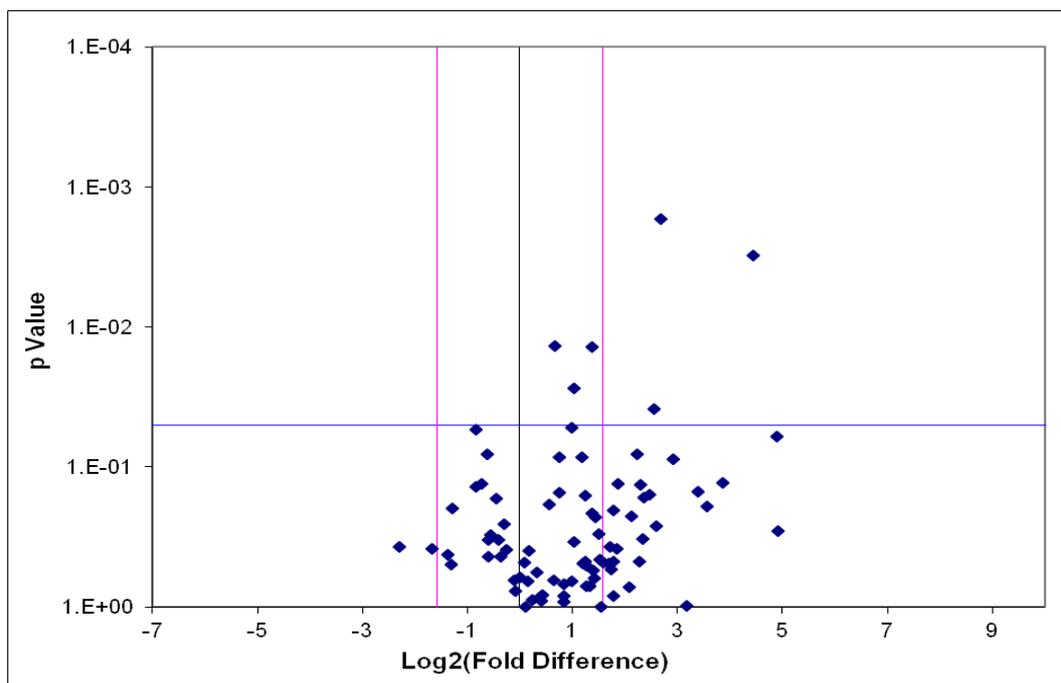


Figure 8: 4, 5 vs 2, 7, 27